

Universidade de Brasília-UnB
Departamento de Biologia Celular
Pós-graduação de Biologia Molecular
Laboratório de Biologia Molecular

Caracterização genética e filogenética de isolados do hantavírus circulante no Distrito Federal, Brasil

Carolina Rezende Melo da Silva

Orientadora: Dra. Andréa Queiroz Maranhão
Co-orientador: Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais e à minha família por tudo na minha vida. Em especial, sou muito grata por meu pai tentar entender a difícil e pouco rentável vida de bióloga que escolhi e sou muito grata também pela paciência materna que me foi dispensada nesses dois anos. Espero que algum dia eu consiga retribuir todo o carinho e sacrifício.

Aos meus orientadores, Andrea e Marcelo, agradeço a oportunidade de participar dessa família científica. Aprendi muito nesse mestrado, tanto de biologia molecular quanto de pessoas. Com certeza não aprendi tudo que eles tentaram me ensinar, mas eu tentei captar o que pude. Muito obrigada por tentar.

Aos meus colegas de trabalho, foi um prazer dividir tantas alegrias e decepções com pessoas tão especiais. Peço desculpas por qualquer erro meu e agradeço a ajuda que sempre foi oferecida. E, por fim, aos meus amigos eu agradeço a ilusão criada de que eu estava descobrindo a cura da hantavirose e de que eu sou uma das melhores biólogas do mundo.

Índice

Índice de Figuras	05
Índice de Tabelas	08
Resumo	09
Introdução	10
Febre hemorrágica com síndrome renal	11
Síndrome cardiopulmonar associada a hantavírus	14
Ciclo de replicação	20
O genoma	21
A proteína do nucleocapsídeo	25
As glicoproteínas	29
A proteína L	32
Evolução dos hantavírus	34
Objetivos	39
Materiais e Métodos	40
Materiais	40
1. Soro de pacientes de HCPS	40
2. Linhagens de <i>E. coli</i>	40
3. Plasmídios	40
4. Meios de cultura	41
5. Soluções e tampões	42
6. Marcadores de DNA	44
Métodos	44
Desenho de iniciadores	44
Preparado de material <i>RNase free</i>	45
Preparado de soluções <i>RNase free</i>	45
Extração de RNA	45
RT-PCR de passo único	45
PCR	46

Tratamento com TAP	47
Ligação das extremidades do RNA	47
Transcrição reversa	48
Análise de DNA em gel de agarose	48
Clonagem e seqüenciamento	49
Ligação de fragmentos de DNA	49
Células competentes para choque térmico e transformação	49
Células competentes para eletroporação e transformação	50
Mini-preparação de DNA plasmidial	51
Digestão de DNA com enzimas de restrição	52
Análise do seqüenciamento	52
Análise filogenética	53
Resultados	54
Desenho de iniciadores	54
Amplificação do segmento genômico S e M	55
Clonagem e seqüenciamento	63
Seqüência do segmento S	64
A seqüência da proteína N	72
Seqüência dos fragmentos do segmento M	74
Análise filogenética	77
Discussão	83
Conclusões e Perspectivas	88
Anexo 1	89
Lista de abreviaturas	99
Referências Bibliográficas	101

Índice de Figuras

Figura 1.	10
Esquema da partícula viral do gênero <i>Hantavirus</i> .	
Figura 2.	17
Distribuição geográfica dos casos de hantavirose ocorridos no Brasil.	
Figura 3.	18
Coevolução de hantavírus e seus hospedeiros naturais.	
Figura 4.	23
Estrutura do genoma viral do gênero <i>Hantavirus</i> .	
Figura 5.	25
Modelo de iniciação-e-realinamento para início da síntese de mRNA e genoma do HTNV.	
Figura 6.	27
Modelo de oligomerização da proteína N.	
Figura 7.	30
Estrutura do precursor glicoproteico do HTNV e o sítio potencial de clivagem.	
Figura 8.	31
Modelagem molecular do domínio fusogênico de G2 de hantavírus em comparação ao descrito para a proteína E de flavivírus.	
Figura 9.	33
Estrutura de mão direita da polimerase do bacteriófago $\Phi 6$.	
Figura 10.	35
Árvore filogenética baseada em diferenças de aminoácidos no gene do segmento M.	
Figura 11.	38
Análise filogenética dos hantavírus da América do Sul.	
Figura 12.	54
Análise da conservação da sequência de iniciadores.	

Figura 13.	56
Análise da qualidade das extrações de RNA viral.	
Figura 14.	57
Amplificação de fragmentos do segmento genômico M.	
Figura 15.	58
Esquema do segmento genômico S e os sítios de anelamento dos iniciadores desenhados.	
Figura 16.	59
Estratégia para amplificação das seqüências não codificadoras do segmento S.	
Figura 17.	60
Amplificação do fragmento S700 do segmento genômico S dos três pacientes.	
Figura 18.	61
Amplificação dos fragmentos S712-1069 e S880-1225 do segmento genômico S do paciente 2.	
Figura 19.	62
Amplificação do fragmento S1225-61circular do paciente 2.	
Figura 20.	63
Clonagem do fragmento S700 no plasmídio pGEM-T para seqüenciamento.	
Figura 21.	63
Clonagem do fragmento S712-1069 no plasmídio pGEM-T easy para seqüenciamento.	
Figura 22.	65
Seqüências de DNA fita positiva do segmento S dos isolados de hantavírus circulantes no DF.	
Figura 23.	69
Fase de leitura aberta codificadora de uma potencial proteína não estrutural NS _s .	
Figura 24.	70
Análise das terminações não codificadoras do segmento S do paciente 2 envolvidas na formação da estrutura de <i>panhandle</i> .	

Figura 25.	71
Análise da deleção de 69 nucleotídeos na seqüência codificadora da proteína N do paciente 7.	
Figura 26.	72
Seqüência deduzida da proteína do nucleocapsídeo codificada pelo segmento S do hantavírus circulante no DF.	
Figura 27.	73
Motivos envolvidos na oligomerização da proteína N.	
Figura 28.	74
Seqüência envolvida na interação da proteína N com o RNA viral.	
Figura 29.	75
Seqüência de aminoácidos predita a partir do fragmento G1 do segmento M.	
Figura 30.	76
Seqüência de aminoácidos predita a partir do fragmento G2 do segmento M.	
Figura 31.	79
Análise filogenética dos três isolados do DF.	
Figura 32.	80
Análise filogenética do segmento S.	
Figura 33.	81
Análise filogenética do fragmento G1 do segmento M.	
Figura 34.	82
Análise filogenética do fragmento G2 do segmento M.	
Figura 35.	84
Predição da estrutura de <i>panhandle</i> do segmento S do isolado circulante no DF.	

Índice de Tabelas

Tabela 1.	12
Gênero <i>Hantavirus</i> .	
Tabela 2.	15
Hantavírus ocorrentes na América do Sul	
Tabela 3.	40
Informações sobre os pacientes de cujos soros foram extraídos RNA.	
Tabela 4.	55
Iniciadores desenhados para o segmento S por meio do programa OLIGO 4.0.	
Tabela 5.	58
Iniciadores utilizados na amplificação do segmento genômico S.	
Tabela 6.	78
Identidade de nucleotídeos de hantavírus sul-americanos em relação ao isolado 2 do DF.	

Resumo

O gênero *Hantavirus* é composto por vírus envelopados de genoma segmentado de RNA fita simples negativo. Na América, alguns membros desse gênero são os agentes etiológicos da síndrome cardiopulmonar associada a hantavírus. No Brasil, seis linhagens distintas de hantavírus foram identificadas: Juquitiba, Castelo dos Sonhos, Araraquara, Araucária, Anajatuba e Rio Mearim. Um surto de hantavirose em 2004 teve grande impacto no Brasil, principalmente nas unidades federadas do Distrito Federal, Santa Catarina e Minas Gerais. Neste trabalho, foi realizada a caracterização genética dos segmentos S e M do hantavírus circulante em pacientes de HCPS do Distrito Federal. RNA viral foi extraído de três pacientes do surto de 2004, residentes em diferentes cidades do Distrito Federal. O segmento genômico S completo foi amplificado e seqüenciado para um dos pacientes e, para os outros dois, um fragmento de 700pb foi obtido. Dois fragmentos do segmento genômico M, um de 300pb localizado na seqüência codante de G1 e o outro de 400pb localizado na seqüência codante de G2, foram amplificados e seqüenciados para um dos pacientes. A partir das seqüências de nucleotídeos obtidas, análises de identidade de nucleotídeos e de *Maximum likelihood* permitiram a inserção do hantavírus circulante no Distrito Federal no contexto filogenético sul-americano. Nas árvores filogenéticas obtidas, os hantavírus associados aos três pacientes formam um ramo monofilético e apresentam a linhagem Araraquara como o hantavírus mais próximo. A linhagem sul-americana Maciel é a segunda mais relacionada aos hantavírus do Distrito Federal.

Introdução

O gênero *Hantavirus*, família *Bunyaviridae*, é composto por vírus envelopados de genoma de RNA fita simples negativo e segmentado (Figura 1). As partículas virais são esféricas a pleomórficas com diâmetro de 80 a 120nm. Os três segmentos genômicos são denominados *small* (S), *medium* (M) e *large* (L). O segmento S codifica a proteína do nucleocapsídeo (N), o segmento M codifica as duas glicoproteínas de envelope (G1 e G2) e o segmento L, a proteína L (RNA polimerase dependente de RNA). Como detalhado na Tabela 1, os hantavírus apresentam distribuição ampla e têm como reservatórios naturais roedores da família *Muridae*, subfamílias *Murinae*, *Arvicolinae* e *Sigmodontinae*. Membros desse gênero são os agentes etiológicos da febre hemorrágica com síndrome renal (HFRS) e da síndrome cardiopulmonar causada por hantavírus (HCPS).

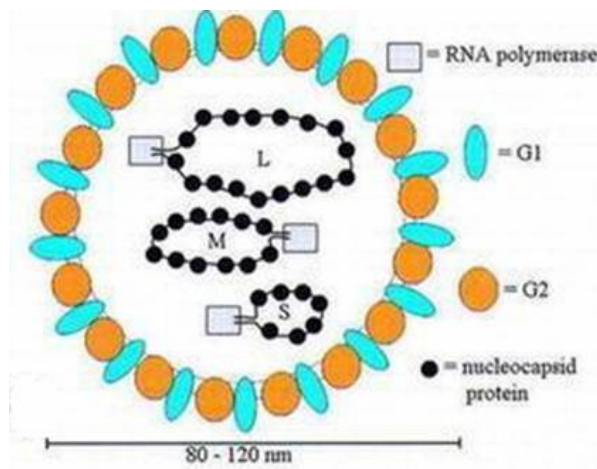


Figura 1. Esquema da partícula viral do gênero *Hantavirus*. Os segmentos genômicos S, M e L foram ilustrados de forma a evidenciar a interação direta do RNA com várias moléculas da proteína do nucleocapsídeo formando uma estrutura helicoidal. A RNA polimerase dependente de RNA (proteína L) também está associada aos segmentos genômicos por estruturas pareadas e complementares (*panhandle*) constituídas pelas extremidades 3' e 5' não codificadoras de cada segmento. As glicoproteínas virais G1 e G2 estão embebidas em uma bicamada lipídica oriunda de uma célula hospedeira.

Febre hemorrágica com síndrome renal (HFRS)

A febre hemorrágica com síndrome renal é uma doença humana caracterizada pela presença de febre, hemorragias e insuficiência renal. Em 1976, o vírus causador da febre hemorrágica coreana (KHF) foi isolado do roedor *Apodemus agrarius coreae* e denominado vírus Hantaan (Lee *et al.*, 1978). Os agentes etiológicos da HFRS são encontrados nos continentes asiático e europeu e têm como hospedeiros naturais roedores da família *Muridae*, subfamílias *Murinae* e *Arvicolinae*.

Várias espécies de hantavírus associadas à HFRS foram identificadas com base em características sorológicas, epidemiológicas e genéticas. Os três maiores patógenos responsáveis por milhares de casos anuais na China, Coreia, Rússia e Europa são o vírus *Hantaan*, o vírus *Seoul* isolado do gênero *Rattus* e o vírus *Puumala* isolado de *Clethrionomys* (Schmaljohn *et al.*, 1985; Sugiyama *et al.*, 1987). O vírus *Dobrava* foi identificado como agente etiológico da HFRS nos Bálcãs (Avsic-Zupanc *et al.*, 1992; Xiao *et al.*, 1993) e vários outros hantavírus patogênicos e não patogênicos estão sendo identificados em diferentes países (Tabela 1). Algumas espécies de hantavírus são constituídas por diferentes soro/genótipos e podem apresentar grande variabilidade, como o PUUV (Sironen *et al.*, 2001).

As manifestações clínicas de HFRS variam de acordo com o vírus envolvido e geralmente são severas em infecções com o HTNV, cuja taxa de mortalidade varia de 5 a 10%. O SEOV está relacionado com infecções menos severas e o PUUV é causador da nefropatia epidêmica (NE), cuja mortalidade é de 0,1 a 0,2%. A NE é uma forma branda de HFRS cuja característica singular é a persistência da infecção (Plyusnin *et al.*, 1996a).

Tabela 1. Gênero *Hantavirus* (informações baseadas no Banco de dados do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus-ICTVdB).

Espécie	Reservatório	Doença	Localização	Referência
<i>Vírus Andes</i> (ANDV)	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	HCPS	Argentina, Chile	López <i>et al.</i> , 1996 López <i>et al.</i> , 1997 Toro <i>et al.</i> , 1998
<i>Vírus Bayou</i> (BAYV)	<i>Oryzomys palustris</i>	HCPS	EUA	Morzunov <i>et al.</i> , 1995 Torrez-Martinez & Hjelle, 1995
<i>Vírus Black Creek Canal</i> (BCCV)	<i>Sigmodon hispidus</i>	HCPS	EUA	Ravkov <i>et al.</i> , 1995
<i>Vírus Cano Delgadito</i> (CADV)	<i>Sigomdon alstoni</i>	?	Venezuela	Fulhorst <i>et al.</i> , 1997
<i>Vírus Dobrava</i> (DOBV)	<i>Apodemus flavicollis</i> , <i>Apodemus agrarius</i>	HFRS	Eslovênia, Estônia e Grécia	Xiao <i>et al.</i> , 1993 Nemirov <i>et al.</i> , 1999 Avsic-Zupanc <i>et al.</i> , 1995
<i>Vírus El Moro Canyon</i> (ELMCV)	<i>Reithrodontomys megalotis</i> <i>Peromyscus maniculatus</i>	?	EUA	Hjelle <i>et al.</i> , 1994 Rawlings <i>et al.</i> , 1996
<i>Vírus Hantaan</i> (HTNV)	<i>Apodemus agrarius</i> , <i>Apodemus peninsulae</i>	HFRS	Coréia, China, Japão, Rússia e Balkans	Lee <i>et al.</i> , 1978 Yashina <i>et al.</i> , 2000 Yashina <i>et al.</i> , 2001 Bugert <i>et al.</i> , 1999 Kitamura <i>et al.</i> , 1983
<i>Vírus Isla Vista</i> (ISLAV)	<i>Microtus californicus</i>	?	EUA	Song <i>et al.</i> , 1995
<i>Vírus Khabarovsk</i> (KHAV)	<i>Microtus fortis</i>	-	Rússia	Hörling <i>et al.</i> , 1996

Continuação Tabela 1.

Espécie	Reservatório	Doença	Localização	Referência
<i>Vírus Laguna Negra</i> (LANV)	<i>Calomys laucha</i>	HCPS	Bolívia e Paraguai	Johnson <i>et al.</i> , 1997
<i>Vírus Muleshoe</i> (MULV)	<i>Sigmodon hispidus</i>	?	EUA	Rawlings <i>et al.</i> , 1996
<i>Vírus New York</i> (NYV)	<i>Peromyscus leucopus</i>	HCPS	EUA	Hjelle <i>et al.</i> , 1995b
<i>Vírus Prospect Hill</i> (PHV)	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	Não patogênico	EUA	Parrington & Kang, 1990
<i>Vírus Puumala</i> (PUUV)	<i>Clethrionomys glareolus</i>	HFRS (NE)	Europa e Rússia	Sironen <i>et al.</i> , 2001
<i>Vírus Rio Marmoré</i> (RIOMV)	<i>Oligoryzomys microtis</i>	?	Bolívia e Peru	Hjelle <i>et al.</i> , 1996 Powers <i>et al.</i> , 1999
<i>Vírus Rio Segundo</i> (RIOSV)	<i>Reithrodontomys mexicanus</i>	?	EUA	Hjelle <i>et al.</i> , 1995a
<i>Vírus Seoul</i> (SEOV)	<i>Rattus norvegicus</i> , <i>Rattus rattus</i> <i>Microtus fortis</i>	HFRS	Coréia, China e Rússia	Yashina <i>et al.</i> , 2000
<i>Vírus Sin Nombre</i> (SNV)	<i>Peromyscus maniculatus</i>	HCPS	EUA e Canadá	Nichol <i>et al.</i> , 1993
<i>Vírus Thailand</i> (THAIV)	<i>Bandicota indica</i>	?	Tailândia	Xiao <i>et al.</i> , 1994
<i>Vírus Thottapalayam</i> (TPMV)	<i>Suncus murinus</i>	?	Índia	Xiao <i>et al.</i> , 1994

Continuação Tabela 1.

Espécie	Reservatório	Doença	Localização	Referência
<i>Vírus Tobetsu</i>	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	?	Japão	Kariwa <i>et al.</i> , 1999 Sironen <i>et al.</i> , 2001
<i>Vírus Topografov</i> (TOPV)	<i>Lemmus sibiricus</i>	?	Sibéria	Plyusnin <i>et al.</i> , 1996b
<i>Vírus Tula</i> (TULV)	<i>Microtus arvalis</i> , <i>Microtus rossiaemeridionalis</i>	Não patogênico	Europa (Rússia, República Tcheca e Eslováquia)	Plyusnin <i>et al.</i> , 1994 Vapalahti <i>et al.</i> , 1996

? : Ausência de informação na literatura

HCPS: síndrome cardiopulmonar associada a hantavírus

HFRS: febre hemorrágica com síndrome renal

Síndrome cardiopulmonar associada a hantavírus (HCPS)

Os hantavírus americanos foram descritos inicialmente na região de Four Corners entre o Novo México e o Arizona nos EUA em 1993, quando ocorreu o primeiro surto de HCPS. O vírus *Sin Nombre*, isolado do roedor *Peromyscus maniculatus*, foi identificado como agente etiológico dessa doença até então desconhecida (Nichol *et al.*, 1993). Desde então, vários hantavírus foram isolados de pacientes e roedores no Novo Mundo (Tabela 1).

No Brasil, foram caracterizadas seis linhagens distintas de hantavírus: Juquitiba, Castelo dos Sonhos, Araraquara, Anajatuba, Rio Mearim e Araucária (Tabela 2; Figura 2). Como ainda não há consenso sobre a constituição de espécies virais, os hantavírus brasileiros serão tratados como genótipos. As variantes Juquitiba e Araraquara ocorrem no estado de São Paulo (Monroe *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2004; Moreli *et al.*, 2004). Em adição, a linhagem Araraquara também foi descrita no Planalto Central brasileiro embora sua caracterização genética nessa região seja escassa (Bisordi *et al.*, 2004). A linhagem Castelo dos sonhos foi isolada no Mato Grosso (Johnson *et al.*, 1999) e no Pará (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005), a Araucária no Paraná (Raboni *et al.*,

2005) e, no Maranhão, a Rio Mearim e Anajatuba (Rosa *et al.*, 2005). A ocorrência dos casos de hantavirose no Brasil é ampla incluindo o Distrito Federal e os estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato grosso, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Amazonas, Bahia, Pará e Rondônia (Figura 2B).

Tabela 2. Hantavírus ocorrentes na América do Sul (Banco de dados do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus-ICTVdB).

Espécie	Linhagem	Reservatório	Doença	Localização	Referência
<i>Vírus Andes</i> (ANDV)	Vírus Andes	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	HCPS	Argentina, Uruguai e Chile	López <i>et al.</i> , 1996 Toro <i>et al.</i> , 1998 Padula <i>et al.</i> , 2000
	Hu39694	-	HCPS	Argentina	Levis <i>et al.</i> , 1997 Levis <i>et al.</i> , 1998
	Vírus Bermejo	<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	HCPS	Argentina	Levis <i>et al.</i> , 1997 Levis <i>et al.</i> , 1998 Padula <i>et al.</i> , 2002
	Vírus Lechiguanas	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	HCPS	Argentina	Levis <i>et al.</i> , 1997 Levis <i>et al.</i> , 1998
	Vírus Maciel	<i>Bolomys obscurus</i>	Não patogênico	Argentina	Levis <i>et al.</i> , 1997 Levis <i>et al.</i> , 1998
	Vírus Oran	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	HCPS	Argentina	Levis <i>et al.</i> , 1997 Levis <i>et al.</i> , 1998
	Vírus Pergamino	<i>Akadon azarae</i> e <i>Bolomys obscurus</i>	Não patogênico	Argentina	Levis <i>et al.</i> , 1997 Levis <i>et al.</i> , 1998
?	Vírus Anajatuba	<i>Oligoryzomys fornesi</i>	?	Brasil	Mendes <i>et al.</i> , 2001 Rosa <i>et al.</i> , 2005
?	Vírus Araraquara	<i>Bolomys lasiurus</i>	HCPS	Brasil	Johnson <i>et al.</i> , 1999 Suzuki <i>et al.</i> , 2004
?	Vírus Auracária	?	HCPS	Brasil	Raboni <i>et al.</i> , 2005

Continuação Tabela 2.

Espécie	Linhagem	Reservatório	Doença	Localização	Referência
<i>Vírus Cano Delgadito</i> (CADV)	Vírus Cano Delgadito	<i>Sigomdon alstoni</i>	?	Venezuela	Fulhorst <i>et al.</i> , 1997
?	Vírus Castelo dos Sonhos	?	HCPS	Brasil	Johnson <i>et al.</i> , 1999
?	Vírus Juquitiba	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	HCPS	Brasil	Monroe <i>et al.</i> , 1999 Suzuki <i>et al.</i> , 2004
<i>Vírus Laguna Negra</i> (LANV)	Vírus Laguna Negra	<i>Calomys laucha</i>	HCPS	Bolívia, Paraguai	Johnson <i>et al.</i> , 1997
<i>Vírus Rio Marmoré</i> (RIOMV)	Vírus Rio Marmoré	<i>Oligoryzomys microtis</i>	?	Bolívia, Peru	Hjelle <i>et al.</i> , 1996 Powers <i>et al.</i> , 1999
?	Vírus Rio Mearim	<i>Holochilus sciureus</i>	?	Brasil	Rosa <i>et al.</i> , 2005

? : Ausência de informação na literatura.

HCPS: síndrome cardiopulmonar associada a hantavírus

HFRS: febre hemorrágica com síndrome renal

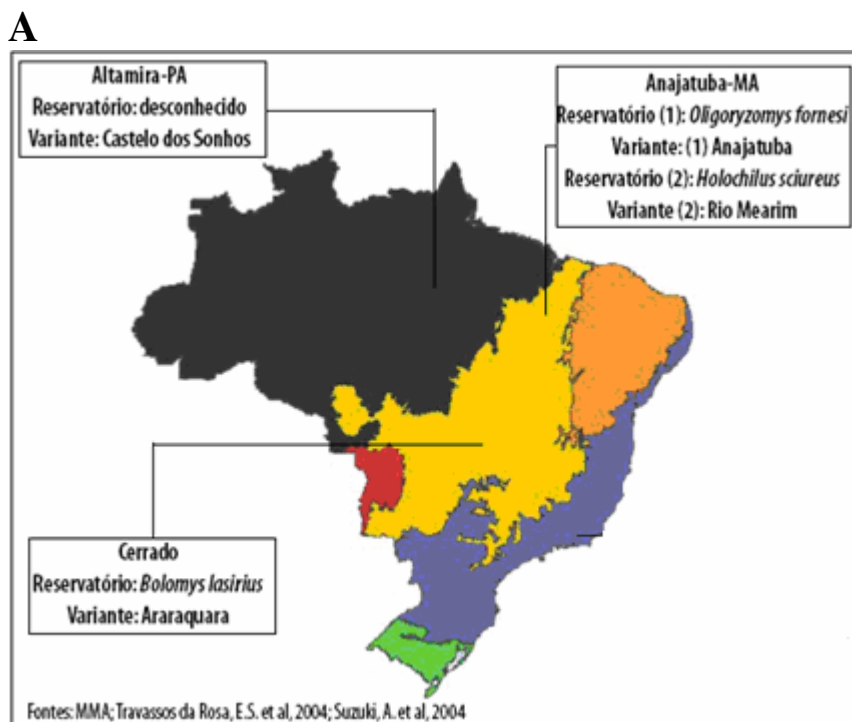


Figura 2. Distribuição geográfica dos casos de hantavirose ocorridos no Brasil. (A) Prováveis reservatórios e variantes virais circulantes no Brasil entre 1993 e 2004. (B) Áreas de transmissão do vírus em 2004 no Brasil. Ambas figuras foram obtidas a partir do boletim eletrônico epidemiológico de 2005 da Secretaria de Vigilância em Saúde (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005).

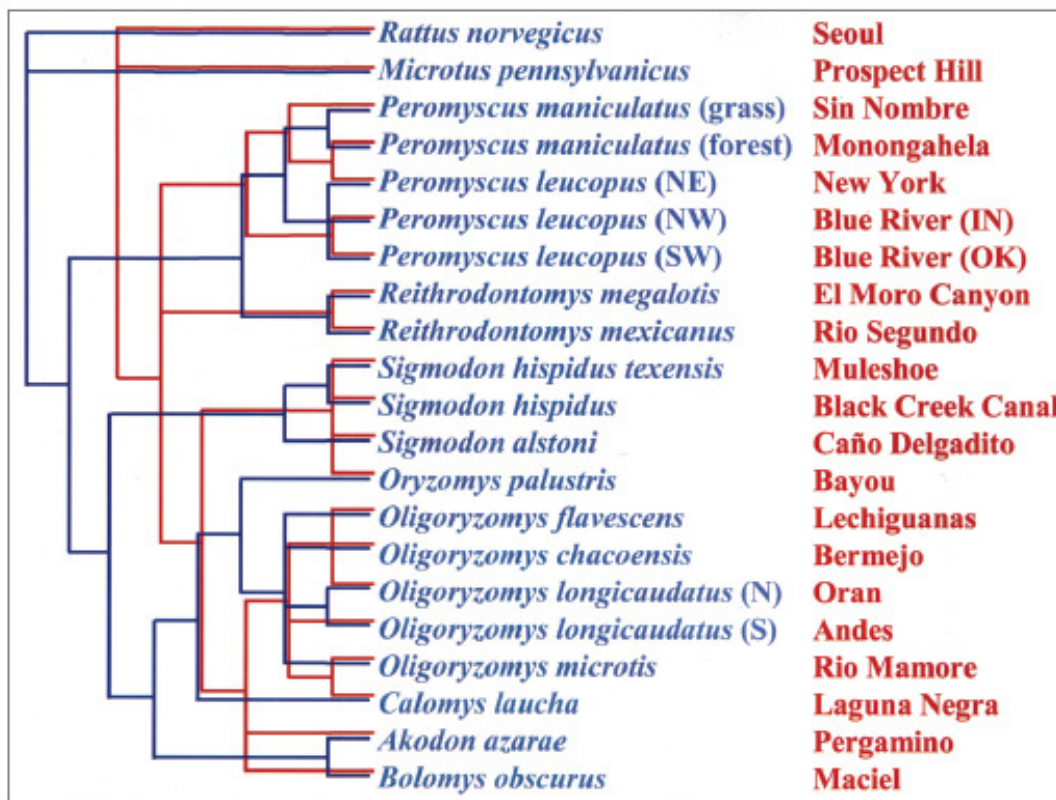


Figura 3. Coevolução de hantavírus e seus hospedeiros naturais (Yates *et al.*, 2002). As árvores filogenéticas de hantavírus (vermelho) e de seus hospedeiros (azul) indicam congruência no caminho evolutivo. A filogenia viral é baseada em seqüências dos segmentos M e S (Plyusnin & Morzunov, 2001) e seqüência de DNA do citocromo b mitocondrial foi empregada para a filogenia dos roedores (Smith & Patton, 1999).

Os hantavírus causadores de HCPS têm como reservatórios naturais roedores silvestres da subfamília *Sigmodontinae* e os hospedeiros de hantavírus em geral não apresentam efeitos deletérios da infecção (Schmaljohn e Hjelle, 1997). As árvores filogenéticas de hantavírus causadores de HFRS e HCPS coincidem com a filogenia de seus hospedeiros demonstrando coevolução entre essas entidades biológicas (Figura 3).

A transmissão do vírus para humanos ocorre em áreas rurais com alta densidade desses roedores, durante campanhas militares ou em áreas periurbanas com grande concentração humana e baixas condições sanitárias. O principal meio de transmissão é a inalação de aerosols contendo excretas e secreções de roedores infectados. Formas raras de contágio incluem mordidas de animais infectados e ingestão de alimentos contaminados por fezes e urina desses roedores. Transmissão pessoa-pessoa foi relatada em 1996 na Argentina envolvendo o ANDV (Padula *et*

al., 1998), mas esse tipo de contágio não foi observado para os demais hantavírus. A hipótese de transmissão oral do ANDV foi reforçada pela presença de partículas virais na saliva e pulmões e pela sua ausência em fezes e excretas em *O. longicaudatus* (Padula *et al.*, 2004).

A HCPS provoca lesões situadas principalmente nos pulmões, fígado, baço e linfonodos (Nolte *et al.*, 1995). Os pulmões, como consequência da infecção, tornam-se avermelhados e inchados com até o dobro do seu peso natural. Os tecidos apresentam danos vasculares com dilatação capilar e edema endotelial. As partículas virais provavelmente não estão relacionadas com destruição celular e com a indução do aumento da permeabilidade vascular, esta última típica das HCPS e HFRS. No caso de HCPS, estudos imuno-histoquímicos demonstraram extensa distribuição de antígenos virais em células endoteliais sem provocar necrose celular (Ferreira, 2003). A patogênese de hantavirose provavelmente está associada a uma resposta imune exagerada (Linderholm *et al.*, 1996).

O quadro clínico de pessoas com HCPS apresenta um período de incubação que pode variar de 0 a 33 dias, tendo 15 dias de média (Young *et al.*, 2000). Antes do aparecimento do edema pulmonar, observam-se durante 3 a 6 dias viremia e sintomas iniciais como febre, mialgias, náuseas, vômitos, diarreia, tosse, dispnéia e outros pródromos menos frequentes (Hallin *et al.*, 1996; Jenison *et al.*, 1995; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005). Em seguida a doença progride para a fase cardiopulmonar na qual ocorre progressiva infiltração de líquido nos alvéolos pulmonares. As consequências da alteração da permeabilidade vascular são taquipnéia, hipoxemia, taquicardia e, em estágios avançados, a hipotensão pode gerar choque e morte (Hallin *et al.*, 1996; Jenison *et al.*, 1995).

Estudos epidemiológicos realizados no Brasil com pacientes de HCPS descrevem a síndrome como aguda e de rápida evolução, de forma que o intervalo médio entre o início dos sintomas e a recuperação ou óbito é por volta de 10 dias, variação de 0 a 34 (Ferreira, 2003; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005). A taxa de letalidade varia entre 30 e 50% (Schmaljohn e Hjelle, 1997) e a ineficiência no diagnóstico contribui para esse alto índice. Não há tratamento específico ou vacina para HCPS, apenas procedimentos médicos como ventilação mecânica, controle hídrico e uso de drogas vasoativas.

O diagnóstico laboratorial, tanto da HCPS quanto da HFRS, é realizado principalmente por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), por IFA

(*immunofluorescence antibody assay*) e por RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*), sendo que o primeiro é o mais utilizado. O ELISA em questão baseia-se em ensaio direto para detecção de IgG e em ensaio de captura para detecção de IgM no soro de pacientes a partir de componentes estruturais virais. Para tanto, são utilizados preparados de proteínas virais obtidos em infecções de culturas de células ou em sistemas de expressão heteróloga.

Assim, foram e estão sendo desenvolvidos sistemas de expressão heteróloga para o nucleocapsídeo e/ou para as glicoproteínas em *E. coli* (Elgh *et al.*, 1997; Jenison *et al.*, 1994), células de inseto (Morii *et al.*, 1998; Araki *et al.*, 2001; Sjölander *et al.*, 2000) e células de mamíferos (Billecocq *et al.*, 2003, Pensiero *et al.*, 1988) visando aperfeiçoamento do diagnóstico laboratorial. O aprimoramento da detecção de infecções causadas por hantavírus é de singular importância para o caso de HCPS, pois o período de infecção que leva ao óbito é relativamente breve. No Brasil, o diagnóstico laboratorial de HCPS é realizado no Instituto Adolfo Lutz (São Paulo), no Instituto Evandro Chagas (Belém) e na Fiocruz (Rio de Janeiro) e é baseado em kits comerciais de MAC-ELISA (IgM *antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay*) com preparados protéicos recombinantes do ANDV em culturas de células.

Ciclo de replicação

A entrada do vírus nas células endoteliais e do sistema imune ocorre por interações entre a partícula viral e componentes celulares. As integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ celulares foram descritas como cruciais para a entrada do SNV, NYV (Gavrilovskaya *et al.*, 1998), HTNV, SEOV e PUUV (Gavrilovskaya *et al.*, 1999) na célula hospedeira. A interação específica entre integrina β_3 e o HTNV reafirma seu papel de receptor (Mou *et al.*, 2006). Integrinas formadas pela subunidade β_1 foram descritas como receptores para o vírus não patogênico PH, indicando uma correlação entre patogenicidade e o receptor envolvido (Gavrilovskaya *et al.*, 1999; Larson *et al.*, 2005). Em experimentos com o HTNV, proteínas de 30kDa (Kim *et al.*, 2002) e 70kDa (Mou *et al.*, 2006) foram identificadas como candidatas a receptores, co-receptores ou moléculas alternativas de interação com esse vírus.

A internalização da partícula viral do HTNV ocorre por meio de endocitose dependente de clatrina e assim a partícula viral envelopada percorre a via endocítica em vesículas endossomais e lisossomais (Jin *et al.*, 2002). Conseqüentemente, o pH da vesícula é reduzido (aproximadamente 6,3) provocando a ativação fusogênica de G2 e a fusão do envelope viral e a membrana endossomal (Arikawa *et al.*, 1985; McCaughey *et al.*, 1999; Ogino *et al.*, 2004; Tischler *et al.*, 2005b). Os nucleocapsídeos são liberados e desmontados no citoplasma tornando os segmentos genômicos disponíveis para a síntese das proteínas virais e para a sua replicação. O segmento M é traduzido em uma poliproteína precursora e que, durante sua translocação para o retículo endoplasmático, é inserida na membrana e clivada em G1 e G2. As glicoproteínas são transportadas para o Golgi (Spiropoulou *et al.*, 2003; Deyde *et al.*, 2005), etapa essencial para formação do heterodímero G1/G2 maduro.

Para a maioria dos membros da família *Bunyaviridae*, a montagem e brotamento da partícula viral ocorrem em membranas intracelulares do Golgi. A liberação de vírions, para finalizar o ciclo de replicação, é consistente com a via de secreção vesicular. Entretanto, para o BCCV (Ravkov *et al.*, 1997) e o SNV (Goldsmith *et al.*, 1995), a montagem da partícula viral foi descrita na membrana plasmática. Em adição, microfilamentos de actina foram descritos como essenciais para a montagem da partícula viral via interação da proteína N com actina monomérica e polimerizada (Ravkov *et al.*, 1998). Foi sugerido, então, que a maturação da partícula viral de hantavírus do novo mundo ocorre na membrana plasmática e é diferenciada do restante da família *Bunyaviridae*.

O genoma

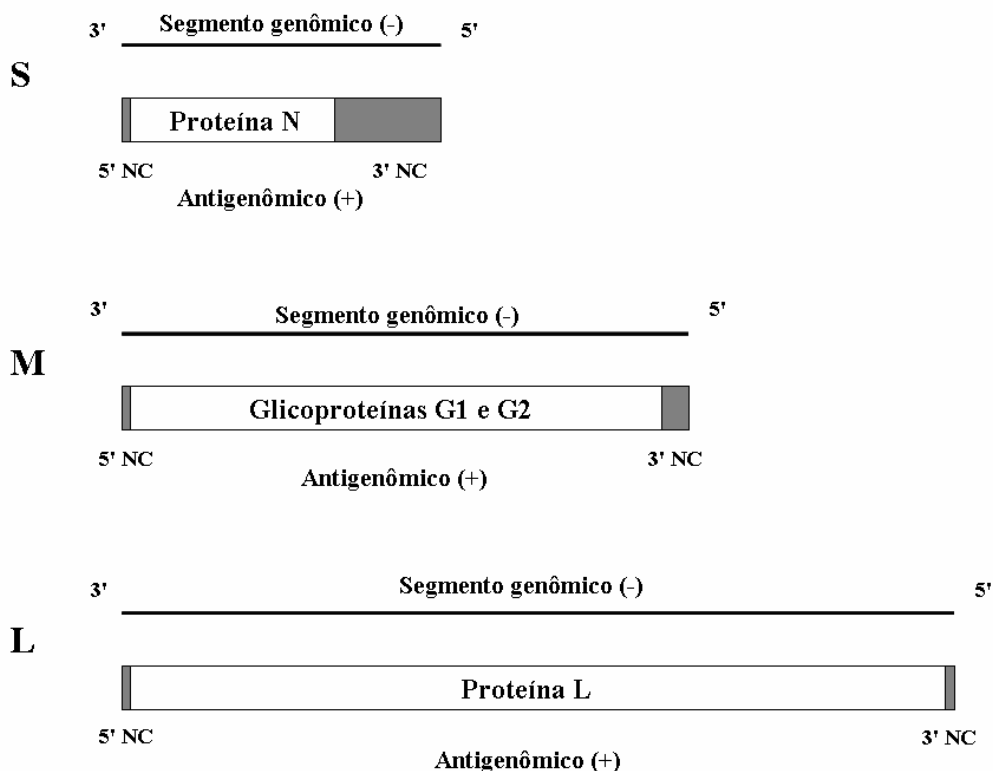
O gênero *Hantavirus* é composto por vírus de genoma de RNA fita simples negativa e trisegmentado (Figura 3A). O segmento *small* (S) tem extensão extremamente variável (1,8 a 2,1kb) e codifica a proteína do nucleocapsídeo (N) (Schmaljohn *et al.*, 1986). Uma fase de leitura aberta para uma proteína não estrutural (NS_s) de 7 a 10kDa é encontrada nesse segmento em vários hantavírus (BAYV, BCCV, ELMCV, ISLAV, KBRV, NYV, PHV, PUUV, RIOSV, SNV, TULV). Embora a proteína NS_s ainda não tenha sido detectada, a baixa frequência de mutações nessa porção do genoma sugere que essa fase de leitura seja funcional em

alguns vírus como SNV, PUUV e TULV (Bowen *et al.*, 1995; Plyusnin *et al.*, 1994). O segmento *medium* (M) tem extensão de 3,7 a 3,8kb e codifica um precursor glicoprotéico posteriormente processado nas glicoproteínas G1 e G2 (Schmaljohn *et al.*, 1987). Por fim, o segmento *large* (L) de 6,5 a 6,7kb é codificador da proteína L ou RNA polimerase dependente de RNA (Schmaljohn, 1990).

As terminações 3' e 5' dos segmentos genômicos são conservadas, complementares e capazes de formar estrutura secundária pareada, cuja semelhança com o cabo de uma panela originou a terminologia em inglês *panhandle* que a designa (Figura 3B), característica presente em toda a família *Bunyaviridae*. Nos hantavírus a estrutura de *panhandle* tem 17pb, dos quais 14 são específicos do gênero, e apresenta falha na complementariedade na posição 9. Em alguns membros do gênero, um pareamento não Watson-Crick está presente na posição 10 (HTNV, SEOV, PUUV, SNV e BCCV). A estrutura de *panhandle* nos segmentos genômicos de hantavírus está envolvida em mecanismos de regulação da transcrição e replicação, no processo de encapsidação do genoma (Mir & Panganiban, 2004) e na proteção do próprio material genético viral.

Entre diferentes soro/genótipos de hantavírus, a identidade de nucleotídeos nos três segmentos genômicos varia de 60 a 70%. Já a identidade de aminoácido de produtos protéicos varia de 70 a 90% para a proteína L, de 60 a 85% para a proteína N e de 50 a 80% para as glicoproteínas G1 e G2. Entre diferentes linhagens de um soro/genótipo de hantavírus diversos níveis de variabilidade são encontrados. Por exemplo, enquanto o segmento M de linhagens do HTNV apresentam 6% de variabilidade (Schmaljohn *et al.*, 1988), as linhagens do SNV apresentam 13 a 14% (Spiropoulou *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995).

A



B

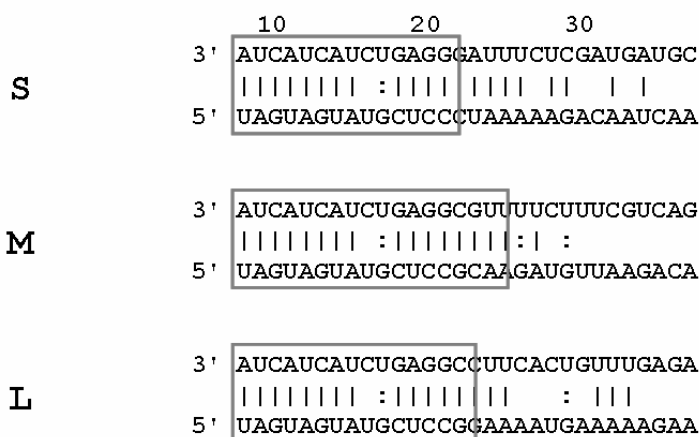


Figura 3. Estrutura do genoma viral do gênero *Hantavirus*. (A) Os segmentos S, M e L estão esquematizados de forma a destacar a sua orientação negativa e sua fase de leitura aberta. Em azul estão destacadas as seqüências não-codificadoras (NC). (B) Estrutura de *panhandle* formada pelas extremidades 3' e 5' dos segmentos genômicos do HTNV. As seqüências terminais específicas do gênero estão destacadas.

Na família *Bunyaviridae*, o início da transcrição e a entrada do mRNA viral na maquinaria traducional têm sido relacionados ao mecanismo de *cap-snatching* descrito para o vírus influenza. Neste mecanismo, a atividade endonuclease da RNA polimerase dependente de RNA cliva mRNAs celulares gerando pequenos fragmentos de RNA contendo 5'-cap, que atuam como iniciadores para a transcrição viral (Rao *et al.*, 2003). Em alguns gêneros da família *Bunyaviridae*, deleções e extensões terminais de nucleotídeos ausentes no genoma viral foram encontrados no mRNA (Garcin *et al.*, 1995; Dobbs *et al.*, 1997).

A replicação do genoma e a síntese de mRNA têm como mecanismo de iniciação o modelo de iniciação-e-realinamento (Garcin *et al.*, 1995; Figura 4). Como evidência deste processo, as moléculas de mRNA do HTNV apresentam um resíduo G na posição -1 e deleções terminais. Em adição, os segmentos genômicos deste vírus apresentam um resíduo U terminal na posição +1 e extremidade 5' contendo monofosfato, indicando que essas cadeias não tiveram sua síntese iniciada por UTP. Deleções e adições de nucleotídeos podem estar associadas a esse mecanismo de replicação e, para o TULV, os segmentos genômicos S e L apresentaram freqüente heterogeneidade em suas terminações 3' (Kukkonen *et al.*, 1998).

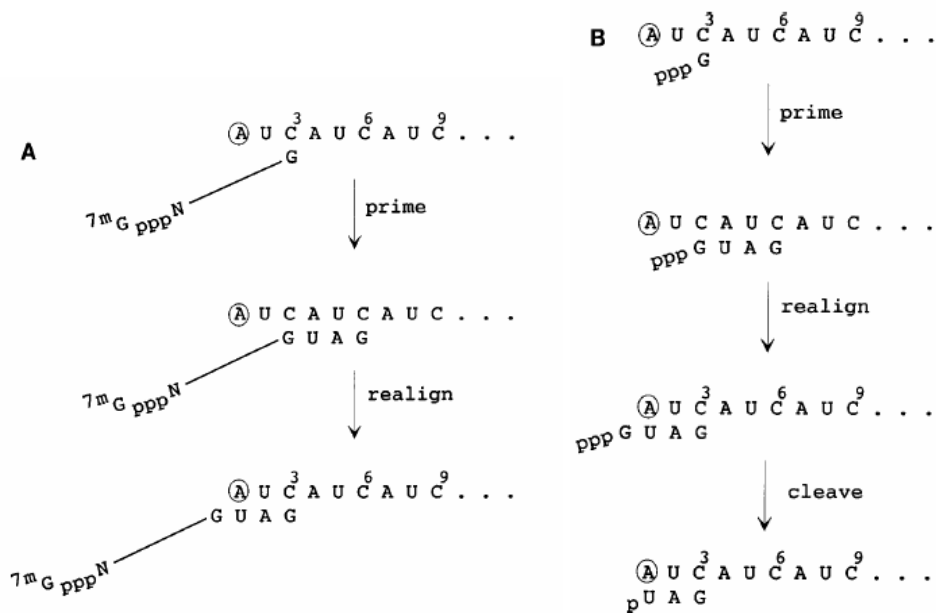


Figura 4. Modelo de iniciação-e-realinhamento para início da síntese de mRNA e genoma do HTNV (Garcin *et al.*, 1995). (A) Início da síntese de mRNA. Iniciadores de RNA celular contendo 5'-cap anelam na posição +3 [C] da extremidade 3' do molde e iniciam a elongação por alguns nucleotídeos. A molécula em síntese dissocia-se do molde, reanela na posição -1 [nucleotídeo G do iniciador não-pareado] e a elongação é reiniciada tendo como consequência a adição de um resíduo G na extremidade 5'. Se os iniciadores celulares anelassem primeiramente na posição +6, o resultado seria deleção de uma das repetições AUC. (B) Início da síntese do genoma. RNA polimerases virais iniciam a síntese com ATP ou GTP, no caso do HTNV, a polimerização de RNA é iniciada por GTP. O mecanismo em geral é semelhante ao descrito acima, com exceção do início via GTP e um passo de clivagem após o realinhamento para remoção do trifosfato, restando um pU na posição +1.

A proteína do nucleocapsídeo

A proteína N de 49 a 51kDa é constituída por 428 a 433 aminoácidos incluindo 4 cisteínas conservadas. Essa proteína estrutural é produzida em excesso em células infectadas e pode formar corpos de inclusão granulares e filamentosos (Hung, 1998). Apesar de anticorpos neutralizantes estarem associados às glicoproteínas do envelope, a proteína N é o antígeno viral mais imunogênico em pacientes (Geimonen *et al.*, 2003b; Jenison *et al.*, 1994). O epitopo imunogênico dominante de N do HTNV é localizado na região aminoterminal nos resíduos 26-46 (Kang *et al.*, 2001), dado coincidente para o SNV cujas posições 17-59 estão

associadas a uma maior imunogenicidade (Jenison *et al.*, 1994). A caracterização de imunogenicidade da proteína N de outros hantavírus também indica a imunodominância dos 120 resíduos amino-terminais (Lundkvist *et al.*, 1995; Gött *et al.*, 1997; Tischler *et al.*, 2005a). Para o ANDV, um outro epitopo imunodominante para humanos foi descrito por Tischler e colaboradores (2005a) nos resíduos 248 a 260.

Estudos com culturas de células e expressão heteróloga da proteína N demonstraram a oligomerização dessa proteína (Alfadhli *et al.*, 2001; Yoshimatsu *et al.*, 2003). Aglomerados de alto peso molecular foram identificados, com predomínio da forma trimérica. O mapeamento de resíduos envolvidos na oligomerização indica um papel essencial dos 40 resíduos amino-terminais e do segmento carboxi-terminal da proteína N (Alfadhli *et al.*, 2001). A pequena porção amino-terminal em questão parece apresentar motivos *coiled coils*. Na região carboxi-terminal, os resíduos 373-387, 388-403 e 404-421 estariam envolvidos na formação de uma hélice-volta-hélice e estudos de modelagem molecular e de duplo-híbrido em mamífero e em levedura mostraram sua importância para a oligomerização (Yoshimatsu *et al.*, 2003; Kaukinen *et al.*, 2004; Figura 5). O processo de multimerização é considerado tipo específico, assim, dependendo do hantavírus estudado resíduos adicionais podem ser incluídos ou descartados (Yoshimatsu *et al.*, 2003). A oligomerização da proteína N também está associada a sua localização na região perinuclear. Os últimos 141 resíduos carboxi-terminais estão diretamente envolvidos na associação periférica da proteína N do BCCV com membranas do Golgi no espaço perinuclear (Ravkov & Compans, 2001).

Em adição, a concentração da proteína N no espaço perinuclear está conectada com sua ligação às proteínas celulares Ubc9 (*small ubiquitin-like modifier-1 conjugating enzyme*), SUMO-1 (*small ubiquitin-like modifier-1*) e outras proteínas relacionadas. Sumoilação é uma modificação pós-traducional na qual uma molécula de SUMO é adicionada a um resíduo de lisina da proteína alvo via ligação isopeptídica. A conjugação de SUMO-1 a proteínas celulares está implicada em processos de estabilização de proteínas, de transporte nuclear, controle do ciclo celular e oncogênese (Saitoh *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 2001). O processo de sumoilação envolve enzimas de ativação, conjugação (Ubc9) e ligação. Os resíduos de aminoácidos 101 a 238 da proteína N foram descritos como responsáveis por essas interações, sendo o motivo MKAE contido nessa seqüência crucial para a

ligação e presente em vários hantavírus. O motivo MKAE foi diretamente associado à localização da proteína N na região perinuclear (Maeda *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Kaukinen *et al.*, 2003).

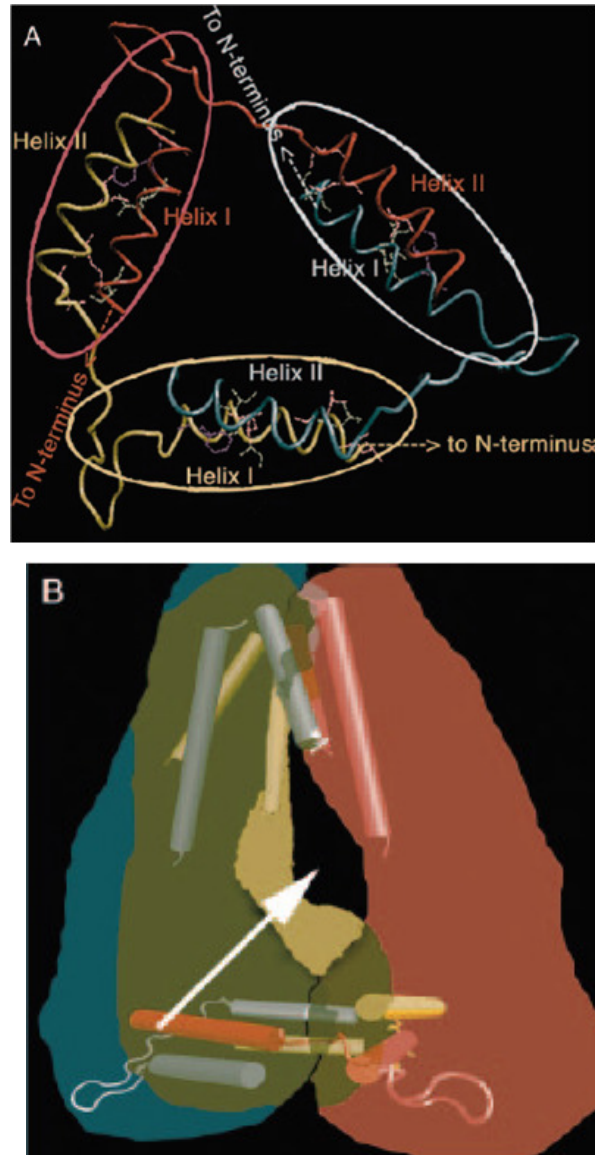


Figura 5. Modelo de oligomerização da proteína N (Kaukinen *et al.*, 2004). (A) Modelagem computacional da região C-terminal do trímico da proteína N. As regiões C-terminais de três moléculas de N estão simbolizadas pelas elipses em vermelho, amarelo e azul. A hélice I de uma molécula é arranjada conformacionalmente de forma a interagir com a hélice II de um outro monômero. (B) Modelo tridimensional de um trímico de proteína N reconstruído por micrografias eletrônicas de uma amostra marcada negativamente. Os três monômeros estão ilustrados em vermelho, amarelo e azul. As hélices estão simbolizadas por cilindros e os motivos *coiled-coils* nas porções N-terminal estão ilustrados em cima e as hélice-volta-hélice nas porções C-terminal estão na porção inferior da figura. A seta indica a provável orientação do RNA viral.

Em comparação a outros modelos virais, a proteína N pode estar envolvida em diversos mecanismos de regulação da transcrição e replicação, no processo de encapsidação do genoma viral e na montagem da partícula viral. Para testar essas hipóteses, a interação da proteína N produzida em sistemas heterólogos e RNA viral de hantavírus foi analisada (Got *et al.*, 1993; Severson *et al.*, 1999). Construções truncadas da proteína N foram expressas em *E. coli* e sua capacidade de ligar RNA viral foi analisada para mapear domínios de ligação ao RNA na proteína N. Por meio de ensaios de ligação por filtração e gel de retardamento, um domínio de ligação específico para RNA viral de hantavírus foi identificado entre os resíduos 195 a 217 da proteína N (Xu *et al.*, 2002; Severson *et al.*, 2005). Os aminoácidos E192, Y206 e S217 e lisinas distribuídas entre as posições 175 a 429 foram identificados como essenciais para a ligação ao RNA viral.

Nesses estudos, a proteína N apresentou ligação específica ao RNA viral genômico e antígenômico apresentando interação fraca com RNA viral mensageiro (apenas a fase aberta de leitura da proteína N, excluídas as seqüências não-codificadoras; Severson *et al.*, 1999). A terminação 5' não-codificadora do segmento genômico S do HTNV demonstrou forte interação com o domínio de ligação de RNA da proteína N (Severson *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002). Por fim, a ligação específica da proteína N trimérica ao *panhandle* do segmento S genômico do SNV foi demonstrada, enquanto as formas mono e diméricas apresentam ligação semi-específica e sensível à presença de sal (Mir & Panganiban, 2004). Assim, foi sugerido que a trimerização da proteína N produziria um complexo protéico capaz de discernir entre moléculas de RNA viral e não viral nos primeiros estágios de encapsidação e montagem da partícula viral.

Em seguida, Mir & Panganiban (2005) detalharam a interação trímero de proteína N e *panhandle* dos três segmentos genômicos do SNV. Seus resultados mostraram que a proteína trimérica liga-se com alta afinidade ao *panhandle* dos segmentos genômicos S, M e L e com baixa afinidade a moléculas complementares aos segmentos genômicos. A interação RNA/proteína é dependente da estrutura secundária e da seqüência primária do *panhandle* e é capaz de provocar rearranjos conformacionais na proteína N trimérica.

A montagem da partícula viral foi relacionada também à capacidade da proteína N de ligar-se a filamentos de actina (Ravkov *et al.*, 1998). Como a montagem da partícula viral dos hantavírus do novo mundo provavelmente ocorre na

membrana plasmática, a interação da proteína N com esse elemento do citoesqueleto está sendo relacionada com o transporte de elementos estruturais virais do Golgi e citoplasma para a periferia celular. O papel dessa interação na morfogênese do BCCV foi estabelecido uma vez que células infectadas tratadas com inibidores de polimerização de actina tiveram sua produção viral drasticamente reduzida (Ravkov *et al.*, 1998).

As glicoproteínas

A maior fase de leitura do segmento genômico M é de aproximadamente 3400 nucleotídeos e codifica um precursor peptídico de 1135 aminoácidos. A clivagem do precursor durante sua translocação no retículo endoplasmático origina as glicoproteínas G1 e G2. As glicoproteínas virais são proteínas transmembrânicas de tipo I, cujos domínios luminais ricos em cisteína constituem heterodímeros com conformações espaciais altamente ordenadas. O heterodímero G1/G2 é relacionado com a ligação aos receptores na célula hospedeira.

A ancoragem no retículo endoplasmático é realizada pela região C-terminal gerando caudas citoplasmáticas de 142 resíduos em G1 e de 8 resíduos em G2. O precursor glicoproteico apresenta sete sítios potenciais para N-glicosilação e quatro domínios hidrofóbicos. O domínio hidrofóbico I envolve os resíduos 1 a 17 e tem função de peptídeo sinal. Os domínios II e IV são os domínios transmembrânicos de G1 e G2 respectivamente. O domínio III é também um peptídeo sinal e encontra-se na porção amino-terminal de G2 nos resíduos 627 a 648, contendo em seu término um motivo WAASA altamente conservado (Löber *et al.*, 2001; Figura 6).

O precursor glicoproteico apresenta sete sítios potenciais para N-glicosilação, cinco em G1 e dois em G2 (Figura 6). Shi & Elliott (2004) demonstraram que, para o HTNV, os sítios N134, N235, N347, N399 e N928 são efetivamente N-glicosilados e sensíveis a endoglicosidase H. Em adição, a N-glicosilação das glicoproteínas do HTNV foi descrita como essencial para o correto dobramento, transporte intracelular e formação correta do heterodímero. O sítio N134 N-glicosilado é crucial para os processos descritos e os outros sítios desempenham um papel aditivo. Por outro lado, não foi identificada glicosilação no sítio N609 o que era previsto uma vez que esse resíduo é localizado no citosol. O

dobramento das glicoproteínas G1 e G2 é auxiliado pelas chaperonas calnexina e calreticulina, ambas presentes no retículo endoplasmático, via interação com cadeias de glicanas N-ligadas.

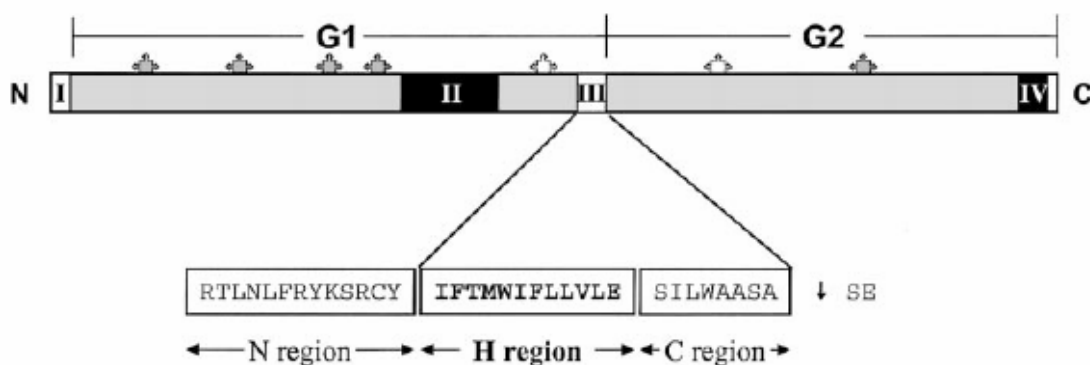


Figura 6. Estrutura do precursor glicoproteico do HTNV e o sítio potencial de clivagem (Löber *et al.*, 2001). O esquema indica quatro domínios hidrofóbicos I-IV, contidos nos resíduos 1 a 17 (I), 441-515 (II), 627-648 (III) e 1097-1127 (IV). O sítio de clivagem em G1 e G2 está apontado pela seta logo após o domínio hidrofóbico III. Os sítios potenciais para N-glicosilação estão ilustrados por quadrados, os cinco sítios com maior probabilidade de glicosilação estão diferenciados em cinza. Em concordância com regras descritas para potenciais peptídeos sinais (Perlman & Halvorson, 1983; von Heijne, 1983; von Heijne, 1986), o domínio hidrofóbico III é dividido em três regiões distintas (N= básica, H= hidrofóbica, C= polar). O motivo WAASA é localizado no término da região C do domínio III e é altamente conservado entre diferentes hantavírus.

Em hantavírus do novo mundo, a cauda citoplasmática da proteína G1 possui um motivo ITAM (*immunoreceptor tyrosine activation motif*) constituído por duas seqüências Yxx(L/I) em tandem (Geimonen *et al.*, 2003a). A presença desse motivo em G1 sugere um provável mecanismo de modulação do sistema imune via cascata de transdução de sinal o que pode estar relacionado com a diferença de patogênese entre as espécies causadoras de HCPS e de HFRS. O domínio ITAM de hantavírus contém resíduos de tirosina (Y619 e Y632) altamente conservados que direcionam a ubiquitinação de G1 e sua degradação via proteassoma (Geimonen *et al.*, 2003b). Os baixos níveis de G1 e G2 extraídos de células infectadas e os baixos níveis de expressão de G1 em sistemas recombinantes podem ser explicados por esse mecanismo (Geimonen *et al.*, 2003b; Pensiero *et al.*, 1988).

A entrada da partícula viral via endocitose é dependente da fusão do envelope viral com a membrana do endossomo. A glicoproteína G2 está relacionada

a esse processo por meio de um peptídeo fusogênico de classe II localizado nos resíduos 763 a 780 do glicoprecursor e dentro dos 130 resíduos amino-terminais de G2 do ANDV (Tischler *et al.*, 2005b). A análise dessa seqüência indica razoável conservação de aminoácidos entre membros da família *Bunyaviridae*, indicando um mecanismo de fusão conservado. A localização do peptídeo fusogênico (dentro dos 130 resíduos amino-terminais de G2) e a numerosa presença de folhas β pregueadas observadas em estudos de modelagem molecular sugerem a classificação desse peptídeo fusogênico como de classe II. A comparação com peptídeos fusogênicos de classe II anteriormente descritos reafirma a provável atividade fusogênica desse domínio de G2 (Figura 7).

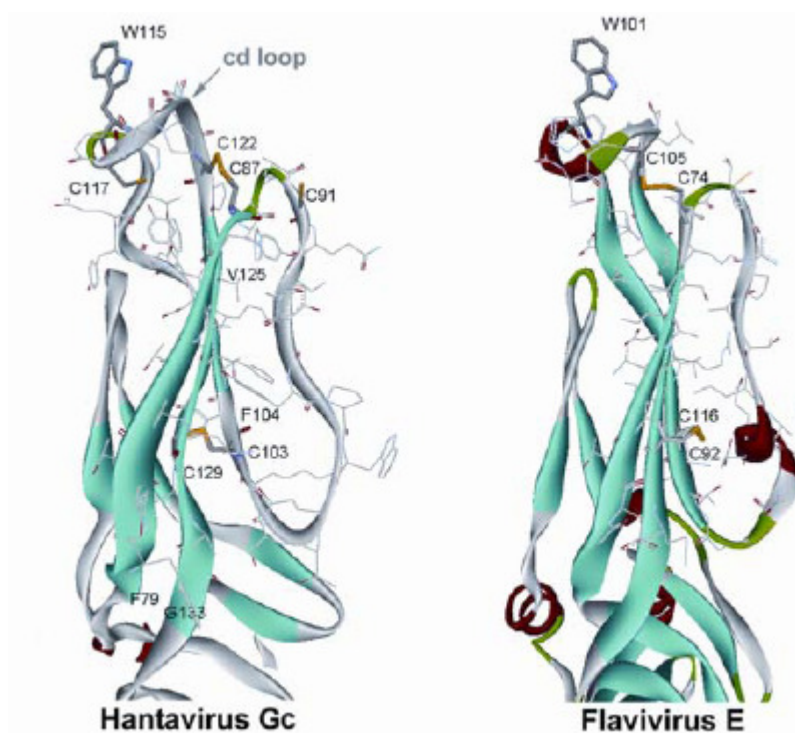


Figura 7. Modelagem molecular do domínio fusogênico de G2 de hantavírus em comparação ao descrito para a proteína E de flavivírus (Tischler *et al.*, 2005b). A ilustração indica as folhas pregueadas em verde e resalta um *loop* e um resíduo de triptofano (W115/W101) conservados entre ambas as moléculas e envolvidos na atividade fusogênica.

Após a clivagem cotraducional do precursor glicoproteico, as glicoproteínas G1 e G2 ancoradas no retículo endoplasmático formam heterodímeros que posteriormente são transportados para o complexo de Golgi. O transporte das glicoproteínas é dependente da formação do heterodímero de forma que há retenção de G1 ou G2 no retículo endoplasmático quando ocorre produção de apenas uma das

glicoproteínas (Spiropoulou *et al.*, 2003; Deyde *et al.*, 2005). Em experimentos com o SNV, o tráfego das glicoproteínas indica acúmulo no complexo de Golgi e, em estágios avançados de expressão e infecção, a presença dessas proteínas na membrana plasmática também foi observada (Spiropoulou *et al.*, 2003).

Como a seqüência codificadora do segmento genômico M é a menos conservada e G1 é a proteína de hantavírus de maior variabilidade (Kukkonen *et al.*, 1998), a imunogenicidade das glicoproteínas pode variar de forma considerável entre diferentes genótipos de hantavírus. Para o ANDV, o principal epitopo de G1 reconhecido por soro humano foi mapeado nos resíduos de aminoácidos 14 a 26, enquanto que anticorpos de roedores reconheceram predominantemente o epitopo 599 a 611 de G1. Para a glicoproteína G2, o soro de ambos homens e roedores reagiu com três sítios, compreendidos nos resíduos de aminoácidos 691 a 703, 918 a 930 e 955 a 967 (Tischler *et al.*, 2005a).

A indução de anticorpos neutralizantes está vinculada às glicoproteínas virais uma vez que essas proteínas são responsáveis pela entrada do vírus na célula e conseqüentemente determinam a suscetibilidade do hospedeiro. Assim, sítios de neutralização foram identificados tanto em G1 quanto em G2 (Heiskanen *et al.*, 1997; Heiskanen *et al.*, 1999; Koch *et al.*, 2003). Ensaio de neutralização de infecção envolvendo vacinas de DNA e anticorpos anti-glicoproteínas mostraram-se promissores (Hooper *et al.*, 2001; Bharadwaj *et al.*, 2002; Rizvanov *et al.*, 2003; Custer *et al.*, 2003).

A proteína L

A proteína L é codificada por uma fase de leitura aberta de 2150 aminoácidos no segmento genômico L cuja massa é de aproximadamente 250kDa (Schmaljohn, 1990). A proteína L de hantavírus contém os motivos (pré-A, A, B, C, D e E) associados à atividade polimerase dependente de RNA (Poch *et al.*, 1989). Os resíduos altamente conservados desses motivos constituem o domínio de polimerase dessa proteína e incluem os resíduos glutamato e lisina, localizados entre os motivos pré-A e A, e o tetrapeptídeo E(F/Y)XS específicos para polimerases de vírus de genoma fita simples negativo (Müller *et al.*, 1994). A atividade polimerase da proteína L está implicada na replicação do genoma e na transcrição (Figura 8).

Assim como a proteína N, a proteína L também associa-se a membranas perinucleares de forma periférica (Kukkonen *et al.*, 2004). A localização da proteína L no espaço perinuclear é independente das outras proteínas virais, mas apresenta colocalização parcial com a proteína N e o complexo de Golgi.

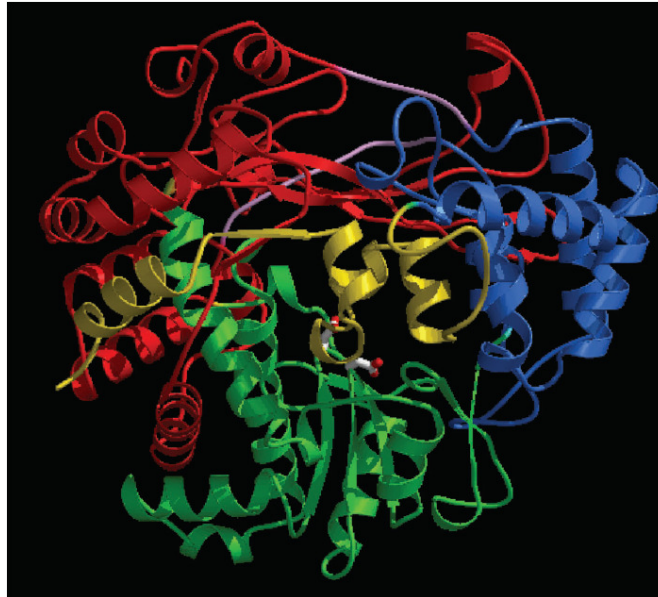


Figura 8. Estrutura de mão direita da polimerase do bacteriófago $\Phi 6$ (Grimes & Stuart *in* van Dijk *et al.*, 2004). Em vermelho estão destacados os dedos, em verde a palma, em azul o polegar e em amarelo o domínio de iniciação. Os motivos descritos para polimerases dependentes de RNA estão presentes na maioria no subdomínio da palma.

Evolução dos hantavírus

Em contraste aos outros membros da família *Bunyaviridae*, os quais são vírus associados a artrópodes, o gênero *Hantavirus* é composto por vírus cujos reservatórios naturais são vertebrados dos táxons *Rodentia* e *Insectivora*. A análise filogenética realizada por Chizhikov e colaboradores (1995) da proteína L dos gêneros da família *Bunyaviridae* reflete essa particularidade dos reservatórios. Enquanto os bunya-, phlebo- e tospovírus provavelmente apresentam um ancestral comum, os hantavírus formam um grupo independente sugerindo origem filogenética diferenciada.

A filogenia de hantavírus é estritamente relacionada aos seus hospedeiros naturais sugerindo coevolução entre essas entidades biológicas. De acordo com a subfamília de roedor envolvida, os hantavírus podem ser divididos em três grupos distintos (Hughes & Friedman, 2000; Plyusnin *et al.*, 1996a; Figura 9). Os hantavírus associados às subfamílias *Arvicolinae* e *Sigmodontinae* são mais relacionados entre si do que em relação aos hantavírus associados à subfamília *Murinae*. Esse dado corrobora a hipótese de coevolução vírus/hospedeiro já que as subfamílias *Arvicolinae* e *Sigmodontinae* são altamente aparentadas (Smith & Patton, 1999).

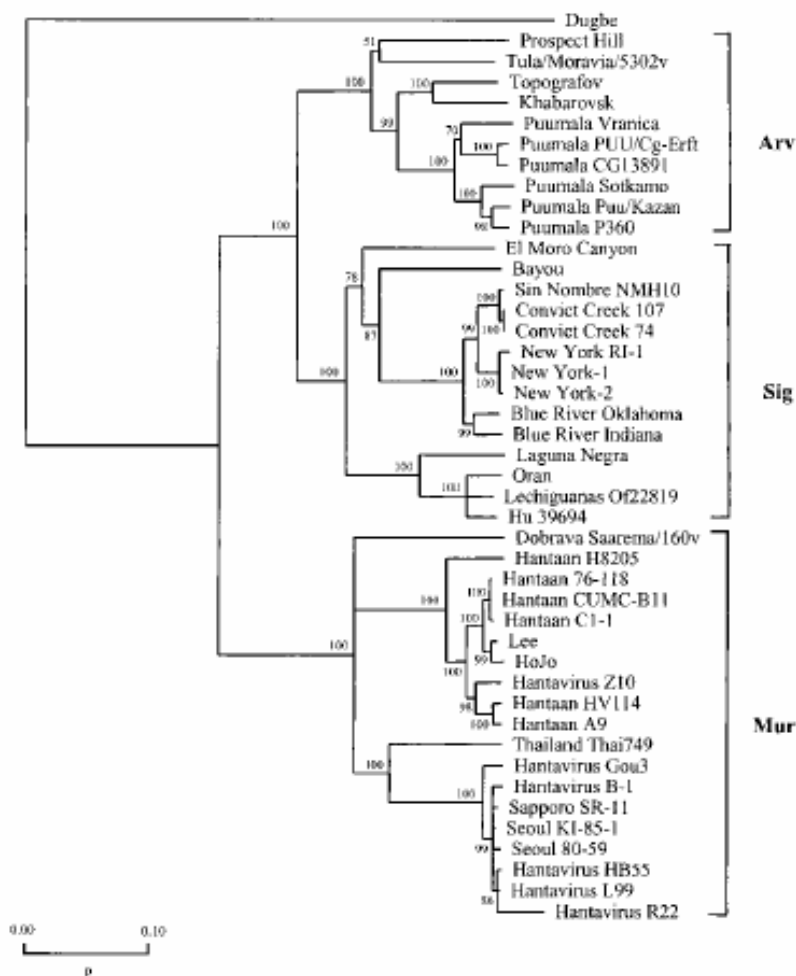


Figura 9. Árvore filogenética baseada em diferenças de aminoácidos no gene do segmento M (Hughes & Friedman, 2000). Três agrupamentos distintos de hantavírus podem ser identificados: Arv, Sig e Mur. O grupo Arv é encontrado nos roedores da subfamília *Arvicolinae* e incluem hantavírus do velho e novo mundo. O grupo Sig designa hantavírus associados à subfamília *Sigmodontinae* e a HCPS. O grupo Mur é restrito a hantavírus do velho mundo carregados por roedores da subfamília *Murinae*. A seqüência do vírus Dugbe foi usada como grupo externo.

O TPMV, único hantavírus cujo hospedeiro natural pertence à classe *Insectivora*, apresenta um ancestral comum com o restante do gênero (Xiao *et al.*, 1994). Assim, descartando a possibilidade de reintrodução de hantavírus nesse processo evolutivo, um hantavírus haveria coexistido com um mamífero ancestral anteriormente à divisão *Rodentia* e *Insectivora*.

Dentro de um genótipo de hantavírus, variantes genéticas apresentam ramificação dependente da distribuição geográfica. O impacto da geografia na árvore filogenética em subtipos de hantavírus foi observado para o PUUV (Heiske *et al.*,

1999; Escutenaire *et al.*, 2001; Sironen *et al.*, 2001), TULV (Song *et al.*, 2004) e outros. A dependência da variabilidade de populações de hantavírus na distribuição geográfica foi evidenciada durante o período pós-glaciação 10000 anos atrás, no qual um processo de isolamento geográfico e posterior recolonização de áreas inabitáveis ocorreu. Assim, a região da Fennoscandinávia na Europa constitui um ótimo modelo de estudo da coevolução de hantavírus e seus hospedeiros (Siivonen, 1982). Em uma distância de apenas 50km dentro da Suécia encontram-se duas vertentes (norte e sul) de recolonização do território após isolamento geográfico por causa da glaciação. Como consequência, duas sub-linhagens do PUUV são encontradas nos limites da antiga barreira geográfica (Hörling *et al.*, 1996; Asikainen *et al.*, 2000).

Os principais mecanismos envolvidos no processo evolutivo dos hantavírus são a deriva genética (substituições, deleções e inserções de nucleotídeos) e o desvio genético (recombinação de segmentos genômicos). A deriva genética parece constituir a maior fonte de variabilidade em hantavírus. A recombinação de segmentos genômicos entre espécies de hantavírus é obscura, por outro lado, a recombinação foi observada entre variantes genéticas de uma mesma espécie viral (Henderson *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995).

Os hantavírus da América da Sul constituem um ramo distinto da árvore filogenética dos hantavírus do Novo Mundo, cujo ancestral é o mesmo dos três outros grupos de hantavírus americanos, associados aos roedores *Peromyscus*, *Reithrodontomys* e *Oryzomys/Sigmodon*. No ramo sul-americano, há divergência evolutiva entre os hantavírus do clado argentino/chileno e os encontrados no Paraguai (LNV) e Bolívia (RMV). Dentro do clado argentino/chileno, três grupos distintos podem ser distinguidos. Um sub-clado é formado pelos genótipos Lechiguanas, Bermejo, Hu39694 e Oran. O segundo inclui os vírus Pergamino e Maciel. As linhagens do vírus Andes formam, por fim, o terceiro sub-clado (Bohlman *et al.*, 2002; Figura 10).

A linhagem brasileira Jucituba, identificada em São Paulo do primeiro caso de HCPS no Brasil em 1993, foi caracterizada geneticamente pela amplificação de um fragmento de 139 nucleotídeos do segmento M (Monroe *et al.*, 1999). A análise filogenética de seqüências dos segmentos S e M das linhagens Araraquara e Castelo dos Sonhos indica que essas linhagens são mais próximas dos genótipos argentinos e chilenos do que entre si (Johnson *et al.*, 1999). Em adição, as variantes Araraquara (São Paulo) e Castelo dos Sonhos (Mato Grosso e Pará) foram

relacionadas aos genótipos Maciel e Andes respectivamente (Bohlman *et al.*, 2002; Figura 10). O vírus Araraquara também foi detectado na região Centro-Oeste e seqüências do genoma para esses isolados ainda não foram publicadas (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005). A análise do fragmento disponível do genótipo Juquitiba apresenta também origem filogenética com os hantavírus argentinos e chilenos, sendo os genótipos Lechiguanas, Oran e Hu39694 os mais relacionados (Johnson *et al.*, 1999). A análise filogenética de um fragmento de 643 nucleotídeos do segmento S indica que as variantes Anajatuba e Rio Mearim, encontradas em roedores no estado do Maranhão, são relacionadas ao vírus Rio Marmoré ocorrente na Bolívia e Peru (Rosa *et al.*, 2005). A linhagem Araucária ocorrente no Paraná apresentou variantes do Paraguai como os hantavírus mais próximos por meio de análise filogenética da seqüência codificadora de N (Raboni *et al.*, 2005).

Embora as relações filogenéticas estabelecidas nos trabalhos acima citados sejam estatisticamente relevantes, uma melhor elucidação da filogenia das linhagens brasileiras dentro do contexto dos hantavírus da América do Sul depende do seqüenciamento de um maior número de isolados e de uma porção maior do genoma dessas linhagens. Neste trabalho, contribuimos com seqüências dos segmentos genômicos S e M de isolados do hantavírus circulante no DF e sugerimos sua inserção no contexto filogenético dos hantavírus da América do Sul.

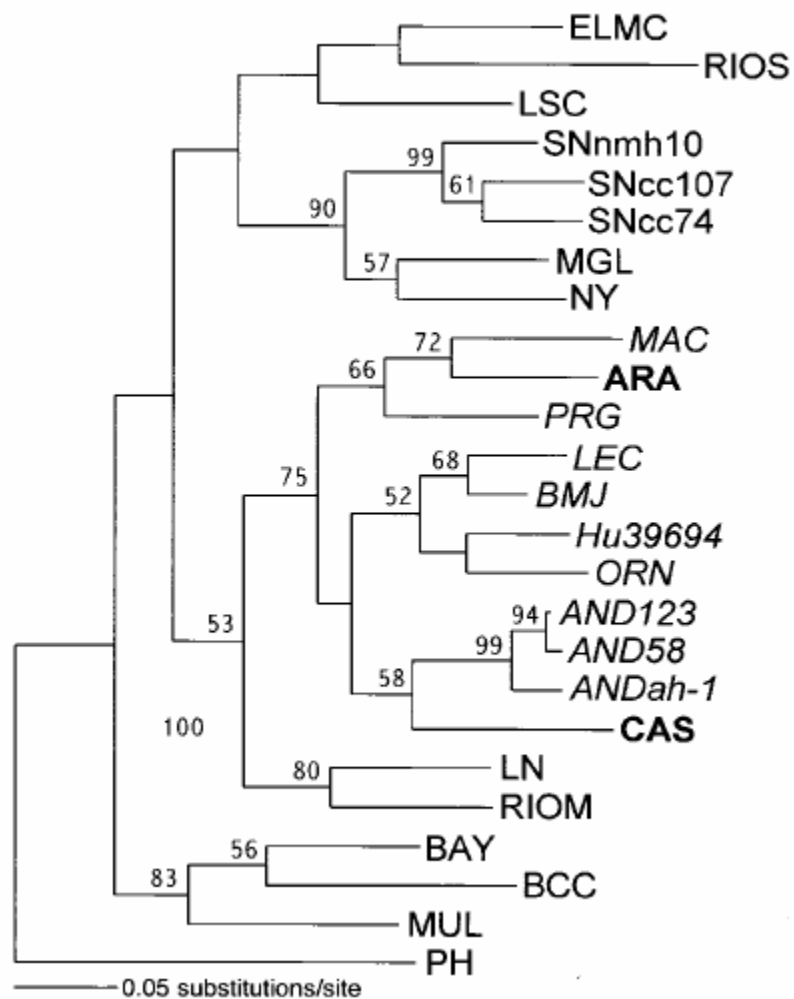


Figura 10. Análise filogenética dos hantavírus da América do Sul (Bohlman *et al.*, 2002). A árvore filogenética foi baseada em um uma seqüência de 643 nucleotídeos do segmento S disponível para as linhagens brasileiras. Análise de maximum-likelihood foi conduzida pelo programa PAUP versão 4b8 na opção de busca heurística. As siglas utilizadas por Bohlman e colaboradores representam ARA: Araraquara (AF307325), CAS: Castelo dos Sonhos (AF307324), ELMC: El Moro Canyon (U11427), RIOS: Rio Segundo (U18100), SN: Sin Nombre (L33816, L33683 e L25784), MGL: Monongahela (U32591), NY: New York (U09488), MAC: Maciel, PRG: Pergamino, LEC: Lechiguanas, BMJ: Bermejo, Hu39694: Andes isolado de um paciente, ORN: Oran, AND: Andes (AF004660), LN: Laguna Negra (AF005727), RIOM: Rio Mármore (U52136), BAY: Bayou (L36929), BCC: Black Creek Canal (L39949), MUL: Muleshoe (U54575), PH: Prospect Hill (M34011).

Objetivos

Assim como foi descrito na Introdução, não há caracterização genética da variante de hantavírus ocorrente na região Centro-Oeste do Brasil. Em 2004, um surto de hantavirose teve grande impacto no país, principalmente nas unidades federadas de Santa Catarina, Minas Gerais e Distrito Federal. Neste surto foram registrados 164 casos de HCPS em 11 unidades federadas, esse valor é equivalente a 32,6% do total de casos desde 1993. Em 2004 foram registrados os primeiros casos de HCPS no Distrito Federal com taxas de incidência de 1,34/100.000 hab. e de mortalidade de 0,58/100.000 hab. (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005).

A importância da caracterização genética das linhagens de hantavírus brasileiras é evidente para a epidemiologia, diagnóstico e tratamento da HCPS no Brasil. Em adição, a elucidação das relações filogenéticas entre os hantavírus brasileiros e entre os hantavírus sul-americanos é dependente dessa caracterização. Nesse trabalho, foi realizada a caracterização genética do segmento S e de fragmentos do segmento M de isolados de pacientes de HCPS do Distrito Federal. Em seguida, uma análise filogenética preliminar foi realizada com as seqüências obtidas.

Materiais e Métodos

Materiais

1. Soro de pacientes de HCPS

Os soros de pacientes de HCPS, dos quais foi extraído RNA viral, foram obtidos e manipulados no Instituto Adolfo Lutz (IAL) em São Paulo. Os pacientes em questão eram residentes no Distrito Federal na ocasião de infecção (Tabela 3) e todos apresentaram sorologia positiva IgM para hantavírus.

Tabela 3. Informações sobre os pacientes de cujos soros foram extraídos RNA.

Registro nesse trabalho	Registro no IAL	Origem do paciente
1	SPH-256033	Brasília-DF
2	SPH-256046	Paranoá-DF
3	SPH-256179	Brasília-DF
4	SPH-256184	Brasília-DF
5	SPH-256814	Luziânia-GO
6	SPH-256755	São Sebastião-DF
7	SPH-257074	Brasília-DF
8	SPH-257093	Planaltina-DF
9	SPH-257212	Gama-DF
10	SPH-262150	Brasília-DF

2. Linhagens de *E. coli*

- XL1-Blue: (Stratagene®, número de catálogo 200228) *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *relA1*, *lac-*, *F'* [ProAB+, *lacIq*, *lacZΔM15*, Tn10(tetr)].

3. Plasmídios

- pGEM-T: 3,0kb, promotores T7 e Sp6, ori ColE1, ori f1, ApR, múltiplos sítios de clonagem, contendo resíduos de deoxitimidil desapareados, adicionados nas extremidades geradas pela digestão

com a endonuclease *EcoR* V (Promega número de catálogo:A3600).

Utilizado para a clonagem dos fragmentos de PCR.

- pGEM-T easy: 3,015kb, promotores T7 e Sp6, ori ColE1, ori f1, ApR, múltiplos sítios de clonagem, contendo resíduos de deoxitimidil despareados, adicionados nas extremidades geradas pela digestão com a endonuclease *EcoR* V (Promega número de catálogo:A1360).

Utilizado para a clonagem dos fragmentos de PCR.

4. Meios de cultura

- Meio LB

peptona de caseína	1,0% (p/v)
extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)

pH 7,2

- Meio LB ágar

Meio LB contendo 1,5% de ágar bacteriológico.

- Meio SB

peptona de caseína	3,0% (p/v)
extrato de levedura	2,0% (p/v)
MOPS	1,0% (p/v)

pH 7,0

- Meio SOB

peptona de caseína	2,0% (p/v)
extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	0,05% (p/v)
KCl	0,00186% (p/v)

pH 7,0

- Meio SOC

Solução estoque de Mg ²⁺ 2M	1mL
Solução estoque de glicose 2M	1mL
Meio SOB	98mL
Total	100mL

A solução foi autoclavada por 20min a 120°C.

5. Soluções e tampões

- Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10mM

EDTA pH 8,0 1mM

- Clorofane

Fenol (equilibrado em pH 7,6) 1v

Clorofórmio 1v

β-hidroxiquinolina 0,05% (p/v)

A solução foi equilibrada com Tris-HCl 100mM pH 7,6.

- Clorofil

Clorofórmio 24v

Álcool Isoamílico 1v

A solução foi equilibrada com 0,25v de tampão TE.

- Solução I

Tris-HCl pH 8,0 25mM

EDTA pH 8,0 10mM

Glicose 50mM

- Solução II

NaOH 0,2N

SDS 1,0% (p/v)

- Solução III

Acetato de potássio 3M

Ácido Acético 2M

pH 4,8 - 5,0

- Glicerol 10% (v/v)

A solução foi filtrada em membrana microbiológica com poro de 0,22 μ m (Millipore).

- CaCl₂ 50mM

A solução foi filtrada em membrana microbiológica com poro de 0,22 μ m (Millipore).

- Solução estoque de Mg²⁺ 2M

MgCl₂. 6H₂O 1M

MgSO₄. 7H₂O 1M

A solução foi filtrada em membrana microbiológica com poro de 0,22 μ m (Millipore).

- Glicose 2M

A solução foi filtrada em membrana microbiológica com poro de 0,22 μ m (Millipore).

- X-Gal 20mg/mL

Dissolvida em dimetilformamida e utilizados 40 μ L para cada 15mL de meio.

- IPTG 1M

Utilizados 7 μ L para cada 15mL de meio.

- Tampão de Corrida para Gel de Agarose 10X

Trizma base 0,89M

Ácido bórico 0,89M

EDTA 0,02M

pH 8,0

- Tampão de Amostra para Gel de Agarose 5X

Tampão de corrida TEB 10X

Glicerol	50,0% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
Xileno cianol	0,1% (p/v)

6. Marcadores de DNA

- 1kb plus Invitrogen (cat. no. 10787-018)
- High mass ladder Invitrogen (cat. no. 10496016)
- Low mass ladder Invitrogen (cat. no. 10068-013)

Métodos

Desenho de iniciadores

Os iniciadores para a amplificação de fragmentos do segmento genômico S e M foram desenhados com auxílio do programa OLIGO 4.0 e direcionados para seqüências conservadas do genoma do vírus. Os iniciadores foram desenhados em geral com 15 a 20 mer e temperatura de anelamento mínima de 43°C.

As regiões conservadas foram estabelecidas a partir de alinhamento de seqüências de linhagens próximas filogeneticamente de hantavírus brasileiros pela ferramenta *ClustalW Multiple Alignment* (Thompson *et al.*, 1994) no programa BioEdit (Hall, 1999). Os genótipos de hantavírus escolhidos para o alinhamento foram Andes, Araraquara, Castelo dos Sonhos, Maciel, Oran, Pergaminho e Lechiguanas. Como as linhagens Araraquara e Maciel eram potencialmente as mais próximas das amostras do DF, as seqüências dos iniciadores foram baseadas nesses hantavírus sempre que havia informação de seqüência. Seqüências de baixa conservação na extremidade 3' do iniciador foram evitadas e, em contrapartida, posições de nucleotídeos com variabilidade entre as linhagens foram aceitas na extremidade 5'. Bases degeneradas foram utilizadas nos iniciadores em posições com divergência de seqüência entre as linhagens analisadas. Essa análise de conservação de seqüência foi também empregada na adaptação de iniciadores descritos na literatura por Johnson e colaboradores (1997) e Deyde e colaboradores (2005) para a amplificação dos isolados do DF.

Preparado de material *RNase free*

Todo o material de vidro e de metal utilizado foi incubado durante a noite em estufa 180°C. O material de plástico foi incubado com DEPC 0,1% por 30min a temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C. Em seguida, o material tratado com DEPC foi lavado com H₂O miliQ *RNase free* e autoclavado por 20min a 120°C. Os microtubos, ponteiros e tubos tipo Falcon utilizados eram sempre novos.

Preparado de soluções *RNase free*

Os reagentes e solventes para uso *RNase free* foram separados dos reagentes e solventes para uso comum. As soluções *RNase free* foram preparadas em frascos de vidro *RNase free* e espátulas de metal *RNase free* foram utilizadas para pesagem dos reagentes. Quando possível, DEPC na concentração final de 0,01% foi adicionado e a solução foi autoclavada por 15min a 120°C.

Extração de RNA

O RNA viral de soro de pacientes de HCPS foi extraído por meio de kit Qiamp RNA viral (Qiagen).

RT-PCR de passo único (adaptado de Moreli *et al.*, 2004)

RNA	3μL
Tampão 10 X	5μL
dNTPs 10mM	2,5μL
MgCl ₂ 50mM	1,5μL
Iniciador 5' 6μM	2,5μL
Iniciador 3' 6μM	2,5μL
DTT 0,1 M	5μL
RNase OUT ^A (40u/ μL)	1μL
SuperScript III ^B (200u/ μL)	0,4μL
Taq Polimerase ^C (5u/ μL)	0,5μL
H ₂ O qsp	50μL de volume final

Programa:

1. 42°C por 50min

2. 95°C por 2min
3. 95°C por 30seg
4. Temperatura de anelamento[#] por 45seg
5. 72°C por 3min
6. Voltar para o passo 3 para 40 ciclos
7. 72°C por 5min
8. 4°C

A- RNase OUT Invitrogen (cat. no. 10777-018).

B- A quantidade de SuperScriptIII Invitrogen (cat. no. 18080-044) utilizada para a RT-PCR de passo único não foi linear em relação ao número de amostras. Foram utilizados 0,4µL/mix para 1 a 7 reações; 0,5µL/mix para 8 a 11 reações; 0,6µL/mix para 12 a 16 reações e 1µL para 17 a 20 reações.

C-Taq Polimerase CENBIOT (cat. no. TPc 05/0606) ou Platinum Taq Polimerase Invitrogen (cat. no. 11708-013).

A temperatura de anelamento utilizada foi a do iniciador com menor temperatura de dissociação.

PCR (Moreli *et al.*, 2004)

cDNA ou DNA	2µL
Tampão 10 X	5µL
dNTPs 10mM	2,5µL
MgCl ₂ 50mM	1,5µL
Iniciador 5' 6µM	2,5µL
Iniciador 3' 6µM	2,5µL
Taq Polimerase* (5u/ µL)	0,5µL
H ₂ O qsp	50µL de volume final

Programa:

1. 95°C por 2min
2. 95°C por 30seg
3. Temperatura de anelamento[#] por 45seg
4. 72°C por 3min
5. Voltar para o passo 2 para 40 ciclos
6. 72°C por 5min
7. 4°C

* Taq Polimerase CENBIOT ou Platinum Taq Polimerase Invitrogen. Na PCR 1 da amplificação das seqüências não codificadoras 1µL de enzima foi usado.

A temperatura de anelamento utilizada foi a do iniciador com menor temperatura de dissociação.

Tratamento com TAP

RNA	1µg (aproximadamente 6pmoles)
Tampão TAP 10X	7µL
TAP* (10u/ µL)	1µL
H ₂ O qsp	70µL

37°C por 2h

Extração das proteínas por fenol/clorofórmio:

1. Foram adicionados 130µL de TE RNase *free* e 200µL de fenol/clorofórmio RNase *free*;
2. A amostra foi agitada por 1min em vortex;
3. Centrifugação por 5000xg por 5min a temperatura ambiente em microcentrífuga do tipo Eppendorf de bancada;
4. A fase aquosa foi coletada em um novo microtubo.

Precipitação:

1. Foram adicionados 3µL de glicogênio 20mg/mL Rnase *free*, 0,1V de NaAc 3M pH 5,5 RNase *free* e 2,5V de etanol 100% RNase *free*.;
2. Incubação a -20°C durante a noite;
3. Centrifugação a 12000rpm em microcentrífuga do tipo Eppendorf de bancada por 45min a 4°C;
4. Foram adicionados 300µL de etanol 70% RNase *free*;
5. Centrifugação a 12000rpm por 15min a 4°C em microcentrífuga do tipo Eppendorf de bancada.

* Epicentre (cat. no. T19100)

Ligação das extremidades do RNA

RNA precipitado	40µL de H ₂ O para ressuspensão
Tampão RNA Ligase 10X	5,5µL
RNase OUT ^A (40u/ µL)	1µL
T4 RNA Ligase ^B (5u/ µL)	3µL
ATP 10mM	5,5µL (1mM final)
H ₂ O qsp	55µL

4°C durante a noite e 37°C por 30min

Extração por fenol/clorofórmio (vide Tratamento com TAP)

Precipitação (vide Tratamento com TAP) e ressuspensão em 16µL de H₂O mili Q.

A- Invitrogen.

B- Epicentre (cat. no. LR5010)

Transcrição reversa

RNA circular	8 μ L
dNTPs 10mM	1 μ L
Iniciador 5' 2 μ M	1 μ L

Programa:

1. 65°C por 5min
2. gelo por 1min
3. Adição do Mix de síntese de cDNA
4. Temperatura de anelamento por 50min (a temperatura de cada iniciador está descrita no Anexo I)
5. 85°C por 5min
6. 4°C

Mix de síntese de cDNA:

5X First Strand Buffer	4 μ L
MgCl ₂ 50mM	1 μ L
DTT 0,1 M	2 μ L
RNase OUT* (40u/ μ L)	1 μ L
SuperScript III* (200u/ μ L)	1 μ L
H ₂ O qsp	10 μ L

*Invitrogen.

Análise de DNA em gel de agarose (Sambrook & Russel, 2001)

A agarose foi preparada em tampão TEB 1X e contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídio. As amostras de DNA em tampão de amostra para gel de agarose foram aplicadas no gel e submetidas a eletroforese em tampão TEB 1X. Para a visualização do DNA, incidia-se luz ultravioleta no gel por meio de transluminador.

Clonagem e seqüenciamento

Os produtos de PCR foram purificados com auxílio de kits e resinas comerciais (PCR e gel extraction kit da Qiagen cat. no. 28004/28704, Microcon YM100 da Amicon cat. no. 42413 e Ultrafree-DA Millipore cat. no. 42600). Em seguida, os fragmentos purificados foram ligados a vetores por meio dos kits de ligação pGEM-T system I e pGEM-T easy (Promega cat. no. A1360), transformados por choque térmico ou eletroporação em *E. coli* XL1Blue e selecionados por meio de ampicilina, X-Gal e IPTG. A transformação foi analisada pelo perfil de digestão (*Eco*R I, *Nco* I e *Sac* II New England Biolabs) e por PCR das mini-preparações de DNA plasmidial (Qiagen cat. no. 27106 e Maranhão & Moraes *in* Azevedo *et al.*, 2003). O seqüenciamento foi realizado no MegaBACE 500 Plus (Molecular Dynamics®) utilizando-se o kit ET terminator da GE-Amersham.

Ligação de fragmentos de DNA

As concentrações de DNA (vetor : inserto) utilizadas nos sistemas de ligação variavam de acordo com o experimento a ser realizado, sendo normalmente a uma razão molar de 1:3, 1:5 ou 1:6. A reação de ligação era efetuada em tampão de ligase 1X, contendo 10 a 200 U de T4 DNA Ligase Invitrogen (cat. no. 15224-017). Os sistemas continham de 10 a 20µL de volume final e as condições de reação eram realizadas segundo instruções do fabricante.

Células competentes para choque térmico e transformação (Maranhão *in* Azevedo *et al.*, 2003)

- Foi preparado um inóculo contendo 50 mL de meio LB e 500µL de um pré-inóculo de *E. coli* crescido durante a noite;
- O inóculo foi incubado a 37°C sob agitação até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm de 0,1 a 0,3;
- Centrifugação a 3.000 xg a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado;
- As células foram ressuspensas em 10mL de solução de CaCl₂ 50mM gelada por meio de suave agitação;
- Centrifugação a 3.000xg a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado;
- As células foram ressuspensas em 1mL de solução gelada de CaCl₂ a 50mM;
- As células foram incubadas em banho de água/gelo por pelo menos 1 hora, a partir do que foram consideradas competentes, podendo ser usadas imediatamente ou durante o período máximo de 24 horas;

- 100 a 200 μ L de células competentes foram incubados com 100 a 500 η g de DNA plasmidial em banho de água/gelo por pelo menos 30 minutos;
- Os sistemas de transformação foram incubados a 42°C por 3 minutos e Recolocados no gelo;
- Foi adicionado 1mL de meio LB aos tubos submetidos ao choque térmico e os tubos foram incubados por 1 hora a 37°C;
- Foram semeados 50 a 500 μ L de células transformadas com plasmídeo intacto em placas contendo meio LB ágar com 100 μ g/mL de ampicilina. Para sistemas de ligação, as células foram concentradas para o volume de 400 μ L e toda a transformação foi semeada;
- As placas foram incubadas a 37°C durante a noite.

Células competentes para eletroporação e transformação (Maranhão *in* Azevedo *et al.*, 2003)

- Uma colônia isolada de XL1Blue foi inoculada em 5mL de meio SB, contendo tetraciclina a uma concentração final de 30 μ g/mL e esse pré-inóculo foi incubado durante a noite sob agitação de 250 rpm a 37°C;
- 0,5mL da cultura foi inoculado em 500mL de meio SB em um frasco de 1L. Foram adicionados 2,5mL de glicose 2M e 2,5mL de solução de Mg 2M, antibióticos não são adicionados nesta etapa;
- O inóculo foi incubado em agitador a 250rpm a 37°C até uma densidade óptica a 600 η m (OD₆₀₀) de 0,7 a 0,9;
- Após o crescimento do inóculo, a temperatura da cultura (bem como dos frascos, pipetas e soluções) foi mantida baixa;
- Centrifugar a 3.000xg por 20min a 4°C, sendo o sobrenadante descartado em seguida;
- As células foram ressuspensas em 25mL de glicerol 10% (v/v) gelado usando-se pipetas pré-resfriadas. Foram adicionados 75mL de glicerol 10% (v/v) gelado e foi realizada centrifugação nas mesmas condições acima descritas. O sobrenadante foi descartado;
- As células foram ressuspensas em 25mL de glicerol 10% (v/v) gelado usando-se pipetas pré-resfriadas. Os frascos foram transferidos para tubos de centrífuga de 50mL e novamente centrifugados nas condições anteriores. Descartar o sobrenadante;
- As células foram ressuspensas no volume residual de glicerol (tipicamente 1 a 2mL). Alíquotas de 110 μ L de células em microtubos novos e estéreis foram em seguida congeladas em banho de álcool/gelo seco;

- As alíquotas foram estocadas a -80°C para transformação por eletroporação;
- O DNA a ser transformado foi incubado com uma alíquota de célula competente e o sistema de transformação foi misturado com a ponteira da pipeta automática em movimentos circulares. O volume do DNA não ultrapassou 10% do volume da alíquota de células. Quando houve mais de um sistema de transformação, uma alíquota foi descongelada de cada vez;
- O sistema de transformação foi transferido para uma cubeta de 0,2cm previamente resfriada. A eletroporação foi realizada seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5kV, 25 μF e 200 Ω (Pulse Controller da BioRad). O τ esperado nessas condições foi de 4,0 a 5,0 milisegundos;
- As células foram recuperadas imediatamente após o choque com três lavagens de 1mL de meio SOC e as células recuperadas foram coletadas em um tubo tipo Falcon de 50mL;
- O sistema de transformação foi incubado em agitador a 250rpm e a 37°C por uma hora;
- Diluições dessa cultura foram semeadas em placa de meio LB ágar contendo ampicilina a uma concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para determinação da eficiência de transformação, um plasmídeo intacto previamente quantificado foi transformado e 0,01; 0,1 e 1 μL dos 3mL de meio SOC da recuperação foram semeados. Para sistemas de ligação, os 3mL foram concentrados para 400 μL por centrifugação e toda a transformação foi semeada;
- As placas de petri foram incubadas a 37°C durante a noite.

Mini-preparação de DNA plasmidial (Maranhão & Moraes *in* Azevedo *et al.*, 2003)

- Foram cultivadas células em 5mL de meio LB contendo o agente antimicrobiano adequado durante a noite a 37°C em agitador a 250rpm;
- 1,5mL da cultura foram coletados por meio de centrifugação a 5000rpm por 5min a temperatura ambiente em microtubo de 1,5mL. O sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido por mais duas vezes;
- O sedimento foi ressuspenso em 200 μL de solução I e incubado em gelo por 5min;
- Foram adicionados 400 μL de solução II preparada na hora e a amostra foi homogeneizada por inversão várias vezes. Em seguida incubou-se em banho de água/gelo por 5min;
- Foram adicionados 300 μL de solução III, o tubo foi misturado por inversão e incubado em banho de água-gelo por mais 10min;

- Centrifugação a 10.000rpm por 20min a 4°C em microcentrífuga do tipo Eppendorf de bancada;
- O sobrenadante foi coletado, foram adicionados 10µL de RNase na concentração 10mg/mL e a amostra foi incubada a 37°C por 1h;
- 300µL de clorofane foram adicionados, a amostra foi homogeneizada com auxílio de vortex por 1min e centrifugada a 5000xg por 5min a temperatura ambiente;
- A fase aquosa foi coletada em um novo microtubo e foram adicionados 300µL de clorofil. A amostra foi homogeneizada com auxílio de vortex por 1min e centrifugadas a 5000xg por 5min a temperatura ambiente;
- A fase aquosa foi coletada em um novo microtubo e foram adicionados 2v de etanol 100% (v/v). A amostra foi incubada a -20°C durante a noite;
- Centrifugação a 12.000rpm por 45 minutos a 4°C em microcentrífuga do tipo Eppendorf de bancada;
- O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500µL de etanol 70% (v/v) sem ressuspender o sedimento;
- Centrifugação a 12.000rpm por 15 min a 4°C em microcentrífuga do tipo Eppendorf de bancada;
- O precipitado seco foi ressuscitado em 30µL de TE ou Tris HCl 10mM (pH 8,5).

Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões de DNA com enzimas de restrição foram realizadas conforme instruções dos fabricantes.

Análise do seqüenciamento

As seqüências de nucleotídeos e seus cromatogramas de seqüenciamento dos fragmentos amplificados dos segmentos genômicos S e M foram obtidos por meio do programa phph (Togawa *et al.*, 2006). Inicialmente as seqüências foram analisadas contra o banco de dados depositado no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando a ferramenta BLASTn. Em seguida, as seqüências obtidas foram manipuladas no programa BioEdit (Hall, 1999). Após a localização dos iniciadores por meio dos quais o fragmento foi inicialmente amplificado e a exclusão de seqüências pertencentes aos vetores, as seqüências foram alinhadas entre si e com outras linhagens de hantavírus por meio da ferramenta *ClustalW Multiple Alignment* (Thompson *et al.*, 1994). Uma seqüência consenso foi estabelecida entre os clones bacterianos seqüenciados de cada fragmento e para cada paciente e as divergências de

seqüência entre os clones foram elucidadas pela análise dos cromatogramas de seqüenciamento.

Análise filogenética

Para todas as análises filogenéticas realizadas, as seqüências dos isolados do DF e de outras linhagens de hantavírus foram alinhadas pela ferramenta *ClustalW Multiple Alignment* (Thompson *et al.*, 1994) no programa BioEdit (Hall, 1999). As regiões com falta de informação de seqüência para qualquer uma das linhagens e as regiões com falhas (*gaps*) no alinhamento foram descartadas de todas as seqüências.

A análise de *Maximum likelihood* PHYLIP *package* (Felsenstein, 1981) foi utilizada para o estudo das relações filogenéticas de hantavírus. Os valores de *bootstrap* foram calculados pelo método *neighbor joining* com fator de correção F84 e 1000 réplicas. Para a determinação de identidade entre linhagens, a ferramenta *Sequence Identity Matrix* do programa BioEdit foi empregada.

Resultados

Desenho de iniciadores

Vários pares de iniciadores foram desenhados e sintetizados para os segmentos genômicos S e M de hantavírus como descrito nos Materiais e Métodos (seção Desenho de iniciadores). Um exemplo de análise da seqüência de um iniciador obtido pelo programa OLIGO 4.0 por alinhamento de seqüências de hantavírus está demonstrado na Figura 11. Esse método de análise também foi utilizado na adaptação de iniciadores descritos na literatura (Johnson *et al.*, 1997; Deyde *et al.*, 2005) para a amplificação de fragmentos genômicos dos isolados do DF.

INICIADOR 5' hanta S880	
MACIEL	ATTGTTGAACTTATTGACCA
PERGAMINO	..A.CA.....G..A..A..
ORAN	..A.....C..C.....
ARARAQUARA	-----
CASTELO DOS SONHOS	-----
ANDES	..A.....C..C.....
ANDES CHILE	...A.C..TT.G..A.....
LAGUNA NEGRAG..TT.A..AC.AGC
ARAUCARIA	..C..G..C.....
INICIADOR OLIGO 4.0	ATTGTTGAACTTATTGACCA
INICIADOR final	ATAGTIGAICTIATTGACCA

Figura 11. Análise da conservação da seqüência de iniciadores. A conservação da seqüência dos iniciadores desenhados e dos adaptados da literatura foi analisada por meio de alinhamento de seqüências de linhagens de hantavírus sul-americanas e brasileiras. O alinhamento exemplificado é o correspondente ao iniciador desenhado 5' hanta S880, cuja posição de anelamento é a 880 do segmento S. O problema de alta variabilidade em algumas posições foi solucionado por degenerações, como o emprego de inosinas (I) nesse iniciador. A conservação da extremidade 3' do iniciador foi priorizada e degenerações nessa região foram evitadas. Os números de acesso das seqüências utilizadas são Araraquara: AF307325, Maciel: AF482716.1, Oran: AF482715.1, Laguna Negra: AF005727.1, Castelo dos Sonhos: AF307324, Andes: AF324902.1 e AY228237, Araucária: AY740633.1, Pergamino: AF482717.1.

Os iniciadores descritos na Tabela 4 mostraram-se eficazes na amplificação de fragmentos do segmento genômico S do hantavírus ocorrente no Distrito Federal. A amplificação de fragmentos do segmento M a partir dos iniciadores

desenhados e dos adaptados de Deyde e colaboradores (2005) não foi bem sucedida. Por outro lado, os iniciadores adaptados dos descritos por Johnson e colaboradores (1997) foram eficazes na amplificação de um fragmento do segmento M. A lista de todos os iniciadores desenhados neste trabalho encontra-se no Anexo 1.

Tabela 4. Iniciadores desenhados para o segmento S por meio do programa OLIGO 4.0 (I=inosina e Y=pirimidinas).

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Posição de anelamento
5' hanta S34	AAAGCTGGAATGAGC	34
3' hanta S1225	ATCATCACCAAGATGGAA	1225
3' hanta S1223	ATCATCACCAAGATGGAAGT	1223
3' hanta S723-2	ATCCAATCCTTTACAAAG	723
5' hanta S712	TGGCTTTGCTTTCTTTGTAA	712
3' hanta S61	CGGTGATGTTTTCTGTAAAT	61
5' hanta S1225	TTCATCTTGGTGATGAT	1225
5' hanta S934	ATTGCAACCCCYCATTCAG	934
5' hanta S880	ATAGTIGAICTIATTGACCA	880
3' hanta S1069	GTTCCACAGACTTTGATGC	1069

Amplificação do segmento genômico S e M

As preparações de RNA de soro de 10 pacientes do Distrito Federal (Tabela 3 nos Materiais e Métodos), com sorologia positiva para hantavírus, foram primeiramente submetidas à RT-PCR de passo único seguida da 2ª reação de PCR empregadas no diagnóstico do Instituto Adolf Lutz (IAL) a fim de se confirmar a qualidade do RNA extraído. Os iniciadores utilizados na RT-PCR de passo único e na 2ª reação de PCR anelam no segmento M de hantavírus e originam como produto final um fragmento de DNA de aproximadamente 400pb referente às posições 2779 e 3221 desse segmento genômico (Tabela 4 do Anexo 1). O resultado desse ensaio encontra-se na Figura 12.

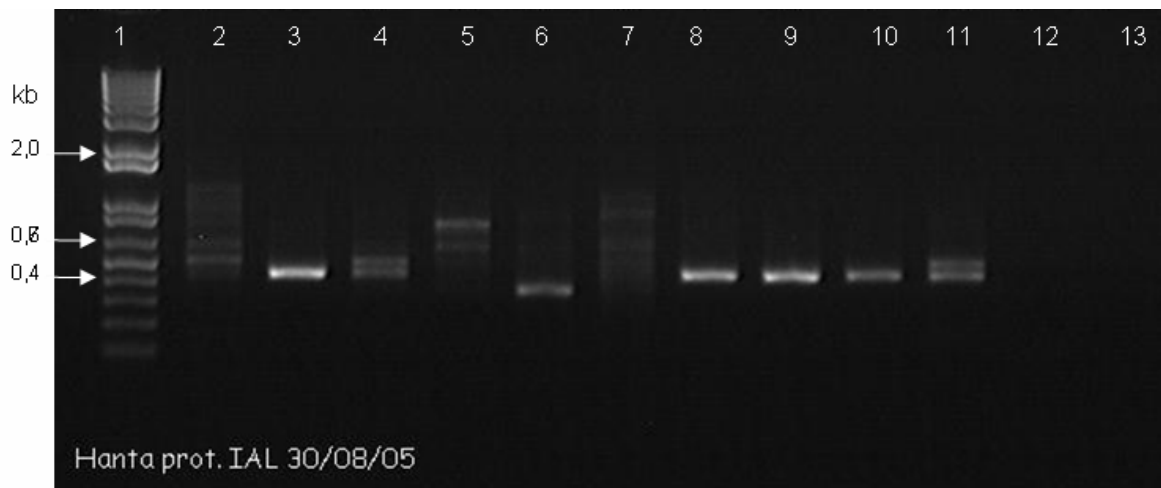
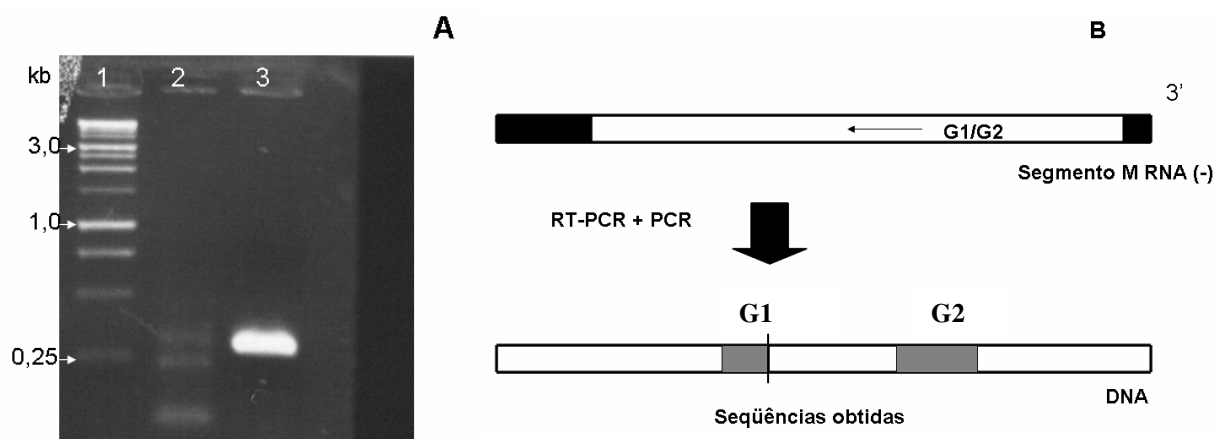


Figura 12. Análise da qualidade das extrações de RNA viral. Amplificação de fragmento de 400pb na RT-PCR de passo único seguida da 2ª reação de PCR empregadas no diagnóstico de hantavírus no IAL usando como molde o RNA viral extraído. Os iniciadores utilizados na RT-PCR de passo único anelam nas posições 2708 e 3344 e os utilizados na 2ª reação de PCR, nas posições 2779 e 3221 do segmento genômico M. Os produtos da 2ª reação de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% (m/v). Amostras: 1-marcador 1kb plus (Invitrogen), 2-paciente 1, 3- paciente 2, 4- paciente 3, 5- paciente 4, 6- paciente 5, 7- paciente 6, 8- paciente 7, 9- paciente 8, 10- paciente 9, 11- paciente 10, 12-controle negativo (água foi utilizada como molde para a primeira reação), 13- controle negativo (água foi utilizada como molde para a segunda reação).

O teste de RT-PCR/PCR indica como positivos os pacientes 2, 3, 7, 8, 9 e 10 embora todos os pacientes analisados apresentem sorologia positiva para hantavírus. Assim, podemos concluir que a preservação dos segmentos genômicos virais é um fator limitante nas amostras de soro dos pacientes. Por isso, das 10 extrações foram escolhidas três (2, 7 e 8), cuja integridade genômica parecia preservada, para as seguintes reações de amplificação. A garantia da qualidade do RNA viral extraído foi crucial para os testes dos iniciadores desenhados nesse trabalho.

A localização no segmento M do fragmento amplificado nessa 2ª reação de PCR (Figura 12) está esquematizada na Figura 13. Como esse fragmento está contido na seqüência codificadora de G2, ele foi denominado G2 neste trabalho. A partir de iniciadores adaptados dos descritos para hantavírus por Johnson e colaboradores (1997), foi amplificado um fragmento de aproximadamente 300pb contido na seqüência codificadora de G1 (Figura 13). De forma semelhante, este fragmento de 300pb foi denominado G1.



Iniciadores adaptados de Jonhson e colaboradores (1997): C

SM1687C 5' ACAATGGGCTCAATGGTITGTGA 3'

SM2255R 5' TTIAGCACIGCATCCATCCA 3'

SM1723C 5' GAITGTGAIACAGCAAAGA 3'

ASM2016R 5' TCAGCACTIACIGCCCA 3'

Figura 13. Amplificação de fragmentos do segmento genômico M. (A) Por meio de iniciadores modificados dos descritos por Jonhson e colaboradores (1997), um fragmento de 300pb do segmento M foi amplificado do segmento M após RT-PCR de passo único (iniciadores SM1687C e SM2255R) seguida de uma 2ª reação de PCR (iniciadores SM1723C e ASM2016R). O produto da 2ª reação de PCR foi analisado em gel de agarose 0,8% (m/v). 1- marcador 1kb (Promega), 2- controle negativo (água como molde), 3- paciente 2. Apesar do controle negativo apresentar fragmentos inesperados, o fragmento de aproximadamente 300pb amplificado foi clonado e seqüenciado. (B) Localização dos dois fragmentos amplificados no segmento M (cinza). O fragmento G1 representa o produto amplificado em (A) e o G2, o produto amplificado na Figura 12. A linha divisória no esquema indica o sítio de clivagem do precursor glicoproteico. (C) As adaptações nos iniciadores desenhados por Jonhson e colaboradores foram realizadas após análise das seqüências de hantavírus próximos às linhagens brasileiras. I=inosina.

Para o segmento S, as reações de transcrição reversa e de cadeia de polimerase e os iniciadores empregados estão descritos na Figura 14 e na Tabela 5. A amplificação da seqüência codificadora do segmento S foi realizada por meio de RT-PCR de passo único seguida de uma 2ª reação de PCR. Já para a amplificação das seqüências não codificadoras, foi empregado o protocolo de Ligação de RNA para seqüenciamento das terminações de mRNAs (Mandl *et al.*, 1991) e, posteriormente, RT seguida de duas reações de PCR (Figura 15).

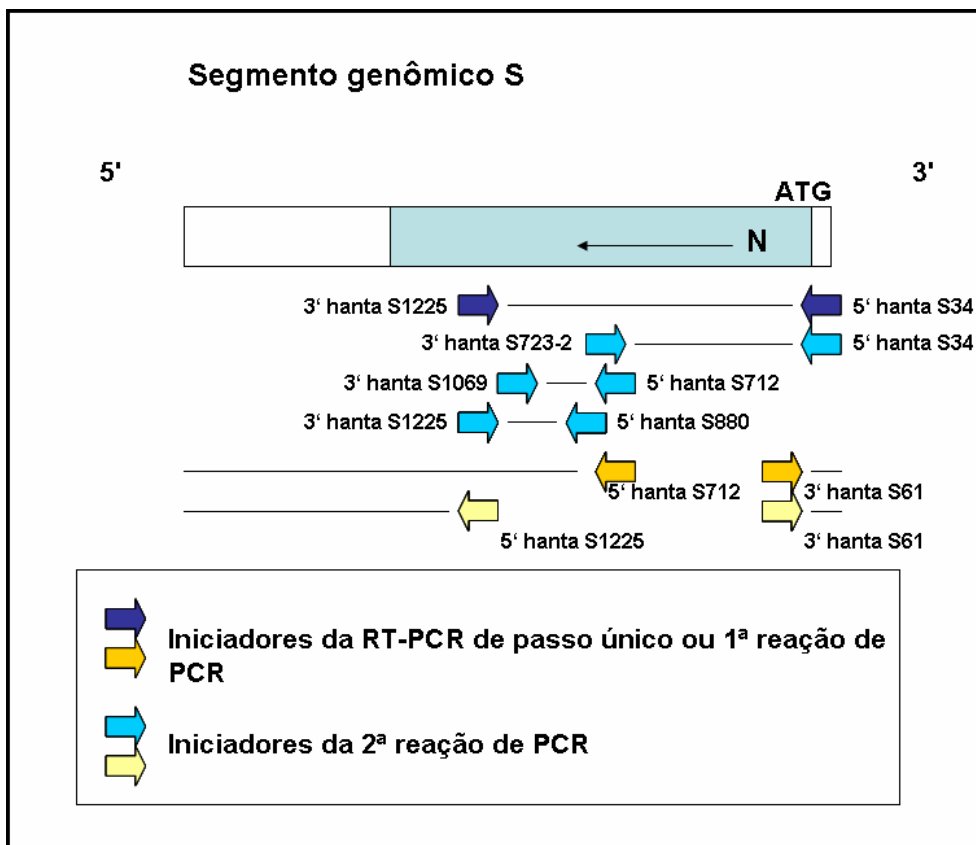


Figura 14. Esquema do segmento genômico S e os sítios de anelamento dos iniciadores desenhados. O esquema da estrutura do segmento S dá ênfase na seqüência codificadora da proteína do nucleocapsídeo (N), que tem início no nucleotídeo 43 e término no 1329 (azul). As seqüências não codificadoras desse segmento estão ilustradas em branco. Os iniciadores desenhados estão simbolizados por setas largas e a orientação sense e antisense dos iniciadores está ilustrada pelo sentido da seta. O nome e o sítio de anelamento dos iniciadores estão ao lado de cada um. Os iniciadores azuis estão envolvidos na amplificação da seqüência codificadora e os amarelos foram empregados na amplificação da seqüência não codificadora desse segmento genômico.

Tabela 5. Iniciadores utilizados na amplificação do segmento genômico S.

Iniciadores da RT	Iniciadores da RT-PCR de passo único ou da 1ª reação de PCR	Iniciadores da 2ª reação de PCR	Tamanho do fragmento final	Nome dado ao fragmento
-	5' hanta S34 3' hanta S1225	5' hanta S34 3' hanta S723-2	707pb	S700
5' hanta S712*	5' hanta S712 3' hanta S61	5' hanta S1225 3' hanta S61	700pb	S1225-61 circular
-	5' hanta S34 3' hanta S1225	5' hanta S712 3' hanta S1069	300pb	S712-1069
-	5' hanta S34 3' hanta S1225	5' hanta S880 3' hanta S1225	300pb	S880-1225

* O RNA molde para essa reação foi previamente submetido ao processo de ligação das extremidades de RNA (Mandl *et al.*, 1991).

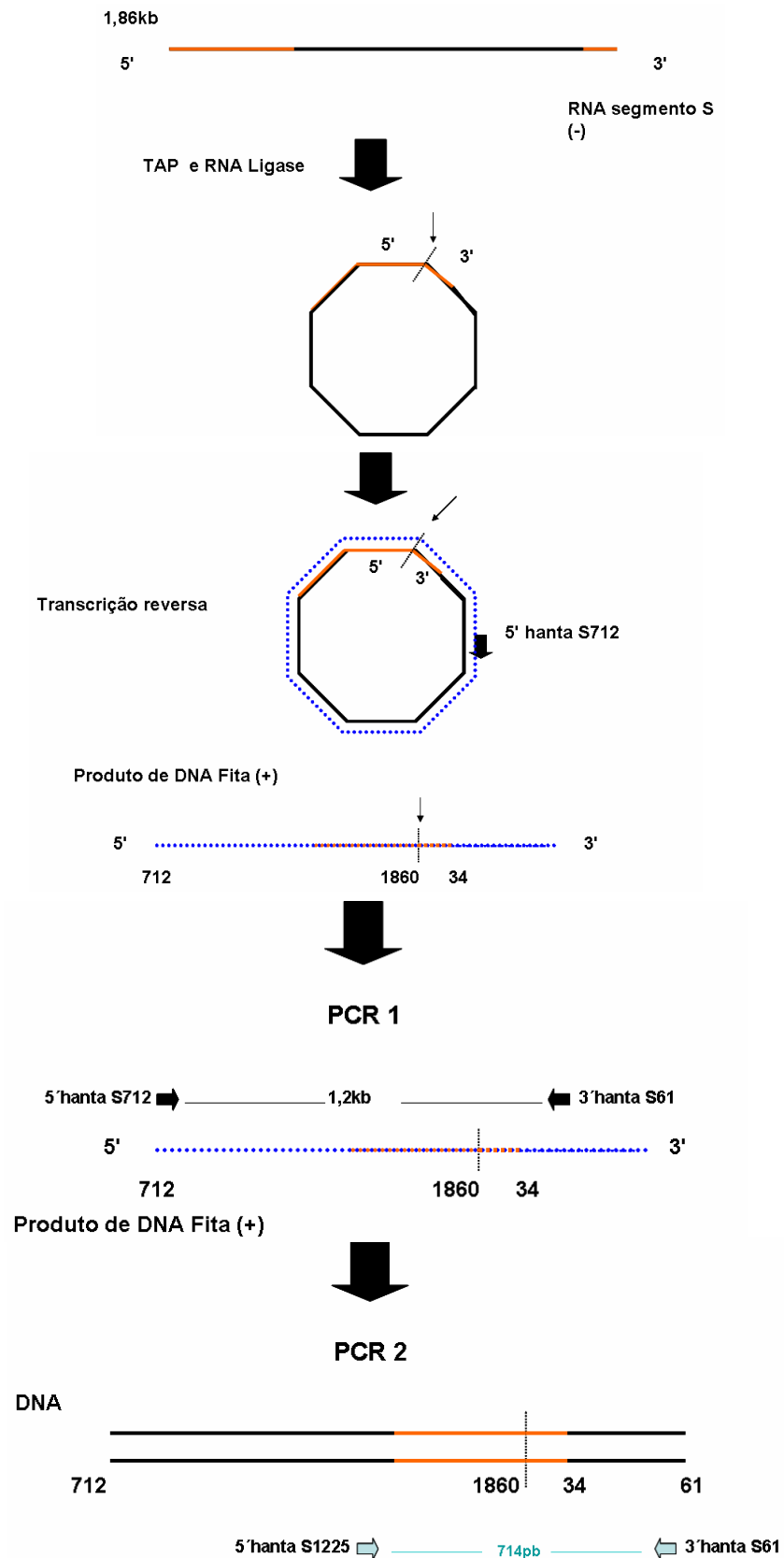
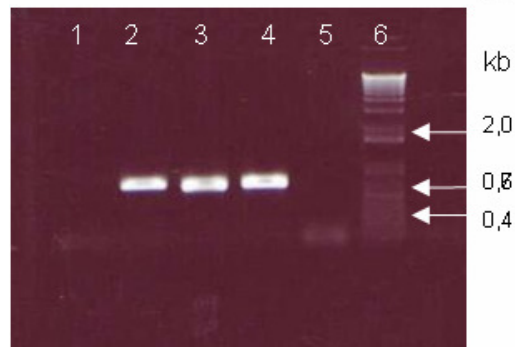


Figura 15. Estratégia para amplificação das seqüências não codificadoras do segmento S. Na ilustração do segmento genômico S, em preto está a fase de leitura aberta da proteína N e em laranja estão esquematizadas as seqüências não codificadoras. Após a ligação das extremidades do RNA pela T4 RNA Ligase, a seta e a barra indicam o sítio de ligação. Os iniciadores utilizados em cada etapa estão ilustrados por uma seta larga e os fragmentos oriundos da amplificação estão indicados entre os iniciadores.

A amplificação dos quatro fragmentos que juntos cobrem toda a sequência do segmento genômico S (Tabela 5) está demonstrada nas Figuras 16, 17 e 18. A amplificação do segmento genômico S completo foi obtida apenas para o paciente 2. Dos pacientes 7 e 8, foi amplificado o fragmento S700 (Tabela 5, Figura 16).



Segmento genômico S

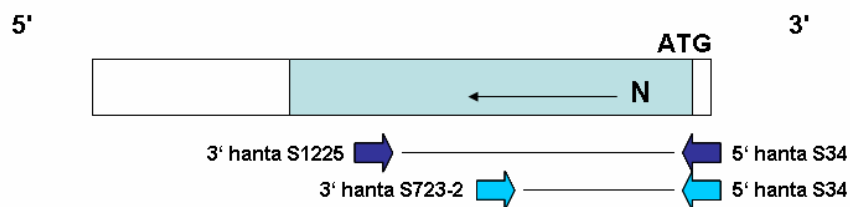
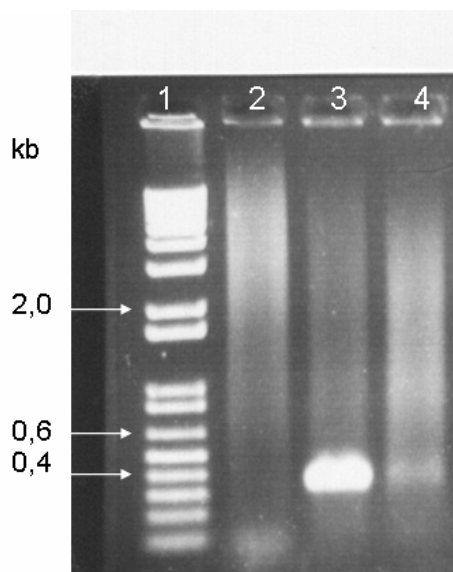


Figura 16. Amplificação do fragmento S700 do segmento genômico S dos três pacientes. Amplificação de fragmento de 707pb do segmento S com os iniciadores 5' hanta S34 e 3' hanta S1225 na RT-PCR de passo único e com os iniciadores 5' hanta S34 e 3' hanta S723-2 na segunda PCR (Tabela 5). A 2ª reação de PCR foi analisada em gel de agarose 0,8% (m/v). 1-controle negativo (água como molde), 2-paciente 2, 3-paciente 7, 4-paciente 8, 5-paciente 9, 6-marcador 1kb plus (Invitrogen).



Segmento genômico S

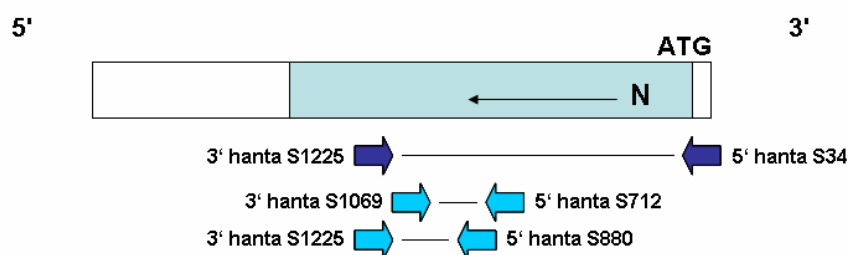
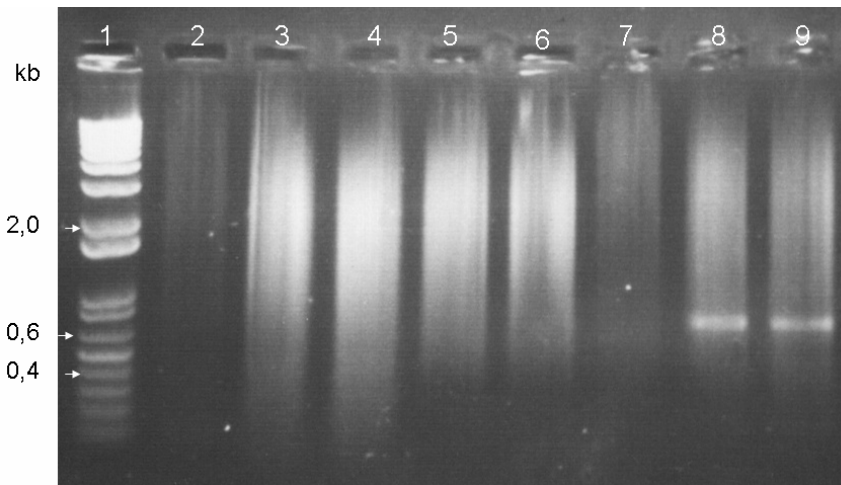


Figura 17. Amplificação dos fragmentos S712-1069 e S880-1225 do segmento genômico S do paciente 2. A amplificação dos dois fragmentos de aproximadamente 300pb foi realizada por meio de RT-PCR de passo único com os iniciadores 5' hanta S34 e 3' hanta S1225. Para o fragmento S712-1069, a 2ª reação de PCR empregou os iniciadores 5' hanta S712 e 3' hanta S1069. Já a amplificação do fragmento S880-1225 utilizou os iniciadores 5' hanta S880 e 3' hanta S1225 em sua 2ª reação de PCR (Tabela 5). Os produtos das 2ª reações de PCR foram analisados em gel de agarose 0,8% (m/v). 1-marcador 1kb plus (Invitrogen), 2-contrôle negativo (água como molde com o par de iniciadores 5' hanta S712 e 3' hanta S1069), 3-paciente 2 (iniciadores 5' hanta S712 e 3' hanta S1069), 4-paciente 2 (iniciadores 5' hanta S880 e 3' hanta S1225).



Segmento genômico S

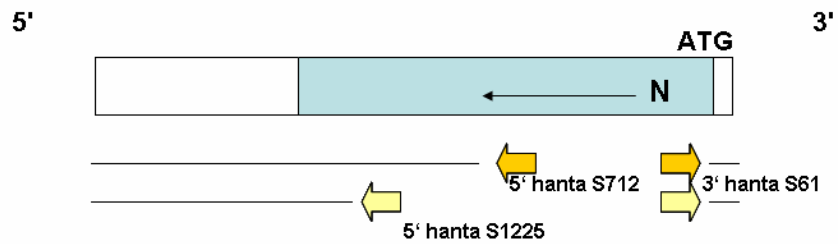


Figura 18. Amplificação do fragmento S1225-61circular do paciente 2. Após tratamento com TAP e T4 RNA Ligase, transcrição reversa e 1ª reação de PCR; um fragmento de aproximadamente 700pb foi amplificado em uma 2ª reação de PCR com os iniciadores 5' hanta S1225 e 3' hanta S61 (Tabela 5 e Figuras 15). Os produtos da 2ª reação de PCR foram analisados em gel de agarose 0,8% (m/v). 1- marcador 1kb plus (Invitrogen), poços 2 a 7- paciente 2 com outros pares de iniciadores (vide Tabela 3 do Anexo 1), 8- paciente 2 (1μL de DNA molde) e 9- paciente 2 (2μL de DNA molde).

Clonagem e seqüenciamento

Os fragmentos amplificados foram clonados nos vetores comerciais pGEM-T ou pGEM-T easy e a análise de alguns clones positivos está demonstrada nas Figuras 19 e 20. Três clones positivos de cada fragmento de cada paciente foram seqüenciados.

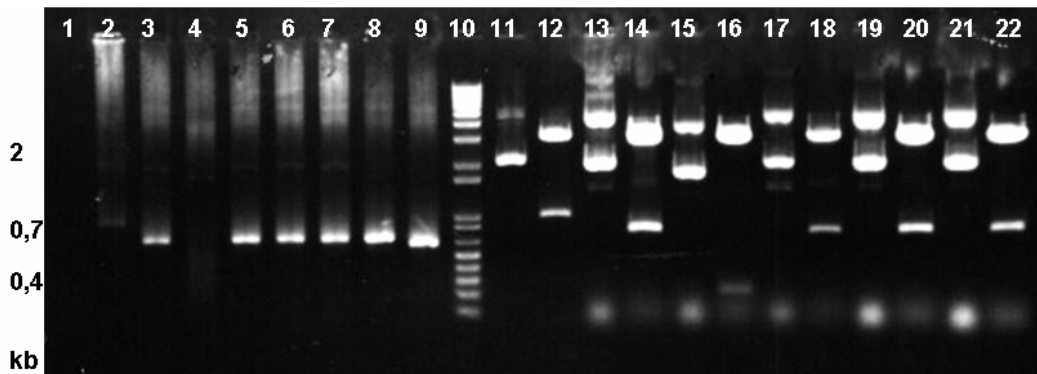


Figura 19. Clonagem do fragmento S700 no plasmídio pGEM-T para seqüenciamento. Os clones positivos foram analisados por PCR de plasmídio com os iniciadores 5' hanta S34 e 3' hanta S723-2 descritos na Tabela 5 e por perfil de restrição com *Nco* I e *Sac* II (liberação do inserto de 707pb). Os produtos de PCR e de digestão foram analisados em gel de agarose 0,8% (m/v). Nos poços 1 a 9 está o resultado da PCR de plasmídio e, nos poços 11 a 22, foi analisada a digestão dos plasmídios. Os plasmídios intactos estão nos poços ímpares e os digeridos nos poços pares. O controle negativo da reação de PCR está no poço 1 e o marcador 1kb plus (Invitrogen), no poço 10. Todos os clones apresentaram concordância entre a PCR e a digestão, o único clone negativo está nos poços 4, 15 e 16. O clone nos poços 2, 11 e 12 apresentou perfil diferenciado do restante e por isso não foi selecionado para o seqüenciamento.

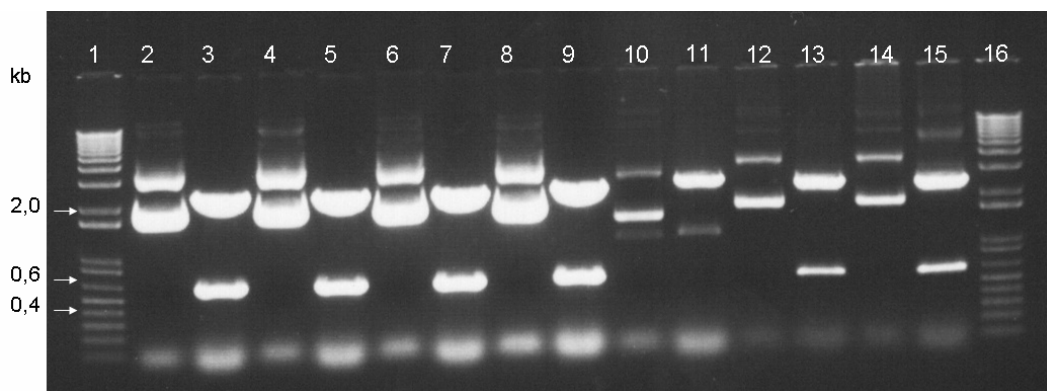


Figura 20. Clonagem do fragmento S712-1069 no plasmídio pGEM-T easy para seqüenciamento. A digestão com *Eco*R I dos clones obtidos na transformação foi analisada em gel de agarose 0,8% (m/v). O marcador 1kb plus (Invitrogen) está nos poços 1 e 16. Nos poços pares estão os plasmídios intactos e nos ímpares, os plasmídios digeridos. Exceto pelo clone nos poços 10 e 11, todas as amostras analisadas apresentaram perfil de restrição esperado.

Seqüência do segmento S

A seqüência obtida com os iniciadores M13 universal e reverso e amostras de plasmídios isolados de três clones bacterianos distintos de cada fragmento do segmento S foi analisada inicialmente pelo programa BLASTn contra o banco de dados de nucleotídeos do NCBI. Os clones considerados positivos apresentaram alinhamento de alta qualidade com diversas linhagens de hantavírus, especialmente o Araraquara e o Maciel. Em seguida, as seqüências obtidas foram manipuladas no programa BioEdit e, com a análise dos cromatogramas do seqüenciamento gerados pelo programa phph, a seqüência consenso de cada fragmento para cada paciente foi estabelecida. As seqüências do segmento S obtidas para cada paciente encontram-se na Figura 21.

Para o paciente 2, o segmento S completo foi obtido por justaposição das seqüências dos fragmentos amplificados e as mutações inseridas pelos iniciadores foram elucidadas pelas regiões de sobreposição de seqüências. O segmento S amplificado e seqüenciado do paciente 2 do Distrito Federal é composto de 1847 nucleotídeos contendo algumas fases abertas de leitura. A maior fase aberta de leitura é de 1283 nucleotídeos (posições 32 a 1315) e codifica uma proteína de 428 resíduos de aminoácidos, a proteína N.


```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Andes TAGTAGTAGACTCCTTGAGAGCTACTGCTGCGAAGCTGGAAATGAGCACCCTCCAGAAATTCAGGAAARCATCACAGC
Maciel .....T.....TA.....A.....G.....G.....G.....T.....T...
Segmento S pac 2 .....T.....A.....G.....G.....G.....C...
S700 pac 7 .....A.....G.....G.....G.....C...
S700 pac 8 .....A.....G.....G.....G.....C...
Araraquara .....G.....C...

      90      100     110     120     130     140     150     160
Andes ACACGAAACACAGCTCGTGACTGCTCGGCAAAAGCTCAAAGATGCCGAGAAAGCGGTGGAGGTGGACCCGGATGACGTTA
Maciel .....A.....CA...G...G...A...A...A...C...C...A...G...
Segmento S pac 2 .....A.....CA...G...T...A...A...A...T...T...A...G...
S700 pac 7 .....A.....CA...G...T...A...A...A...T...T...A...G...
S700 pac 8 .....A.....CA...G...T...A...A...A...T...T...A...G...
Araraquara .....CA.A.G...T...A...A...A...T...T...A...A...

      170     180     190     200     210     220     230     240
Andes ACAAGAGCACACTACAAAGTAGACGGGCAGCTGTGTCTACATTGGAGACCAAACTCGGGAACTCARGAGGCARCTTGCA
Maciel .....T.....G...C.....A.....T...A...G.....A...G...T...
Segmento S pac 2 .T..A..T..T..G...G...A...A...A...T...G...G...
S700 pac 7 .T..A..T..T..G...G...A...A...A...T...G...G...
S700 pac 8 .T..A..T..T..G...G...A...A...A...T...G...G...
Araraquara .....T...G...G...A...A...A...T...G...G...

      250     260     270     280     290     300     310     320
Andes GATCTGGTGGCAGCTCAAAAATTGGCTACAAAACAGTTGATCCAAACAGGGCTTGAGCCTGATGACCATCTGAAAGAGAA
Maciel .....CT.....C.....A.....G...A...
Segmento S pac 2 .....T...T...G...G...C...T...G...A...G...G...
S700 pac 7 .....T...T...G...G...C...T...G...A...G...G...
S700 pac 8 .....T...T...G...G...C...T...G...A...G...G...
Araraquara .....T...T...G...G...T...A...A...G...

      330     340     350     360     370     380     390     400
Andes ATCATCTCTGAGATATGGGAATGCTTGGATGTTAACTCAATTGATTTGGAAGAACCGAGTGGACAGACTGCTGATTGGA
Maciel .....CT.....T...C...T...T...CC...A...C...C...
Segmento S pac 2 .....A...A...A...C...T...T...CC...T...G...G...A...C...C...A...A...C...
S700 pac 7 .....A...A...A...C...T...T...CC...T...G...G...A...C...C...A...A...C...
S700 pac 8 .....A...A...A...C...T...T...CC...T...G...G...A...C...C...A...A...C...
Araraquara .....A...G...C...T...C...C...T...G...A...C...A...A...C...

      410     420     430     440     450     460     470     480
Andes AGGCTATAGGAGCATATATCTTAGGGTTTGCATTTCCGATCATACTAAGGGCCCTATATATGCTGTCAACCCCGTGGAGA
Maciel .....T.....C...AC.G..T.....C.....TT.G..C.....G...
Segmento S pac 2 .A..A..T..G..T..C...G..A...C...T...T...G...T...T...T...G...
S700 pac 7 .A..A..T..G..T..C...G..A...C...T...TG...G...T...T...T...G...
S700 pac 8 .A..A..T..G..T..C...G..A...C...T...T...G...T...T...T...G...
Araraquara .....A..T..G..T..C...G..T...C...T...T...T...T...T...G...

      490     500     510     520     530     540     550     560
Andes CAGACTGTGAAGACAAACAAGGAACCCAGGATAGGTTTAAAGGATGATTCTTCCTTTGAGAAAGTCAATGGGATACGTAA
Maciel .....G...C...G...G...G...T...A...T...A...C...A...T...A...T...A...G...
Segmento S pac 2 .....A...G...T...G...C...A...A...A...A...T...G...
S700 pac 7 .....A...G...T...G...C...A...A...A...A...T...G...
S700 pac 8 .....A...G...T...G...C...A...A...A...A...T...G...
Araraquara .....A...G...G...C...T...C...A...A...G...C...G...C...G...

```

```

570      580      590      600      610      620      630      640
Andes    ACCAAAAACACCTTTATGTCTCAATGCCAACTGCGCAATCTACTATGAAAGGCTGAAAGAATCACGCCAGGGCGGTTTAGGA
Maciel   G.....G..T..C..CA.....C.....G.....T..G..C..A.....A.....G..G..A..A..T...A.....A..
Segmento S pac 2  .G..T...CA...T...T...C...G...A...A...T...AA...C...
S700 pac 7     T...CA...T...C...G...A...A...T...AA...C...
S700 pac 8     G..T...CA...T...C...G...A...A...T...AA...C...
Araraquara  G..T...A...T...A...C..C...A...G..G..A..A..T...AA...C...

```

```

650      660      670      680      690      700      710      720
Andes    CAATTGCTTGTGGCCTTTCCACGACAGGTCAAAGCTCGAAATATAATAAGTCCCTGTAAATGGGAGTAATTGGATTGGCC
Maciel   .G...TA....AT.G..T..T..T..A..G...C..G...C...C..A..G...G..C...C...T...A..T
Segmento S pac 2  .T...A....AT.G..T...A..A..G..C...C..C..T...A..C...G...C...T...CT
S700 pac 7     .T...A....AT.G..T...A..A..G..C...C..C..T...A..C...G...C...CT
S700 pac 8     .T...A....AT.G..T...A..A..G..C...C..C..T...A..C...G...C...CT
Araraquara  .T...A....GT.A...T...A..G...C..G...C..T...A..C

```

```

730      740      750      760      770      780      790      800
Andes    TTCTTTGTAAAGGACTGGATGGATCGGATAGAGGAATCCCTGGCTGCAGAGTGTCCATTCTTGCCTAAGCCAAAGGTTGC
Maciel   .....G.....T.....A.....G...T...A..G..A..C..T...A.....C..AACR..
Segmento S pac 2  .....A..T.....AA.....A..T...A..CT..T..A..C..G..T..A..A..A..T...AACCC.
S700 pac 7     .....T.....
S700 pac 8     .....T.....
Araraquara  .....

```

```

810      820      830      840      850      860      870      880
Andes    TTCAGAAACCTTCATGCTACCAACAGATGATTTTCCTGAACAGACAAAGCAAGTCAATGAATCTAAGGTTCAAGACA
Maciel   .G..T..GA.A.....G..C.....T...GCA..C..TT.T...G...C..C..G..TG...G...C..A..C..C...T.
Segmento S pac 2  .....G..A.....G..C..A.....AGCT..C..T..C...C...G..AG...TG...C...CT..T.
S700 pac 7     .....
S700 pac 8     .....
Araraquara  .....

```

```

890      900      910      920      930      940      950      960
Andes    TTATGACTTATAGATCATGCTGAACACTGAGTCTGCTACCTTGTTTACAGAAATGCAACACCCCATTCAGTCTGGGTG
Maciel   ..G...AC.T..T..C..G.....GT.....C...C.....A..T.GC.....G.....
Segmento S pac 2  .AG.A..T...T..C.....G.....G..A..T..A...A..G...C.GT..A...T..T...A
S700 pac 7     .....
S700 pac 8     .....
Araraquara  .....

```

```

970      980      990      1000     1010     1020     1030     1040
Andes    TTTGCAATGTCACCTGACCGGTGCCCTCCGACTGCATTGTATGTTGACGGGTACCAGAACTTGGTGCCTTTTCCAT
Maciel   .....TA...T..A...A...A...G...A..G...G..A...C..T..G...
Segmento S pac 2  .....C...TA.A...A...A...A...A...C..AA.G..T...T.A...C...G.G..
S700 pac 7     .....
S700 pac 8     .....
Araraquara  .....

```

```

1050     1060     1070     1080     1090     1100     1110     1120
Andes    TCCTCAGGACATGCGTAATACCATCATGGCATCCAAATCTGTGGGAACTGCAGAAAGAGAGCTGAAGAAGAAATCTGCCT
Maciel   A..A..A..T...A.A...T...A..G...A...T..G...T.A...A...A..
Segmento S pac 2  C...A..T...A.G...T...T...T..G..A..C..T...A.G.T...T...
S700 pac 7     .....
S700 pac 8     .....
Araraquara  .....

```

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 Andes TCTATCAATCTTACCTAAGAAGGACCAATCTATGGGGATTCAACTGGACCAGAAAATCATAATCTCTACATGCTTCA
 MacielTT.G...C.A...G.A...G.G...C.C.G..T..T.G..T
 Segmento S pac 2 ..T..C..G...TT.G..C...G..C...A..A..T.....AT.A...G..C
 S700 pac 7
 S700 pac 8
 Araraquara

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 Andes TGGGGTAAGGAGCTGTGAATCATTTCCATCTTGGTGATGATGGACCCCTGAACTAAGGCAGCTAGCTCAATCCCTAAT
 MacielG..G...C...T...T.G..A..A...A..GG.TT...
 Segmento S pac 2A..C.....T.....TC.C..A..T...G..AT...
 S700 pac 7
 S700 pac 8
 Araraquara

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 Andes TGACACCAAGGTGAAGGAGATCTCCACCCAGAGCCACTCAGTTGTAAGTGCTTA-----ATGARAGGATGATTG--
 Maciel ...T..T..A.....A...G...TT.G...C.....TCA.GG--GTG.AGGGT.G..T..AGTC
 Segmento S pac 2 C..T.....T...A...G...T..A..C...AGTTAA.GATAGT..ATGGC.T.AG..AGTG
 S700 pac 7
 S700 pac 8
 Araraquara

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 Andes --AAGAAAGACTTTCC--GGGCTTGTCCACATA-TTAATCATCTCAGGACCTATCCTTAATGTATTATAGGGTCTT--
 Maciel TT..TG.T.GG...T.AG.....T..GT.....GG..G..--C.....C.....GA--
 Segmento S pac 2 TG.T.GTTC--..TTCT...TGG.A.....A.....A.GG.....-TT.A.A.C.C.AG....A.T
 S700 pac 7
 S700 pac 8
 Araraquara

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 Andes ATTATAAGGGTGCTTAAGGGGTCACTTACTAATACGGGTAAAGGGTTCATTACTATTTTTTGCCTAGGGTTAGAGGGC
 MacielGA.GT...TTAC.....T.....T.CT..C.T..G.AC.AC.A..AA.TACATT.GCACTATT
 Segmento S pac 2AGTT...TTACCTA.TTACG..T.T.CT..C.T..G.AC.A----.TCATATT.GCACTA.G
 S700 pac 7
 S700 pac 8
 Araraquara

1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 Andes CACTACATCGTATTTTGCCTACGGGAAAGGGAGGGTGGGTTAGTCTATATTATA GTTGTAAAGTTTTTGTACTCATAGG
 Maciel GGGG.A..G.GGA.ATACA.GTA.TC.GTAT.TAT.CAA.AT..A.TC.G.G.GTA.C...GT.G...AGTTGTT...
 Segmento S pac 2 GGG.TGGGGACGA..TATAAC..AT.TTGA.TTTTACAT.C.C.AGT..GG-----AATTGTC..A.
 S700 pac 7
 S700 pac 8
 Araraquara

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 Andes TTAATAAGGAATCAGCTATATGAATCAATGATTGATTGGCTATTTTTTTAGGTTAAGTGATTGCAATTTAATAGTTGT
 Maciel .A.G..GCT..CT..T.G.....A..C...CAA..TAG..AG.C.TTA...CCA...AT..C---.TA.GCC
 Segmento S pac 2 .GTTAGGTCTGCT...GC.....G.....CA...GA.CAGG.GATA...TCAT..ATG..--GGA.AA.
 S700 pac 7
 S700 pac 8
 Araraquara

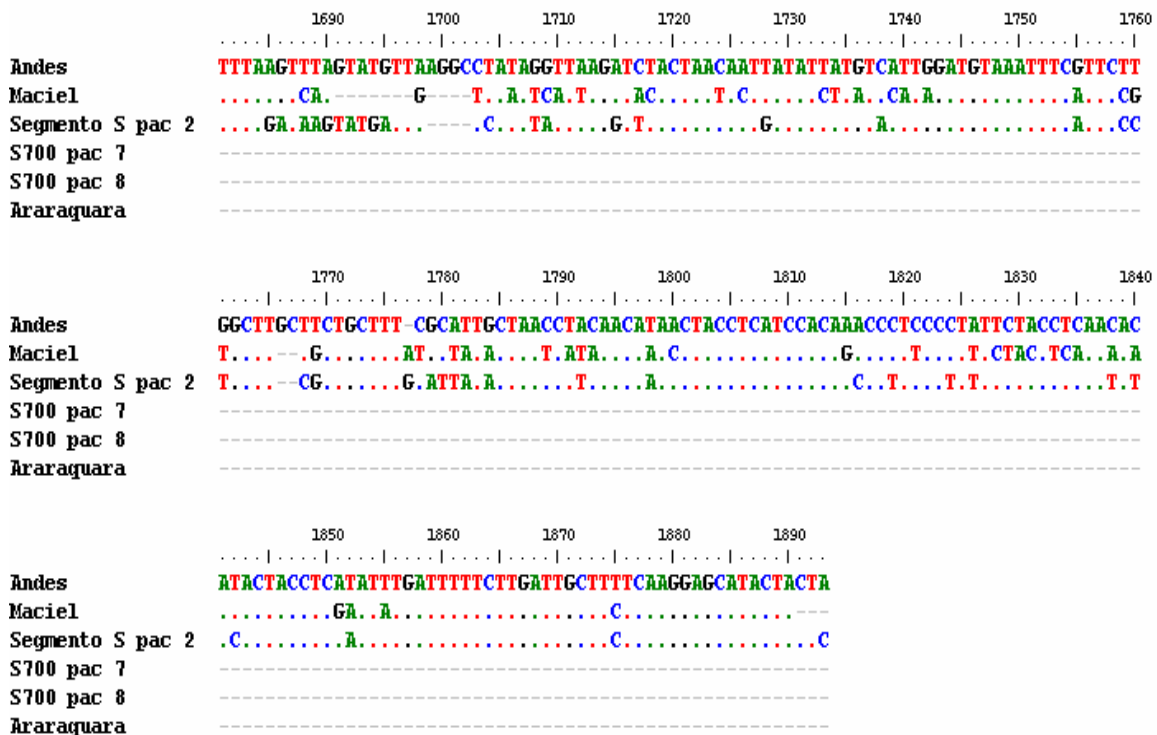


Figura 21. Sequências de DNA fita positiva do segmento S dos isolados de hantavírus circulantes no DF. As seqüências dos hantavírus Andes, Maciel e Araraquara foram usadas para alinhar as seqüências obtidas de pacientes do DF. Pontos representam identidade de nucleotídeos e traços, ausência de informação de seqüência. Os números de acesso das seqüências utilizadas são Araraquara: AF307325, Maciel: AF482716.1 e Andes: AF482715.1.

A seqüência codificadora para uma potencial proteína não estrutural (NS_S) de 7 a 10kDa foi encontrada nos três pacientes (Plyusnin *et al.*, 1996a). Essa fase aberta de leitura é diferente da codificadora da proteína N e tem início no nucleotídeo 111 e fim no 299. A seqüência dessa fase de leitura é altamente conservada sendo idêntica para os pacientes 2 e 8. O paciente 7 apresenta dois nucleotídeos diferentes em relação aos outros pacientes e ambos geram modificações de aminoácidos na predição da proteína NS_S (Figura 22).

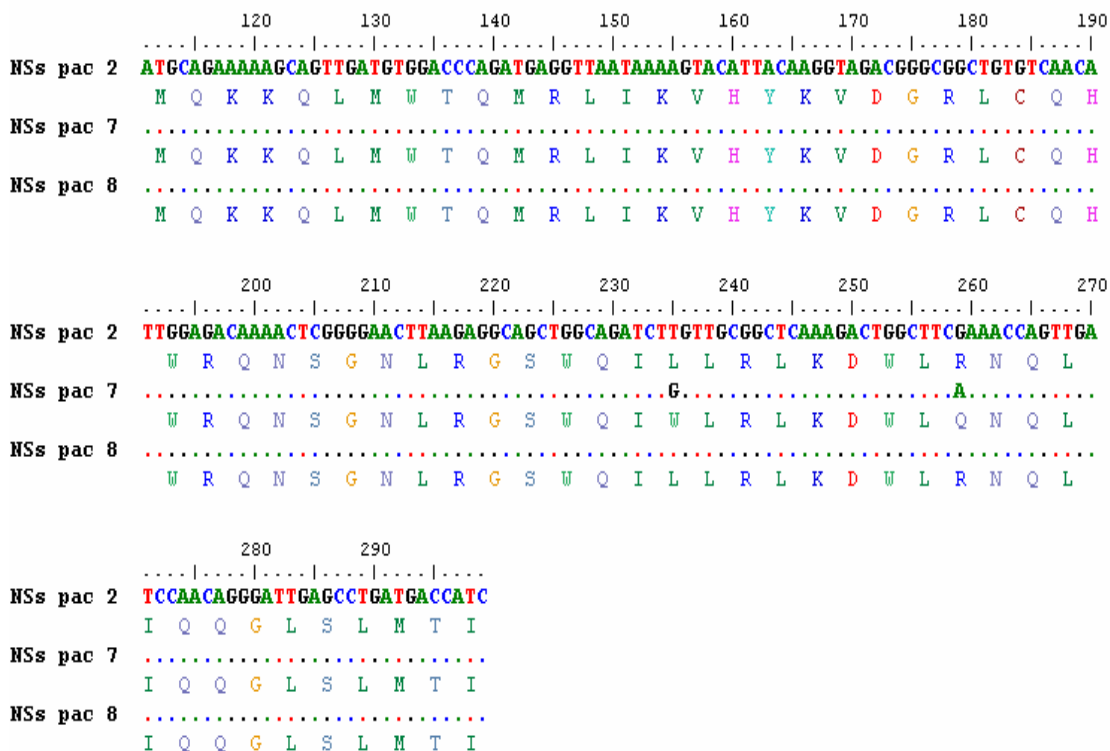


Figura 22. Fase de leitura aberta codificadora de uma potencial proteína não estrutural NS_s. Alinhamento da seqüência de DNA codificadora da potencial NS_s dos três pacientes. Situada entre os nucleotídeos 111 e 299 da fita de DNA positiva do segmento S do paciente 2, essa fase de leitura aberta é diferente da fase codificadora da proteína N apesar de haver sobreposição entre essas seqüências. Os pontos indicam identidade de seqüência de nucleotídeos. A seqüência de aminoácidos da potencial proteína NS_s encontra-se abaixo de cada fase de leitura de cada paciente. Essa região genômica apresenta alta conservação de seqüência sendo que as fases de leitura dos pacientes 2 e 8 são idênticas. O paciente 7 apresenta duas mutações nos nucleotídeos 235 e 259 e ambas geram modificações não conservativas no aminoácido codificado.

A seqüência não codificadora é composta por 531 nucleotídeos em sua extremidade 5' e por 31 nucleotídeos na extremidade 3'. As seqüências envolvidas na formação da estrutura de *panhandle* foram identificadas em ambas as extremidades segundo o padrão previamente proposto (Chizhikov *et al.*, 1995). Entretanto, foi verificada deleção de alguns nucleotídeos conservados para a constituição do *panhandle* na extremidade 3' não codificadora. Ainda na extremidade 3', uma mutação de U para C na posição 28 foi encontrada. Na extremidade 5' não codificadora, foram identificadas duas mutações nas posições 1 e 19 em relação a outros hantavírus (Figura 23). Ambas mutações aparecem em regiões de alta qualidade do cromatograma em todos os clones analisados.

Extremidade 3' não codificadora		
	10	20
3'	AUCAUCAUCUGAGGAACUCUUCGAUGAU	SN
3'A.C.CU.....	BAY
3'A.C.CU.....	BCC
3'A.C.UC.....	PH
3'A.C.UC.....	PUU Sotkamo
3'A.C.UC.....	PUU 90-13
3'G.U.UC.....	SEO 80-39
3'G.U.UC.....	HTN 76-118
3'	...A.C. AU C	Paciente 2 DF
Extremidade 5' não codificadora		
	10	20
5'	UAGUAGUAUGCUCUUGAAAAGCAAU	SN
5'A.....U.G.....CA.U	BAY
5'G.....U.G.....CA.U	BCC
5'A.....U.G.....CA.U	PH
5'G.....U.G.....CA.U	PUU Sotkamo
5'G.....U.G.....CA.U	PUU 90-13
5'G.....C.A.....AC.A	SEO 80-39
5'G.....C.A.....AC.A	HTN 76-118
5'	GG.....U.G. GCA.U	Paciente 2 DF

Figura 23. Análise das terminações não codificadoras do segmento S do paciente 2 envolvidas na formação da estrutura de *panhandle*. Figura adaptada de Chizhikov e colaboradores (1995). As seqüências de RNA fita negativa estão alinhadas de forma a destacar as seqüências terminais de cada segmento genômico. A identidade de nucleotídeos está representada por ponto e os nucleotídeos ressaltados em cinza são as posições onde foram encontradas mutações. Em cinza-claro estão destacadas as mutações localizadas em posições de alta conservação e em cinza-escuro está destacada uma mutação localizada em uma posição de alta variabilidade. Na terminação 3' da extremidade 3' houve deleção de 11 nucleotídeos e, na sua terminação 5', houve uma mutação de U para G (posição 28). Na extremidade 5', foram encontradas duas mutações (posições 1 e 19) em relação a outros hantavírus. SN: Sin Nombre, BAY: Bayou, BCC: Black Creek Canal, PH: Prospect Hill, PUU: Puumala, SEO: Seoul, HTN: Hantaan e DF: Distrito Federal.

O fragmento S700 (posição 34 a 723 do segmento S) do paciente 7 apresentou uma deleção de 69 nucleotídeos em relação aos dois outros pacientes. A posição da deleção compreendeu os nucleotídeos 488 a 557 da seqüência de nucleotídeos do segmento S completo do paciente 2. Essa deleção foi encontrada em seus três clones sequenciados e os cromatogramas de seqüência apresentaram razoável qualidade nessa região. A fase de leitura da proteína N foi modificada pela deleção de forma que a seqüência obtida do paciente 7 codificaria uma proteína N truncada (Figura 24).

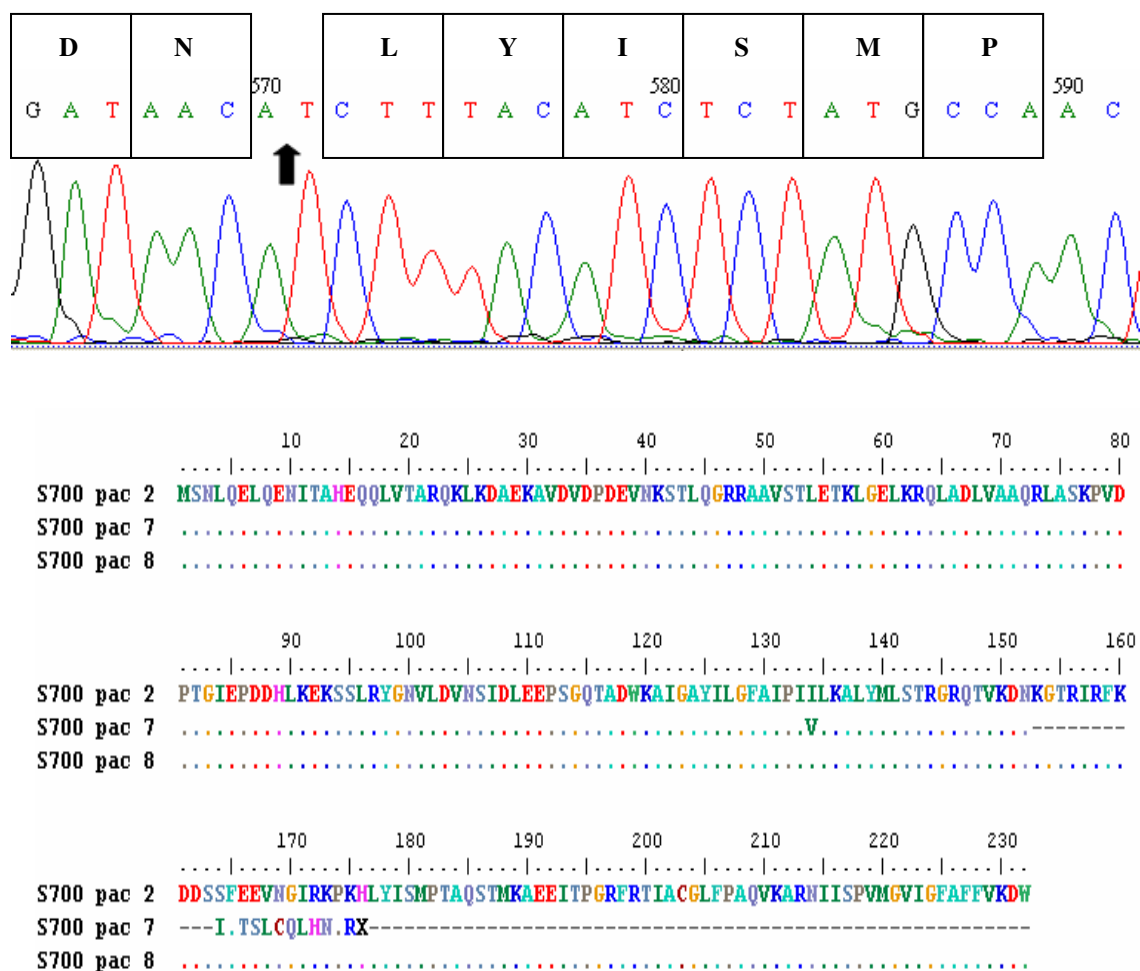


Figura 24. Análise da deleção de 69 nucleotídeos na seqüência codificadora da proteína N do paciente 7. O cromatograma da qualidade do seqüenciamento de nucleotídeos da região na qual está presente a deleção de 69 nucleotídeos de um dos clones do paciente 7 está apresentado na porção superior da figura. A seta preta indica a posição na qual os nucleotídeos deletados estão inseridos na seqüência dos dois outros pacientes. A numeração no cromatograma não diz respeito à posição da seqüência no segmento genômico viral. Os retângulos pretos indicam a fase de leitura da proteína. Na porção inferior da figura mostrou-se o alinhamento das seqüências de aminoácidos previstas a partir dos fragmentos S700 amplificados dos três pacientes. A deleção de 23 aminoácidos no paciente 7 é iniciada no aminoácido 153 e, como se pode observar, compromete a fase de leitura do restante da proteína abolindo o alinhamento da seqüência do paciente 7 e gerando um códon de terminação prematuro (indicado por X na seqüência).

A seqüência da proteína N

A proteína N codificada pelo segmento S do hantavírus circulante no DF é constituída por 428 aminoácidos e sua seqüência é conservada em relação a outros hantavírus (Figura 25).

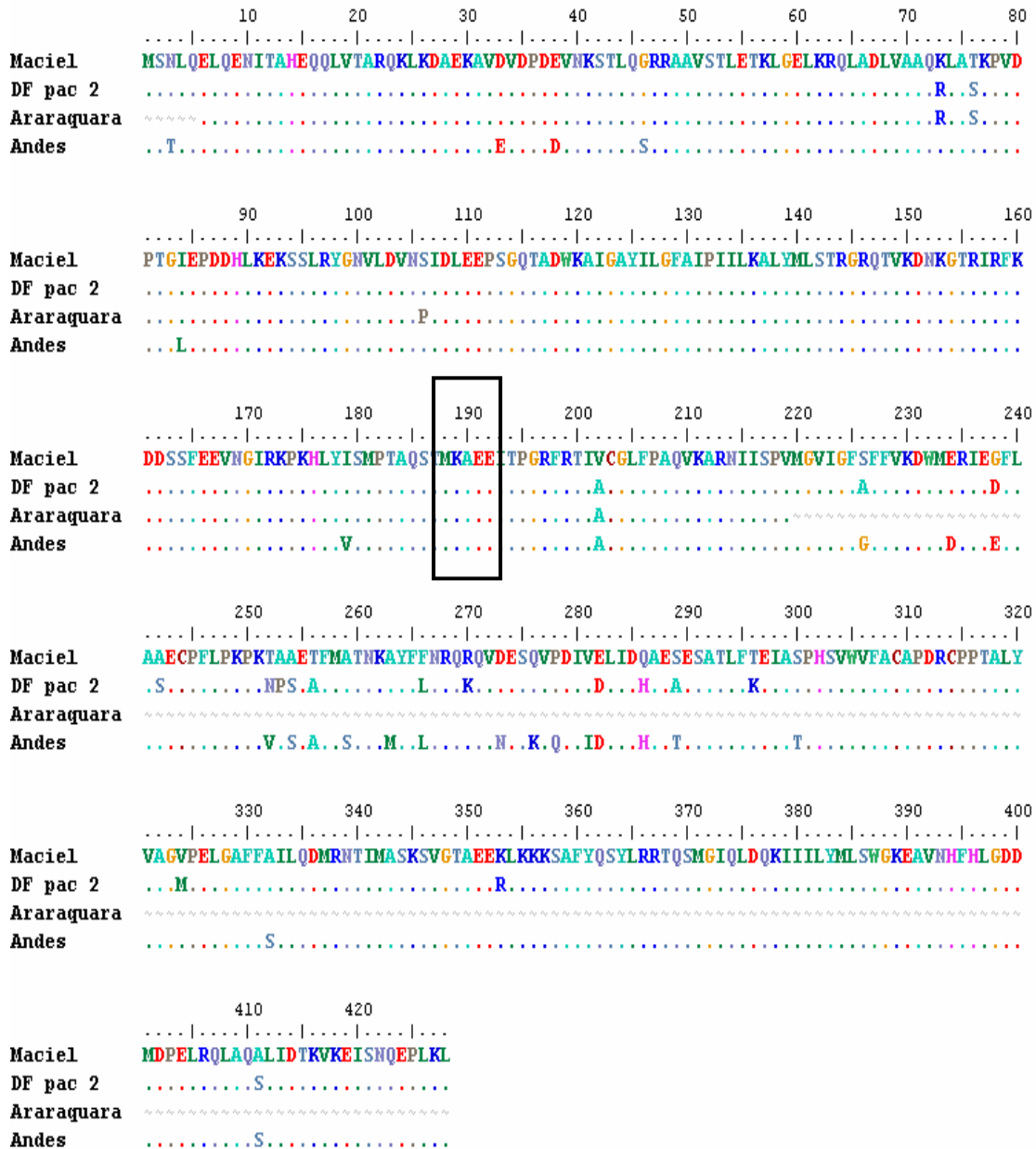


Figura 25. Seqüência deduzida da proteína do nucleocapsídeo codificada pelo segmento S do hantavírus circulante no DF. As seqüências da proteína N dos hantavírus Araraquara, Maciel e Andes foram alinhadas com a seqüência de aminoácidos obtida do paciente 2. Os pontos indicam identidade de aminoácidos e o til (~) indica ausência de informação de seqüência. O motivo MKAE, envolvido na interação da proteína N com SUMO-1 e Ubc-9 e na sua localização perinuclear, está conservado na posição 188 da proteína deduzida do paciente 2 e está destacado por um retângulo preto.

O motivo MKAE, envolvido na interação da proteína N com SUMO-1 e Ubc9 e na localização perinuclear dessa proteína (Maeda *et al.*, 2003), está conservado na posição 188 da seqüência predita da proteína N dos pacientes 2 e 8 (Figura 25).

Os três conjuntos de resíduos de aminoácidos, constituintes da estrutura hélice-volta-hélice responsável pela oligomerização da proteína N, descritos por Kaukinen e colaboradores (2004) foram identificados por alinhamento com o TULV (Figura 26). Algumas mutações foram encontradas, mas os motivos em geral estão conservados.

Andes		GIQLDQKIIILYMLS	
DF paciente 2		
Tula	373 R..L.F.TE	387
Andes		WGKEAVNHFHLGDDMD	
DF paciente 2		
Tula	388	.. SDI	403
Andes		PELRQLAQSLIDTKVKEI	
DF paciente 2		
Tula	404 T Q	421

Figura 26. Motivos envolvidos na oligomerização da proteína N. Os três conjuntos de resíduos de aminoácidos constituintes da estrutura de hélice-volta-hélice na proteína N do vírus circulante no DF foram identificados por alinhamento com a seqüência da proteína N do TULV. Os aminoácidos idênticos estão simbolizados por ponto e em cinza estão destacadas as mutações não conservativas. O número de acesso do ANDV é AF482715.1 e do TULV é NC005228.

A seqüência, entre os resíduos de aminoácidos 195 a 217, envolvida na interação proteína N e RNA viral foi identificada por alinhamento com o HTNV (Severson *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2002; Figura 27). Em comparação ao HTNV, os resíduos E192 e Y217 da proteína N estão conservados nas seqüências dos pacientes do DF. Na posição 206, ao invés de tirosina foi encontrado uma fenilalanina. Essa

modificação, além de conservativa, está presente em vários hantavírus (TULV, SNV, ANDV). Esses três resíduos (E192, Y206 e S217) foram implicados na interação da proteína N com o RNA viral do HTNV (Severson *et al.*, 2005).

	192	217
Andes	EITPGRFRTIACGLFPAQVKARNIIS	
DF pac 2	
DF pac 8	
HantaanY..AI...Y...I...QM..	
	*	*

Figura 27. Sequência envolvida na interação da proteína N com o RNA viral. A sequência da proteína previamente descrita na sua interação com RNA viral foi identificada por alinhamento com a sequência da proteína N do HTNV (Número de acesso: AAG60259.1). Os aminoácidos idênticos estão simbolizados por ponto e as três posições (E192, Y206 e S217) descritas como cruciais para essa interação estão destacadas por asteriscos. A sequência é conservada nos pacientes do DF em relação ao HTNV e todas as mutações encontradas podem ser consideradas conservativas.

Sequência dos fragmentos do segmento M

A análise do seqüenciamento dos fragmentos denominados G1 e G2 do segmento M do paciente 2 foi feita de acordo com o descrito nos Materiais e Métodos (seção Análise do seqüenciamento). A procura por seqüências similares aos fragmentos G1 e G2 no banco de dados do NCBI por meio da ferramenta de BLASTn teve como resultado diversas linhagens de hantavírus, em especial as sul-americanas.

O fragmento G1 apresentou alinhamento nas posições esperadas (1720 a 2019) descritas por Johnson e colaboradores (1997) em relação ao segmento M do ANDV. A sequência de nucleotídeos amplificada nesse fragmento corresponde aos resíduos de aminoácidos 554 a 651 do precursor glicoproteico deduzido a partir da sequência de nucleotídeos do segmento M. A sequência de aminoácidos em questão inclui a região carboxi-terminal da glicoproteína G1 e o domínio hidrofóbico III do precursor glicoproteico descrito para o HTNV (Figura 6; Löber *et al.*, 2001).

O domínio hidrofóbico III é dividido em tres regiões distintas: N = básica, H = hidrofóbica e C = polar e essas três regiões constituintes de um potencial peptídeo sinal foram encontradas na sequência de aminoácidos predita pelo fragmento G1 do paciente 2 (Figura 28). A região N está conservada nos hantavírus sul-americanos em relação ao

HTNV embora uma modificação não conservativa do aminoácido 622 de asparagina (HTNV) para glicina esteja presente nas linhagens sul-americanas. A região H é conservada entre os hantavírus sul-americanos analisados, mas apresenta modificações não conservativas em relação à seqüência do HTNV. As posições de maior divergência entre o HTNV e os sul-americanos na região H são os resíduos de aminoácidos 633, 634, 637, 638, 641 e 642. Na região C, há conservação de seqüência de aminoácidos entre todas as linhagens de hantavírus analisadas. A posição 644 foi a única que apresentou uma modificação não conservativa de serina no HTNV para uma leucina ou isoleucina nos hantavírus sul-americanos. Em adição o motivo WAASA, conservado em diversos hantavírus, apresentou uma mutação conservativa na posição 649 de alanina para uma valina no paciente 2 do DF resultando no motivo WAVSA (Figura 28). A qualidade do seqüenciamento dos nucleotídeos codificadores da valina na posição 649 foi alta em todos os clones seqüenciados.

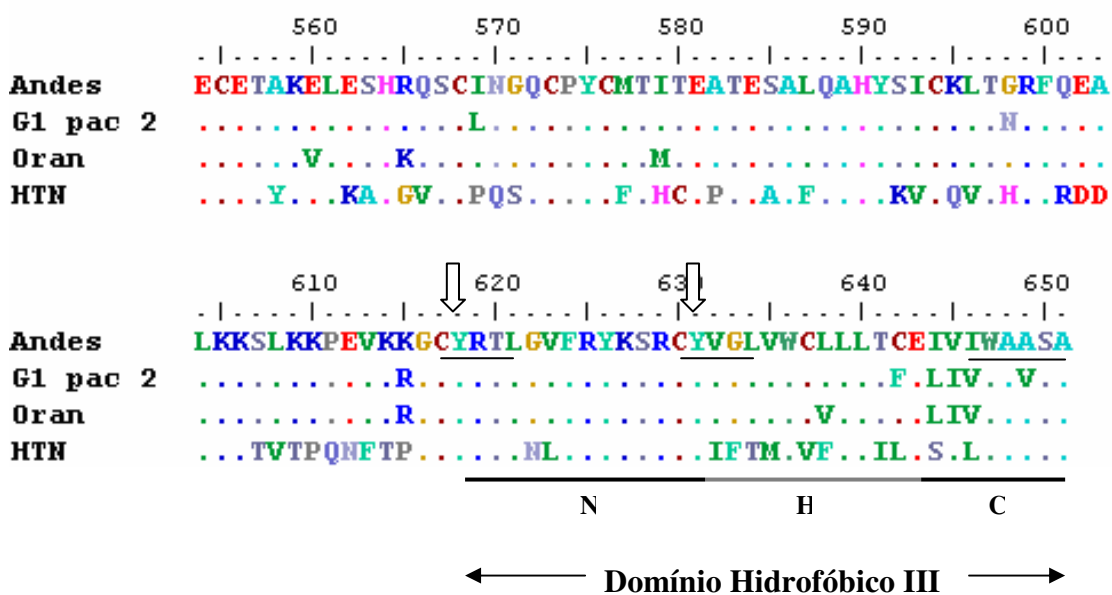


Figura 28. Seqüência de aminoácidos predita a partir do fragmento G1 do segmento M. Alinhamento da seqüência de resíduos de aminoácidos obtida do fragmento G1 sequenciado com hantavírus sul-americanos (ANDV e ORNV) e o HTNV. A seqüência de aminoácidos obtida (554 a 651) inclui a porção carboxi-terminal da glicoproteína G1 e o domínio hidrofóbico III descrito por Löber e colaboradores (2001) do precursor glicoproteico. As três regiões N (básica), H (hidrofóbica) e C (polar) constituintes de um potencial peptídeo sinal estão presentes na seqüência do isolado 2 do DF e são conservadas entre os hantavírus sul-americanos. O motivo WAASA da região C está sublinhado e apresentou uma modificação para WAVSA no isolado brasileiro. As setas largas destacam os resíduos de tirosina conservados e constituintes do domínio ITAM de G1. A partir dos resíduos de tirosina estão as seqüências Yxx(L/I) sublinhadas.

O motivo ITAM presente na cauda citoplasmática da glicoproteína G1 de hantavírus americanos é formado por duas seqüências Yxx(L/I) em tandem entre os resíduos de aminoácidos 611 e 652. A seqüência de aminoácidos deduzida a partir do fragmento G1 do paciente 2 apresenta as duas seqüências em tandem constituintes do motivo ITAM (Figura 28). As seqüências Yxx(L/I) do hantavírus brasileiro são conservadas em relação às linhagens sul-americanas. O HTNV não possui o motivo ITAM uma vez que apenas uma das seqüências Yxx(L/I) está presente. A ausência ou presença desse motivo tem sido implicada na diferença de patogênese de hantavírus causadores de HFRS e de HCPS. Os resíduos de tirosina destacados na Figura 29 por setas são conservados em diversos hantavírus e são responsáveis pela ubiquitinação da glicoproteína G1 (Geimonen *et al.*, 2003a).

A seqüência do fragmento G2 apresentou alinhamento nas posições esperadas (2770 a 3223) em relação ao segmento M do ANDV segundo informações obtidas sobre os iniciadores pelo IAL. A seqüência de nucleotídeos amplificada nesse fragmento corresponde aos resíduos de aminoácidos 906 a 1056 do precursor glicoproteico deduzido a partir da seqüência de nucleotídeos do segmento M (Figura 29). Como a clivagem do precursor ocorre após o motivo WAASA (resíduo 652 aproximadamente, Löber *et al.*, 2001), podemos inferir que o fragmento em questão corresponde aos aminoácidos 254 a 404 da glicoproteína G2.

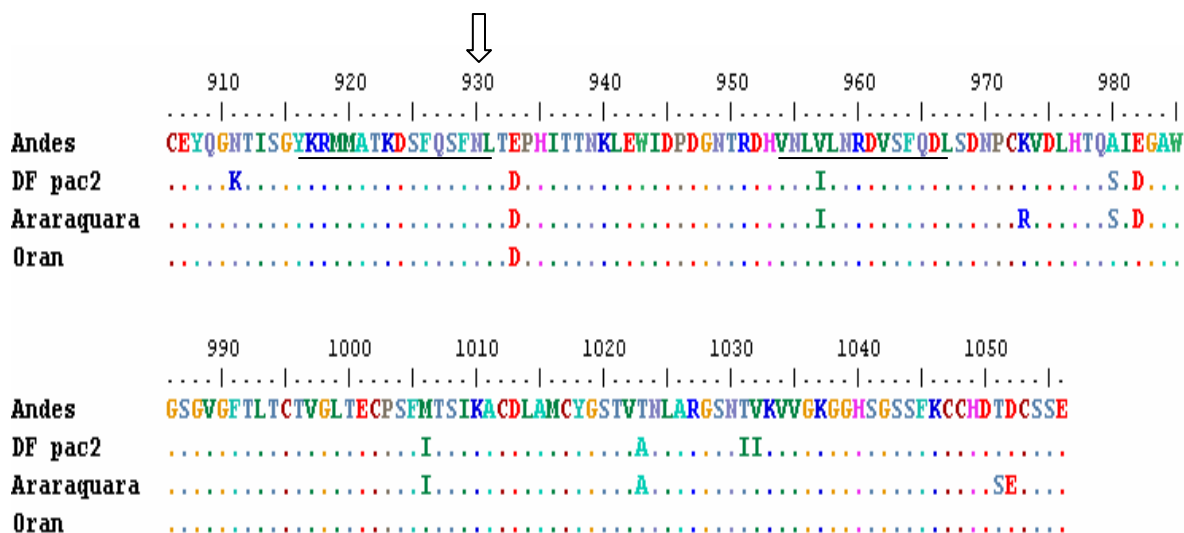


Figura 29. Seqüência de aminoácidos predita a partir do fragmento G2 do segmento M. Alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzida do fragmento G2 com linhagens virais sul-americanas. A seqüência obtida corresponde aos resíduos de aminoácidos 906 a 1056 da glicoproteína precursora. O sítio de N-glicosilação N928 descrito para o HTNV (Shi & Elliot, 2004) está presente nas linhagens sul-americanas na

posição indicada pela seta. Dois epitopos imunodominantes de G2 para homens e roedores descritos para o ANDV (Tischler *et al.*, 2005a) estão sublinhados.

Na seqüência de aminoácidos deduzida do fragmento G2 do paciente 2, está conservado o sítio de N-glicosilação N930 descrito para o HTNV por Shi & Elliot (2004). Na seqüência obtida da glicoproteína G2, estão presentes também dois epitopos imunogênicos reconhecidos por homens e roedores para o ANDV. Os epitopos estão compreendidos entre os resíduos de aminoácidos 918 a 930 e 955 a 967 (Tischler *et al.*, 2005a; Figura 29).

Análise filogenética

A análise de identidade de nucleotídeos realizada conforme o descrito nos Materiais e Métodos indica que os isolados circulantes no DF possuem maior identidade entre si do que em relação a outras linhagens de hantavírus brasileiras e sul-americanas. A análise de identidade da seqüência do fragmento S700 dos três pacientes mostrou que os pacientes 2 e 8 são idênticos (identidade igual a 1,0) e ambos apresentaram identidade igual a 0,993 em relação ao paciente 7. A seqüência de aminoácidos deduzida a partir dos fragmentos S700 dos três pacientes apresenta, além da deleção de 23 aminoácidos no paciente 7, apenas uma modificação de isoleucina para uma valina na posição 134 do paciente 7 em relação aos dois outros isolados do DF.

A identidade de nucleotídeos entre o paciente 2 do DF e os sul-americanos está detalhada na Tabela 6. Os valores de identidade obtidos para o fragmento S700 do paciente 2 em relação aos hantavírus sul-americanos foram iguais para a mesma análise com os outros dois pacientes. Considerando as seqüências disponíveis para as variantes brasileiras, o hantavírus mais relacionado é o Araraquara. Em adição, as seqüências de aminoácidos deduzidas a partir dos fragmentos S700 dos isolados 2 e 8 e da linhagem Araraquara apresentam apenas uma diferença de resíduo de aminoácido na posição 106 (prolina no Araraquara e serina no DF). O paciente 7, além dessa divergência na posição 106, também apresenta em relação ao Araraquara a deleção de 23 aminoácidos e a diferença de aminoácido na posição 134, que o distingue dos outros isolados do DF.

Em geral, os valores de identidade obtidos entre o isolado 2 e os hantavírus sul-americanos foram menores para o segmento S do que para o fragmento S700. Essa diminuição de identidade é explicada pelo acréscimo de dados de seqüências não codificadoras, geralmente menos conservadas em relação a seqüências codificadoras.

Na análise do segmento S completo, o vírus Maciel é o mais próximo. Em contrapartida, para os fragmentos de M analisados o vírus Maciel foi o de menor identidade. Os valores de identidade apresentados na Tabela 6 para o segmento M são correspondentes aos dois fragmentos G1 e G2 concatenados.

Tabela 6. Identidade de nucleotídeos de hantavírus sul-americanos em relação ao isolado 2 do DF.

Hantavírus	S700	Segmento S	Fragmentos do segmento M
Araraquara	0,930	-	0,935
Maciel	0,849	0,805	0,799
Oran	0,839	0,757	-
Andes	0,839	0,765	0,827
Castelo dos Sonhos	0,827	-	0,814
Lechiguanas	0,823	0,744	0,808
Pergamino	0,839	0,777	0,817
Araucaria	0,823	0,752	-

A análise de *Maximum likelihood* obtida por meio do programa BioEdit/PHYMLIP *package* para a seqüência de nucleotídeos que codifica a porção amino-terminal da proteína N indica que as linhagens Araraquara e Maciel são as mais relacionadas aos isolados do Distrito Federal. Os isolados do DF constituíram um ramo monofilético na árvore obtida, sugerindo que os isolados analisados refletem a existência de um hantavírus circulante no DF e descartando a possibilidade de eventos aleatórios na introdução de vírus na região. Os valores de *bootstrap* calculados pelo método *neighbor joining* garantem a confiabilidade das relações filogenéticas estabelecidas pelo método *Maximum likelihood* (Figura 30).

Para a seqüência completa do segmento S, a variante Maciel foi a mais próxima ao hantavírus circulante no DF embora o hantavírus Araraquara não tenha entrado na análise por falta de disponibilidade de seqüência (Figura 31). Os valores de *bootstrap* obtidos para o segmento S garantem a associação do hantavírus circulante no DF ao clado argentino/chileno no contexto filogenético sul-americano.

As análises das seqüências do segmento M confirmaram os dados obtidos para o segmento S, sendo a variante Araraquara a mais relacionada aos isolados deste

trabalho (Figuras 32 e 33). Apenas para a seqüência do segmento M codificadora de G2 (Figura 33), a variante Maciel não foi a segunda mais próxima.

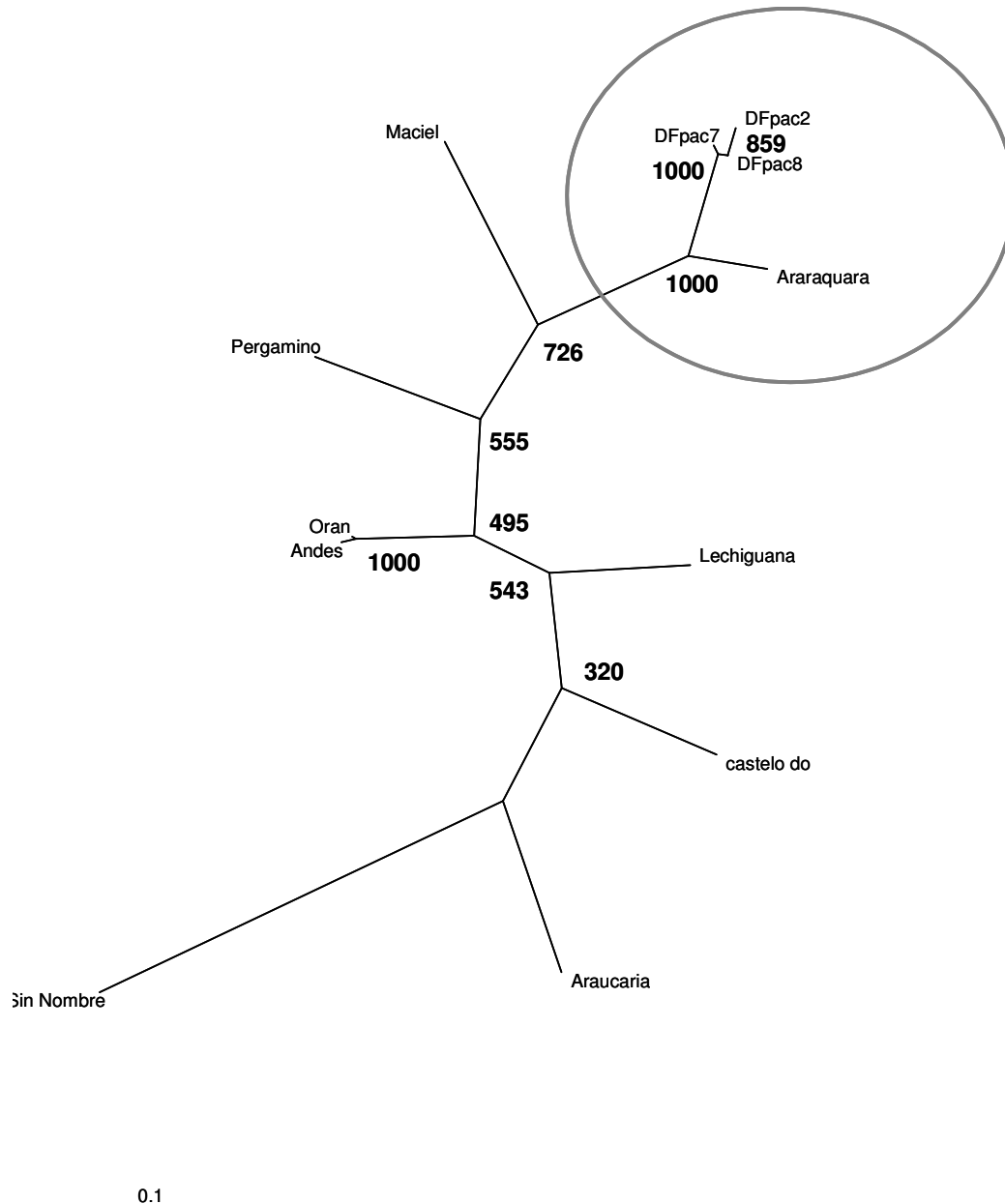


Figura 30. Análise filogenética dos três isolados do DF. A seqüência de nucleotídeos dos pacientes 2, 7 e 8 correspondente ao fragmento S700 foi utilizada em análise de *Maximum Likelihood* com outras linhagens de hantavírus sul-americanos. Após alinhamento das seqüências de todos os hantavírus analisados, foram descartadas todas as posições nas quais havia falha no alinhamento em alguma das linhagens ou falta de informação de seqüência. O SNV foi definido como grupo externo. Os valores de *bootstrap* foram calculados pelo método *neighbor joining* com fator de correção F84 e 1000 réplicas. Os números de acesso das seqüências utilizadas são Araraquara: AF307325, Maciel: AF482716, Oran: AF482715, Castelo dos Sonhos: AF307324, Andes: AF324902, Araucária: AY740633, Pergamino: AF482717, Lechiguana: AF482714, Sin Nombre: NC_005216.

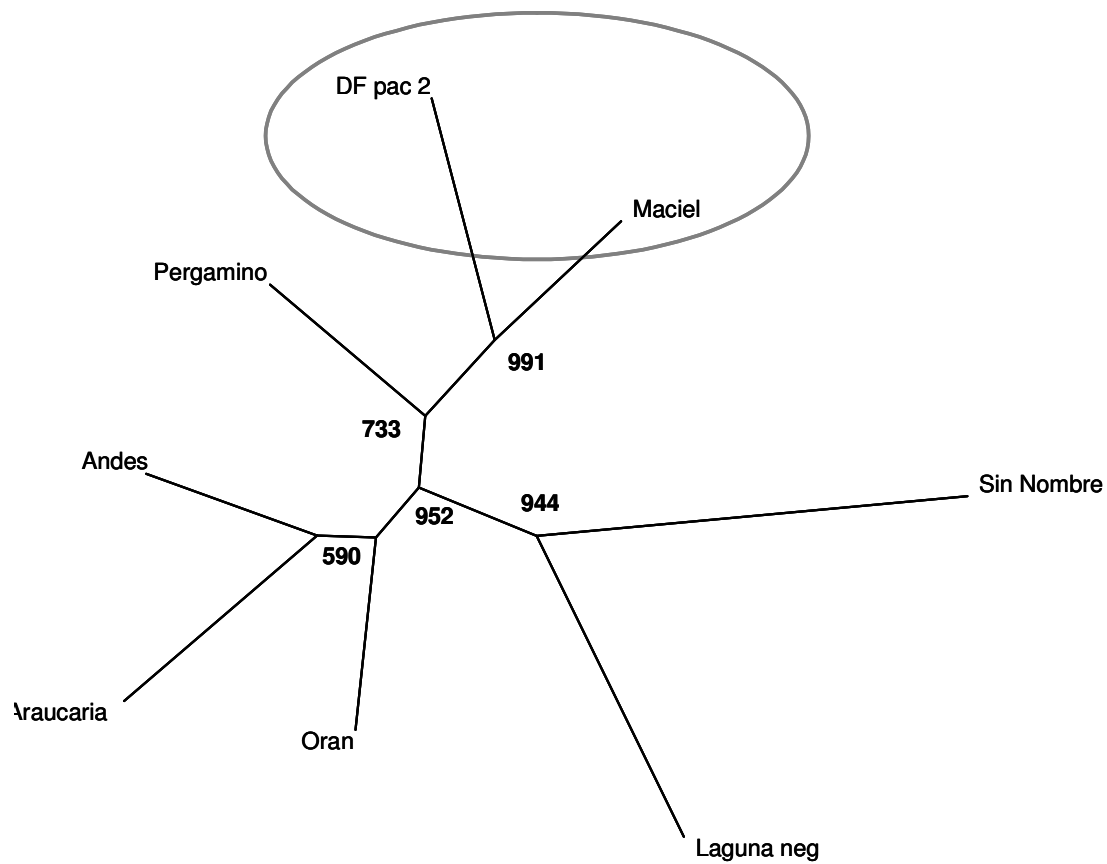


Figura 31. Análise filogenética do segmento S. A seqüência de nucleotídeos do segmento S do paciente 2 foi utilizada em análise de *Maximum Likelihood* com outras linhagens de hantavírus sul-americanos. Após alinhamento das seqüências de todos os hantavírus analisados, foram descartadas todas as posições nas quais havia falha no alinhamento em alguma das linhagens ou falta de informação de seqüência. O SNV foi definido como grupo externo. Os valores de *bootstrap* foram calculados pelo método *neighbor joining* com fator de correção F84 e 1000 réplicas. Os números de acesso das seqüências utilizadas são Maciel: AF482716, Oran: AF482715, Andes: AF324902, Laguna Negra: AF005727, Araucária: AY740633, Pergamino: AF482717 e Sin Nombre: NC_005216.

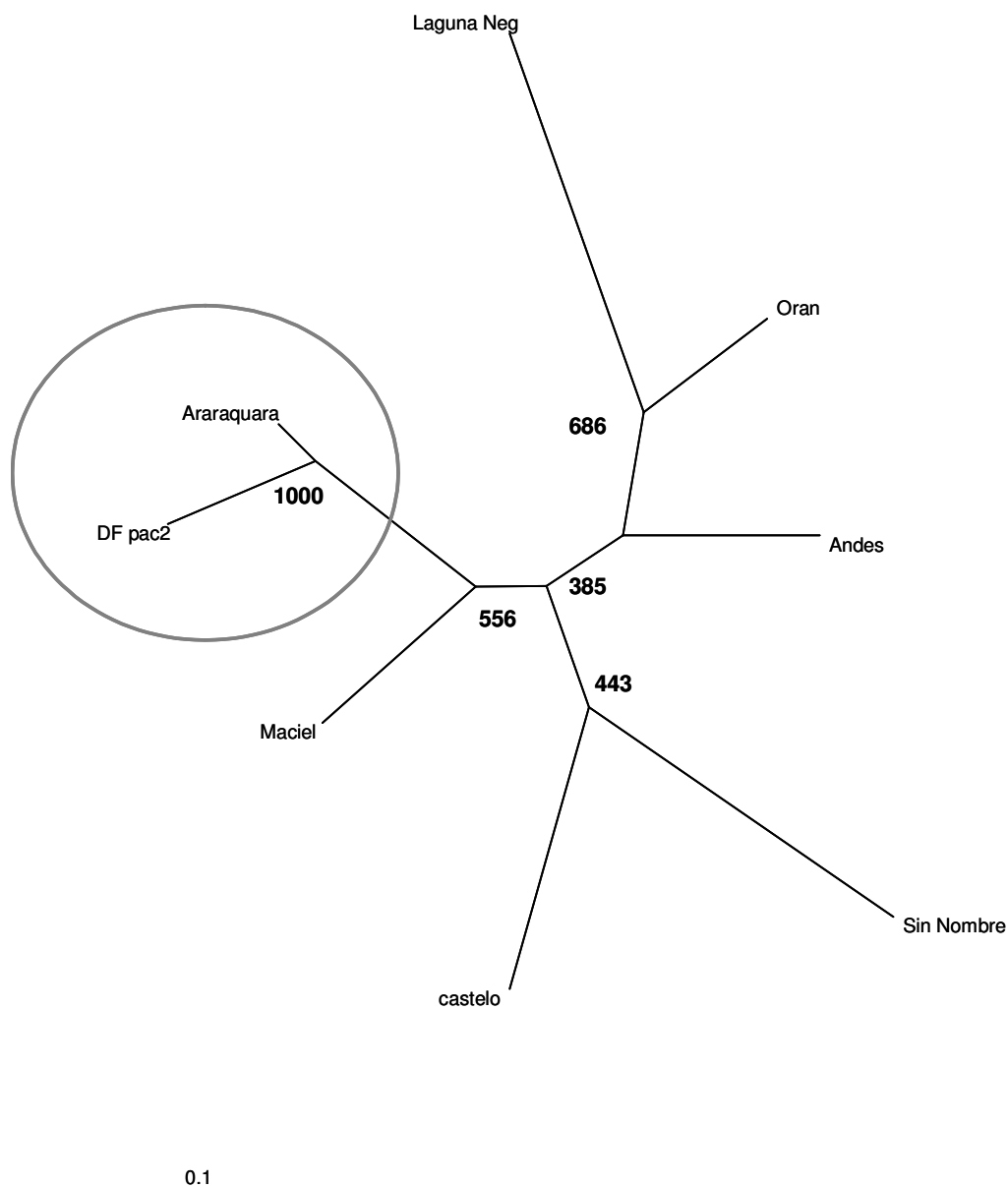


Figura 32. Análise filogenética do fragmento G1 do segmento M. A seqüência de nucleotídeos do fragmento G1 do segmento M do paciente 2 foi utilizada em análise de *Maximum Likelihood* com outras linhagens de hantavírus sul-americanos. Após alinhamento das seqüências de todos os hantavírus analisados, foram descartadas todas as posições nas quais havia falha no alinhamento em alguma das linhagens ou falta de informação de seqüência. O SNV foi definido como grupo externo. Os valores de *bootstrap* foram calculados pelo método *neighbor joining* com fator de correção F84 e 1000 réplicas. Os números de acesso das seqüências utilizadas são Araraquara: AF307327, Castelo dos Sonhos: AF307326, Maciel: AF028027, Oran: AF028024, Andes: NC_003467, Laguna Negra: AF005728 e Sin Nombre: NC_005215.

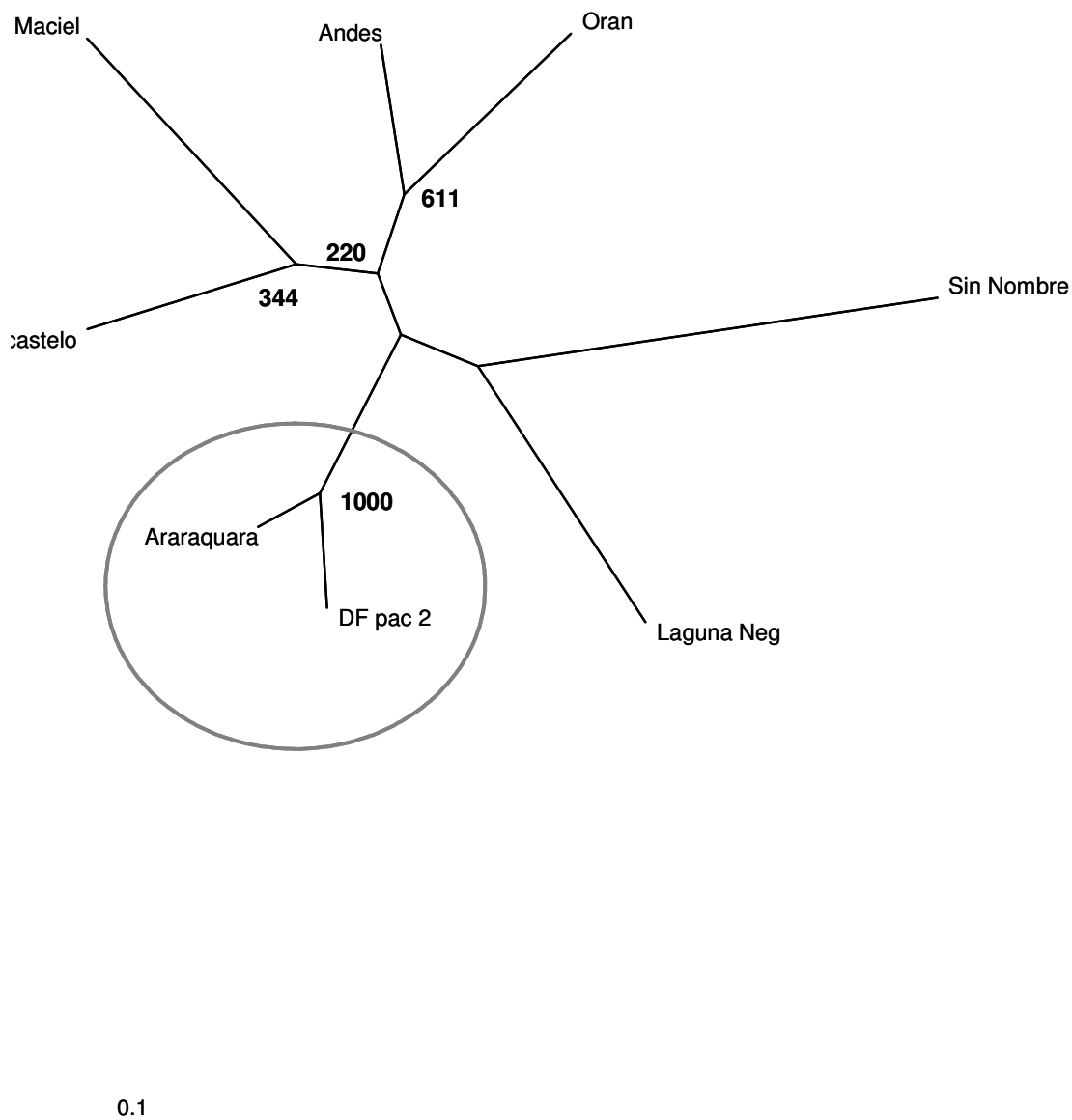


Figura 33. Análise filogenética do fragmento G2 do segmento M. A seqüência de nucleotídeos do fragmento G2 do segmento M do paciente 2 foi utilizada em análise de *Maximum Likelihood* com outras linhagens de hantavírus sul-americanos. Após alinhamento das seqüências de todos os hantavírus analisados, foram descartadas todas as posições nas quais havia falha no alinhamento em alguma das linhagens ou falta de informação de seqüência. O SNV foi definido como grupo externo. Os valores de *bootstrap* foram calculados pelo método *neighbor joining* com fator de correção F84 e 1000 réplicas. Os números de acesso das seqüências utilizadas são Araraquara: AF307327, Castelo dos Sonhos: AF307326, Maciel: AF028027, Oran: AF028024, Andes: NC_003467, Laguna Negra: AF005728 e Sin Nombre: NC_005215.

Discussão

Neste trabalho foram desenhados iniciadores inéditos para a amplificação do segmento S de hantavírus brasileiros e sua eficácia foi comprovada em isolados circulantes no DF. A estratégia utilizada permitiu a amplificação desse segmento por completo a partir de quatro produtos de 2ª reação de PCR. Em adição, apenas na junção dos fragmentos S880-1225 e S1225-61 circular não houve sobreposição de seqüência e, assim, possíveis mutações inseridas pelos iniciadores não puderam ser detectadas. A escolha do método de ligação das extremidades para seqüenciamento de mRNAs (Mandl *et al.*, 1991) foi crucial para a garantia de que a seqüência das terminações envolvidas não seria originada do iniciador.

O segmento S amplificado da linhagem circulante no DF apresenta tamanho similar ao esperado para hantavírus, assim como o tamanho da seqüência codificadora da proteína N e das seqüências não codificadoras (Plyusnin *et al.*, 1996a). A seqüência do segmento S apresentou razoável similaridade com outros hantavírus, principalmente os sul-americanos.

A terminação 5' não codificadora envolvida na estrutura de *panhandle* encontrada nesses isolados é conservada em relação a outros hantavírus (Figura 23) exceto por duas mutações em posições de alta conservação. Apesar de localizadas em posições conservadas, as mutações nas posições 1 (U para G) e 19 (A para G) podem ainda assim permitir a formação da estrutura de *panhandle*. De forma semelhante, a mutação encontrada na terminação 3' na posição 28 da estrutura de *panhandle* pode não eliminar essa conformação secundária, mas sim representar uma característica da variabilidade das variantes circulantes nessa região. A potencial estrutura de *panhandle* codificada pelo segmento S do paciente do DF foi predita na Figura 34.

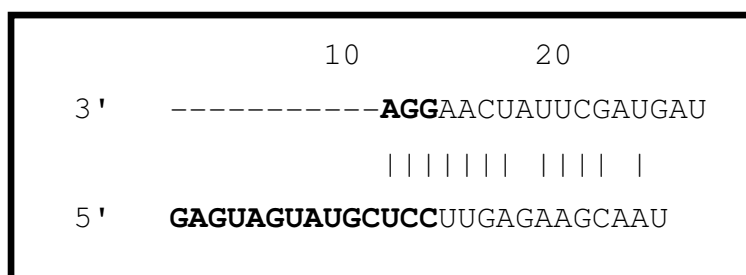


Figura 34. Predição da estrutura de *panhandle* do segmento S do isolado circulante no DF. As extremidades 3' e 5' do segmento genômico S do paciente 2 foram alinhadas de forma a evidenciar a provável estrutura de *panhandle*. Em negrito estão destacadas as seqüências terminais específicas do gênero. As linhas verticais indicam complementariedade de seqüência.

As deleções encontradas na extremidade 3' não codificadora já haviam sido descritas na literatura (Kukkonen *et al.*, 1998) e uma possível explicação reside no mecanismo de replicação de *prime and realign* empregado por hantavírus (Garcin *et al.*, 1995). Em seu trabalho com o TULV, Kukkonen e colaboradores (1998) mostraram a heterogeneidade de seqüências encontrada em terminações 3' principalmente dos segmentos S e L incluindo deleções e adições. As deleções obtidas na extremidade 3' pode ser também um reflexo do número reduzido de isolados utilizados no presente trabalho e da natureza heterogênea inerente aos vírus de RNA. Se a hipótese de heterogeneidade da extremidade 3' do segmentos genômicos oriunda do mecanismo de replicação por *prime and realign* estiver correta, a amplificação e o seqüenciamento de outros isolados de hantavírus do DF apresentará seqüências com extremidades completas, com adições e deleções.

Um argumento que poderia ser sugerido para explicar as deleções presentes na extremidade 3' seria o de degradação do RNA genômico viral por exonucleases. Entretanto, como a extremidade 5' do segmento S encontra-se completa, a hipótese de degradação do genoma parece improvável. Em adição, no mesmo trabalho citado acima, Kukkonen e colaboradores (1998) encontraram baixas taxas de heterogeneidade no segmento M e alta heterogeneidade nos segmentos S e L. Essa diferença de heterogeneidade encontrada entre os segmentos genômicos do TULV dificilmente seria originada de degradação por RNases na célula hospedeira ou pelo processo de manipulação do RNA viral.

A detecção da heterogeneidade nas extremidades 3' está estritamente ligada ao método empregado para amplificar as seqüências não codificadoras. O protocolo de

Ligação de RNA para seqüenciamento das terminações de mRNAs (Mandl *et al.*, 1991) gera informações das seqüências terminais livres de deduções oriundas de iniciadores ou de determinações de seqüências consenso para vários clones. Índícios como deleções na extremidade 5' de mRNA viral e do segmento genômico S do HTNV (Garcin *et al.*, 1995) e da linhagem sul-americana Maciel (Bohlman *et al.*, 2002) sustentam a existência de heterogeneidade nas extremidades dos segmentos genômicos de hantavírus e enfraquecem a possibilidade de erros metodológicos.

A fonte de RNA viral foi o soro de pacientes de HCPS e, assim, os segmentos genômicos que serviram como molde para as reações de amplificação provavelmente estavam contidos em partículas virais. Segundo Mir & Panganiban (2004), no SNV a interação trîmero de proteína N e RNA genômico ocorre pela estrutura de *panhandle* e essa interação atua no processo de encapsidação do genoma viral. Assim sendo, podemos sugerir que a molécula do segmento genômico S do paciente do DF, mesmo contendo deleções na extremidade 3', foi capaz de gerar uma estrutura de *panhandle*. Outra explicação seria o papel de outros elementos no segmento S na interação com a proteína N e no processo de encapsidação para o hantavírus circulante no DF.

A seqüência codificadora do segmento S amplificado codifica uma proteína N de tamanho similar (428 resíduos) ao encontrado no gênero *Hantavirus* (Plyusnin *et al.*, 1996a) e a seqüência de aminoácidos dessa proteína é conservada em relação a outros hantavírus. O motivo MKAE, envolvido na interação da proteína N com as proteínas SUMO-1 e Ubc-9 (Maeda *et al.*, 2003), foi encontrado na proteína codificada pelo segmento S do hantavírus do DF. Em adição, esse motivo sugere que essa proteína pode estar localizada na região perinuclear durante o ciclo de replicação viral.

Motivos essenciais (hélice-volta-hélice) para oligomerização (Kaukinen *et al.*, 2004) foram identificados na proteína N de hantavírus do DF e, apesar da presença de algumas variações na seqüência, esses motivos podem ser considerados conservados. A oligomerização da proteína N é um processo crucial para a montagem do nucleocapsídeo viral e a conservação de motivos envolvidos na interação proteína N-proteína N, a despeito de variações interespecíficas (Yoshimatsu *et al.*, 2003), é essencial para o ciclo de replicação dos hantavírus.

De forma semelhante, a seqüência descrita por Severson e colaboradores (2005) e por Xu e colaboradores (2002) da proteína N responsável pela ligação ao RNA viral foi identificada na proteína deduzida dos três pacientes do DF. O motivo em geral é conservado em relação ao HTNV contendo apenas modificações de aminoácidos

conservativas. Dos três resíduos de maior importância para essa interação (E192, Y206 e S217; Severson *et al.*, 2005) dois estão conservados (E192 e S217) e um (Y206) apresentou uma modificação conservativa.

A seqüência predita da proteína N, a partir do fragmento S700, do paciente 7 apresentou uma deleção de 23 aminoácidos (ausência de 69 nucleotídeos no fragmento amplificado). A análise da qualidade das reações de seqüenciamento sugere que essa deleção pode ser característica do isolado, mas como há modificação da fase de leitura do restante da proteína a deleção pode ser oriunda de erros nas reações de polimerização. Como a seqüência obtida do paciente 7 geraria uma proteína N truncada e com seus domínios de oligomerização e ligação ao RNA comprometidos, a possibilidade de erro na amplificação é provável.

Uma fase aberta de leitura para uma potencial proteína não estrutural (NS_S) foi encontrada nas seqüências de nucleotídeos amplificadas dos três pacientes. Assim como o descrito para o SNV, PUUV e TULV; a frequência de mutações nessa fase de leitura é baixa nos isolados do DF sugerindo a possibilidade de que ela seja funcional nesse hantavírus (Spiropoulou *et al.*, 1994; Bowen *et al.*, 1995; Plyusnin *et al.*, 1994).

As seqüências dos fragmentos G1 e G2 obtidas apresentaram localização esperada dentro do segmento genômico M e similaridade a outros hantavírus. Na seqüência de aminoácidos deduzida a partir do fragmento G1 estão inclusos a porção carboxi-terminal da glicoproteína G1 e o domínio hidrofóbico III, constituído por suas três regiões N = básica, H =hidrofóbica e C = polar (Löber *et al.*, 2001). Em relação ao HTNV, as três regiões do potencial peptídeo sinal apresentaram várias modificações não conservativas, principalmente a região H. Entretanto, o domínio hidrofóbico III é conservado entre as linhagens sul-americanas analisadas, indicando a manutenção da função de peptídeo sinal ainda que a seqüência primária seja diferente.

O motivo ITAM, característico da cauda citoplasmática da glicoproteína G1 de hantavírus americanos, está presente na seqüência predita do fragmento G1 do isolado do DF. A presença desse motivo sugere que o hantavírus circulante na região Centro-Oeste também seja capaz de modular o sistema imune assim como talvez ocorra com os outros hantavírus causadores de HCPS. Os dois resíduos de tirosina, constituintes desse motivo, estão envolvidos na ubiquitinação dessa glicoproteína resultando na sua degradação via proteassoma.

A seqüência de aminoácidos deduzida a partir do fragmento G2 do segmento M do paciente do DF apresentou alta conservação em relação a outros hantavírus sul-

americanos. O sítio de N-glicosilação descrito por Shi & Elliot (2004) foi encontrado na posição 928 e dois epitopos imunogênicos do ANDV estão conservados da sequência do DF.

As análises filogenéticas e de identidade indicaram que o hantavírus presente no DF pertence ao clado de hantavírus argentino/chileno. Ainda de acordo ao descrito por Bohlman e colaboradores (2002), nossos dados sugerem que o vírus do DF e o Araraquara são mais relacionados ao vírus Maciel. Entretanto, a análise de *Maximum Likelihood* do fragmento G2 do segmento M e de identidade dos fragmentos desse segmento apontam outros hantavírus do clado argentino/chileno como os mais relacionados ao hantavírus do DF. Essa disparidade poderia ser explicada por um evento de recombinação de segmentos genômicos embora uma caracterização genética mais completa do segmento M seja necessária para confirmar esses dados.

A variante brasileira Araraquara foi a mais próxima ao hantavírus presente no DF em todas as análises filogenéticas e de identidade realizadas com os fragmentos dos segmentos S e M disponíveis em banco de dados. Uma vez que os dois hantavírus são encontrados nos roedores da espécie *Bolomys lasiurus* e apresentam alta similaridade, pode-se sugerir que o hantavírus causador de HCPS circulante no DF é um isolado da linhagem Araraquara. Entretanto, as seqüências de Araraquara disponíveis atualmente são restritas (um fragmento de 673pb do segmento S e dois fragmentos de 1,2kb e 1,8kb sobrepostos do segmento M) o que pode induzir erros na filogenia. Uma caracterização genética mais ampla é essencial para a devida classificação das linhagens brasileiras.

Conclusões e Perspectivas

A caracterização genética de isolados virais de pacientes do DF indica que essa linhagem de hantavírus é pertencente ao clado argentino/chileno e tem, como hantavírus mais relacionado desse clado, a variante Maciel. O hantavírus circulante no DF provavelmente é um genótipo da variante brasileira Araraquara uma vez que a identidade de nucleotídeos do segmento S entre esses hantavírus é alta e ambos estão associados ao roedor *B. lasiurus*.

A amplificação dos fragmentos G1 e G2 e do segmento S completo dos isolados 7 e 8 contribuirá para a classificação do hantavírus circulante no DF e, assim, essa é a perspectiva imediata deste projeto. Em adição, a determinação das seqüências das extremidades não codificadoras do segmento S desses outros isolados pode elucidar a questão das deleções presentes na extremidade 3' do paciente 2.

As seqüências obtidas do segmento M podem facilitar o desenho de iniciadores e favorecer a amplificação desse segmento. A amplificação do segmento M completo, além de contribuir para a inserção do hantavírus do DF no contexto filogenético e taxonômico, possibilitará experimentos de expressão heteróloga das glicoproteínas codificadas por esse hantavírus.

A seqüência do segmento S do hantavírus do DF pode e está sendo utilizada para expressão heteróloga da proteína N ou de fragmentos dela. A expressão de produtos protéicos recombinantes da proteína N possui diversos fins desde a caracterização de etapas do ciclo de replicação viral desse hantavírus até a sua aplicação em diagnóstico ou terapia.

Anexo 1

Todos os iniciadores desenhados, adaptados e utilizados neste projeto para amplificação de fragmentos dos segmentos genômicos S e M estão descritos nessa seção (Tabelas 1 e 4). As reações de transcrição reversa, PCR e RT-PCR de passo único foram realizadas segundo o descrito nos Materiais e Métodos. As reações testadas e suas diferentes combinações de iniciadores e temperaturas estão detalhadas nas Tabelas 2 e 3 (segmento S) e 5 e 6 (segmento M).

Tabela 1. Iniciadores desenhados e usados neste trabalho para o segmento S.

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Posição	Td (°C)
Hanta RT-PCR	ATCATCATCTGAGGAACT	1	47,0
5' hanta S27	CGGATCCAAAGCTGGAATGAGC	27	58,5
5' hanta S34	AAAGCTGGAATGAGC	34	45,7
5' hanta S34 L	AAAGCTGGAATGAGCACC	34	53,0
3' hanta S61	CGGTGATGTTTTCTGTAAT	61	50,4
3' hanta S71	GTTTCGTGTGCGGTGATGT	71	55,9
3' hanta S79	GAGTTGTTGTTTCGTGTGC	79	51,9
5' hanta S79	GCACACGAACAACAGCTC	79	54,5
3' hanta S85	AGTCACGAGTTGTTGTTC	85	49,8
SAHN-C	CAAAACCAGTTGATCCAACAGGG	213	55
(Moreli <i>et al.</i>, 2004)			
SAHN-S	GATGAATCATCCTTGAACCTTAT	454	55
(Moreli <i>et al.</i>, 2004)			
5' hanta S712	TGGCTTTGCTTTCTTTGTAA	712	50,5
5' hanta S723	CTTTGTAAAGGATTGGAT	723	43,9
3' hanta S723-1	CCTCGAGGCAATCCTTTACAAAG	723	55,9
cloning			
3' hanta S723-2	ATCCAATCCTTTACAAAG	723	43,9
5' hanta S880	ATAGTIGAICTIATTGACCA	880	52,4
5' hanta S934	ATTGCAACCCCYCATTCAG	934	54,3
3' hanta S1069	GTTCCACAGACTTTGATGC	1069	53,6

5' hanta S1191	TATGTTITCITGGGGIAA	1191	52,3
5' hanta S1202	GGGGIAAGGAIGCIGTGA	1202	61,4
3' hanta S1202	TTCACAGCCTCCTTICCCC	1202	60,0
3' hanta S1223	ATCATCACCAAGATGGAAGT	1223	51,2
3' hanta S1225	ATCATCACCAAGATGGAA	1225	47,9
5' hanta S1225	TTCCATCTTGGTGATGAT	1225	47,9
3' hanta STAA	AAGTCGACTTTACAGCTTTAGAGGCTCC	1320	59,8
Sal I			
3' hanta SGAA	TTCCAGCTTTAGAGGCTCC	1320	54,5
3' hanta SGAA	ACGCGGCCGCTTTCCAGCTTTAGAGGCT	1320	69,9
Not I			
	CC		
3' hanta SGAA	TAGCGGCCGCCCTTCCCTCGATTTTCCAG	1320	71,7
Not I fator Xa			
	CTTTAGAGGCTCC		
3' hanta 1	ACAGTAAACCCGTAATTAGTG	1470	49,9
round N inteira			
5' hanta S1836	GATTTTTCTTGATTGCTT	1836	43,0

I = inosina e Y = pirimidina.

Tabela 2. Reações de RT-PCR de passo único e 2ª reação de PCR direcionadas para a seqüência do segmento S.

RT-PCR de passo único	Tm (°C)	2ª reação de PCR	Tm (°C)	Amplificação
		5' hanta S34	43	Sim
		3' hanta S723-2		
		5' hanta S712	50	Sim
5' hanta S34	50	3' hanta S1069		
3' hanta S1225		5' hanta S880	47	Sim
		3' hanta S1225		
		5' hanta S34	50	Não
		3' hanta S1225		
		SAHN-C	50	Sim
		SAHN-S		
		5' hanta S34	43	Sim
5' hanta S34 longo	50	3' hanta S723-2		
3' hanta S1223		5' hanta S34 longo	50	Não
		3' hanta S1223		
		SAHN-C	50	Sim
		SAHN-S		
		5' hanta S34	43	Não
5' hanta S79	50	3' hanta S723-2		
3' hanta S1223		5' hanta S79	50	Não
		3' hanta S1223		
		SAHN-C	50	Sim
		SAHN-S		
5' hanta S27	50	5' hanta S27	50	Não
3' hanta S723-1		3' hanta S723-1		

Continuação Tabela 2.

RT-PCR de passo único	T _m (°C)	2 ^a reação de PCR	T _m (°C)	Amplificação
		5' hanta S34	45	Não
		3' hanta SGAA		
		5' hanta S34	45	Não
5' hanta S34		3' hanta SGAA <i>Not</i> I		
3' hanta 1 <i>round</i> N inteira	45	5' hanta S34	45	Não
		3' hanta SGAA <i>Not</i> I		
		fator Xa		
		5' hanta S34	45	Não
		3' hanta STAA <i>Sal</i> I		
		5' hanta S34	45	Não
		3' hanta SGAA		
5' hanta S34		5' hanta S34	45	Não
3' hanta SGAA	45	3' hanta SGAA <i>Not</i> I		
		5' hanta S34	45	Não
		3' hanta SGAA <i>Not</i> I		
		fator Xa		

Tabela 3. Amplificação de fragmentos do segmento S por meio de RT e duas reações de PCR.

Transcrição reversa	Tm (°C)	1ª reação de PCR	Tm (°C)	2ª reação de PCR	Tm (°C)	Amplificação
				5' hanta S34	45	Não
				3' hanta 1 <i>round</i> N		
		5' hanta S34		inteira		
		3' hanta 1 <i>round</i> N	45	5' hanta S34	45	Não
		inteira		3' hanta SGAA		
5' hanta S34	45			5' hanta S34	43	Não
				3' hanta S723-2		
				5' hanta S34	45	Não
		5' hanta S34	45	3' hanta SGAA		
		3' hanta SGAA		5' hanta S34	43	Não
				3' hanta S723-2		
		5' hanta S723	43	5' hanta S934	54	Não
		3' hanta S71		3' hanta S1202		
				5' hanta S880	52	Não
				3' hanta S1069		
				5' hanta S934	54	Não
				3' hanta S1202		
				5' hanta S1191	51	Não
				3' hanta S79		
				5' hanta S1202	51	Não
				3' hanta S79		
				5' hanta S1225	47	Não
		5' hanta S723	43	3' hanta S79		
		3' hanta S85		5' hanta S1836	43	Não
5' hanta S712 ¹	50			3' hanta S79		
				5' hanta S1191	50	Não
				3' hanta S61		
				5' hanta S1202	50	Não
				3' hanta S61		
				5' hanta S1225	47	Não
				3' hanta S61		
				5' hanta S880	52	Sim²
				3' hanta S1069		
		5' hanta S712	50	5' hanta S934	54	Não
		3' hanta S61		3' hanta S1202		
				5' hanta S1225	47	Sim
				3' hanta S61		

Continuação Tabela 3.

Transcrição reversa	Tm (°C)	1ª reação de PCR	Tm (°C)	2ª reação de PCR	Tm (°C)	Amplificação
				5' hanta S880	52	Não
		5' hanta S723	43	3' hanta S1069		
		3' hanta S71		5' hanta S934	54	Não
				3' hanta S1202		
				5' hanta S880	52	Não
				3' hanta S1069		
				5' hanta S934	54	Não
				3' hanta S1202		
				5' hanta S1191	51	Não
				3' hanta S79		
				5' hanta S1202	51	Não
				3' hanta S79		
5' hanta S723 ¹	43	5' hanta S723	43	5' hanta S1225	47	Não
		3' hanta S85		3' hanta S79		
				5' hanta S1836	43	Não
				3' hanta S79		
				5' hanta S1191	50	Não
				3' hanta S61		
				5' hanta S1202	50	Não
				3' hanta S61		
				5' hanta S1225	47	Não
				3' hanta S61		

1- O RNA molde para essa reação foi previamente submetido ao processo de ligação das extremidades de RNA (Mandl *et al.*, 1991).

2- O fragmento amplificado (189pb) do paciente 2 foi clonado em pGEM-T easy e seqüenciado. A seqüência obtida era de hantavírus e contribuiu para a confirmação da seqüência obtida pelos outros fragmentos (S712-1069 e S880-1225) descritos nos resultados (Tabela 5).

Tabela 4. Iniciadores desenhados e usados neste trabalho para o segmento M.

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Posição	Td (°C)
5' hanta M1	TAGTAGTACTCCGCAA	1	48,8
5' hanta M10	ACTCCGCAAGAAGAAGCA	10	54,2
Var 5' M60 peq adaptado (Deyde <i>et al.</i>, 2005)	GATGGAAGGGTGGTATYTG	60	51,3
Var 5' G1 60 peq adaptado (Deyde <i>et al.</i>, 2005)	GAGATGGAAGGGTGGT	60	50,6
Var 5' G1 60 gra adaptado (Deyde <i>et al.</i>, 2005)	GAGATGGAAGGGTGGTATTTGITTG	60	57,5
SM1687C adaptado (Johnson <i>et al.</i>, 1997)	ACAATGGGCTCAATGGTITGTGA	1687	59,1
SM1723C adaptado (Johnson <i>et al.</i>, 1997)	GAITGTGAIACAGCAAAGA	1723	51,9
Var 5' G2 1935 peq adaptado (Deyde <i>et al.</i>, 2005)	TCCATGAAAAGTAGATGTT	1935	45,8
Var 5' G2 1935 gra adaptado (Deyde <i>et al.</i>, 2005)	AAAAGTAGATGTTATGTIGG	1935	47,0
5' hanta M G2 1943	ATGTWGGMYTAGTATGGTGCCT	1943	62,0
Var 3' G1 2040 gra (1 round) adaptado (Deyde <i>et al.</i>, 2005)	ACTCCATGIGCAGTATCTGACCA	2040	59,6
ASM2016R adaptado (Johnson <i>et al.</i>, 1997)	TCAGCACTIACIGCCCA	2016	58,9
3' hanta M G1 2222	ATGTCGCATCCATCCAAT	2222	52,0
SM2255R adaptado (Johnson <i>et al.</i>, 1997)	TTIAGCACIGCATCCATCCA	2255	58,9
M2708F	Instituto Adolfo Lutz	2708	-

Continuação Tabela 4.

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Posição	Td (°C)
5' hanta M G2 2758	ACMCCAGTTTGTGAATATCAAG	2758	60,0
M2779F	Instituto Adolfo Lutz	2779	-
M3221R	Instituto Adolfo Lutz	3221	-
M3344R	Instituto Adolfo Lutz	3344	-
3' hanta M3374	GCACTACAACAACAATCC	3374	48,7
Var 3' G2/M3460 peq adaptado (Deyde <i>et al.</i> , 2005)	TTAAACAGTTTTCTTATGGCC	3460	48,8
Var 3' M3460 gra adaptado (Deyde <i>et al.</i> , 2005)	GCTTAAACAGTTTTCTTG	3460	43,9
3' hanta M G2 3593	TGAGTAAAGTATTTGTTTTTTTA	3593	56,0
3' hanta M G2 3635	GGAACAAAACCTCGGTAAG	3635	58,0
3' hanta M3645	GCTCCGCAGGAACAAAAG	3645	54,4

I = inosina, Y = pirimidina, M = A ou C, W = A ou T, K = G ou T.

Tabela 5. Reações de RT-PCR de passo único e 2ª reação de PCR direcionadas para a seqüência codificadora do segmento M.

RT-PCR de passo único	Tm (°C)	2ª reação de PCR	Tm (°C)	Amplificação
		5' hanta M10	43, 48 e	Não
		3' hanta M G1 2222	50	
		5' hanta M G2 1943	50	Não
5' hanta M1	43, 48 e	3' hanta M G2 3593		
3' hanta M3374	50	5' hanta M G2 2758	50 e 43	Não
		3' hanta M G2 3635		
		M2779F	43	Não
		M3221R		
		5' hanta M10	48 e 50	Não ¹
		3' hanta M G1 2222		
		5' hanta M G2 1943	50 ²	Não
5' hanta M10	43, 48 e	3' hanta M G2 3593		
3' hanta M3645	50	5' hanta M G2 2758	50 ²	Não
		3' hanta M G2 3635		
		M2779F	43	Não
		M3221R		
M2708F	37 e 43	M2779F	37 e 43	Sim
M3344R		M3221R		
SM1687C	58	SM1723C	51	Sim
SM2255R		ASM2016R		
		Var 5' M60 peq	51	Não
Var 5' M60 peq	48	Var 3' G1 2040 gra		
Var 3' G2/M3460		Var 5' G1 60 peq	57	Não
peq		Var 3' G1 2040 gra		

1. Nenhuma obteve amplificação. Um fragmento de aproximadamente 2kb foi amplificado, mas após cloangem em pGEM-T e sequenciamento verificou-se a origem humana do fragmento.
2. Também foram testadas por gradiente de PCR as temperaturas de anelamento (°C): 43; 43,8; 44,9; 46,2; 47,8; 49,4; 51,1; 52,6; 53,9; 54,9 e 55,5. Nenhuma obteve amplificação.

Tabela 6. Reações de amplificação de fragmentos do segmento M por meio de transcrição reversa seguida de duas reações de PCR.

Transcrição reversa	Tm (°C)	1ª reação de PCR	Tm (°C)	2ª reação de PCR	Tm (°C)	Amplificação
		5' hanta M1 3' hanta M3374	48	5' hanta M10 3' hanta M G1 2222	48	Não
				5' hanta M10 3' hanta M G1 2222	48	Não
5' hanta M1	50			5' hanta M G2 2758	52	Não
		5' hanta M10 3' hanta M3645	48	3' hanta M G2 3635		
				5' hanta M G2 1943 3' hanta M G2 3593	52	Não

Lista de Abreviaturas

ANDV: *vírus Andes*

BAYV: *vírus Bayou*

BCCV: *vírus Black Creek Canal*

CADV: *vírus Cano Delgadito*

DF: Distrito Federal

DOBV: *vírus Dobrava*

EDTA: *Diaminoethanetetraacetic acid*

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

ELMCV: *vírus El Moro Canyon*

G1: glicoproteína G1

G2: glicoproteína G2

HCPS: *hantavirus cardiopulmonary syndrome* ou síndrome cardiopulmonar associada a hantavírus

HFRS: *hemorrhagic fever with renal syndrome* ou febre hemorrágica com síndrome renal

HTNV: *vírus Hantaan*

IAL: Instituto Adolfo Lutz

ICTVdB: *International Committee on Taxonomy of Viruses databases*

IFA: *immunofluorescence antibody assay*

IgG: imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IPTG: *isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*

ISLAV: *vírus Isla Vista*

ITAM: *immunoreceptor tyrosine activation motif*

KBRV: *vírus Khabarovsk*

KHF: *korean hemorrhagic fever* ou febre hemorrágica coreana

LANV: *vírus Laguna Negra*

MAC-ELISA: *IgM antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay*

mRNA: RNA mensageiro

MULV: *vírus Muleshoe*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NE: *nephropathia epidêmica* ou *nefroptia epidêmica*
NS_s: não estrutural
NYV: *vírus New York*
PCR: *polymerase chain reaction*
PHV: *vírus Prospect Hill*
PUUV: *vírus Puumala*
Proteína N: proteína do nucleocapsídeo
RIOMV: *vírus Rio Marmore*
RIOSV: *vírus Rio Segundo*
RT: *reverse transcription*
RT-PCR: *reverse transcription-polymerase chain reaction*
Segmento L: segmento *large*
Segmento M: segmento *medium*
Segmento S: segmento *small*
SEOV: *vírus Seoul*
SNV: *vírus Sin Nombre*
TAP: *tobacco acid pyrophosphatase*
Td: temperatura de dissociação
THAIV: *vírus Thailand*
Tm: temperatura de anelamento ou *melting*
TPMV: *vírus Thottapalayam*
TOPV: *vírus Topografov*
TULV: *vírus Tula*
Ubc 9: *small ubiquitin-like modifier-1 conjugating enzyme*
SUMO-1: *small ubiquitin-like modifier-1*
X-Gal: *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside*

Referências Bibliográficas

1. Alfadhli, A., Z. Love, B. Arvidson, J. Seeds, J. Willey, and E. Barklis. 2001. Hantavirus nucleocapsid protein oligomerization. *Journal of Virology*. 75: 2019-2023.
2. Asikainen, K., T. Hänninen, H. Henttonen, J. Niemimaa, J. Laakkonen, H. K. Andersen, N. Bille, H. Leirs, A. Vaheri, and A. Plyusnin. 2000. Molecular evolution of Puumala hantavirus in Fennoscandia: phylogenetic analysis of strains from two recolonization routes, Karelia and Denmark. *Journal of General Virology*. 81: 2833-2841.
3. Avsic-Zupanc, T., S. Y. Xiao, R. Stojanovic, A. Gligic, G. van der Groen, and J. W. LeDuc. 1992. Characterization of Dobrava virus: a hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *Journal of Medical Virology*. 38: 132-137.
4. Avsic-Zupanc, T., A. Toney, Y. Chu, and C. Schmaljohn. 1995. Genetic and antigenic properties of Dobrava virus: a unique member of the *Hantavirus* genus, family *Bunyaviridae*. *Journal of General Virology*. 76: 2801-2808.
5. Azevedo, M. O., M. S. S. Felipe, M. M. Brigido, A. Q. Maranhão and M. T. De-Souza. 2003. Técnicas básicas em biologia molecular. Editora Universidade de Brasília. Brasília, DF.
6. Bharadwaj, M., K. Mirowsky, C. Ye, J. Botten, B. Masten, J. Yee, C. R. Lyons, and B. Hjelle. 2002. Genetic vaccines protect against Sin Nombre hantavirus challenge in deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Journal of General Virology*. 83: 1745-1751.
7. Billecocq, A. D. Coudrier, F. Boué, B. Combes, H. Zeller, M. Artois, and M. Bouloy. 2003. Expression of the nucleoprotein of the Puumala virus from the recombinant Semliki Forest virus replicon: characterization and use as a potential diagnostic tool. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. p. 658–663.
8. Bisordi, I., A. Suzuki, S. Levis, J. Garcia, T. K. N. Sugahara, L. E. Pereira, R. P. Souza, L. T. M. Souza, S. R. Mayer, and M. P. Cerroni. Araraquara Virus associated with hantavirus outbreak in Distrito Federal and Goiás State, Brazil, 2004. In: III Simpósio Internacional sobre Arbovírus dos Trópicos e Febres Hemorrágicas, 2004. Belém, PA. III Simpósio Internacional sobre Arbovírus dos Trópicos e Febres Hemorrágicas.
9. Bohlman, M. C., S. P. Morzunov, J. Meissner, M. B. Taylor, K. Ishibashi, L. Rowe, S. Levis, D. Enria, and S. C. S. Jeor. 2002. Analysis of hantavirus genetic diversity in Argentina: S segment-derived phylogeny. *Journal of Virology*. 76:3765-3773.
10. Bowen, M. D., H. Kariwa, P. E. Rollin, C. J. Peters, and S. T. Nichol. 1995. Genetic characterization of a human isolate of Puumala hantavirus from France. *Virus Research*. 38: 279-289.
11. Bugert, J. J., T. M. Welzel, M. Zeier and G. Darai. 1999. Hantavirus infection-haemorrhagic fever in Balkans-potencial nephrological hazards in the Kosovo war. *Nephrol Dial Transplant*. 14: 1843-1844.
12. Chizhikov, V. E., C. F. Spiropoulou, S. P. Morzunov, M. C. Monroe, C. J. Peters, and S. T. Nichol. 1995. Complete genetic characterization and analysis of isolation of Sin Nombre virus. *Journal of Virology*. 69: 8132-8136.

13. Custer, D. M., E. Thompson, C. S. Schmaljohn, T. G. Ksiazek, and J. W. Hooper. 2003. Active and passive vaccination against hantavirus pulmonary syndrome with Andes virus M genome segment-based DNA vaccine. *Journal of Virology*. 77: 9894-9905.
14. Deyde, V. M., A. A. Rizvanov, J. Chase, E. W. Otteson, S. C. St. Jeor. 2005. Interactions and trafficking of Andes and Sin Nombre hantavirus glycoproteins G1 and G2. *Virology*. 331: 307-315.
15. Dobbs, M., M. Jin, and C. Y. Kang. 1997. The S-genomic RNA of Hantaan virus contain only two trinucleotide repeats at its 5' end and the 3' end of S-specific mRNA is truncated and lacks poly-A tail. *Experimental and Molecular Medicine*. 29: 81-83.
16. Elgh, F., A. Lundkvist, O. A. Alexeyev, H. Stenlund, T. Avsic-Zupanc, B. Hjelle, H. W. Lee, K. J. Smith, R. Vainionpaa, D. Wiger, G. Wadell, and P. Juto. 1997. Serological diagnosis of hantavirus infections by an enzyme-linked immunosorbent assay based on detection of immunoglobulin G and M responses to recombinant nucleocapsid proteins of five viral serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 35:1122-1130.
17. Escutenaire, S., P. Chalon, P. Heyman, G. Van der Auwera, G. van der Groen, R. Verhagen, I. Thomas, L. Karelle-Bui, A. Vaheiri, P.-P. Pastoret, A. Plyusnin. 2001. Genetic characterization of Puumala hantavirus strains from Belgium: evidence for a distinct phylogenetic lineage. *Virus Research*. 74: 1-15.
18. Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*. 17: 368-376.
19. Ferreira, M. S. 2003. Hantaviruses. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*. 36: 81-96.
20. Fulhorst, C. F., M. C. Monroe, R. A. Salas, G. Duno, A. Utrera, T. G., Ksiazek, S. T. Nichol, N. M. C. Manzione, D. Tovar, R. B. Tesh. 1997. Isolation, characterization and geographic distribution of Cano Delgadito virus, a newly discovered South American hantavirus (family Bunyaviridae). *Virus Research*. 51: 159-171.
21. Garcin, D., M. Lezzi, M. Dobbs, R. M. Elliott, C. Schmaljohn, C. Y. Kang, and D. Kolakofsky. 1995. The 5' ends of Hantaan virus (*Bunyaviridae*) RNAs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of RNA synthesis. *Journal of Virology*. 69: 5754-5762.
22. Geimonen, E., R. LaMonica, K. Springer, Y. Farooqui, I. N. Gavrillovskaya, and E. R. Mackow. 2003. Hantavirus pulmonary syndrome-associated hantaviruses contain conserved and functional ITAM signaling elements. *Journal of Virology*. 77:1638-1643. (a)
23. Geimonen, E., I. Fernandez, I. N. Gavrillovskaya and E. R. Mackow. 2003. Tyrosine residues direct the ubiquitination and degradation of the NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail. *Journal of Virology*. 77(20): 10760-10768. (b)
24. Gavrillovskaya, I. N., M. Shepley, R. Shaw, M. H. Ginsberg, and E. R. Mackow. 1998. β_3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 7074-7079.
25. Gavrillovskaya, I. N., E. J. Brown, M.H. Ginsberg, and E. R. Mackow. 1999. Cellular entry of hantavirus which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by β_3 integrins. *Journal of Virology*. 73: 3951-3959.

26. Goldsmith, C. S., L. H. Elliott, C. J. Peters, and S. R. Zaki. 1995. Ultrastructural characteristics of Sin Nombre virus, causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. *Archives of Virology*. 140: 2107-2122.
27. Gött, P., L. Zöller, G. Darai, and E. K. F. Bautz. 1997. A major antigenic domain of hantaviruses is located on the aminoproximal site of the viral nucleocapsid protein. *Virus Genes*. 14: 31-40.
28. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
29. Hallin, G. W., S. Q. Simpson, and R. E. Crowell. 1996. Cardiopulmonary manifestations of the hantavirus pulmonary syndrome. *Critical Care Medicine*. 24:252-258.
30. Heiskanen, T., A. Lundkvist, A. Vaheri, and H. Lankinen. 1997. Phage-displayed peptide targeting on the Puumala hantavirus neutralization site. *Journal of Virology*. 71: 3879-3885.
31. Heiskanen, T., A. Lundkvist, R. Silymani, E. Koivunen, A. Vaheri, and H. Lankinen. 1999. Phage-displayed peptides mimicking the discontinuous neutralization sites of Puumala hantavirus glycoproteins. *Virology*. 262: 321-332.
32. Heiske, A., B. Anheier, J. Pilaski, V. E. Volchkov, H. Feldmann. 1999. A new *Clethrionomys*-derived hantavirus from Germany: evidence for distinct genetic sublineages of Puumala viruses in Western Europe. *Virus Research*. 61: 101-112.
33. Henderson, W.W., M. C. Monroe, S. C. St. Jeor, W. P. Thayer, J. E. Rowe, C. J. Peters. 1995. Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. *Virology*. 214: 602-10.
34. Hjelle, B., F. Chavez-Giles, N. Torrez-Martinez, T. Yates, J. Sarisky, J. Webb, and M. Ascher. 1994. Genetic identification of a novel hantavirus of the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis*. *Journal of Virology*. 68: 6751-6754.
35. Hjelle, B., B. Anderson, N. Torrez-Martinez, W. Song, W. L. Gannon, and T. L. Yates. 1995a. Prevalence and geographic genetic variation of hantaviruses of the new world mice (*Reithrodontomys*): identification of a divergent genotype from a Costa Rican *Reithrodontomys mexicanus*. *Virology*. 207: 452-459.
36. Hjelle, B., S-W. Lee, W. Song, N. Torrez-Martinez, J-W Song, R. Yanagihara, I. Gavrillovskaya, and E. R. Mackow. 1995b. Molecular linkage of hantavirus pulmonary syndrome to white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*: genetic characterization of the M genome of New York virus. *Journal of Virology*. 69: 8137-8141.
37. Hjelle, B., N. Torrez-Martinez, and F. T. Koster. 1996. Hantavirus pulmonary syndrome-related virus from Bolivia. *The Lancet*. 347: 57.
38. Hooper, J. W., D. M. Custer, E. Thompson, and C. S. Schmaljohn. 2001. 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. *Journal of Virology*. 75: 8469-8477.
39. Hörling, J., V. Chizhikov, A. Lundkvist, M. Jonsson, L. Ivanov, A. Dekonenko, B. Niklasson, T. Dzagurova, C. J. Peters, E. Tkachenko, and S. Nichol. 1996. Khabarovsk virus: a

phylogenetically and serologically distinct *Hantavirus* isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east Russia. *Journal of General Virology*. 77: 687-694.

40. Hughes, A. L., and R. Friedman. 2000. Evolutionary and protein-coding genes of hantaviruses. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 1558-1568.

41. Jenison, S., T. Yamada, C. Morris, B. Anderson, N. Torrez-Martinez, N. Keller, and B. Hjelle. 1994. Characterization of human antibody responses to Four Corners hantavirus infections among patients with hantavirus pulmonary syndrome. *Journal of Virology*. 68: 3000-3006.

42. Jenison, S., B. Hjelle, S. Simpson, G. Hallin, R. Feddersen, and F. Koster. 1995. Hantavirus pulmonary syndrome: clinical, diagnostic and virologic aspects. *Seminars Respiratory Infections*. 10:259-269.

43. Jin, M., J. Park, S. Lee, and 7 other authors. 2002. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology*. 294, 60-69.

44. Johnson, A. M., M. D. Bowen, T. G. Ksiazek, R. J. Williams, R. T. Bryan, J. N. Mills, C. J. Peters, and S. T. Nichol. 1997. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology*. 238: 115-127.

45. Johnson, A. M., L. T. M. de Souza, I. B. Ferreira, L. E. Pereira, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, C. J. Peters, and S. T. Nichol. 1999. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *Journal of Medical Virology*. 59: 527-535.

46. Kang, J., Y. Lee, K. Ahn, J. Song, K. Song, L. J. Baek, P. Lee and B. Ahn. 2001. A dominant antigenic region of the Hantaan virus nucleocapsid protein located within a amino-terminal short stretch of hydrophilic residues. *Virus Genes*. 23: 183-186.

47. Kariwa, H., K. Yoshimatsu, J. Sawabe, E. Yokota, J. Arikawa, I. Takashima, H. Fukushima, A. Lundkvist, F. N. Shubin, L. M. Isachkova, R. A. Slonova, G. N. Leonova, and N. Hashimoto. 1999. Genetic diversities of hantaviruses among rodents in Hokkaido, Japan and Far East Russia. *Virus Research*. 59: 219-228.

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

49. Kaukinen, P., V. Kumar, K. Tulimäki, P. Engelhardt, A. Vaheri, and A. Plyusnin. 2004. Oligomerization of hantavirus N protein: C-terminally α -helices interact to form a shared hydrophobic space. *Journal of Virology*. 78: 13669-13677.

50. Kim, T., Y. Choi, H. Cheong, and J. Choe. 2002. Identification of a cell surface 30kDa protein as a candidate receptor for Hantaan virus. *Journal of General Virology*. 83: 767-773.

51. Kitamura, T., C. Morita, T. Komatsu, K. Sugiyama, J. Arikawa, S. Shiga, H. Takeda, Y. Akao, K. Imaizumi, A. Oya, N. Hashimoto, and S. Urasawa. 1983. Isolation of virus causing hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) through a cell culture system. *Japan Journal Medical of Scientific Biology*. 36: 17-25.

52. Koch, J., M. Liang, I. Queitsch, A. A. Kraus, and E. K. F. Bautz. 2003. Human recombinant neutralizing antibodies against Hantaan virus G2 protein. *Virology*. 308: 64-73.

53. Kukkonen, S. K. J., A. Vaheri, and A. Plyusini. 1998. Completion of Tula hantavirus genome sequence: properties of the L segment and heterogeneity found in the 3' termini of the S and L genome RNAs. *Journal of General Virology*. 79: 2615-2622.
54. Kukkonen, S. K. J., A. Vaheri, and A. Plyusnin. 2004. Tula hantavirus L protein is a 250kDa perinuclear membrane-associated protein. *Journal of General Virology*. 85: 1181-1189.
55. Lee, H. W.; P. W. Lee and K. M. Johnson. 1978. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic Fever. *Journal of Infectious Diseases*. 137, 298-308.
56. Lee, B-H., K. Yoshimatsu, A. Maeda, K. Ochiai, M. Morimatsu, K. Araki, S. Morikawa, and J. Arikawa. 2003. Association of the nucleocapsid protein of the Seoul and Hantaan hantaviruses with small ubiquitin-like modifier-1-related molecules. *Virus Research*. 98: 83-91.
57. Levis, S., J. E. Rowe, S. Morzunov, D. A. Enria, and S. St. Jeor. 1997. New hantaviruses causing hantavirus pulmonary syndrome in central Argentina. *The Lancet*. 349: 998-999.
58. Levis, S., S. P. Morzunov, J. E. Rowe, D. Enria, N. Pini, G. Calderon, M. Sabattini, and S. C. St. Jeor. 1998. Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *The Journal of Infectious Diseases*. 177: 529-538.
59. Li, A. D., K. Anderson, C. Schmaljohn. 1995. 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*. 206: 973-83.
60. Linderholm, M., C. Ahlm, B. Settergren, A. Waage, and A. Tärnvik. 1996. Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6 and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Journal of Infectious Diseases*. 173:38-43.
61. Löber, C., B. Anheier, S. Lindow, H. Klenk, and H. Feldmann. 2001. The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA. *Virology*. 289: 224-229.
62. López, N., P. Padula, C. Rossi, M. E. Lázaro, and M. T. Franze-Fernandez. 1996. Genetic identification of a new hantavirus causing severe pulmonary syndrome in Argentina. *Virology*. 220: 223-226.
63. López, N., P. Padula, C. Rossi, S. Miguel, A. Edelstein, E. Ramírez, and M. T. Franze-Fernández. 1997. Genetic characterization and phylogeny of Andes virus and variants from Argentina and Chile. *Virus Research*. 50: 77-84.
64. Lundkvist, A.; S. Björsten; B. Niklasson; and N. Ahlborg. 1995. Mapping of B-cell determinants in the nucleocapsid protein of Puumala virus: definition of epitopes specific for acute immunoglobulin G recognition in humans. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2: 82-86.
65. Maeda, A., B-H. Lee, K. Yoshimatsu, M. Saijo, I. Kurane, J. Arikawa, and S. Morikawa. 2003. 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*. 305: 288-297.

66. McCaughey, C., X. Shi, R. M. Elliot, D. E. Wyatt, H. J. O'Neill, P. V. Coyle. 1999. Low pH-induced cytopathic effect—a survey of seven hantavirus strains. *Journal of Virological Methods*. 81: 193-197.
67. Mendes, W. S., N. J. L. Aragão, H. J. Santos, L. Raposo, P. F. C. Vasconcelos, E. S. T. Rosa, and M. R. Elkhoury. 2001. Hantavirus pulmonary syndrome in Anajatuba, Maranhão, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 43: 237-240.
68. Mir, M. A.; and A. T. Panganiban. 2004. Trimeric hantavirus nucleocapsid protein binds specifically to the viral RNA panhandle. *Journal of Virology*. 78, 8281-8288.
69. Monroe, M. C., S. P. Morzunov, A. M. Johnson, M. D. Bowen, H. Artsob, T. Yates, C. J. Peters, P. E. Rollin, T. G. Ksiazek, and S. T. Nichol. 1999. Genetic diversity and distribution of *Peromyscus*-borne hantaviruses in North America. *Emerging Infectious Diseases*. 5: 75-86.
70. Moreli, M. L., R. L. M. Souza, L. T. M. Figueiredo. 2004. Detection of Brazilian hantavirus by reverse transcription polymerase chain reaction amplification of N gene in patients with hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99: 633-638.
71. Morzunov, S. P., H. Feldman, C. F. Spiropoulou, V. A. Semenova, P. E. Rollin, T., G. Ksiazek, C. J. Peters, and S. T. Nichol. 1995. A newly recognized virus associated with a fatal case of hantavirus pulmonary syndrome in Louisiana. *Journal of Virology*. 69: 1980-1983.
72. Mou, D. L., Y. P. Wang, C. X. Huang, G. Y. Li, L. Pan, W. S. Yang, and X. F. Bai. 2006. Cellular entry of Hantaan virus A9 strain: specific interactions with $\beta 3$ integrins and a novel 70 kDa protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 339: 611-617.
73. Müller, S., C. Hoegge, G. Pyrowolakis, and S. Jentsch. 2001. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nature Reviews*. 2:202-210.
74. Nemirov, K., O. Vapalahti, A. Lundkvist, V. Vasilenko, I. Golovljova, A. Plyusnina, J. Niemimaa, J. Laakkonen, H. Henttonen, A. Vaheri, and A. Plyusnin. 1999. Isolation and characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Estonia. *Journal of General Virology*. 80: 371-379.
75. Nichol, S.T., C. F. Spiropoulou, S. Morzunov, P. E. Rollin, T. G. Ksiazek, H. Feldmann, A. Sanchez, J. Childs, S. Zaki, C. J. Peters. 1993. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*. 262: 914-917.
76. Nolte, K. B., R. M. Feddersen, K. Foucar, S. R. Zaki, F. T. Koster, D. Madar, T. L. Merlin, P. J. McFeeley, E. T. Umland, and R. E. Zumwalt. 1995. Hantavirus pulmonary syndrome in the United States: a pathological description of a disease caused by a new agent. *Human Pathology*. 26(1):110-20.
77. Ogino, M., K. Yoshimatsu, H. Ebihara, K. Araki, B. Lee, M. Okumura, and J. Arikawa. 2004. Cell fusion activities of Hantaan virus envelope glycoproteins. *Journal of Virology*. 78: 10776-10782.
78. Padula, P. J., A. Edelstein, S. D. Miguel, N. M. Lopez, C. M. Rossi and R. D. Rabinovich. 1998. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology*. 241:323-30.
79. Padula, P. J., S. B. Colavecchia, V. P. Martinez, M. O. G. D. Valle, A. Edelstein, S. D. L. Miguel, J. Russi, J. Mora Riquelme, N. Colucci, M. Almirón, and R. D. Rabinovich. 2000.

Genetic diversity, distribution, and serologic features of hantavirus infection in five countries in south America. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3029-3035.

80. Padula, P., M. G. D. Valle, M. G. Alai, P. Cortada, M. Villagra, and A. Gianella. 2002. *Andes virus* and first case report of *Bermejo virus* causing fatal pulmonary syndrome. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 437-429.

81. Padula, P., R. Figheroa, M. Navarrete, E. Pizarro, R. Cadiz, C. Bellomo, C. Jofre, L. Zaror, E. Rodriguez, and R. Murúa. 2004. Transmission study of Andes hantavirus infection in wild Sigmodontine rodents. *Journal of Virology*. 78: 11972-11979.

82. Parrington, M. A., and C. Y. Kang. 1990. Nucleotide sequence analysis of the S genomic segment of prospect hill virus: Comparison with the prototype hantavirus. *Virology*. 175: 167-175.

83. Pensiero, M. N., G. B. Jennings, C. S. Schmaljohn, and J. Hay. 1988. Expression of the Hantaan virus M genome segment by using a vaccinia virus recombinant. *Journal of Virology*. 62:696-702.

84. Perlman, D., and H. O. Halvorson. 1983. A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signals peptides. *Journal of Molecular Biology*. 167: 391-409.

85. Plyusnin, A., O. Vapalahti, H. Lankinen, H. Lehväslaiho, N. Apenkina, Y. Myasnikov, H. Kallio-Kokko, H. Henttonen, A. Lundkvist, M. Brummer-Korvenkontio, I. Gavrillovskaia, and A. Vaheri. 1994. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by european common voles. *Journal of Virology*. 1994: 7833-7839.

86. Plyusnin, A., O. Vapalahti, and A. Vaheri. 1996a. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *Journal of General Virology*. 77:2677-2687.

87. Plyusnin, A., O. Vapalahti, A. Lundkvist, H. Henttonen, and A. Vaheri. 1996b. Newly recognised hantavirus in siberian lemmings. *The Lancet*. 347: 1835-1836.

88. Plyusnin A., and S. P. Morzunov. 2001. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. In Schmaljohn, C.S., and S. T. Nichol. editors. *Hantaviruses: Current Topics in Microbiology and Immunology*. New York: Springer. 47-75.

89. Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue, and N. Tordo. 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *The EMBO Journal*. 8: 3867-3874.

90. Powers, A. M., D. R. Mercer, D. M. Watts, H. Guzman, C. F. Fulhorst, V. L. Popov, and R. B. Tesh. 1999. Isolation and genetic characterization of a hantavirus (Bunyaviridae: *Hantavirus*) from a rodent, *Oligoryzomys microtis* (Muridae), collected in northeastern Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61: 92-98.

91. Raboni, S. M., C. M. Probst, J. Bordignon, A. Zeferino, and C. N. D. dos Santos. 2005. Hantaviruses in central south America: phylogenetic analysis of the S segment from HPS cases in Paraná, Brazil. *Journal of Medical Virology*. 76: 553-562.

92. Rao, P., W. Yuan, and R. M. Krug. 2003. Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis. *The EMBO Journal*. 22: 1188-1198.

93. Ravkov, E.V., P. E. Rollin, T. G. Ksiazek, C. J. Peters, and S. T. Nichol. 1995. Genetic and serological analysis of Black Creek Canal virus associated with human disease and *Sigmadon hispidus* infection. *Virology*. 210: 482-489.
94. Ravkov, E. V., S. T. Nichol, and R. W. Compans. 1997. Polarized entry and release in epithelial cells of Black Creek Canal virus, a new world hantavirus. *Journal of Virology*. 71: 1147-1154.
95. Ravkov, E. V., S. T. Nichol, C. J. Peters, and R. W. Compans. 1998. Role of actin microfilaments in Black Creek Canal virus morphogenesis. *Journal of Virology*. 72: 2865-2870.
96. Ravkov, E. V., and R. Compans. 2001. Hantavirus nucleocapsid protein is expressed as a membrane-associated protein in the perinuclear region. *Journal of Virology*. 75: 1808-1815.
97. Rosa, E. S. T., J. N. Mills, P. J. Padula, M. R. Elkhoury, T. G. Ksiazek, W. S. Mendes, E. D. Santos, G. C. B. Araújo, V. P. Martinez, J. F. S. T. Rosa, and A. Edelstein. 2005. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implications of likely reservoirs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 5: 11-19.
98. Saitoh, H., R. T. Pu, and M. Dasso. 1997. SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier. *Trends in Biological Science*. 22: 374-376.
99. Sambrook, J., and D. W. Russel. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, USA.
100. Schmaljohn, C. S., S. E. Hasty, J. M. Dalrymple, J. W. LeDuc, H. W. Lee, C.-H von Bonsdorff, M. Brummer-Korvenkontio, A. Vaheri, T. F. Tsai, H. L. Hegnery, D. Goldgaber and P.-W Lee. 1985. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. *Science*. 227: 1041-1044.
101. Schmaljohn, C. S., G. B. Jennings, J. Hay, J. M. Dalrymple. 1986. Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. *Virology*. 155: 633-43.
102. Schmaljohn, C. S., A. L. Schmaljohn, and J. M. Dalrymple. 1987. Hantaan virus M RNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology*. 157: 31-39.
103. Schmaljohn, C. S., J. Arikawa, S. E. Hasty, L. Rasmussen, H. W. Lee, P. W. Lee, and J. M. Dalrymple. 1988. Conservation of antigenic properties and sequences encoding the envelope proteins of prototype Hantaan virus and two virus isolates from Korean hemorrhagic fever patients. *Journal of General Virology*. 69: 1949-1955.
104. Schmaljohn, C. S. 1990. Nucleotide sequence of the L genome segment of Hantaan virus. *Nucleic Acid Research*. 18: 6728.
105. Schmaljohn, C. and B. Hjelle. 1997. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerging Infectious Diseases*. 3: 95-104.
106. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. 2005. Aspectos epidemiológicos da infecção e da patogenicidade por hantavírus no Brasil (2004). Boletim eletrônico epidemiológico. Ano 05, Nº 03.

107. Severson, W., L. Partins, C. S. Schmaljohn, and C. B. Jonsson. 1999. Characterization of the Hantaan nucleocapsid protein ribonucleic acid interaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 33732-33739.
108. Severson, W. E., X. Xu, and C. B. Jonsson. 2001. cis-acting signals in encapsidation of Hantaan virus S-segment viral genomic RNA by its N protein. *Journal of Virology*. 75: 2646-2652.
109. Severson, W., X. Xu, M. Kuhn, N. Senutovitch, M. Thokala, F. Ferron, S. Longhi, B. Canard, and C. B. Jonsson. 2005. Essential amino acids of the Hantaan virus N protein in its interaction with RNA. *Journal of Virology*. 79: 10032-10039.
110. Shi, X., and R. M. Elliott. 2004. Analysis of N-linked glycosylation of Hantaan virus glycoproteins and the role of oligosaccharide side chains in protein folding and intracellular trafficking. *Journal of Virology*. 78:5414-5422.
111. Siivonen, L. 1982. The history of the Fennoscandian mammal fauna. *Acta Zoologica Fennica*. 169: 7-10.
112. Sironen, T., A. Vaeheri, and A. Plyusnin. 2001. Molecular evolution of Puumala Hantavirus. *Journal of Virology*. 75: 11803-11810.
113. Sjölander, B. K., I. Golovljova, A. Plyusnin, and Å. Lundkvist. 2000. Diagnostic potential of Puumala virus nucleocapsid protein expressed in *Drosophila melanogaster* cells. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:2324-2329.
114. Smith, M. F., J. L. Patton. 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of Sigmodontinae rodents in south America: evidence from cytochrome *b*. *Journal of Mammalian Evolution*. 6: 89-128.
115. Song, W., N. Torrez-Martinez, W. Irwin, F. J. Harrison, R. Davis, M. Ascher, M. Jay, and B. Hjelle. 1995. Isla Vista virus: a genetically novel hantavirus of the California vole *Microtus californicus*. *Journal of General Virology*. 76: 3195-3199.
116. Song, J-W., L. J. Baek, K-J. Song, A. Skrok, J. Markowski, J. Bratosiewicz-Wasik, R. Kordek, P. P. Liberski, and R. Yanagihara. 2004. Characterization of Tula virus from common voles (*Microtus arvalis*) in Poland: evidence for geographic-specific phylogenetic clustering. *Virus Genes*. 29: 239-247.
117. Spiropoulou, C. F., C. S. Goldsmith, T. R. Shoemaker, C. J. Peters, and R. W. Compans. 2003. Sin Nombre virus glycoprotein trafficking. *Virology*. 308: 48-63.
118. Sugiyama, K., S. Morikawa, Y. Matsuura, E. A. Tkachenko, C. Morita, T. Komatsu, Y. Akao, and T. Kitamura. 1987. Four serotypes of haemorrhagic fever with renal syndrome viruses identified by polyclonal and monoclonal antibodies. *Journal of General Virology*. 68: 979-987.
119. Suzuki, A., I. Bisordi, S. Levis, J. Garcia, L. E. Pereira, R. P. Souza, T. K. N. Sugahara, N. Pini, D. Enria and L. T. M. Souza. 2004. Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brasil. *Emerging Infectious Diseases*. 10:2127-2134.
120. Tischler, N. D., H. Galeno, M. Roseblatt, and P. D. T. Valenzuela. 2005a. Human and rodent humoral immune responses to Andes virus structural proteins. *Virology*. 334: 319-326.

121. Tischler, N. D., A. Gonzalez, T. Perez-Acle, M. Roseblatt, and P. D. T. Valenzuela. 2005b. Hantavirus Gc glycoprotein: evidence for a class II fusion protein. *Journal of General Virology*. 86: 2937-2947.
122. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.
123. Togawa, R. C., M. M. Brigido, C. M. R. Santos, and M. T. Júnior. 2006. The use of the PHPH tool to assembly the gene sequences that are candidate to the biotic and abiotic stress in /Musa acumitana/. XXXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Aguas de Lindoia/ SP, Brazil.
124. Toro, J., J. D. Vega, A. S. Khan, J. N. Mills, P. Padula, W. Terry, Z. Yadón, R. Valderrama, B. A. Ellis, C. Pavletic, R. Cerda, S. Zaki, S. Wun-Ju, R. Meyer, M. Tapia, C. Mansilla, M. Baro, J. A. Vergara, M. Concha, G. Calderon, D. Enria, C. J. Peters, and T. G. Ksiazek. 1998. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997. *Emerging Infectious Diseases*. 4: 687-694.
125. Torrez-Martinez, N., and B. Hjelle. 1995. Enzootic of Bayou hantavirus in rice rat (*Oryzomys palustris*) in 1993. *The Lancet*. 346: 780-781.
126. van Dijk, A. A., E. V. Makeyevt, and D. H. Bamford. 2004. Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. *Journal of General Virology*. 85: 1077-1093.
127. Von Heijne, G. 1983. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *European Journal of Biochemistry*. 133: 17-21.
128. Von Heijne, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acid Research*. 14: 4683-4690.
129. Xiao, S. Y., G. Diglisic, T. Avsic-Zupanc, J. W. LeDuc. 1993. Dobrava virus as a new Hantavirus: evidenced by comparative sequence analysis. *Journal of Medical Virology*. 39: 152-155.
130. Xiao, S.Y., J. W. Leduc, Y. K. Chu, and C. S. Schmaljohn. 1994. Phylogenetic analyses of virus isolates in the genus Hantavirus, family Bunyaviridae. *Virology*. 198: 205-217.
131. Xu, X., W. Severson, N. Villegas, C. S. Schmaljohn, and C. B. Jonsson. 2002. The RNA binding domain of the Hantaan virus N protein maps to a central, conserved region. *Journal of Virology*. 76: 3301-3308.
132. Yashina, L. N., N. A. Patrushev, L. I. Ivanov, R. A. Slonova , V. P. Mishin , G. G. Kompanez , N. I. Zdanovskaya, I. I. Kuzina, P. F. Safronov, V. E. Chizhikov, C. Schmaljohn, and S. V. Netesov. 2000. Genetic diversity of hantaviruses associated with hemorrhagic fever with renal syndrome in the far east of Russia. *Virus Research*. 70: 31-44.
133. Yashina, L. N., V. Mishin, N. Zdanovskaya, C. Schmaljohn, and L. Ivanovt. 2001. A newly discovered variant of a hantavirus in Apodemus peninsulae, far eastern Russia. *Emerging Infectious Diseases*. 7: 912-913.

134. Yoshimatsu, K., B. Lee, K. Araki, M. Morimatsu, M. Ogino, H. Ebihara, and J. Arikawa. 2003. The multimerization of hantavirus nucleocapsid protein depends on type-specific epitopes. *Journal of Virology*. 77: 943-952.
135. Young, J. C., G. R. Hansen, T. K. Graves, M. P. Deasy, J. G. Humphreys, C. L. Fritz, K. L. Garham, A. S. Khan, T. G. Ksiazek, K. B. Metzger, and C. L. Peters. 2000. The incubation period of hantavirus pulmonary syndrome. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 62:714-717.