Fernanda Perez Yeda

**MONTAGEM DE UM PSEUDO-HANTAVÍRUS
QUIMERA, CONTENDO A NUCLEOPROTEÍNA DO
VÍRUS ARARAQUARA E AS GLICOPROTEÍNAS
DO VÍRUS ANDES, EM SISTEMA BACULOVÍRUS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Charlotte Marianna
Hársi

São Paulo

2009

RESUMO

Yeda FP. Montagem de um pseudo-hantavírus quimera, contendo a nucleoproteína do vírus Araraquara e as glicoproteínas do vírus Andes, em sistema baculovírus [Tese de doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2009.

Os hantavírus, membros da família *Bunyaviridae*, são os agentes infecciosos responsáveis pela Febre Hemorrágica com Síndrome Renal e pela Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus. São vírus com genoma constituído por três segmentos de RNA fita simples, de polaridade negativa, designados como S, M e L, que codificam, respectivamente, a nucleoproteína, as glicoproteínas G1 e G2 e a RNA polimerase dependente de RNA. Com o objetivo de estudar a montagem de pseudopartículas quiméricas de hantavírus, a proteína N do vírus Araraquara e as glicoproteínas G1 e G2 do vírus Andes foram expressas em sistema baculovírus. Os segmentos genômicos que codificam as proteínas N, G1 e G2 foram clonados no vetor pFastBacDual e os baculovírus recombinantes foram obtidos utilizando-se o sistema Bac-to-Bac[®] (Invitrogen[™]). As proteínas N, G1 e G2, coexpressas em células *High five*, foram detectadas, por *Western blot*, nas frações solúvel e insolúvel dos extratos celulares, com 50, 70 e 54 kDa, respectivamente. Pelo ensaio de imunofluorescência, pôde-se visualizar a localização citoplasmática das três proteínas, com detecção das proteínas G1 e G2 na membrana plasmática. A microscopia confocal permitiu visualizar a colocalização das proteínas G1 e G2 com a proteína N. Pelos ensaios de imunoprecipitação foram verificadas as interações entre as proteínas N, G1 e G2, e pela centrifugação em gradiente de sacarose, as proteínas foram detectadas juntas, predominantemente, nas densidades entre 0,8 e 1,2 g/cc. Essas densidades são próximas daquela da partícula de hantavírus intacta, entre 1,18 e 1,19 g/cc (Schmaljohn and Hooper, 2001), e de pseudopartículas de hantavírus observadas por Betenbaugh et al. (1995). Essas frações foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão, com a visualização de uma pseudopartícula com morfologia semelhante à do vírion. O pseudo-hantavírus quimera obtido neste estudo poderá, no futuro, ser utilizado em estudos imunológicos, estruturais e morfológicos, além de fornecer subsídios para o desenvolvimento de pseudopartículas infecciosas, para estudar os processos de transcrição e replicação do vírus.

Palavras-chave: Hantavírus. Pseudovírus quimera. Nucleoproteína. Glicoproteína. Sistema baculovírus. Expressão de proteínas.

ABSTRACT

Yeda FP. Assembly of a chimeric hantavirus-like particle, containing the Araraquara nucleoprotein and the Andes glycoproteins, expressed in baculovirus system [PhD Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2009.

Hantaviruses, members of the *Bunyaviridae* family, are the infectious agents responsible for the Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome and the Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. The viral genome is composed by three segments of single-stranded negative-sense RNA, designated as S, M and L, which encode, respectively, the nucleoprotein, the G1 and G2 glycoproteins, and the RNA-dependent RNA polymerase. In order to study the assembly of a chimeric hantavirus-like particle, the Araraquara nucleoprotein and the Andes glycoproteins were expressed in a baculovirus system. The open reading frame of the S and M segments were cloned into pFastBacDual vector and the recombinant baculovirus was obtained using the Bac-to-Bac[®] (Invitrogen[™]) expression system. The co-expression of the N, G1 and G2 proteins, in *High Five* cells, with 50, 70 and 54 kDa, respectively, were detected by Western blot in both soluble and insoluble fractions of infected cells extract. Immunofluorescence assay showed the three proteins in the cytoplasm and the G1 and G2 proteins in the plasma membrane. Confocal microscopy showed the colocalization of G1 and G2 proteins with the N protein. Immunoprecipitation assay confirmed the interaction among N, G1 and G2 proteins. Centrifugation in sucrose density gradient showed that all three proteins were detected together, predominantly, in the fractions with densities between 0.8 and 1.2 g/cc. These densities are close to the hantavirus particle density, between 1.18 and 1.19 g/cc (Schmaljohn and Hooper, 2001) and to the hantavirus-like particles obtained by Betenbaugh et al., (1995). These fractions were analyzed by transmission electron microscopy and the hantavirus-like particle showed the same morphology as the virion. The chimeric hantavirus-like particle produced in this study could be used, in the future, in immunological, structural and morphological studies, providing means for the development of infectious virus-like particles, and for further studies in viral transcription and replication processes.

Key words: Hantavirus. Virus-like particles. Nucleoprotein. Glycoprotein. Baculovirus system. Protein expression.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e epidemiologia

1.1.1 Febre Hemorrágica com Síndrome Renal

Em meados da década de 1950, uma doença febril aguda acometeu cerca de 3.000 soldados americanos durante a Guerra da Coreia, com manifestações hemorrágicas, choque, falha renal e uma taxa de letalidade de 5% a 10% (Smadel, 1953). Essa doença, descrita como febre hemorrágica coreana, teve o seu agente etiológico isolado em 1976, a partir do tecido pulmonar do roedor silvestre *Apodemus agrarius* (Lee et al., 1978). Esse agente foi denominado de vírus Hantaan e tornou-se o protótipo do gênero *Hantavírus*, membro da família *Bunyaviridae* (Lee et al., 1978).

Relatos anteriores, da década de 30, descrevem, na Escandinávia e na Finlândia, uma forma mais branda da febre hemorrágica, a nefropatia epidêmica. O agente responsável por essa síndrome, o vírus Puumala, foi isolado a partir de seu hospedeiro, o roedor *Clethrionomys glareolus*, na Finlândia (Brummer-Korvenkontio et al., 1980). Desde então, outros hantavírus têm sido caracterizados em vários países da Europa e da Ásia, como o vírus Seoul, na Coreia (Lee et al., 1982), o vírus Thottapalayam, na Índia (Carey et al., 1971), o vírus Thailand, na Tailândia (Elwell et al., 1985) e o vírus Dobrava, na Eslovênia (Avsic-Zupanc et al., 1995).

Em 1983, a Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*) adotou o termo Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) para designar as infecções caracterizadas por febre, hemorragia e comprometimento renal (WHO, 1983), até então descritas na Europa, na Ásia e na África, sob diferentes denominações, tais como nefrosenefrite hemorrágica epidêmica, nefropatia epidêmica, nefrite epidêmica, febre hemorrágica epidêmica, febre Songo ou febre hemorrágica coreana (Lee, 1988).

Aproximadamente 150.000 a 200.000 casos de FHSR são descritos anualmente (Lee, 1996) e estão associados, principalmente, aos vírus Hantaan, Seoul, Puumala, Dobrava, Saaremaa, Amur e Far East (Bi et al., 2008). Os casos mais graves são causados pelo vírus Hantaan, na Ásia, e pelo vírus Dobrava, na Iugoslávia e em outras regiões da Europa (Lednicky, 2003; Vapalahti et al., 2003), com uma taxa de letalidade entre 3 e 12%. Recentemente, os vírus Amur e Far East foram descritos no leste da Rússia e são responsáveis, também, por casos graves de FHSR (Lokugamage et al., 2004; Yashina et al.,

2001). Já o vírus Seoul, responsável por casos moderados de FHSR, foi descrito principalmente na Ásia (Figura 1) (Bi et al., 2008). O vírus Saaremaa, encontrado na Estônia, na Eslováquia, na Eslovênia, na Hungria, na Dinamarca e na Alemanha (Vapalahti et al., 2003) e o vírus Puumala, na Federação Rússia e na Europa Nórdica e Central (Bi et al., 2008), são responsáveis por casos mais brandos da FHSR, sendo que este último apresenta uma taxa de letalidade variando entre 0,1 e 0,4% (Bi et al., 2008).

Figura 1: Distribuição geográfica global da Febre Hemorrágica por Síndrome Renal e da Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus.

Fonte: Modificado de Bi et al., 2008.

1.1.2 Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus

Em maio de 1993, na região de *Four Corners*, nos Estados Unidos (Novo México, Arizona, Colorado e Utah), um novo hantavírus, o Sin Nombre, foi descrito como o causador de uma nova moléstia, a Síndrome Pulmonar por Hantavírus (Nichol et al., 1993) ou como denominada mais recentemente, Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (SCPH) (Hjelle, 1999). Essa é descrita como uma doença grave, emergente, com alta letalidade, caracterizada por um infiltrado pulmonar bilateral intersticial e comprometimento cardiorrespiratório (Figueiredo et al., 2001; Silva et al., 1997). A partir dessa descrição em 1993, outros casos de SCPH têm sido reportados por toda a América, desde o Canadá até a Patagônia.

Na América do Sul, o primeiro surto conhecido de SCPH ocorreu no Brasil, entre novembro e dezembro de 1993, no qual foram diagnosticados três casos, dos quais dois

evoluíram para óbito (Iversson et al., 1994; Silva et al., 1997; Vasconcelos et al., 1997). A investigação sorológica indicou a presença de um novo hantavírus, denominado de vírus Juquitiba (Vasconcelos et al., 1997). Apesar desse dado, desde a década de 70, tem-se observado, no país, a partir de estudos sorológicos, a presença de infecção humana por hantavírus (Hindrichsen et al., 1993; Iversson et al., 1994; Leduc, 1991; Vasconcelos et al., 1992).

Até o presente, no Brasil, foram descritas cinco espécies de hantavírus associadas à doença humana: o vírus Anajatuba, no Maranhão; o vírus Castelo dos Sonhos, no Pará; o vírus Araraquara, no Sudeste e Planalto Central; o vírus Juquitiba, na Serra do Mar e região Sul; e o vírus Araucária, no Paraná (Figueiredo, 2004). De 1993 até outubro de 2009, foram notificados 1.193 casos da SCPH no Brasil, sendo que 456 deles foram descritos na região Sul, 369 na região Sudeste, 285 na região Centro-Oeste, 69 na região Norte e 14 na região Nordeste (dados obtidos da Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde) (comunicação pessoal¹).

Casos de hantavirose, também, têm sido descritos em outros países da América Latina, como no Panamá (Vicent et al., 2000), no Paraguai, na Bolívia (Johnson et al., 1997), no Chile, no Uruguai, na Argentina (Levis et al., 1997; Levis et al., 1998; López et al., 1996), no Peru e na Venezuela (Bharadwaj et al., 1997; Fulhorst et al., 1997). Na Argentina e no Chile, desde 1995, o vírus Andes tem sido o responsável pela maior parte dos casos de SCPH (López et al., 1996). O surto mais grave ocorreu em 1996, pelo vírus Andes Epilink/96, no sul da Argentina, nas cidades de El Bólon, Bariloche e Esquel. Nesse surto foi observada, pela primeira vez, a transmissão interpessoal de um hantavírus (Enria et al., 1996; Padula et al., 1998; Wells et al., 1997).

Aproximadamente 200 casos de SCPH são descritos por ano nas Américas (Lednicky, 2003). Apesar de o número de casos ser inferior em relação ao da FHSR, o índice de letalidade é alto, cerca de 40% (Lednicky, 2003). Na América do Norte, os casos de SCPH estão relacionados, principalmente, ao vírus Sin Nombre, nos Estados Unidos, enquanto os vírus New York, Monongahela, Bayou e Black Creek Canal têm sido descritos apenas nos Estados Unidos (Figura 1) (McIntyre, 2005; Weir, 2005).

O vírus Andes é o agente encontrado na maior parte dos casos de SCPH na Argentina, no Chile e no Uruguai (Padula et al., 2000), e o vírus Laguna Negra, na Bolívia e no Paraguai (Johnson et al., 1997). Na Argentina, também têm sido descritos casos associados aos vírus

¹ Comunicação por email. Casos de Hantavirose por Unidade Federada Provável de Infecção e Ano de Ocorrência. Brasil, 1993-2009.

Orán, Lechiguanas e Hu39694 (Levis et al., 1998). Recentemente, o vírus Jucuitiba foi também detectado na Argentina e o vírus Bermejo, no Paraguai (Padula et al., 2007). O vírus Choclo, encontrado no Panamá, foi o primeiro hantavírus descrito na América Central (Figura 1) (Vicent et al., 2000). Já no Peru e na Venezuela foram descritos os vírus Rio Mamoré e Caño Delgadito, respectivamente (Bharadwaj et al., 1997; Fulhorst et al., 1997)

1.2 Os vírus Araraquara e Andes

No Brasil, os hantavírus têm sido descritos como vírus emergentes de problema de saúde pública, sendo que, mais de 80% dos casos ocorrem, normalmente, nas regiões Sul, Sudeste e do Planalto central. Figueiredo et al. (2009), relatam que o vírus Araraquara pode ser responsável por mais de 50% dos casos, com um índice de letalidade de aproximadamente 40%. Esse vírus foi associado à espécie de roedor *Necromys lasiurus*, encontrado na região de cerrados do Brasil, nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás, e no Distrito Federal (Figueiredo et al., 2009).

O vírus Andes tem sido responsável pela maior parte dos casos de SCPH na Argentina, no Chile e no Uruguai. Na Argentina e no Chile, cinco variantes do vírus Andes têm sido descritas: o Andes Central Prata, encontrado nas margens do Rio da Prata (no Uruguai e na Argentina) e no centro da província de Buenos Aires, na Argentina; o Andes Central Buenos Aires, encontrado em diversas regiões da província de Buenos Aires; o Andes Central Lechiguanas, detectado na província Entre Rios, no centro da Argentina; o Andes Norte, identificado no norte da Argentina, nas províncias Jujuy, Salta e Orán; e o Andes Sul, identificado no Chile e na região sul da Argentina (Levis et al., 1998; Padula et al., 2000). O vírus Andes é associado ao roedor *Oligoryzomys longicaudatus* (Levis et al., 1998) e, no Chile, também tem sido detectado em outras espécies de roedores, como o *Akodon olivaceus* e o *Akodon longipilis* (Toro et al., 1998).

1.3 Classificação

Estabelecida em 1975, a família *Bunyaviridae* compreende quatro gêneros constituídos por vírus que infectam vertebrados (gêneros *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*) e um gênero contendo vírus que infectam plantas (gênero *Tospovirus*). Os membros pertencentes a essa família apresentam propriedades morfológicas, morfogênicas e

antigênicas similares, sendo transmitidos por artrópodes (mosquitos e carrapatos), com exceção dos hantavírus que são transmitidos por roedores (Schmaljohn e Hooper, 2001).

Atualmente, o Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus (ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*) reconhece 23 espécies de hantavírus. Segundo o relatório do ICTV, quatro critérios foram sugeridos para separar as espécies: (I) estar associado a uma única espécie ou subespécie de roedor reservatório primário; (II) apresentar, pelo menos, 7% de diferença na sequência de aminoácidos das glicoproteínas e da nucleoproteína; (III) apresentar no teste de neutralização uma diferença de, pelo menos, quatro vezes no título dos anticorpos; (IV) não formar rearranjos naturais com outras espécies de hantavírus (Plyusnin, 2002).

1.4 Transmissão e rearranjo genético

As hantaviroses são zoonoses de roedores silvestres, transmitidas acidentalmente ao homem, principalmente, pelo contato direto com saliva, fezes e urina, ou pela inalação de aerossóis, contendo excretas de roedores infectados. Outras formas menos comuns de transmissão incluem a ingestão de alimentos contaminados por essas excretas e mordidas de roedores infectados (Krüger et al., 2001). A transmissão interpessoal, apesar de rara, foi observada no sul da Argentina, em 1996 e 2002 e, provavelmente, no Chile, em 1997, e, em ambos os casos, pelo vírus Andes (Martinez, 2005, Padula et al.; 1998, Toro et al., 1998; Wells et al., 1997).

Os roedores são infectados pelos hantavírus de forma persistente e específica, ou seja, cada espécie de hantavírus está associada, predominantemente, a uma espécie de roedor e tem coevoluído com seu respectivo hospedeiro (Bohlman et al., 2002; Morzunov et al., 1998; Plyusnin e Morzunov, 2001). Esses roedores são pertencentes às subfamílias *Murinae* (Hantaan, Seoul, Dobrava), *Arvicolinae* (Puumala) e *Sigmodontinae* (Sin Nombre, Black Creek Canal, Bayou, New York, Juquitiba, Araraquara, Castelo dos Sonhos, Hu39694, Andes, Lechiguanas, Laguna Negra e Orán), da família *Muridae* (Plyusnin et al., 2001). Além dos roedores, os hantavírus também têm sido detectados em morcegos, porcos, pássaros (Jung e Kim, 1995; Slonova et al., 1992; Yang et al., 1998 apud Bi et al., 2008) e em animais domésticos, como gatos e cachorros (Luo et al., 1985; Malecki et al., 1998), porém não existem estudos nem para determinar se essa infecção é ou não persistente e

assintomática nem estudos de transmissão do vírus para outros animais ou humanos (Mills et al., 2002).

Estudos filogenéticos mostram uma forte correlação genética entre os hantavírus e os hospedeiros roedores, porém tem sido observada a ocorrência de uma mesma espécie de hantavírus infectando mais de uma espécie de roedor como, por exemplo, o vírus Seoul, que está associado a duas espécies de roedores, o *Rattus rattus* e o *Rattus norvegicus* (Elliott et al., 2000). Já o vírus Andes, encontrado predominantemente na espécie *Oligoryzomys longicaudatus*, foi também detectado nas espécies *Bolomys obscurus* e *Akodon azarae* (Levis et al., 1998). Além disso, também tem sido descrita uma mesma espécie de roedor hospedando mais de uma espécie de hantavírus como, por exemplo, o *Peromyscus leucopus*, hospedando tanto o vírus Sin Nombre quanto o vírus New York, o *Apodemus agrarius*, hospedando o vírus Hantaan e o vírus Saaremaa, e o *Sigmodon hispidus*, hospedando o vírus Back Creek Canal e o vírus Muleshoe (Plyusnin, 2002).

Assim, a cocirculação de várias espécies de hantavírus em uma determinada população de roedores e a coinfeção de um mesmo roedor com duas espécies distintas podem promover o aparecimento de novas espécies de hantavírus, devido à troca dos segmentos de RNA genômico entre as diferentes espécies, hospedando um mesmo roedor. Esse rearranjo genético tem um importante papel na evolução, na patogênese e na epidemiologia de muitos vírus segmentados. Tais eventos têm sido observados naturalmente para diversos vírus de RNA segmentados, como para o rotavírus (Chitambar et al., 2009), para o vírus La Crosse (Reese et al., 2008) e para o vírus influenza A (Khiabian et al., 2009). Esses mecanismos são frequentemente utilizados pelo vírus influenza A, resultando em novas variantes virais responsáveis por pandemias mundiais, como as ocorridas em 1918, 1957, 1968 e, mais recentemente, em 2009 (Khiabian et al., 2009; Scalera e Mossad, 2009).

Para os hantavírus, tem sido observada a troca de segmentos de RNA entre as espécies filogeneticamente próximas, no caso de infectarem a mesma espécie de roedor (Henderson et al., 1995; Li et al., 1995). A ocorrência de troca genética entre os hantavírus filogeneticamente distantes é rara, mas pode acontecer, caso as diferentes espécies de roedores dividam o mesmo habitat, ou se um roedor for susceptível à infecção por espécies diferentes de hantavírus (Henderson et al., 1995; Rodriguez et al., 1998).

Na literatura, alguns casos de rearranjos espontâneos de segmentos de RNA foram descritos para as variantes do vírus Puumala (Razzauti et al., 2008; Razzauti et al., 2009), do vírus Sin Nombre (Henderson et al., 1995; Li et al., 1995) e do vírus Dobrava (Klempa et al.,

2003). Na China, foi detectada a troca de segmentos genômicos entre os vírus Hantaan e Seoul, que circulavam em uma mesma região, resultando em uma variante contendo o segmento S do vírus Seoul e os segmentos M e L do vírus Hantaan (Zou et al., 2008).

Além da ocorrência espontânea, esses rearranjos genéticos foram, também, obtidos *in vitro* entre as diferentes espécies de hantavírus, como entre os vírus Sin Nombre e Black Creek Canal (Rodriguez et al., 1998), entre os vírus Sin Nombre e Andes (Rizvanov et al., 2004), entre os vírus Hantaan e Seoul (Kang et al., 2002a apud Zou et al., 2008), assim como entre os hantavírus mais distantes filogeneticamente, como os vírus Hantaan e Prospect Hill (Kang et al., 2002b apud Zou et al., 2008). A eficiência na formação *in vitro* desses vírus recombinantes pode ser influenciada por propriedades conformacionais, estruturais e funcionais das proteínas (Rizvanov et al., 2004; Krüger et al., 2001).

1.5 Estrutura do vírion e do genoma

Os hantavírus são vírus esféricos, envelopados, com diâmetro variando de 80 a 120 nm e apresentando, na sua superfície, projeções glicoprotéicas de 5 a 10 nm de comprimento, ancoradas na bicamada lipídica do envelope (Figura 2). Seu genoma consiste em três segmentos de RNA fita simples, polaridade negativa, designados como grande (L), médio (M) e pequeno (S), os quais possuem sequências nucleotídicas complementares nas extremidades 3' e 5' altamente conservadas, capazes de formar estruturas circulares e estáveis de RNA (Schmaljohn e Hooper, 2001).

O segmento L codifica a RNA polimerase dependente de RNA, atuando na transcrição e replicação do RNA genômico viral (vRNA). O segmento M codifica um precursor glicoprotéico (GPC – *glycoprotein precursor*) que, durante a maturação é clivado na sequência conservada WAASA, gerando as glicoproteínas G1 ou Gn e G2 ou Gc do envelope viral, responsáveis pelo reconhecimento dos receptores na célula hospedeira (Spiropoulou, 2001). O segmento S codifica a proteína N do nucleocapsídeo viral, a qual é complexada com cada um dos segmentos de vRNA e, provavelmente, com a polimerase viral, para formar três distintas ribonucleoproteínas (RNPs) (Elliot, 1990; Schmaljohn et al., 1983; Schmaljohn e Hooper, 2001).

Diferente dos outros vírus de RNA fita negativa, os hantavírus não possuem uma proteína de matriz para conectar a nucleoproteína com as glicoproteínas, sugerindo que exista uma interação direta entre as projeções citoplasmáticas de G1 e/ou G2 e a proteína N (Jonsson e Schmaljohn, 2001). O gênero *Hantavírus*, assim como o *Nairovirus*, são os únicos

membros da família *Bunyaviridae* que não apresentam proteína não-estrutural, codificada pelos segmentos S e M (Schmaljohn e Hooper, 2001).

Figura 2: Ilustração da estrutura da partícula viral do hantavírus. A membrana lipídica do vírion contém as glicoproteínas G1 e G2. Internamente, os RNAs genômicos virais são complexados com a proteína N e com a RNA polimerase dependente de RNA, para formar os ribonucleocapsídeos.
Fonte: Jonsson et al., 2005.

1.6 Ciclo replicativo

1.6.1 Ligação do vírus à superfície celular

A entrada dos hantavírus nas células hospedeiras ocorre pela ligação das proteínas G1 e/ou G2 do envelope viral com receptores presentes na superfície das membranas celulares (Figura 3). As integrinas celulares $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$, presentes nas células endoteliais, nos linfócitos e nas plaquetas, têm sido descritas como mediadoras da entrada celular dos hantavírus patogênicos, enquanto que as integrinas $\alpha_5\beta_1$ são as responsáveis pela entrada dos hantavírus não patogênicos (Gavrilovskaya et al., 1998, 1999; Mackow et al., 1999). Dessa

forma, a interação dos hantavírus com diferentes classes de integrinas pode estar relacionada a uma maior ou menor patogenicidade viral.

Apesar dos hantavírus se ligarem às integrinas, estes não apresentam a sequência tripeptídica RGD (Arg-Gly-Asp) nas suas glicoproteínas (Mackow e Gavrilovskaya, 2001), sendo provável que a sua interação com as integrinas ocorra através de outros sítios de ligação ainda desconhecidos.

Além das integrinas, duas proteínas, uma de 30 kDa (Kim et al., 2002) e outra de 70 kDa (Mou et al., 2006) têm sido identificadas como possíveis candidatas a receptores ou co-receptores, auxiliando na entrada do vírus Hantaan na célula hospedeira. Com relação à proteína de 30 kDa, apesar de o vírus Hantaan se ligar de forma específica, anticorpos para esta proteína não foram capazes de bloquear totalmente a infecção, sendo que, provavelmente, esse vírus utilize outros receptores ou co-receptores para infectar a célula hospedeira (Kim et al., 2002). Além disso, a função de ambas as proteínas durante o processo de infecção viral ainda não foi determinada.

Figura 3: Representação esquemática da replicação dos hantavírus. 1: Ligação do vírus a receptores presentes na superfície celular; 2: Entrada do vírus por endocitose, seguida da fusão das membranas e liberação dos ribonucleocapsídeos e da RNA polimerase dependente de RNA no citoplasma; 3: Transcrição primária; 4: Tradução das proteínas virais; 5: Replicação do vRNA através de um cRNA intermediário; 6: Montagem dos vírus no complexo de Golgi ou na membrana plasmática; 7: Saída do vírus por brotamento no Golgi seguido por exocitose ou por brotamento através da membrana plasmática.

Fonte: Jonsson et al., 2005.

1.6.2 Entrada do vírus na célula

Após a interação com os receptores, a partícula viral entra na célula hospedeira por endocitose, percorrendo a via endocítica em vesículas endossomais e lisossomais (Figura 3). O mecanismo de entrada para o vírus Hantaan, Black Creek Canal e Seoul ocorre através de vesículas recobertas por clatrina, após interação com as integrinas β , ao passo que, para o vírus Andes, ocorre por vias independentes de clatrina e caveolina (Jin et al., 2002; Ramanathan e Jonsson, 2008). Em seguida, a acidificação da vesícula promove alterações conformacionais em G1 e/ou G2, resultando na fusão do envelope viral com a membrana da vesícula, liberando os três ribonucleocapsídeos no citoplasma (Arikawa et al., 1985).

1.6.3 Transcrição primária do RNA viral

Com o genoma e a polimerase viral no citoplasma, os três segmentos de RNA genômicos são transcritos em mRNAs (Figura 3). Esse processo de transcrição ocorre somente com as ribonucleoproteínas e não com os RNAs livres (Lopez et al., 1995).

Para o início da transcrição primária, é necessária a produção de *primers*, os quais são adquiridos a partir dos mRNAs celulares capeados, em um processo denominado de *cap-snatching*, de forma semelhante ao descrito para o vírus influenza (Plotch et al., 1981). Assim, a RNA polimerase dos hantavírus atua como uma endonuclease, clivando o terminal 5' capeado dos mRNAs do hospedeiro, gerando *primers* a partir de mRNAs presentes no citoplasma das células (Li et al., 2001). Com isso, a transcrição resulta em um mRNA viral com uma extensão 5' contendo *primers* derivados do hospedeiro (Figura 4).

O mecanismo de síntese dos mRNAs é baseado no modelo de iniciação-e-realinhamento. Nesse modelo, os *primers* obtidos a partir da clivagem dos mRNAs do hospedeiro são alinhados no terminal 3' do RNA viral e estendidos com alguns nucleotídeos. Em seguida, ocorre o re-alinhamento do primer, sendo que somente os nucleotídeos adicionados durante essa curta extensão pareiam com o RNA e, finalmente, a extensão final pode ser reiniciada (Garcin et al., 1995).

A terminação da síntese dos mRNAs tem sido estudada para o vírus Sin Nombre, sendo que as regiões ricas em U e C têm sido descritas como possíveis sítios de terminação dos segmentos M e S, respectivamente (Hutchinson et al., 1996).

1.6.4 Tradução dos mRNAs

As proteínas virais são sintetizadas no citoplasma, sendo que os mRNAs dos segmentos S e L são traduzidos em ribossomos livres, enquanto o mRNA do segmento M é traduzido em ribossomos ligados às membranas (Schmaljohn e Hooper, 2001). As proteínas N, G1, G2 e L estão descritas nos itens 1.7 a 1.9.

1.6.5 Replicação dos vRNAs

Para a replicação genômica dos hantavírus, a RNA polimerase dependente de RNA muda sua função de transcriptase para replicase, para a síntese do genoma viral, utilizando como molde uma fita de RNA complementar (cRNA) (Figura 4) (Schmaljohn e Hooper, 2001). Tanto o vRNA quanto o cRNA são encapsidados pela proteína N, sendo que esse processo de encapsidação pode servir como um sinal de anti-terminação, permitindo a síntese completa do genoma viral (Kolakofsky e Hacker, 1991).

De forma similar ao descrito na síntese dos mRNAs, Garcin et al. (1995) sugerem que o mecanismo de síntese dos cRNAs e dos vRNAs seja, também, baseado no modelo de iniciação-e-realinamento, porém utilizando-se um trifosfato de guanidina como iniciador da replicação, em vez de *primers* derivados do hospedeiro.

Figura 4: Transcrição e Replicação do RNA genômico do gênero *Hantavirus*, família *Bunyaviridae*. A: Transcrição do mRNA, precedida pela clivagem endonucleotídica dos mRNAs capeados do hospedeiro, pela polimerase viral (*cap-snatching*). B: Síntese do mRNA a partir do vRNA. Um sinal de terminação da transcrição não definido (V) é encontrado próximo ao terminal 5' do vRNA. C: Síntese dos cRNAs, utilizados como molde para a síntese de novos vRNAs. Fonte: modificado de Schmaljohn e Hooper, 2001.

1.6.6 Transporte das proteínas virais, montagem e liberação da partícula viral

As glicoproteínas G1 e G2 sintetizadas são processadas cotranslacionalmente no retículo endoplasmático e, posteriormente, transferidas para o aparelho de Golgi, na forma de heterodímeros. O sinal para o transporte das glicoproteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi está localizado na proteína G1, sendo que o processo de heterodimerização é essencial para o transporte eficiente das duas glicoproteínas para o complexo de Golgi (Schmaljohn e Hooper, 2001; Ruusala et al., 1992; Shi e Elliott, 2002; Spiropoulou et al., 2003).

Como os hantavírus não possuem uma proteína de matriz para a ligação das proteínas do envelope viral com os nucleocapsídeos, é provável que a interação ocorra diretamente entre os ribonucleocapsídeos acumulados do lado citoplasmático das vesículas e as proteínas do envelope viral localizadas no lúmen das vesículas (Schmaljohn e Hooper, 2001). Na literatura, trabalho sugere que a longa cauda citoplasmática da proteína G1, em contradição à curta cauda citoplasmática de G2, substitua a função da proteína de matriz, presente em outros vírus de RNA (Spiropoulou, 2001). Para outros membros da família *Bunyaviridae*, dados sugerem uma interação transmembrânica da proteína N com as proteínas G1 ou G2, sugerindo que os domínios transmembrânicos de G1 ou G2 expostos no lado citoplasmático da membrana estejam envolvidos na interação com a proteína N (Smith e Pifat, 1982; Schmaljohn e Hooper, 2001).

Após o brotamento nas cisternas do complexo de Golgi, os vírions são transportados para a superfície da célula dentro de vesículas similares às aquelas da via secretória (Figura 3). A liberação dos vírions nas células infectadas ocorre por exocitose, quando as vesículas contendo os vírus se fundem com a membrana plasmática celular (Schmaljohn e Hooper, 2001). Para os vírus Sin Nombre e Black Creek Canal, que causam a SCPH, foi observada, também, a montagem e brotamento dos vírions na membrana plasmática celular (Goldsmith et al., 1995; Ravkov et al., 1997).

Durante as etapas do ciclo replicativo, os hantavírus utilizam diferentes componentes do citoesqueleto do hospedeiro. Estudos realizados com os vírus Hantaan, Black Creek Canal, Seoul e Andes mostraram que os microtúbulos são requeridos em várias etapas do ciclo viral, enquanto a actina parece ser essencial na entrada do vírus na célula (Ramanathan e Jonsson, 2008). Além disso, a actina parece também exercer uma função nas etapas de montagem, replicação e pós-entrada dos vírus Andes e Black Creek Canal (Ramanathan e Jonsson, 2008; Ravkov et al., 1998).

1.7 Proteína N

A proteína N é o componente viral mais abundante e é altamente conservada entre as espécies de hantavírus. É uma molécula multifuncional envolvida em várias etapas importantes da replicação e montagem dos vírus, principalmente na encapsidação do RNA (Kaukinen et al., 2005). No processo de montagem, a proteína N interage com os RNAs virais para formar as ribonucleoproteínas, com a proteína L e, provavelmente, com a cauda citoplasmática da proteína G1 (Kukkonen et al., 2004; Ravkov e Compans, 2001; Xu et al., 2002b). Além disso, a proteína N interage também com diferentes proteínas celulares, tais como os filamentos de actina, a proteína modificadora pequena relacionada à ubiquitina (SUMO-1 – *small ubiquitin-like modifier*), a proteína Daxx (*Death associated protein 6*) e a proteína MxA-induzida por interferon (Kaukinen et al., 2003a; Khaiboullina et al., 2005; Lee et al., 2003; Li et al., 2002; Maeda et al., 2003). A proteína N é sintetizada no citoplasma e localiza-se na região perinuclear, associada com membranas (Kaukinen et al., 2004; Kukkonen et al., 2004; Ravkov e Compans, 2001).

A proteína N dos hantavírus apresenta uma massa molecular que varia de 50 a 54 kDa, contendo entre 429 a 433 resíduos de aminoácidos. A análise da sequência sugere três domínios conservados separados por duas regiões mais variáveis. O domínio de ligação ao RNA, que inclui do aminoácido 175 ao 217, localiza-se na região central da molécula e é altamente conservado (Severson et al., 2005; Xu et al., 2002b). As regiões envolvidas na interação com proteínas celulares e virais permanecem para serem mapeadas.

De forma similar às nucleoproteínas de outros vírus de RNA fita negativa, a proteína N do hantavírus pode oligomerizar, com formação de alguns dímeros, mas, principalmente, de trímeros. Esses complexos podem servir como intermediários nos processos de formação de RNPs (Alfadhli et al., 2001; Kaukinen et al., 2001, 2003b, 2004; Mir e Panganiban, 2004). Tanto o domínio C-terminal quanto o N-terminal da proteína N contribuem para a oligomerização. Dados da literatura descrevem um modelo de arranjo “cabeça-a-cabeça” e “cauda-a-cauda” para a proteína N (Alminaitte et al., 2006; Kaukinen et al., 2003b, 2004). Esse modelo sugere que a oligomerização ocorra em duas etapas, com uma interação inicial entre os domínios N-terminais, seguida pela consolidação da interação entre os domínios C-terminais.

A proteína N recombinante tem sido eficientemente obtida em sistemas de expressão em células eucariotas e procariotas, tais como nos sistemas vírus vaccínia, baculovírus e *E.coli* (Betenbaugh et al., 1995; Jonsson et al., 2001; Vapalahti et al., 1996). Em células

infectadas com o hantavírus, a proteína N é expressa em excesso, com formação de agregados e estruturas filamentosas no citoplasma (Vapalahti et al., 1995; Ravkov et al., 1998).

A proteína N recombinante tem sido utilizada como antígeno para o diagnóstico específico e é altamente imunogênica, podendo induzir uma forte resposta imune protetora em modelos animais (Geldmacher et al., 2004a; Maes et al., 2006; Schmaljohn et al., 1990; Yoshimatsu et al., 1993). Seus epítomos antigênicos estão distribuídos por toda a molécula, sendo que os principais estão localizados na região N-terminal da proteína (Lundkvist et al., 1996; Vapalahti et al., 1996). Além disso, essa proteína induz alta reação cruzada por anticorpos, pois é a proteína viral mais conservada entre as espécies de hantavírus (de Carvalho et al., 2002; Geldmacher et al., 2004b).

1.8 Proteínas G1 e G2

As proteínas G1 e G2 são as glicoproteínas virais, resultantes da clivagem cotranslacional de um precursor glicoprotéico de 1.135 aminoácidos, codificado pelo segmento genômico M, de aproximadamente 3.400 nucleotídeos (Spiropoulou, 2001). Essa clivagem ocorre no pentapeptídeo conservado WAASA do GPC (Löber et al., 2001), provavelmente, por peptidases sinais celulares presentes no lúmen do retículo endoplasmático (Spiropoulou, 2001).

As proteínas G1 e G2 apresentam massa molecular variando de 68 a 76 kDa e de 52 a 58 kDa, respectivamente. Ambas são descritas como proteínas transmembrânicas integrais do tipo I, contendo sequências sinais. A interação entre as proteínas G1 e G2, com a heterodimerização e o correto enovelamento das proteínas (Deyde et al., 2005; Ruusala et al., 1992; Shi e Elliott, 2002; Spiropoulou et al., 2003), é essencial para o transporte de ambas para o complexo de Golgi, com posterior maturação e brotamento da partícula viral (Spiropoulou, 2001). A formação do heterodímero ocorre no retículo endoplasmático, pela associação das proteínas com duas chaperonas, a calnexina e a calreticulina (Shi e Elliott, 2004). Apesar de trabalhos mostrarem que a sequência sinal para o transporte das proteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi esteja localizada na proteína G1 (Ruusala et al., 1992; Spiropoulou et al., 2003; Schmaljohn e Hooper, 2001), outros autores tem sugerido que a sequência sinal de G2, próxima a cauda citoplasmática da proteína G1, pode também ser essencial para a localização de ambas no complexo de Golgi (Shi e Elliott, 2002)

Em células transfectadas expressando as proteínas G1 ou G2, isoladamente, tem sido descrito o transporte deficiente dessas proteínas para o complexo de Golgi, com retenção no retículo endoplasmático (Spiropoulou et al., 2003). Para a proteína G1, a superexpressão pode formar agregados de proteínas mal enoveladas, com acúmulo em estruturas como agressomas (Spiropoulou et al., 2003). Esses agressomas são inclusões citoplasmáticas formadas no centro organizador de microtúbulos, quando a capacidade das células em degradar proteínas mal enoveladas é excedida (Johnston et al., 1998; Kopito, 2000).

As glicoproteínas apresentam quatro domínios hidrofóbicos. O domínio I, do aminoácido 1 ao 17, apresenta a função de peptídeo sinal na proteína G1 (Löber et al., 2001). O domínio II (do aminoácido 441 ao 515) e o domínio IV (do aminoácido 1097 ao 1127) são os domínios transmembrânicos de G1 e G2, respectivamente (Spiropoulou et al., 1994). O domínio III, do aminoácido 627 ao 648, é um peptídeo sinal localizado na região amino-terminal da proteína G2, contendo, em sua porção final, um motivo pentapeptídeo WAASA altamente conservado (Löber et al., 2001; Spiropoulou, 2001).

Além disso, as glicoproteínas contêm cinco sítios de N-glicosilação, sendo que quatro deles estão localizados na proteína G1 (N134, N235, N347 e N399) e um na proteína G2 (N928) (Shi e Elliott, 2004). Dentre esses sítios, quatro são conservados entre as espécies de hantavírus (N134, N347, N399 e N928), sugerindo que a N-glicosilação é importante para a conformação e a função das proteínas. Mais especificamente, o sítio N134 tem sido descrito por ser crucial para o correto enovelamento da proteína G1, enquanto a mutação nos outros sítios é considerada mais tolerada (Shi e Elliott, 2004). Por outro lado, a ausência de N-glicosilação no sítio N928 da proteína G2 resulta em perda da fusão celular, devido à mudança conformacional e falha em obter a estrutura tridimensional nativa da proteína G2 (Zheng et al., 2007b).

A N-glicosilação é associada com diversas funções das glicoproteínas virais, tais como a ligação das partículas virais aos receptores celulares, a mediação de fusão das membranas virais e celulares, a entrada do vírus nas células e o direcionamento das proteínas para os sítios de montagem e brotamento do vírus. Além disso, a N-glicosilação é importante para a manutenção da conformação dos epítopos das proteínas G1 e G2, essenciais para o uso como antígenos na produção de anticorpos neutralizantes e do seu reconhecimento por anticorpos monoclonais (Doms et al., 1993; Shi e Elliott, 2004).

As glicoproteínas são as responsáveis em induzir uma resposta imune celular protetora e podem induzir o organismo a produzir anticorpos neutralizantes (Arikawa et al., 1992; Terajima et al., 2002; Yoshimatsu et al., 1993). Estudos demonstram que a imunização

com o segmento M inteiro é mais eficiente em induzir uma resposta protetora do que com as proteínas G1 ou G2 isoladamente (Schmaljohn et al., 1990). Isso ocorre porque a interação entre as duas proteínas resulta na formação de um complexo com uma estrutura tridimensional próxima daquela encontrada *in vivo*, com manutenção da conformação dos epítomos (Kallio-Kokko et al., 2001; Schmaljohn et al., 1990).

As proteínas G1 e G2 recombinantes têm sido produzidas em diversos sistemas de expressão, como em sistemas baculovírus e vírus vaccínia recombinante. Essas proteínas têm sido utilizadas em estudos sobre a morfogênese viral, o transporte e a localização intracelular das proteínas, a entrada do vírus na célula, os sítios de glicosilação e em estudos imunogênicos (Deyde et al., 2005; Pensiero e Hay, 1992; Ruusala et al., 1992; Schmaljohn et al., 1990; Shi e Elliott, 2004; Spiropoulou et al., 2003; Yoshimatsu et al., 1993).

1.9 Proteína L

A proteína L apresenta uma massa molecular de aproximadamente 246 kDa e é codificada pelo segmento genômico L, que varia de 6.530 a 6.562 nucleotídeos (Schmaljohn e Hooper, 2001). A proteína L atua como uma replicase, transcriptase e endonuclease, transcrevendo os mRNAs e replicando o RNA genômico, utilizando como intermediário o RNA complementar.

A proteína L, assim como a proteína N, são as únicas proteínas virais necessárias para a síntese de RNA (Flick et al., 2003). Em estudos sobre a localização da proteína L, foi demonstrada uma associação com membranas, na região perinuclear, assim como para a proteína N, sugerindo que essa região seja o sítio para a síntese de RNA (Kukkonen et al., 2004; Ravkov e Compans, 2001).

A sequência de aminoácidos da proteína L apresenta várias regiões conservadas entre as espécies de hantavírus, essenciais para a função da polimerase. Essas regiões são conhecidas como motivos pré-A, A, B, C, D e E (Müller et al., 1994; Poch et al., 1989). Além disso, outras regiões conservadas têm sido descritas na sua sequência de aminoácidos, sendo que duas delas precedem o motivo pré-A e uma localiza-se posteriormente ao motivo E (Aquino et al., 2003; Müller et al., 1994).

1.10 Tratamento e desenvolvimento de vacinas contra os hantavírus

Até o presente, não existem métodos terapêuticos ou profiláticos eficazes e seguros para a FHSR e a SCPH, como antivirais, imunoterapias ou vacinas licenciadas pela WHO. Atualmente, o principal tratamento disponível para os casos graves de hantavirose é realizado através do suporte em unidade de terapia intensiva, com monitoração cuidadosa da oxigenação, do balanço dos fluidos e da pressão arterial, além da diálise e da ventilação mecânica ou oxigenação extracorpórea (Figueiredo et al., 2001; Maes et al., 2009).

A ribavirina é o único antiviral utilizado no tratamento de pacientes infectados por hantavirose, porém sua eficácia ocorre somente quando administrada na fase inicial da infecção, ou seja, nos primeiros cinco dias após o início dos sintomas (Huggins et al., 1991). Esse antiviral tem sido muito utilizado em surtos de FHSR, causados pelo vírus Hantaan, na Coreia e, principalmente, na China (Huggins et al., 1991). Estudos nos EUA e no Brasil não mostraram resultados clínicos benéficos, após a administração dessa droga em pacientes com SCPH (Chapman et al., 1999; Figueiredo et al., 2001; Mertz et al., 2004).

Outras drogas, também, têm sido testadas quanto à sua eficácia no tratamento da SCPH, como os corticosteróides, porém os resultados não foram muito promissores (Figueiredo et al., 2001). Por outro lado, o antimicrobiano lactoferrina, uma glicoproteína ligante de ferro, mostrou-se eficaz *in vitro* e *in vivo* contra infecções pelo vírus Seoul, atuando como inibidor da adsorção viral (Murphy et al., 2001).

A imunização passiva, utilizando anticorpos neutralizantes humanos, pode ser efetiva no tratamento de infecções por hantavírus, devido ao quadro de choque estar associada a baixos níveis de anticorpos neutralizantes contra o vírus (Figueiredo et al., 2000). Apesar de não existirem relatos de sua eficácia em humanos, estudos em camundongos, utilizando anticorpos monoclonais neutralizantes ou soros policlonais para o vírus Hantaan têm, efetivamente, protegido os animais da infecção pelo hantavírus (Xu et al., 2002a).

Diversas vacinas para os hantavírus têm sido desenvolvidas, porém, até o momento, nenhuma foi aprovada pela WHO. Apesar disso, esforços no sentido de se obter uma vacina eficaz contra as hantavirose têm sido feitos por vários grupos de pesquisa como, por exemplo, as vacinas de vírus inativados (Lee et al., 1990), de proteínas recombinantes (Rizvanov et al., 2003; Schmaljohn et al., 1990), de vírus vaccínia recombinante (McClain et al., 2000; Schmaljohn et al., 1992), de citomegalovírus recombinante (Rizvanov et al., 2003; Rizvanov et al., 2006), de DNA “nu” (Custer et al., 2003), de antígenos quiméricos com o

vírus da hepatite B (Geldmacher et al., 2004a) e de vetores adenovirais recombinantes (Maeda et al., 2005; Safronetz et al., 2009).

Atualmente, pelo menos três diferentes tipos de vacinas inativadas têm sido desenvolvidas na Coreia e na China. A primeira vacina inativada, a HantavaxTM, pertencente ao *Rhein Biotech Group*, é uma vacina contra o vírus Hantaan, obtida a partir do vírus amplificado em cérebros de camundongos. É a única vacina produzida comercialmente e licenciada para uso em humanos na Coreia (Lee e An, 1988). Apesar do seu uso nos últimos 10 anos, a segurança e a eficácia dessa vacina ainda são questionadas, pois foi observada a redução dos títulos de anticorpos neutralizantes após um ano de vacinação (Cho et al., 2002).

As outras duas vacinas inativadas foram desenvolvidas contra os vírus Hantaan e Seoul, a partir de células de rim do camundongo *Mongolian gerbil* e de células de rim do camundongo *Syrian*. Essas vacinas foram capazes de induzir uma forte resposta imune humoral, porém a resposta neutralizante foi mantida por um curto período de tempo (Choi et al., 2003; Lu et al., 1996; Song et al., 1992; Dong et al., 2005).

Com relação às vacinas contendo partículas quiméricas derivadas do vírus da hepatite B, carregando fragmentos da proteína N dos vírus Puumala, Dobrava e Hantaan, mostraram alta imunogenicidade em camundongos, de forma semelhante às partículas quiméricas derivadas do poliomavírus (Geldmacher et al., 2004a; Gedvilaite et al., 2004). Da mesma forma, inoculação de vírus recombinante expressando as proteínas estruturais dos hantavírus, como o vírus vaccínia e o citomegalovírus, também foram eficazes em proteger animais contra infecção pelo hantavírus, porém apresentaram uma desvantagem com relação à imunidade pré-existente contra os vírus carreadores (Chu et al., 1995; Rizvanov et al., 2003; Rizvanov et al., 2006; Xu et al., 1992). Recentemente, vetores adenovirais deficientes de replicação e expressando as proteínas estruturais dos vírus Sin Nombre e Andes têm sido descritos como capazes de induzir proteção *in vivo* contra os hantavírus, em modelos animais (Maeda et al., 2005; Safronetz et al., 2009).

Utilizando-se a tecnologia do DNA recombinante, têm sido desenvolvidas vacinas baseadas no uso das proteínas estruturais dos hantavírus, pois as proteínas N, G1 e G2 têm demonstrado uma forte antigenicidade, capazes de induzir uma resposta imune protetora (Schmaljohn et al., 1990; Yoshimatsu et al., 1993). Para isso, as proteínas N, G1 e G2 têm sido expressas a partir de genes inteiros ou de regiões dos genes, utilizando diversos sistemas de expressão de proteínas recombinantes, como os sistemas baculovírus, o vírus vaccínia e o de leveduras, entre outros sistemas de expressão em células eucariotas (Dargeviciute et al.,

2002; Geldmacher et al., 2004b; Schmaljohn et al., 1990; Yoshimatsu et al., 1993; Maes et al., 2006).

Dentre as técnicas disponíveis para o desenvolvimento de vacinas, a mais promissora tem sido aquela baseada no uso do DNA na forma de plasmídeo ou de DNA linear, conhecida como vacina de DNA ou de ácido nucleico. Vários estudos têm demonstrado que o uso do DNA “nu” estimula uma resposta imune efetiva e duradoura para as proteínas codificadas pelos genes vacinais (Sharma e Khuller, 2001). Esse método também possibilita a geração de vacinas multivalentes, para diversas espécies de hantavírus.

Com relação às vacinas baseadas na proteína N, é possível obter-se uma proteção cruzada, principalmente entre os membros filogenicamente próximos, pois a proteína N é a proteína viral mais conservada entre as espécies de hantavírus (de Carvalho et al., 2002; Geldmacher et al., 2004b). Por outro lado, as vacinas desenvolvidas contra as glicoproteínas induzem uma resposta imune neutralizante específica para uma determinada espécie de hantavírus ou para as espécies muito próximas geneticamente, pois essa proteína pode variar muito entre as espécies de hantavírus que causam a SCPH e a FHSR (Custer et al., 2003; Hooper et al., 2001).

1.11 Pseudovírus

Além dessas técnicas, os pseudovírus (VLP - *virus-like particles*) têm sido muito utilizados para o desenvolvimento de vacinas virais, pois são partículas ausentes de material genético, contendo propriedades estruturais e imunológicas semelhantes às da partícula viral *in vivo* (Näslund et al., 2009; Schellenbacher et al., 2009; Vietheer et al., 2007; Wen et al., 2009). Essas partículas são formadas pela coexpressão das proteínas estruturais do vírus, a partir de um sistema de expressão de proteínas heterólogas, em células eucariotas. Como resultado, as proteínas organizam-se espontaneamente para formar as pseudopartículas virais, obtendo-se, dessa forma, um modelo *in vitro* não infeccioso, com características semelhantes às do vírion.

Devido a essas características similares, com manutenção da conformação dos epítomos, os VLPs têm o potencial para ativar ambos os caminhos endógenos e exógenos do antígeno, permitindo a apresentação de peptídeos virais por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *Major Histocompatibility Complex*) de classes I e II (Kovacsics e Rock, 1994). São estruturalmente similares ao vírus autêntico e, portanto, contêm mais epítomos induzindo anticorpos, comparados com outras subunidades de vacinas,

além de induzirem uma resposta protetora mais efetiva do que aquela contendo proteínas na forma não nativa (McBurney et al., 2007).

Os VLPs também têm sido utilizados para o desenvolvimento de reagentes para o diagnóstico viral e como carreadores de epítomos exógenos imunogênicos (Michel et al., 2008; Yang et al., 2008; Zvirbliene et al., 2006; Tegerstedt et al., 2005). Além disso, podem ser usados como modelos de estudo para investigar os processos de montagem e brotamento da partícula viral, ajudando a responder questões críticas sobre os processos intracelulares dos vírus.

Diversos VLPs têm sido obtidos para vírus clinicamente importantes, tais como para o vírus da imunodeficiência humana (Wang et al., 2007), para o vírus da síndrome respiratória aguda grave (Ho et al., 2004), para o vírus da hepatite C (Triyatni et al., 2002), para o papilomavírus (Zheng et al., 2004), para o enterovírus 71 (Chung et al., 2006) e para o rotavírus (Clark et al., 2009).

1.12 Minigenoma

Mais recentemente, propostas para o desenvolvimento de vacinas, além de estudos sobre a função dos genes e das proteínas virais têm sido descritas, utilizando-se o sistema minigenoma (Albariño et al., 2009; Halpin et al., 2004; Khattar et al., 2000). Esse sistema consiste na geração de segmentos genômicos de RNAs artificiais, pela substituição dos genes virais por um gene repórter (cloramfenicol acetiltransferase, proteína verde fluorescente ou luciferase), utilizado para verificar a funcionalidade do sistema. Esse gene repórter é flanqueado pelas regiões terminais não codificantes (NTR - *terminal nontranslated regions*) do correspondente segmento genômico viral, contendo todos os elementos regulatórios necessários para transcrição, replicação, encapsidação e empacotamento do genoma em partículas virais. Além disso, é necessária a expressão das proteínas responsáveis pela transcrição e replicação, fornecidas ao sistema pela infecção das células com o vírus selvagem ou pela cotransfecção com plasmídeos recombinantes expressando essas proteínas.

Dois sistemas têm sido utilizados para gerar genomas artificiais de vírus de RNA fita negativa, o T7 RNA polimerase (Fuerst et al., 1986) e a RNA polimerase I (Zobel et al., 1993; Neumann et al., 1994). Para os hantavírus, o minigenoma foi gerado pela transferência do gene repórter CAT (cloramfenicol acetiltransferase), flanqueado pelas NTRs do segmento genômico viral L, em um vetor contendo o sistema da RNA polimerase I (Flick et al., 2003; Zhang et al., 2008). Além disso, para a transcrição, replicação e encapsidação desses

segmentos genômicos artificiais, foi necessária a cotransfecção das células com plasmídeos recombinantes expressando as proteínas L e N, ambos sob o controle do promotor CMV (Flick et al., 2003).

Esse sistema tem sido utilizado para estudar algumas etapas do ciclo viral, tais como a transcrição (Barr et al., 2006), a replicação (Barr et al., 2003; Ikegami et al., 2005) e o empacotamento (Flick et al., 2004; Kohl et al., 2006), de outros membros da família *Bunyaviridae*. Apesar disso, esse sistema é limitado, pois não permite o estudo dos componentes estruturais envolvidos na montagem e maturação do vírus, o empacotamento das ribonucleoproteínas, a interação com receptores celulares, assim como o uso em terapias genéticas e vacinais (Eichler et al., 2004; Watanabe et al., 2002).

Dessa forma, baseado no sistema minigenoma, foi desenvolvido um VLP infeccioso para o vírus Uukuniemi, membro da família *Bunyaviridae*, pela adição de um plasmídeo expressando as glicoproteínas ao sistema minigenoma RNA polimerase I, juntamente com os plasmídeos recombinantes expressando as proteínas N e L (Överby et al., 2006). Como consequência, o minigenoma contendo o gene repórter foi encapsidado, replicado e empacotado em VLPs. Esses VLPs brotaram no Golgi e foram transportados para a membrana plasmática, onde foram liberados no sobrenadante, podendo ser utilizados para infectar novas células, com transferência do minigenoma. Esse minigenoma pode ser replicado e transcrito, caso as proteínas N e L sejam também coexpressas nessas células (Överby et al., 2006). Nos últimos anos, os estudos de vacinas de VLP têm sido realizadas a partir do sistema minigenoma, gerando VLPs infecciosos, porém deficientes de replicação, como tem sido descrito para o vírus influenza (Watanabe et al., 2002).

Neste presente trabalho foi estudada a montagem de pseudopartículas não infecciosas para os hantavírus, para serem utilizadas, no futuro, em estudos imunológicos e estruturais, e para o conhecimento dos mecanismos de interação do vírus com a célula hospedeira, sem a necessidade do uso de condições extremas de biossegurança. Além disso, essas pseudopartículas poderão fornecer subsídios para o desenvolvimento de VLPs infecciosos, a partir do sistema minigenoma, podendo ainda ser estudados os processos de transcrição e replicação viral.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A expressão simultânea da proteína N do vírus Araraquara e das proteínas G1 e G2 do vírus Andes, em células *High five*, pelo sistema baculovírus Bac-to-Bac[®] (Invitrogen[™]), resultou na montagem de um pseudo-hantavírus quimera.
- O pseudo-hantavírus quimera, analisado por microscopia eletrônica de transmissão, apresentou morfologia semelhante à da partícula de hantavírus *in vivo*, com o tamanho esperado, contendo espículas de glicoproteínas na superfície do envelope viral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Albariño CG, Bergeron E, Erickson BR, Khristova ML, Rollin PE, Nichol ST. Efficient reverse genetics generation of infectious junin viruses differing in glycoprotein processing. *J Virol.* 2009;83(11):5606-5614.

Alfadhli A, Love Z, Arvidson B, Seeds J, Willey J, Barklis E. Hantavirus nucleocapsid protein oligomerization. *J Virol.* 2001;75(4):2019-2023.

Alminaité A, Halttunen V, Kumar V, Vaheri A, Holm L, Plyusnin A. Oligomerization of hantavirus nucleocapsid protein: analysis of the N-terminal coiled-coil domain. *J Virol.* 2006;80(18):9073-9081.

Aquino VH, Moreli ML, Moraes Figueiredo LT. Analysis of oropouche virus L protein amino acid sequence showed the presence of an additional conserved region that could harbour an important role for the polymerase activity. *Arch Virol.* 2003;148(1):19-28.

Arikawa J, Takashima I, Hashimoto N. Cell fusion by haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) viruses and its application for titration of virus infectivity and neutralizing antibody. *Arch Virol.* 1985;86(3-4):303-313.

Arikawa J, Yao JS, Yoshimatsu K, Takashima I, Hashimoto N. Protective role of antigenic sites on the envelope protein of Hantaan virus defined by monoclonal antibodies. *Arch Virol.* 1992;126(1-4):271-81.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. United States of America: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience; 1989. 2 vol.

Avsic-Zupanc T, Toney A, Anderson K, Chu YK, Schmaljohn C. Genetic and antigenic properties of Dobrava virus: a unique member of the Hantavirus genus, family Bunyaviridae. *J Gen Virol.* 1995;76 (Pt 11):2801-2808.

Bac-to-Bac[™] Baculovirus Expression Systems. Instruction Manual. Invitrogen[™] Life Technologies. 2004

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Black WC 4th, Doty JB, Hughes MT, Beaty BJ, Calisher CH. Temporal and geographic evidence for evolution of Sin Nombre virus using molecular analyses of viral RNA from Colorado, New Mexico and Montana. *Virol J*. 2009;6:102.

Barr JN, Elliott RM, Dunn EF, Wertz GW. Segment-specific terminal sequences of Bunyamwera bunyavirus regulate genome replication. *Virology*. 2003;311(2):326-338.

Barr JN, Rodgers JW, Wertz GW. Identification of the Bunyamwera bunyavirus transcription termination signal. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 1):189-198.

Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol*. 1998;72(5):3827-3836.

Betenbaugh M, Yu M, Kuehl K, White J, Pennock D, Spik K, Schmaljohn C. Nucleocapsid- and virus-like particles assemble in cells infected with recombinant baculoviruses or vaccinia viruses expressing the M and the S segments of Hantaan virus. *Virus Res*. 1995;38(2-3):111-124.

Bi Z, Formenty PB, Roth CE. Hantavirus infection: a review and global update. *J Infect Dev Ctries*. 2008;2(1):3-23.

Bohlman MC, Morzunov SP, Meissner J, Taylor MB, Ishibashi K, Rowe J, Levis S, Enria D, St Jeor SC. Analysis of hantavirus genetic diversity in Argentina: S segment-derived phylogeny. *J Virol*. 2002;76(8):3765-3773.

Boudko SP, Kuhn RJ, Rossmann MG. The coiled-coil domain structure of the Sin Nombre virus nucleocapsid protein. *J Mol Biol*. 2007;366(5):1538-44.

Bharadwaj M, Botten J, Torrez-Martinez N, Hjelle B. Rio Mamore virus: genetic characterization of a newly recognized hantavirus of the pygmy rice rat, *Oligoryzomys microtis*, from Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;57(3):368-374.

Bräutigam S, Snezhkov E, Bishop DH. Formation of poliovirus-like particles by recombinant baculoviruses expressing the individual VP0, VP3, and VP1 proteins by comparison to particles derived from the expressed poliovirus polyprotein. *Virology*. 1993;192(2):512-524.

Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, von Bonsdorff CH, Vuorimies J, Manni T, Penttinen K, Oker-Blom N, Lähdevirta J. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis*. 1980;141(2):131-4.

Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(3):1059-63.

Carey DE, Reuben R, Panicker KN, Shope RE, Myers RM. Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. *Indian J Med Res*. 1971;59(11):1758-1760.

Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet*. 1997;350(9071):134-138.

Cattaneo R, Rose JK. Cell fusion by the envelope glycoproteins of persistent measles viruses which caused lethal human brain disease. *J Virol*. 1993;67(3):1493-502.

Chapman LE, Mertz GJ, Peters CJ, Jolson HM, Khan AS, Ksiazek TG, Koster FT, Baum KF, Rollin PE, Pavia AT, Holman RC, Christenson JC, Rubin PJ, Behrman RE, Bell LJ, Simpson GL, Sadek RF. Intravenous ribavirin for hantavirus pulmonary syndrome: safety and tolerance during 1 year of open-label experience. Ribavirin Study Group. *Antivir Ther*. 1999;4(4):211-9.

Chitambar SD, Arora R, Chhabra P. Molecular characterization of a rare G1P[19] rotavirus strain from India: evidence of reassortment between human and porcine rotavirus strains. *J Med Microbiol*. 2009.

Cho HW, Howard CR, Lee HW. Review of an inactivated vaccine against hantaviruses. *Intervirology*. 2002;45(4-6):328-333.

Choi Y, Ahn CJ, Seong KM, Jung MY, Ahn BY. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. *Vaccine*. 2003;21(17-18):1867-73.

Chu YK, Jennings GB, Schmaljohn CS. A vaccinia virus-vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus. *J Virol*. 1995;69(10):6417-6423.

Chung YC, Huang JH, Lai CW, Sheng HC, Shih SR, Ho MS, Hu YC. Expression, purification and characterization of enterovirus-71 virus-like particles. *World J Gastroenterol*. 2006;12(6):921-927.

Clark KB, Lin SC, Humphrey C, Foytich K, Esona M, Wang Y, Liu M, Jiang B. Expression and characterization of human group C rotavirus virus-like particles in insect cells. *Virology*. 2009;387(2):267-272.

Crawford SE, Labbé M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, Estes MK. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol.* 1994;68(9):5945-5952.

Custer DM, Thompson E, Schmaljohn CS, Ksiazek TG, Hooper JW. Active and passive vaccination against hantavirus pulmonary syndrome with Andes virus M genome segment-based DNA vaccine. *J Virol.* 2003;77(18):9894-9905.

Dargeviciute A, Brus Sjölander K, Sasnauskas K, Krüger DH, Meisel H, Ulrich R, Lundkvist A. Yeast-expressed Puumala hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model. *Vaccine.* 2002;20(29-30):3523-3531.

de Carvalho Nicacio C, Gonzalez Della Valle M, Padula P, Björling E, Plyusnin A, Lundkvist A. Cross-protection against challenge with Puumala virus after immunization with nucleocapsid proteins from different hantaviruses. *J Virol.* 2002;76(13):6669-6677.

Deyde VM, Rizvanov AA, Chase J, Otteson EW, St Jeor SC. Interactions and trafficking of Andes and Sin Nombre Hantavirus glycoproteins G1 and G2. *Virology.* 2005;331(2):307-315.

Doms RW, Lamb RA, Rose JK, Helenius A. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology.* 1993;193(2):545-562.

Dong GM, Han L, An Q, Liu WX, Kong Y, Yang LH. Immunization effect of purified bivalent vaccine to haemorrhagic fever with renal syndrome manufactured from primary cultured hamster kidney cells. *Chin Med J (Engl).* 2005;118(9):766-8.

Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol.* 1994;68(10):6147-6160.

Eichler R, Strecker T, Kolesnikova L, ter Meulen J, Weissenhorn W, Becker S, Klenk HD, Garten W, Lenz O. Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). *Virus Res.* 2004;100(2):249-255.

Elliott RM. Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol.* 1990;71 (Pt 3):501-522.

Elliott RM, Bouloy M, Calisher CH, Goldbach R, Moyer JT, Nichol ST, Pettersson R, Plyusnin A, Schmaljohn CS. Bunyaviridae. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop

DHL, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, Mcgeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. Virus Taxonomy. VIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press; 2000. p. 599-621.

Elwell MR, Ward GS, Tingpalapong M, LeDuc JW. Serologic evidence of Hantaan-like virus in rodents and man in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1985;16(3):349-354

Enria D, Padula P, Segura EL, Pini N, Edelstein A, Posse CR, Weissenbacher MC. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Possibility of person to person transmission. *Medicina (B Aires)*. 1996;56(6):709-711.

Estrada DF, Boudreaux DM, Zhong D, St Jeor SC, De Guzman RN. The Hantavirus Glycoprotein G1 Tail Contains Dual CCHC-type Classical Zinc Fingers. *J Biol Chem*. 2009;284(13):8654-60. Epub 2009 Jan 29.

Figueiredo LTM, Forster AC, Fulhorst C, Rodrigues EMS, Koster F, Campos GM, Kats G, Felipe JS, Pereira LE, Iversson LB, Simão M, Padula P, Felix P, Vasconcelos P, Bradley R, Shope R, Oliveira RC, Hinrichsen SL. Contribuição ao conhecimento sobre a hantavirose no Brasil. *Informe Epidemiológico do SUS*. 2000;9(3):167-178.

Figueiredo LT, Campos GM, Rodrigues FB. Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavírus: aspectos epidemiológicos, clínicos, do diagnóstico laboratorial e do tratamento. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34(1):13-23.

Figueiredo LTM. Hantavíroses. In: Cimerman S, Cimerman B. *Manual de condutas em infectologia*. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 123-132.

Figueiredo LT, Moreli ML, de-Sousa RL, Borges AA, de-Figueiredo GG, Machado AM, Bisordi I, Nagasse-Sugahara TK, Suzuki A, Pereira LE, de-Souza RP, de-Souza LT, Braconi CT, Harsi CM, de-Andrade-Zanotto PM; Viral Diversity Genetic Network Consortium. Hantavirus pulmonary syndrome, central plateau, southeastern, and southern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(4):561-567.

Flick K, Hooper JW, Schmaljohn CS, Pettersson RF, Feldmann H, Flick R. Rescue of Hantaan virus minigenomes. *Virology*. 2003;306(2):219-224.

Flick K, Katz A, Overby A, Feldmann H, Pettersson RF, Flick R. Functional analysis of the noncoding regions of the Uukuniemi virus (Bunyaviridae) RNA segments. *J Virol*. 2004;78(21):11726-11738.

Fooks AR, Stephenson JR, Warnes A, Dowsett AB, Rima BK, Wilkinson GW. Measles virus nucleocapsid protein expressed in insect cells assembles into nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol.* 1993;74 (Pt 7):1439-1444.

Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, Moss B. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(21):8122-6.

Fulhorst CF, Monroe MC, Salas RA, Duno G, Utrera A, Ksiazek TG, Nichol ST, de Manzione NM, Tovar D, Tesh RB. Isolation, characterization and geographic distribution of Caño Delgadito virus, a newly discovered South American hantavirus (family Bunyaviridae). *Virus Res.* 1997;51(2):159-171.

Garcin D, Lezzi M, Dobbs M, Elliott RM, Schmaljohn C, Kang CY, Kolakofsky D. The 5' ends of Hantaan virus (Bunyaviridae) RNAs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of RNA synthesis. *J Virol.* 1995;69(9):5754-5762.

Gaudin Y, Barge A, Ebel C, Ruigrok RW. Aggregation of VSV M protein is reversible and mediated by nucleation sites: implications for viral assembly. *Virology.* 1995;206(1):28-37.

Gavrilovskaya IN, Shepley M, Shaw R, Ginsberg MH, Mackow ER. Beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(12):7074-7079.

Gavrilovskaya IN, Brown EJ, Ginsberg MH, Mackow ER. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *J Virol.* 1999;73(5):3951-3959.

Gedvilaite A, Zvirbliene A, Staniulis J, Sasnauskas K, Krüger DH, Ulrich R. Segments of puumala hantavirus nucleocapsid protein inserted into chimeric polyomavirus-derived virus-like particles induce a strong immune response in mice. *Viral Immunol.* 2004;17(1):51-68.

Geldmacher A, Skrastina D, Petrovskis I, Borisova G, Berriman JA, Roseman AM, Crowther RA, Fischer J, Musema S, Gelderblom HR, Lundkvist A, Renhofa R, Ose V, Krüger DH, Pumpens P, Ulrich R. An amino-terminal segment of hantavirus nucleocapsid protein presented on hepatitis B virus core particles induces a strong and highly cross-reactive antibody response in mice. *Virology.* 2004a;323(1):108-119.

Geldmacher A, Schmalzer M, Krüger DH, Ulrich R. Yeast-expressed hantavirus Dobrava nucleocapsid protein induces a strong, long-lasting, and highly cross-reactive immune response in mice. *Viral Immunol.* 2004b;17(1):115-122.

Gliniak BC, Kozak SL, Jones RT, Kabat D. Disulfide bonding controls the processing of retroviral envelope glycoproteins. *J Biol Chem*. 1991;266(34):22991-22997.

Goldsmith CS, Elliott LH, Peters CJ, Zaki SR. Ultrastructural characteristics of Sin Nombre virus, causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. *Arch Virol*. 1995;140(12):2107-2122.

Halpin K, Bankamp B, Harcourt BH, Bellini WJ, Rota PA. Nipah virus conforms to the rule of six in a minigenome replication assay. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 3):701-707.

Henderson WW, Monroe MC, St Jeor SC, Thayer WP, Rowe JE, Peters CJ, Nichol ST. Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. *Virology*. 1995;214(2):602-610.

Hindrichsen S, Medeiros de Andrade A, Clement J, Leirs H, McKenna P, Matthys P, Neild GH. Hantavirus infection in Brazilian patients from Recife with suspected leptospirosis. *Lancet*. 1993;341(8836):50.

Hjelle B. Hantaviruses and Hantavirus cardiopulmonary syndrome in the Americas. In: Saluzzo JF, Dodet B. *Factors in the Emergence and Control of Rodent-borne Viral Diseases (Hantaviral and Arenal Diseases)*. Amsterdam; 1999. p. 55-62.

Ho Y, Lin PH, Liu CY, Lee SP, Chao YC. Assembly of human severe acute respiratory syndrome coronavirus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318(4):833-838.

Hobman TC, Lundstrom ML, Mauracher CA, Woodward L, Gillam S, Farquhar MG. Assembly of rubella virus structural proteins into virus-like particles in transfected cells. *Virology*. 1994;202(2):574-585.

Hooper JW, Custer DM, Thompson E, Schmaljohn CS. DNA vaccination with the Hantaan virus M gene protects Hamsters against three of four HFRS hantaviruses and elicits a high-titer neutralizing antibody response in Rhesus monkeys. *J Virol*. 2001;75(18):8469-8477.

Hu YC, Hsu JT, Huang JH, Ho MS, Ho YC. Formation of enterovirus-like particle aggregates by recombinant baculoviruses co-expressing P1 and 3CD in insect cells. *Biotechnol Lett*. 2003;25(12):919-925.

Huggins JW, Hsiang CM, Cosgriff TM, Guang MY, Smith JI, Wu ZO, LeDuc JW, Zheng ZM, Meegan JM, Wang QN, et al. Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis*. 1991;164(6):1119-1127.

Hurtley SM, Helenius A. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol.* 1989;5:277-307.

Hutchinson KL, Peters CJ, Nichol ST. Sin Nombre virus mRNA synthesis. *Virology.* 1996;224(1):139-149.

International Committee on Taxonomy of Viruses. *Hantavirus*.
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>

Ikegami T, Peters CJ, Makino S. Rift valley fever virus nonstructural protein NSs promotes viral RNA replication and transcription in a minigenome system. *J Virol.* 2005;79(9):5606-5615.

Iversson LB, da Rosa AP, Rosa MD, Lomar AV, Sasaki Mda G, LeDuc JW. Infecção humana por Hantavirus nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. *Rev Assoc Med Bras.* 1994;40(2):85-92.

Jarvis DL, Kowar ZS, Hollister JR. Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system. *Curr Opin Biotech.* 1998;9:528-533.

Jin M, Park J, Lee S, Park B, Shin J, Song KJ, Ahn TI, Hwang SY, Ahn BY, Ahn K. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology.* 2002;294(1):60-69.

Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 1998;143(7):1883-1898.

Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Peters CJ, Nichol ST. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology.* 1997;238(1):115-127.

Jonsson CB, Schmaljohn CS. Replication of hantaviruses. *Curr Opin Microbiol Immunol.* 2001;256:15-32.

Jonsson CB, Gallegos J, Ferro P, Severson W, Xu X, Schmaljohn CS. Purification and characterization of the Sin Nombre virus nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2001;23(1):134-141.

Jonsson CB, Milligan BG, Arterburn JB. Potential importance of error catastrophe to the development of antiviral strategies for hantaviruses. *Virus Res.* 2005;107(2):195-205.

Jung YT, Kim GR. Genomic characterization of M and S RNA segments of hantaviruses isolated from bats. *Acta Virol.* 1995;39(4):231-233.

Kallio-Kokko H, Leveelahti R, Brummer-Korvenkontio M, Lundkvist A, Vaheri A, Vapalahti O. Human immune response to Puumala virus glycoproteins and nucleocapsid protein expressed in mammalian cells. *J Med Virol.* 2001;65(3):605-613.

Kariwa H, Tanabe H, Mizutani T, Kon Y, Lokugamage K, Lokugamage N, Iwasa MA, Hagiya T, Araki K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Synthesis of Seoul virus RNA and structural proteins in cultured cells. *Arch Virol.* 2003;148(9):1671-1685.

Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N. Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol.* 2006;151(7):1291-1308.

Kaukinen P, Koistinen V, Vapalahti O, Vaheri A, Plyusnin A. Interaction between molecules of hantavirus nucleocapsid protein. *J Gen Virol.* 2001;82(Pt 8):1845-1853.

Kaukinen P, Vaheri A, Plyusnin A. Non-covalent interaction between nucleocapsid protein of Tula hantavirus and small ubiquitin-related modifier-1, SUMO-1. *Virus Res.* 2003a;92(1):37-45.

Kaukinen P, Vaheri A, Plyusnin A. Mapping of the regions involved in homotypic interactions of Tula hantavirus N protein. *J Virol.* 2003b;77(20):10910-10916.

Kaukinen P, Kumar V, Tulinmäki K, Engelhardt P, Vaheri A, Plyusnin A. Oligomerization of Hantavirus N protein: C-terminal alpha-helices interact to form a shared hydrophobic space. *J Virol.* 2004;78(24):13669-13677

Kaukinen P, Vaheri A, Plyusnin A. Hantavirus nucleocapsid protein: a multifunctional molecule with both housekeeping and ambassadorial duties. *Arch Virol.* 2005;150(9):1693-713.

Khaiboullina SF, Rizvanov AA, Deyde VM, St Jeor SC. Andes virus stimulates interferon-inducible MxA protein expression in endothelial cells. *J Med Virol.* 2005;75(2):267-275.

Khattar SK, Yunus AS, Collins PL, Samal SK. Mutational analysis of the bovine respiratory syncytial virus nucleocapsid protein using a minigenome system: mutations that affect encapsidation, RNA synthesis, and interaction with the phosphoprotein. *Virology*. 2000;270(1):215-228.

Khiabian H, Trifonov V, Rabadan R. Reassortment patterns in Swine influenza viruses. *PLoS One*. 2009;4(10):7366.

Kim TY, Choi Y, Cheong HS, Choe J. Identification of a cell surface 30 kDa protein as a candidate receptor for Hantaan virus. *J Gen Virol*. 2002;83(Pt 4):767-773.

Klempa B, Schmidt HA, Ulrich R, Kaluz S, Labuda M, Meisel H, Hjelle B, Krüger DH. Genetic interaction between distinct Dobrava hantavirus subtypes in *Apodemus agrarius* and *A. flavicollis* in nature. *J Virol*. 2003;77(1):804-809.

Kohl A, Lowen AC, Léonard VH, Elliott RM. Genetic elements regulating packaging of the Bunyamwera orthobunyavirus genome. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 1):177-187.

Kolakofsky D, Hacker D. Bunyavirus RNA synthesis: genome transcription and replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1991;169:143-59.

Konishi E, Pincus S, Paoletti E, Shope RE, Burrage T, Mason PW. Mice immunized with a subviral particle containing the Japanese encephalitis virus prM/M and E proteins are protected from lethal JEV infection. *Virology*. 1992;188(2):714-720.

Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*. 2000;10(12):524-30.

Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. Presentation of exogenous antigens by macrophages: analysis of major histocompatibility complex class I and II presentation and regulation by cytokines. *Eur J Immunol*. 1994;24(10):2421-2428.

Krüger DH, Ulrich R, Lundkvist A A. Hantavirus infections and their prevention. *Microbes Infect*. 2001;3(13):1129-44.

Kukkonen SK, Vaheri A, Plyusnin A. Tula hantavirus L protein is a 250 kDa perinuclear membrane-associated protein. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 5):1181-9.

Latham T, Galarza JM. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. J Virol. 2001;75(13):6154-65.

Le May N, Gauslart N, Billecocq A, Bouloy M. The N terminus of Rift Valley fever virus nucleoprotein is essential for dimerization. J Virol. 2005;79(18):11974-80.

Lednicky JA. Hantaviruses. a short review. Arch Pathol Lab Med. 2003;127(1):30-5.

Leduc JW. Hantaan and related virus. In: International Symposium on Tropical Arboviruses and Haemorrhagic Fevers; Belém, Pará.1991.

Lee HW, Lee PW, Johnson KM. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. J Infect Dis. 1978;137(3):298-308.

Lee HW, Baek LJ, Johnson KM. Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. J Infect Dis. 1982;146(5):638-44.

Lee HW, An Cn. Development of vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome. J Korean Soc Virol. 1988;18:143-148.

Lee HW. Global update on distribution of haemorrhagic fever with renal syndrome and hantaviruses. Virus Info Exch News. 1988;5(3):82-84, 1988.

Lee HW, An CN, Song JW, Baek LJ, Seo TJ. Field trial of an inactivated vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome in humans. Arch Virol. 1990;35-47.

Lee HW. Epidemiology and pathogenesis of haemorrhagic fever with renal syndrome. In: Elliot RM. The *Bunyaviridae*. New York: Plenum Press; 1996. p. 253-267.

Lee BH, Yoshimatsu K, Maeda A, Ochiai K, Morimatsu M, Araki K, Ogino M, Morikawa S, Arikawa J. Association of the nucleocapsid protein of the Seoul and Hantaan hantaviruses with small ubiquitin-like modifier-1-related molecules. Virus Res. 2003;98(1):83-91.

Levis S, Rowe JE, Morzunov S, Enria DA, St Jeor S. New hantaviruses causing hantavirus pulmonary syndrome in central Argentina. Lancet. 1997;349(9057):998-9.

Levis S, Morzunov SP, Rowe JE, Enria D, Pini N, Calderon G, Sabattini M, St Jeor SC. Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *J Infect Dis.* 1998;177(3):529-538.

Li D, Schmaljohn AL, Anderson K, Schmaljohn CS. Complete nucleotide sequences of the M and S segments of two hantavirus isolates from California: evidence for reassortment in nature among viruses related to hantavirus pulmonary syndrome. *Virology.* 1995;206(2):973-983.

Li ML, Rao P, Krug RM. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J.* 2001;20(8):2078-2086.

Li XD, Mäkelä TP, Guo D, Soliymani R, Koistinen V, Vapalahti O, Vaheri A, Lankinen H. Hantavirus nucleocapsid protein interacts with the Fas-mediated apoptosis enhancer Daxx. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 4):759-766.

Liao S, Wang S, Xu L, Deng D, Xu Q, Wang W, Zhu T, Bai X, Zhou J, Xu G, Lu Y, Meng L, Ma D. Production and verification of human papillomavirus type 18 vaccine in vitro. *Oncol Rep.* 2008;20(1):211-217.

Liu L, Celma CC, Roy P. Rift Valley fever virus structural proteins: expression, characterization and assembly of recombinant proteins. *Virol J.* 2008;5:82.

Löber C, Anheier B, Lindow S, Klenk HD, Feldmann H. The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA. *Virology.* 2001;289(2):224-229.

Lokugamage K, Kariwa H, Lokugamage N, Miyamoto H, Iwasa M, Hagiya T, Araki K, Tachi A, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Genetic and antigenic characterization of the Amur virus associated with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Virus Res.* 2004;101(2):127-134.

Lopez N, Muller R, Prehaud C, Bouloy M. The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules. *J Virol.* 1995;69(7):3972-3979.

López N, Padula P, Rossi C, Lázaro ME, Franze-Fernández MT. Genetic identification of a new hantavirus causing severe pulmonary syndrome in Argentina. *Virology.* 1996;220(1):223-226.

Lu Q, Zhu Z, Weng J. Immune responses to inactivated vaccine in people naturally infected with hantaviruses. *J Med Virol*. 1996;49(4):333-5.

Luckow VA, Summers MD. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *BioTechnology*. 1988;6:47-55.

Lundkvist A, Kallio-Kokko H, Sjölander KB, Lankinen H, Niklasson B, Vaheri A, Vapalahti O. Characterization of Puumala virus nucleocapsid protein: identification of B-cell epitopes and domains involved in protective immunity. *Virology*. 1996;216(2):397-406.

Luo ZZ, Li SQ, Peng DS, Wang YY, He H, Li YZ, Zhou N, Ni DS, Li YX, Xue ZY. Isolation and characterization of epidemic haemorrhagic fever virus from domestic cats. *Chin J Microbiol Immunol*. 1985;5: 79-81.

McClain DJ, Summers PL, Harrison SA, Schmaljohn AL, Schmaljohn CS. Clinical evaluation of a vaccinia-vectored Hantaan virus vaccine. *J Med Virol*. 2000;60(1):77-85.

Mackow ER, Ginsberg MH, Gavrilovskaya IN. $\beta 3$ Integrins mediate the cellular entry of pathogenic hantaviruses. In: Saluzzo JF, Dodet B. *Factors in the Emergence and Control of Rodent-borne Viral Diseases (Hantaviral and Arenal Diseases)*. Amsterdam; 1999. p.113-123.

Mackow ER, Gavrilovskaya IN. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2001;256:91-115.

Maeda A, Lee BH, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, Morikawa S. The intracellular association of the nucleocapsid protein (NP) of hantaan virus (HTNV) with small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) conjugating enzyme 9 (Ubc9). *Virology*. 2003;305(2):288-297.

Maeda K, West K, Hayasaka D, Ennis FA, Terajima M. Recombinant adenovirus vector vaccine induces stronger cytotoxic T-cell responses than recombinant vaccinia virus vector, plasmid DNA, or a combination of these. *Viral Immunol*. 2005;18(4):657-667.

Maes P, Keyaerts E, Bonnet V, Clement J, Avsic-Zupanc T, Robert A, Van Ranst M. Truncated recombinant Dobrava hantavirus nucleocapsid proteins induce strong, long-lasting immune responses in mice. *Intervirology*. 2006;49(5):253-260.

Maes P, Clement J, Van Ranst M. Recent approaches in hantavirus vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8(1):67-76.

Mahy BW, Brown CC. Emerging zoonoses: crossing the species barrier. *Rev Sci Tech*. 2000;19(1):33-40.

Malecki TM, Jillson GP, Thilsted JP, Elrod J, Torrez-Martinez N, Hjelle B. Serologic survey for hantavirus infection in domestic animals and coyotes from New Mexico and northeastern Arizona. *J Am Vet Med Assoc*. 1998;212(7):970-973.

Martinez VP, Bellomo C, San Juan J, Pinna D, Forlenza R, Elder M, Padula PJ. Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(12):1848-1853.

McBurney SP, Young KR, Ross TM. Membrane embedded HIV-1 envelope on the surface of a virus-like particle elicits broader immune responses than soluble envelopes. *Virology*. 2007;358(2):334-346.

McIntyre NE, Chu YK, Owen RD, Abuzeineh A, De la Sancha N, Dick CW, Holsomback T, Nisbett RA, Jonsson C. A longitudinal study of Bayou virus, hosts, and habitat. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(6):1043-1049.

Meissner JD, Rowe JE, Borucki MK, St Jeor SC. Complete nucleotide sequence of a Chilean hantavirus. *Virus Res*. 2002;89(1):131-143.

Mertz GJ, Miedzinski L, Goade D, Pavia AT, Hjelle B, Hansbarger CO, Levy H, Koster FT, Baum K, Lindemulder A, Wang W, Riser L, Fernandez H, Whitley RJ; Collaborative Antiviral Study Group. Placebo-controlled, double-blind trial of intravenous ribavirin for the treatment of hantavirus cardiopulmonary syndrome in North America. *Clin Infect Dis*. 2004;39(9):1307-1313.

Michel PO, Mäkelä AR, Korhonen E, Toivola J, Hedman L, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Oker-Blom C. Purification and analysis of polyhistidine-tagged human parvovirus B19 VP1 and VP2 expressed in insect cells. *J Virol Methods*. 2008;152(1-2):1-5.

Mills JN, Corneli A, Young JC et al. Hantavirus pulmonary syndrome-United States: updated recommendations for risk reduction. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*. 2002;51(RR-9):1-12.

Mir MA, Panganiban AT. Trimeric hantavirus nucleocapsid protein binds specifically to the viral RNA panhandle. *J Virol*. 2004;78(15):8281-8288.

Moreli ML. Diagnóstico de hantavírus por detecção genômica com estudo filogenético e produção de uma proteína N recombinante [tese (Doutorado em Ciências Médicas)]. São

Paulo (Brasil): Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2005.

Morzunov SP, Rowe JE, Ksiazek TG, Peters CJ, St Jeor SC, Nichol ST. Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in *Peromyscus leucopus* mice in North America. *J Virol*. 1998;72(1):57-64.

Mou DL, Wang YP, Huang CX, Li GY, Pan L, Yang WS, Bai XF. Cellular entry of Hantaan virus A9 strain: specific interactions with beta3 integrins and a novel 70kDa protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339(2):611-617.

Müller R, Poch O, Delarue M, Bishop DH, Bouloy M. Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J Gen Virol*. 1994;75 (Pt 6):1345-1352.

Murphy FA. New, emerging, and reemerging infectious diseases. *Adv Virus Res*. 1994;43:1-52.

Murphy ME, Kariwa H, Mizutani T, Tanabe H, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Characterization of in vitro and in vivo antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *J Vet Med Sci*. 2001;63(6):637-645.

Näslund J, Lagerqvist N, Habjan M, Lundkvist A, Evander M, Ahlm C, Weber F, Bucht G. Vaccination with virus-like particles protects mice from lethal infection of Rift Valley Fever Virus. *Virology*. 2009;385(2):409-15.

Neumann G, Zobel A, Hobom G. RNA polymerase I-mediated expression of influenza viral RNA molecules. *Virology*. 1994;202(1):477-9.

Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*. 1993;262(5135):914-917.

O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. Baculovirus expression vectors. New York: Oxford University Press; 1994.

Overby AK, Popov V, Neve EP, Pettersson RF. Generation and analysis of infectious virus-like particles of uukuniemi virus (bunyaviridae): a useful system for studying bunyaviral packaging and budding. *J Virol*. 2006;80(21):10428-10435.

Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, López NM, Rossi CM, Rabinovich RD. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology*. 1998;241(2):323-330.

Padula PJ, Colavecchia SB, Martínez VP, Gonzalez Della Valle MO, Edelstein A, Miguel SD, Russi J, Riquelme JM, Colucci N, Almirón M, Rabinovich RD. Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America. *J Clin Microbiol*. 2000;38(8):3029-3035.

Padula P, Martinez VP, Bellomo C, Maidana S, San Juan J, Tagliaferri P, Bargardi S, Vazquez C, Colucci N, Estévez J, Almiron M. Pathogenic hantaviruses, northeastern Argentina and eastern Paraguay. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(8):1211-1214.

Pensiero MN, Hay J. The Hantaan virus M-segment glycoproteins G1 and G2 can be expressed independently. *J Virol*. 1992;66(4):1907-1914.

Persson R, Pettersson RF. Formation and intracellular transport of a heterodimeric viral spike protein complex. *J Cell Biol*. 1991;112(2):257-266.

Plotch SJ, Bouloy M, Ulmanen I, Krug RM. A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell*. 1981;23(3):847-858.

Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2001;256:47-75.

Plyusnin A. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. *Arch Virol*. 2002;147(4):665-682.

Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J*. 1989;8(12):3867-3874.

Pollard AJ, Dobson SR. Emerging infectious diseases in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis*. 2000;13(3):265-275.

Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA. Glycobiology. *Annu Rev Biochem*. 1988;57:785-838.

Ramanathan HN, Chung DH, Plane SJ, Sztul E, Chu YK, Guttieri MC, McDowell M, Ali G, Jonsson CB. Dynein-dependent transport of the hantaan virus nucleocapsid protein to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. J Virol. 2007;81(16):8634-8647.

Ramanathan HN, Jonsson CB. New and Old World hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles. Virology. 2008;374(1):138-50.

Ravkov EV, Nichol ST, Compans RW. Polarized entry and release in epithelial cells of Black Creek Canal virus, a New World hantavirus. J Virol. 1997;71(2):1147-1154.

Ravkov EV, Nichol ST, Peters CJ, Compans RW. Role of actin microfilaments in Black Creek Canal virus morphogenesis. J Virol. 1998;72(4):2865-2870.

Ravkov EV, Compans RW. Hantavirus nucleocapsid protein is expressed as a membrane-associated protein in the perinuclear region. J Virol. 2001;75(4):1808-1815.

Razzauti M, Plyusnina A, Henttonen H, Plyusnin A. Accumulation of point mutations and reassortment of genomic RNA segments are involved in the microevolution of Puumala hantavirus in a bank vole (*Myodes glareolus*) population. J Gen Virol. 2008;89(Pt 7):1649-1660.

Razzauti M, Plyusnina A, Sironen T, Henttonen H, Plyusnin A. Analysis of Puumala hantavirus in a bank vole population in northern Finland: evidence for co-circulation of two genetic lineages and frequent reassortment between strains. J Gen Virol. 2009;90(Pt 8):1923-31.

Reese SM, Blitvich BJ, Blair CD, Geske D, Beaty BJ, Black WC 4th. Potential for La Crosse virus segment reassortment in nature. Virol J. 2008;5:164.

Rhiel M, Mitchell-Logean CM, Murhammer DW. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (*HighFive*TM) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. Biotechnol.Bioeng. 1997;55:909-920.

Rizvanov AA, van Geelen AG, Morzunov S, Otteson EW, Bohlman C, Pari GS, St Jeor SC. Generation of a recombinant cytomegalovirus for expression of a hantavirus glycoprotein. J Virol. 2003;77(22):12203-12210.

Rizvanov AA, Khaiboullina SF, St Jeor S. Development of reassortant viruses between pathogenic hantavirus strains. Virology. 2004;327(2):225-232.

Rizvanov AA, Khaiboullina SF, van Geelen AG, St Jeor SC. Replication and immunoactivity of the recombinant *Peromyscus maniculatus* cytomegalovirus expressing hantavirus G1 glycoprotein in vivo and in vitro. *Vaccine*. 2006;24(3):327-334.

Rodriguez LL, Owens JH, Peters CJ, Nichol ST. Genetic reassortment among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*. 1998;242(1):99-106.

Roelvink PW, van Meer MM, de Kort CA, Possee RD, Hammock BD, Vlak JM. Dissimilar expression of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin and p10 genes. *J Gen Virol*. 1992;73 (Pt 6):1481-1489.

Ruusala A, Persson R, Schmaljohn CS, Pettersson RF. Coexpression of the membrane glycoproteins G1 and G2 of Hantaan virus is required for targeting to the Golgi complex. *Virology*. 1992;186(1):53-64.

Safronetz D, Hegde NR, Ebihara H, Denton M, Kobinger GP, St Jeor S, Feldmann H, Johnson DC. Adenovirus vectors expressing hantavirus proteins protect hamsters against lethal challenge with andes virus. *J Virol*. 2009;83(14):7285-7295.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. 3 vol.

Scalera NM, Mossad SB. The first pandemic of the 21st century: a review of the 2009 pandemic variant influenza A (H1N1) virus. *Postgrad Med*. 2009;121(5):43-47.

Schellenbacher C, Roden R, Kirnbauer R. Chimeric L1-L2 virus-like particles as potential broad-spectrum human papillomavirus vaccines. *J Virol*. 2009;83(19):10085-95.

Schmaljohn CS, Hasty SE, Harrison SA, Dalrymple JM. Characterization of Hantaan virions, the prototype virus of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis*. 1983;148(6):1005-1012.

Schmaljohn CS, Hasty SE, Rasmussen L, Dalrymple JM. Hantaan virus replication: effects of monensin, tunicamycin and endoglycosidases on the structural glycoproteins. *J Gen Virol*. 1986;67 (Pt 4):707-17.

Schmaljohn CS, Schmaljohn AL, Dalrymple JM. Hantaan virus M RNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology*. 1987;157(1):31-39.

Schmaljohn CS, Chu YK, Schmaljohn AL, Dalrymple JM. Antigenic subunits of Hantaan virus expressed by baculovirus and vaccinia virus recombinants. *J Virol*. 1990;64(7):3162-3170.

Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM. Preparation of candidate vaccinia-vectored vaccines for haemorrhagic fever with renal syndrome. *Vaccine*. 1992;10(1):10-13.

Schmaljohn CS, Hooper JW. *Bunyaviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1581-1602.

Schmidt J, Jandrig B, Klempa B, Yoshimatsu K, Arikawa J, Meisel H, Niedrig M, Pitra C, Krüger DH, Ulrich R. Nucleocapsid protein of cell culture-adapted Seoul virus strain 80-39: analysis of its encoding sequence, expression in yeast and immuno-reactivity. *Virus Genes*. 2005;30(1):37-48.

Severson W, Xu X, Kuhn M, Senutovitch N, Thokala M, Ferron F, Longhi S, Canard B, Jonsson CB. Essential amino acids of the hantaan virus N protein in its interaction with RNA. *J Virol*. 2005;79(15):10032-10039.

Sharma AK, Khuller GK. DNA vaccines: future strategies and relevance to intracellular pathogens. *Immunol Cell Biol*. 2001;79(6):537-546.

Shi X, Elliott RM. Golgi localization of Hantaan virus glycoproteins requires coexpression of G1 and G2. *Virology*. 2002;300(1):31-38.

Shi X, Elliott RM. Analysis of N-linked glycosylation of hantaan virus glycoproteins and the role of oligosaccharide side chains in protein folding and intracellular trafficking. *J Virol*. 2004;78(10):5414-22.

Silva MV, Vasconcelos MJ, Hidalgo NT, Veiga AP, Canzian M, Marotto PC, de Lima VC. Hantavirus pulmonary syndrome. Report of the first three cases in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1997;39(4):231-234.

Simon K, Lingappa VR, Ganem D. Secreted hepatitis B surface antigen polypeptides are derived from a transmembrane precursor. *J Cell Biol*. 1988;107(6 Pt 1):2163-2168.

Slonova RA, Tkachenko EA, Kushnarev EL, Dzagurova TK, Astakova TI. Hantavirus isolation from birds. *Acta Virol*. 1992;36(5):493.

Smadel JE. Epidemic hemorrhagic fever. *Am J Public Health Nations Health*. 1953;43(10):1327-1330.

Smith JF, Pifat DY. Morphogenesis of sandfly viruses (Bunyaviridae family). *Virology*. 1982;121(1):61-81.

Song G, Huang YC, Hang CS, Hao FY, Li DX, Zheng XL, Liu WM, Li SL, Huo ZW, Huei LJ, et al. Preliminary human trial of inactivated golden hamster kidney cell (GHKC) vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). *Vaccine*. 1992;10(4):214-6.

Spiropoulou CF, Morzunov S, Feldmann H, Sanchez A, Peters CJ, Nichol ST. Genome structure and variability of a virus causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*. 1994;200(2):715-723.

Spiropoulou CF. Hantavirus maturation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2001;256:33-46.

Spiropoulou CF, Goldsmith CS, Shoemaker TR, Peters CJ, Compans RW. Sin Nombre virus glycoprotein trafficking. *Virology*. 2003;308(1):48-63.

Sun Y, Carrion R Jr, Ye L, Wen Z, Ro YT, Brasky K, Ticer AE, Schwegler EE, Patterson JL, Compans RW, Yang C. Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells. *Virology*. 2009;383(1):12-21.

Tan BH, Fu JL, Sugrue RJ. Characterization of the dengue virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol*. 2007;379:163-176.

Tegerstedt K, Lindencrona JA, Curcio C, Andreasson K, Tullus C, Forni G, Dalianis T, Kiessling R, Ramqvist T. A single vaccination with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles prevents outgrowth of HER-2/neu-expressing tumors. *Cancer Res*. 2005;65(13):5953-5957.

Terajima M, Van Epps HL, Li D, Leporati AM, Juhlin SE, Mustonen J, Vaheri A, Ennis FA. Generation of recombinant vaccinia viruses expressing Puumala virus proteins and use in isolating cytotoxic T cells specific for Puumala virus. *Virus Res*. 2002;84(1-2):67-77.

Toro J, Vega JD, Khan AS, Mills JN, Padula P, Terry W, Yadón Z, Valderrama R, Ellis BA, Pavletic C, Cerda R, Zaki S, Shieh WJ, Meyer R, Tapia M, Mansilla C, Baro M, Vergara JA, Concha M, Calderon G, Enria D, Peters CJ, Ksiazek TG. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(4):687-694.

Triyatni M, Saunier B, Maruvada P, Davis AR, Ulianich L, Heller T, Patel A, Kohn LD, Liang TJ. Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: a model system for studying viral binding and entry. *J Virol*. 2002;76(18):9335-9344.

Vapalahti O, Kallio-Kokko H, Närvänen A, Julkunen I, Lundkvist A, Plyusnin A, Lehväslaiho H, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Lankinen H. Human B-cell epitopes of Puumala virus nucleocapsid protein, the major antigen in early serological response. *J Med Virol*. 1995;46(4):293-303.

Vapalahti O, Lundkvist A, Kallio-Kokko H, Paukku K, Julkunen I, Lankinen H, Vaheri A. Antigenic properties and diagnostic potential of puumala virus nucleocapsid protein expressed in insect cells. *J Clin Microbiol*. 1996;34(1):119-125.

Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(10):653-661.

Vasconcelos PFC, Travassos Da Rosa ES, Travassos Da Rosa APA, Travassos Da Rosa JFS. Evidence of circulating Hantaviruses in Brazilian Amazonia through high prevalence of antibodies in residents of Manaus, Brazil. *Cienc Cult*. 1992;44:162-163.

Vasconcelos MI, Lima VP, Iversson LB, Rosa MD, da Rosa AP, da Rosa ES, Pereira LE, Nassar E, Katz G, Matida LH, Zaparoli MA, Ferreira JJ, Peters CJ. Hantavirus pulmonary syndrome in the rural area of Jucituba, São Paulo metropolitan area, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1997;39(4):237-238.

Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*. 1977;13(4):213-217.

Vietheer PT, Boo I, Drummer HE, Netter HJ. Immunizations with chimeric hepatitis B virus-like particles to induce potential anti-hepatitis C virus neutralizing antibodies. *Antivir Ther*. 2007;12(4):477-87.

Vincent MJ, Quiroz E, Gracia F, Sanchez AJ, Ksiazek TG, Kitsutani PT, Ruedas LA, Tinnin DS, Caceres L, Garcia A, Rollin PE, Mills JN, Peters CJ, Nichol ST. Hantavirus pulmonary syndrome in Panama: identification of novel hantaviruses and their likely reservoirs. *Virology*. 2000;277(1):14-19.

Volpers C, Schirmacher P, Streeck RE, Sapp M. Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology*. 1994;200(2):504-512.

Wang BZ, Liu W, Kang SM, Alam M, Huang C, Ye L, Sun Y, Li Y, Kothe DL, Pushko P, Dokland T, Haynes BF, Smith G, Hahn BH, Compans RW. Incorporation of high levels of chimeric human immunodeficiency virus envelope glycoproteins into virus-like particles. *J Virol.* 2007;81(20):10869-78.

Wang Y, Boudreaux DM, Estrada DF, Egan CW, St Jeor SC, De Guzman RN. NMR structure of the N-terminal coiled coil domain of the Andes hantavirus nucleocapsid protein. *J Biol Chem.* 2008;283(42):28297-304.

Watanabe T, Watanabe S, Neumann G, Kida H, Kawaoka Y. Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. *J Virol.* 2002;76(2):767-773.

Weir E. Hantavirus: 'tis the season. *CMAJ.* 2005;173(2):147.

Wells RM, Sosa Estani S, Yadon ZE, Enria D, Padula P, Pini N, Mills JN, Peters CJ, Segura EL. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. *Emerg Infect Dis.* 1997;3(2):171-174.

Wen Z, Ye L, Gao Y, Pan L, Dong K, Bu Z, Compans RW, Yang C. Immunization by influenza virus-like particles protects aged mice against lethal influenza virus challenge. *Antiviral Res.* 2009.

World Health Organization. Haemorrhagic fever with renal syndrome: memorandum from a WHO meeting, *Bull. WHO.* 1983;61:269-275.

Xu X, Ruo SL, McCormick JB, Fisher-Hoch SP. Immunity to Hantavirus challenge in *Meriones unguiculatus* induced by vaccinia-vectored viral proteins. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;47(4):397-404.

Xu Z, Wei L, Wang L, Wang H, Jiang S. The in vitro and in vivo protective activity of monoclonal antibodies directed against Hantaan virus: potential application for immunotherapy and passive immunization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002a;298(4):552-558.

Xu X, Severson W, Villegas N, Schmaljohn CS, Jonsson CB. The RNA binding domain of the hantaan virus N protein maps to a central, conserved region. *J Virol.* 2002b;76(7):3301-3308.

Xu F, Yang Z, Wang L, Lee YL, Yang CC, Xiao SY, Xiao H, Wen L. Morphological characterization of hantavirus HV114 by electron microscopy. *Intervirology*. 2007;50(3):166-72.

Yang C, Ye L, Compans RW. Protection against filovirus infection: virus-like particle vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7(3):333-344.

Yashina L, Mishin V, Zdanovskaya N, Schmaljohn C, Ivanov L. A newly discovered variant of a hantavirus in Apodemus peninsulae, far Eastern Russia. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(5):912-913.

Yoshii K, Hayasaka D, Goto A, Obara M, Araki K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Ivanov L, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens expressed in mammalian cells for serodiagnosis of tick-borne encephalitis. *J Virol Methods*. 2003;108(2):171-179.

Yoshimatsu K, Yoo YC, Yoshida R, Ishihara C, Azuma I, Arikawa J. Protective immunity of Hantaan virus nucleocapsid and envelope protein studied using baculovirus-expressed proteins. *Arch Virol*. 1993;130(3-4):365-376.

Yoshimatsu K, Lee BH, Araki K, Morimatsu M, Ogino M, Ebihara H, Arikawa J. The multimerization of hantavirus nucleocapsid protein depends on type-specific epitopes. *J Virol*. 2003;77(2):943-952.

Zhang FL, Wu XA, Luo W, Bai WT, Liu Y, Yan Y, Wang HT, Xu ZK. The expression and genetic immunization of chimeric fragment of Hantaan virus M and S segments. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;354(4):858-863.

Zhang Y, Li XH, Jiang H, Huang CX, Wang PZ, Mou DL, Sun L, Xu Z, Wei X, Bai XF. Expression of L protein of Hantaan virus 84FLi strain and its application for recovery of minigenomes. *APMIS*. 2008;116(12):1089-1096.

Zheng J, Ma J, Yang XF, Liu HL, Cheng HW, Si LS, Wang YL. Highly efficient and economical baculovirus expression system for preparing human papillomavirus type16 virus-like particle. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2004;36(8):548-552.

Zheng F, Ma L, Shao L, Wang G, Chen F, Zhang Y, Yang S. Envelope glycoproteins of hantavirus can mediate cell-cell fusion independently. *New Microbiol*. 2007a;30(2):101-107.

Zheng F, Ma L, Shao L, Wang G, Chen F, Zhang Y, Yang S. Defining the N-linked glycosylation site of Hantaan virus envelope glycoproteins essential for cell fusion. *J Microbiol.* 2007b;45(1):41-47.

Zobel A, Neumann G, Hobom G. RNA polymerase I catalysed transcription of insert viral cDNA. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(16):3607-14.

Zou Y, Hu J, Wang ZX, Wang DM, Yu C, Zhou JZ, Fu ZF, Zhang YZ. Genetic characterization of hantaviruses isolated from Guizhou, China: evidence for spillover and reassortment in nature. *J Med Virol.* 2008;80(6):1033-1041.

Zvirbliene A, Samonskyte L, Gedvilaite A, Voronkova T, Ulrich R, Sasnauskas K. Generation of monoclonal antibodies of desired specificity using chimeric polyomavirus-derived virus-like particles. *J Immunol Methods.* 2006;311(1-2):57-70.