

**Biología molecular de los mecanismos de invasión
y virulencia del hantavirus.**

JUAN HERNÁNDEZ BARRETO
GRADO EN BIOLOGÍA
-
TUTOR: GUIDO SANTOS ROSALES

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
2023/2024



ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	4
EL VIRUS	5
<i>Taxonomía</i>	5
<i>Estructura del Hantavirus</i>	5
<i>Proteína Gc</i>	7
<i>Proteína Gn</i>	7
<i>Proteína N</i>	8
FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS	10
<i>Vectores</i>	12
PATOLOGÍA	15
<i>Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (HFRS)</i>	15
<i>Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus (HCPS)</i>	15
INFECCIÓN	16
<i>Mecanismo de entrada del virus</i>	16
<i>Mutaciones en los receptores</i>	19
<i>Mecanismo de replicación</i>	19
<i>Papel de la proteína N</i>	20
<i>Regulación del interferón como factor de virulencia</i>	21
TERAPIAS	23
<i>Vacunación</i>	23
<i>Anticuerpos</i>	23
<i>Antivirales</i>	24
DISCUSIÓN	24
BIBLIOGRAFÍA	26

RESUMEN

En este trabajo se ha buscado aunar la información más actualizada y relevante sobre la bioquímica del hantavirus. El hantavirus es un patógeno que produce patologías graves y es diseminado por gran variedad de vectores roedores por todo el mundo, por lo que es una amenaza latente en cuanto al desarrollo de epidemias. Conocer los aspectos bioquímicos que suceden durante su infección y que conforman su estructura puede ser de ayuda para combatir a una enfermedad potencialmente mortal.

ABSTRACT

In this paper, we have sought to combine the most up-to-date and relevant information on the biochemistry of hantavirus. Hantavirus is a pathogen that causes severe diseases and is spread by a wide variety of rodent vectors around the world, making it a latent threat for the development of epidemics. Understanding the biochemical aspects that occur during its infection and that make up its structure can be helpful in combating a potentially deadly disease.

INTRODUCCIÓN

El hantavirus es un virus perteneciente a la familia Bunyaviridae (Mitchell, C. 2019) de transmisión zoonótica por parte de roedores en todo el mundo (MacNeil, A., Nichol, S.T., Spiropoulou, C.F., 2011), que fue aislado por primera vez cerca del río Hantaan en la década de los 80, el cual le da nombre, en la península coreana. Fue aislado en los pulmones de *Apodemus agrarius*, su reservorio natural en la zona (Lee, H. W., 1981). Este virus produce la fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS por sus siglas en inglés), enfermedad que durante la guerra de Corea fue llamada fiebre hemorrágica de Corea.

Posteriormente, se empezaron a descubrir nuevas especies en el continente americano que producían otra patología, el Síndrome Cardiorrespiratorio por Hantavirus (HPS por sus siglas en inglés). A estos nuevos virus se les clasificó como Hantavirus del Nuevo Mundo para

diferenciarlos de los presentes principalmente en Europa y Asia (Hantavirus del Viejo Mundo). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el año 1993 (Nichol et al., 1993).

En esta revisión se tratará de explicar, desde un punto de vista molecular, la importancia de virus como este que suponen un potencial riesgo de epidemias zoonóticas. Al tratarse de un virus que afecta a pocas personas al año, se ha quedado en el olvido, dejando de lado la necesidad de avanzar con tratamientos específicos o incluso, una vacuna. Cabe destacar que este virus tiene una alta tasa de mortalidad y es poco conocido en el ambiente sanitario, por lo que un brote en una zona donde la prevalencia es muy baja podría causar malos diagnósticos y tratamientos que empeoren la prognosis del paciente y aumenten el gasto médico.

Aunar los principales conocimientos y avances de este patógeno a nivel bioquímico puede ser útil como una herramienta que proporcione un contexto molecular de cómo infecta el virus y cuáles son sus debilidades para desarrollar nuevos tratamientos y también para dar a conocer cómo se trata a día de hoy.

OBJETIVOS

El objetivo es la recopilación de los conocimientos más novedosos sobre el hantavirus para proporcionar una visión actualizada de su estructura y los mecanismos de infección y replicación. Profundizar en los aspectos bioquímicos y moleculares de la infección por hantavirus sirve para entender mejor su ciclo de vida y las interacciones con el hospedador. Además, tratándose de un potencial riesgo para la salud pública, el espíritu de este trabajo es sensibilizar a la comunidad científica y al público en general sobre la importancia de la vigilancia y el control del hantavirus, y la necesidad de adoptar comportamientos preventivos.

EL VIRUS

Taxonomía.

Los hantavirus se engloban en el orden Bunyavirales, que fue establecido en el año 2016, pasando el género Hantavirus a familia, y, por lo tanto, a denominarse Hantaviridae (Loenen et al., 2019). Los Hantavirus han presentado cierta complejidad a la hora de establecer nuevos miembros y es que una característica de éstos es que existen algunos capaces de cambiar de huésped, lo cual va contra los criterios que marca el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Guo et al., 2013).

Además, en el noveno informe de ICTV, aparecen hantavirus que incumplen el segundo criterio del mismo, que es que la diferencia entre aminoácidos que codifican la nucleocápside y la glicoproteína deben diferir en al menos un 7%, pero para poder incluir a estos, se subió al 10% y al 11% respectivamente.

Para establecer las diferencias entre los 4 grupos de hantavirus que existen, se toma la proteína N (proteína de la nucleocápside) y se miden las diferencias de la secuencia que la codifica.

Estructura del Hantavirus.

Estos virus son esféricos con un diámetro entre 80 y 120 nm y están recubiertos por una bicapa lipídica en la cara externa que es sintetizada por las membranas del aparato de Golgi (Hepojoki et al. 2010) y que alberga proteínas en forma de picos o espinas, los cuales, según estudios de la masa molecular, se corresponden a 4 subunidades de Gn y 4 de Gc (Cifuentes-Muñoz, N. *et al.*, 2014). Pese a estar cubierto, es bastante sensible a tratamientos de calor, detergentes o luz ultravioleta, al contrario que otros virus con envoltura. Por otro lado, tienen una vida relativamente larga a temperatura ambiente y hasta 18 días a bajas temperaturas (4°C a -18°C) lo cual es una ventaja para su transmisión (Kallio et al. 2006). El virión consiste en un 50% de proteínas, 20-30% de lípidos, 7% de glúcidos y 2% de ARN.

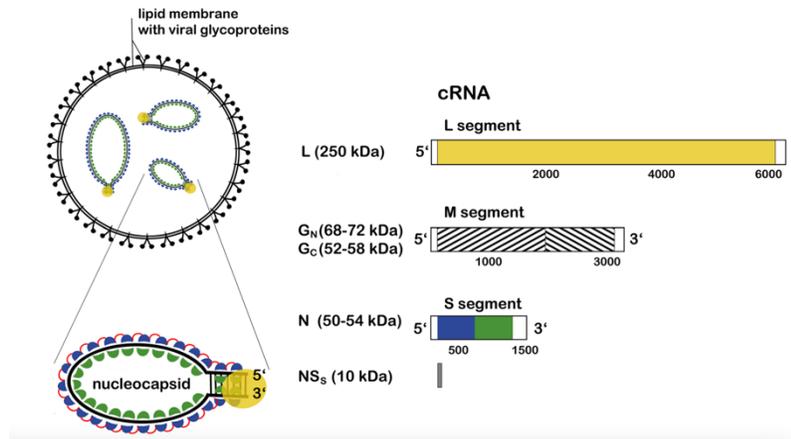


Imagen 1, Reuter, M., Krüger D. H. (2017). A la izquierda se observa el hantavirus y su envuelta, con las glicoproteínas Gn/Gc distribuidas por toda la superficie. Los fragmentos forman un asa debido a que existe complementariedad de bases entre ambos extremos. Se observa en el fragmento ampliado que está cubierto por repeticiones de la proteína N y que se unen entre ellas.

Los hantavirus poseen un genoma de ARN monocatenario, con polaridad negativa de tres fragmentos (S, M y L), con un total de 11-19 kb, que se transcribe y se replica en el citoplasma de las células infectadas (Avšič-Županc *et al.*, 2019). En total, codifican 5 proteínas: una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), las glicoproteínas Gn y Gc, la proteína no estructural NSs y la proteína N. Las secuencias de ambos extremos de cada segmento de ARN forman estructuras cerradas mediante uniones covalentes y son reconocidas por la proteína N, siendo muy importantes para la transcripción y la replicación viral. Estas secuencias están bien conservadas dentro del género, pero difieren de otros géneros de Bunyavirales.



Imagen 2, tomadas de Protein Data Bank. Estructura de la glicoproteína Gn de Haantan Virus (izquierda) y proteína Gc de Puumala Virus en conformación post-fusión (pH 6.0) (derecha).

Los ARNm contienen UTRs en ambos extremos 5' y 3' formando un marco de lectura abierto (ORF) de la proteína viral que se codifica. El UTR 5' se basa en repeticiones del fragmento UAGUAGUAG y está involucrado en la iniciación de la traducción, mientras que el extremo 3' la secuencia repetida es AUCAUCAUCUG y se cree que es importante en el mecanismo de iniciación de la transcripción por la RdRp viral (Hussein *et al.*, 2011).

Proteína Gc

La proteína Gc de los hantavirus desempeña un papel crucial en el ciclo de vida del virus, particularmente al mediar en la fusión de membranas y facilitar la entrada del virus en las células huésped. La proteína Gc forma complejos heterodiméricos con la proteína Gn, y estos heterodímeros se ensamblan aún más en picos tetraméricos en la superficie viral, creando una red que es crucial para la naturaleza pleomórfica del virus y su capacidad de entrar en las células huésped a través de la endocitosis mediada por receptores (Serris *et al.*, 2020) (Bignon *et al.*, 2019). Estructuralmente, la Gc es una proteína de fusión de clase II, caracterizada por tener los dominios I, II y III ricos en láminas β , que sufren cambios conformacionales significativos durante el proceso de fusión que son necesarios para la inserción de los bucles de fusión en la membrana de la célula huésped (Guardado-Calvo *et al.*, 2016). Este comportamiento dinámico depende del pH, ya que la proteína Gc muestra diferentes estados oligoméricos a pH neutro y ácido, lo que facilita la entrada del virus en las células huésped (Rissanen *et al.*, 2017). Los estudios estructurales también han demostrado que la proteína Gc puede formar homodímeros e interactuar lateralmente con otros picos, lo que contribuye a la estabilidad y al ensamblaje de la envoltura viral (Bignon *et al.*, 2019) (Petazzi *et al.*, 2021). La estructura de la proteína Gc está muy conservada en diferentes especies de hantavirus, como lo demuestran las similitudes estructurales entre las proteínas Gc del virus Hantaan y el virus Puumala, a pesar de sus diferencias genéticas y geográficas (Rissanen *et al.* 2017).

Proteína Gn.

La cristalografía de rayos X de alta resolución ha revelado que la proteína Gn del virus Hantaan (HTNV) y el virus Puumala (PUUV) comparten un pliegue α/β conservado, lo que indica una conservación estructural en diferentes clados de hantavirus (Rissanen *et al.*, 2017). La proteína Gn cristaliza en una configuración tetramérica a pH ácido, que es distinta de su organización de pH neutro, lo que sugiere que sufre transiciones estructurales durante la absorción endocítica del virus, lo que facilita la fusión de la membrana al exponer los bucles de fusión de Gc (Rissanen *et al.*, 2017). Se ha demostrado que el ectodominio de la proteína Gn provoca una respuesta de anticuerpos neutralizantes, con anticuerpos monoclonales específicos dirigidos a distintos epítomos del ectodominio Gn, lo que proporciona información sobre su accesibilidad inmunológica y su potencial para el diseño de vacunas (Rissanen *et al.*, 2021).

Proteína N.

Se encuentra codificada en el segmento pequeño (S) del ARN y se expresa en el citoplasma de las células infectadas en gran cantidad, ya que es vital en muchos procesos para la replicación viral. Por esta razón, es la partícula antigénica predominante del virus en un análisis serológico (Hussein *et al.*, 2011).

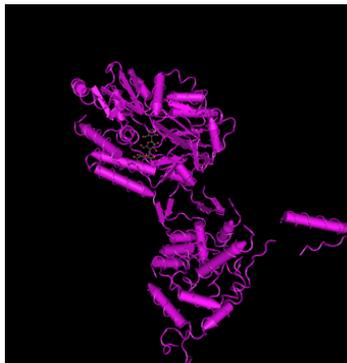


Imagen 3, Protein Data Base. Estructura de la proteína N.

La proteína N está formada por 433 aminoácidos. Es la proteína de la nucleocápside y el principal componente estructural del hantavirus, teniendo fundamentalmente dos funciones principales, proteger al virus y encapsidar el ARN viral.

La proteína posee una configuración bicúspide y principalmente α -helicoidal. La estructura cristalina de los dominios centrales de la proteína N (NPCore) del virus Sin Nombre (SNV) y el virus de los Andes (ANDV) revela un lóbulo N y un lóbulo C que bloquean una grieta de unión al ARN, y los residuos cargados positivamente desempeñan un papel clave en la unión del ARN y la replicación del virus (Guo *et al.*, 2016).

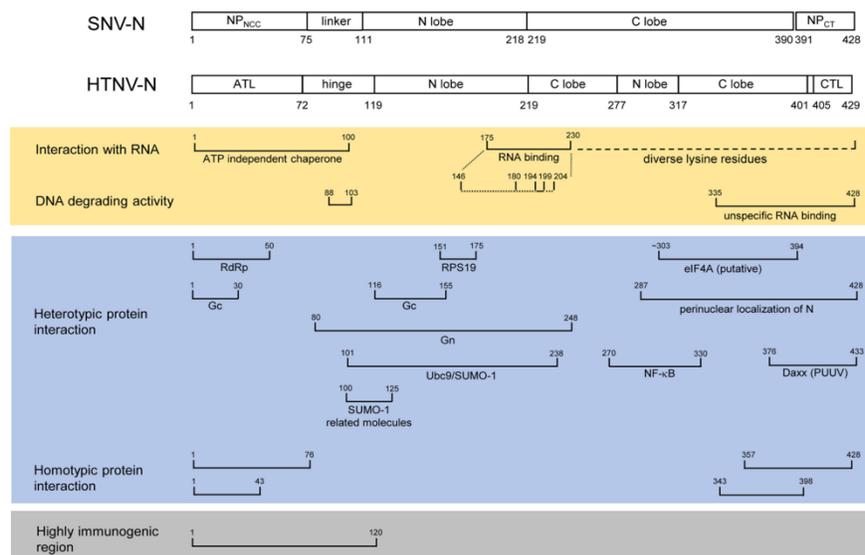


Imagen 4, Reuter, M., Krüger D. H. (2017). NP_{NCC}: dominio de hélice N-terminal. NP_{CT}: cola C-terminal. ATL: brazo amino-terminal. CTL: brazo carboxi-terminal. En los cuadros de debajo se señalan las regiones de interacción con ác. nucleicos, proteínas y una región altamente inmunogénica.

Los estudios sobre los constructos de la proteína N derivados del puumalavirus revelaron que la proteína N forma grandes agregados fibrilares mediante multimerización, con complejos compuestos por más de 10 proteínas individuales (Welke et al., 2022). Los sitios antigénicos de la proteína se encuentran tanto en la región N-terminal como en la C-terminal, y esta

última contiene un sitio antigénico específico del serotipo y dependiente de la multimerización (Yoshimatsu, K., Arikawa, J., 2014)

FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS

Las infecciones por hantavirus son un problema de salud pública significativo en Europa y Asia. La incidencia de las enfermedades por hantavirus varía considerablemente en diferentes regiones del mundo. Mientras que China tiene el mayor número de casos, la incidencia general está disminuyendo debido a las medidas de prevención de enfermedades (Xiao *et al.* 2022). En contraste, los países europeos están experimentando un aumento en el número de casos (Ivanova *et al.* 2021) que pueden estar relacionados con factores climáticos y la variación genética (Vial, P. *et al.* 2023). El síndrome hemorrágico con síndrome renal (HFRS) es la enfermedad focal natural más común de etiología viral en Rusia (Wang *et al.*, 2021). La prevalencia de la infección por hantavirus en el sudeste asiático y África está subestimada y se necesitan más estudios adicionales. En China, la incidencia de HFRS muestra variación estacional, con el mayor número de casos ocurriendo en primavera e invierno.

En España, la prevalencia de hantavirus es bastante baja (0,06%). Pero en 2022, un grupo de investigación encontró que el topillo campesino (*Microtus arvalis*) puede suponer un riesgo de salud pública ya que son un reservorio de hantavirus y en los picos de población pueden llegar a una densidad de 1.000 individuos por hectárea, estando en contacto con otros muchos roedores que podrían contagiar al ser humano en zona rurales (Herrero-Cófreces, S. *et al.*, 2022).

En el resto de Europa (UE), el país con más casos reportados es Finlandia, con 1299 casos en el año 2022 según el Centro Europeo para el Control y la Prevención de Enfermedades (ECDC), que supera a la suma total de todos los casos en la Unión Europea. En Europa se reportan más de 9.000 casos anuales y el principal hantavirus que provoca estas infecciones es Puumala Virus (PUUV), que predomina en Europa Central, los balcanes y Rusia, coincidiendo con el hábitat de su vector, *Myodes glareolus*. Este virus produce un cuadro no muy severo de fiebre hemorrágica con síndrome renal conocida como nefropatía epidémica

(NE). Los casos más severos de HFRS se dan en los Balcanes y son causados por Dobrava Virus (DOBV), cuyo vector es *A. flavicollis*. Recientemente, se ha observado un aumento de los casos en regiones más al centro y al sur de Europa (Bélgica, Francia, Alemania...) de nefropatía epidémica causada por PUUV (O. Vapalahti *et al.*, 2003, P. Heiman *et al.*, 2009, P. Heyman *et al.*, 2011, T. Avsic-Zupanc *et al.*, 1999).

En América, los hantavirus se denominan Hantavirus del Nuevo Mundo y fueron descubiertos en la década de los 90 en la región de las cuatro esquinas (Estados Unidos) y el primer virus aislado fue llamado ‘Sin Nombre Virus’ (Muranyi *et al.* 2005.). Desde ese momento, se han descubierto muchos más a lo largo de todo el continente que causan aproximadamente 300 casos de HPS (síndrome pulmonar por hantavirus) al año con una mortalidad que llega al 50% (Muranyi *et al.*).

Los casos más significativos se dan en países como Brasil, Estados Unidos y Colombia. En América del Sur, el primer hantavirus asociado al síndrome pulmonar por hantavirus (SPH) se identificó en Brasil en 1993, y en 2012 se habían registrado más de 1400 casos (Guzmán T, C. *et al.*, 2017). Los Estados Unidos también han registrado casos de hantavirus, con 624 casos notificados de HPS en los últimos 20 años, predominantemente en los estados al oeste del río Misisipi Knust, B. *et al.*, 2013).

La infección del ser humano es accidental y no supone ninguna ventaja de diseminación para el virus porque el ser humano no puede contagiar a otro. Solamente uno, la variante ‘Andes Virus’, se ha visto que es capaz de producir contagio humano-humano (ICTV, 9th report), pudiendo ser una potencial amenaza para la salud pública. En este caso, según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), el contagio se produce por contacto directo con la persona infectada o con sus fluidos corporales e incluso estando en sus proximidades por un tiempo superior a 1 hora, aunque este tipo de contagio sigue siendo raro comparado con la posibilidad de contagio por roedores infectados, dándose principalmente en el cono sur de Sudamérica.

El contagio depende principalmente de la exposición a roedores portadores en zonas en las que se han reportado casos, con un riesgo de contagio de un 50%. Además, se ha observado que es más probable que la enfermedad la porten ratones adultos y principalmente machos y que los ejemplares juveniles son menos susceptibles a ser portadores (Mills, Ksiazek et al., 1999).

Por otro lado, existe la posibilidad de que fenómenos climáticos relacionados con “El Niño” provoquen un aumento de las poblaciones de roedores portadores después de inviernos lluviosos (Glass, Cheek et al., 2000). Esto podría suponer un riesgo en un planeta en el que el cambio climático acentúa los fenómenos climáticos extremos.

Vectores.

La epidemiología del hantavirus está totalmente ligada a la propagación por los vectores, ya que, como hemos dicho, el contagio de un ser humano a otro sólo se ha descrito en un virus y en muy pocas ocasiones y localizadas en el cono sur de sudamérica, por lo que sin vector es imposible la propagación.



Imagen 4. Apodemus agrarius.

Se pensaba que los hantavirus, relacionados cada uno con un huésped específico, co-evolucionan con el huésped, aunque se ha visto que lo más probable es que se deba a que un cambio de huésped provoque nuevas adaptaciones del virus y no a un fenómeno de co-divergencia. Esto se debe a que los análisis de reconciliación topológicas co-filogenéticas no

muestran una topología que sea más similar a la que se da por casualidad (Ramsden, Holmes and Charleston, 2008).

Tabla 1 Avšič-Županc et al., 2019. En la siguiente tabla se enumeran los hantavirus conocidos hasta la fecha con su vector y distribución.

VECTOR	VIRUS	PATOLOGÍA
Amur/Soochong	<i>Apodemus peninsulae</i> (Siberia).	HFRS
Dobrava	<i>Apodemus flavicollis</i> (Balcanes).	HFRS
Hantaan	<i>Apodemus agrarius</i> (China, Rusia y Península de Corea).	HFRS
Thailand	<i>Bandicota indica</i> , <i>B. savile</i> (Sudeste de Asia)	HFRS
Puumala	<i>Myodes glareolus</i> (Europa y Asia).	HFRS
Luxi	<i>Eothenomys miletus</i> (China).	HFRS
Saaremaa	<i>Apodemus agrarius</i> (Europa).	HFRS
Seoul	<i>Rattus</i> (Corea del Sur)	HFRS
Tula	<i>Microtus avalis</i> (Europa, Asia)	HFRS
Sangassou	<i>Holomyscus simus</i>	
Anajatuba	<i>Oligoryzomys fornesi</i> (América del Sur)	HCPS
Araucaria	<i>Oligoryzomys nigripes</i> , <i>Oxymycterus judex</i> , <i>Akodon montensis</i> (América del Sur)	HCPS
Araraquara	<i>Bolomys lasiurus</i> (Brazil)	HCPS
Bayou	<i>Oryzomys palustris</i> (América del Norte)	HCPS

Bermejo	<i>Bolomys lasiurus</i> (Argentina)	HCPS
Black Creek Canal	<i>Sigmodon hispidus</i> (América del Norte)	HCPS
Costelo dos Sonhos	<i>Oligoryzomys eliurus</i> (América del Sur)	HCPS
Choclo	<i>Oligoryzomys fulvescens</i> (Panamá)	HCPS
Itapua	<i>Oligoryzomys nigripes</i> (América del Sur)	HCPS
Juquitiba	<i>Oligoryzomys nigripes</i> (Brasil)	HCPS
Laguna Negra	<i>Colomys laucha</i> (Argentina, Bolivia, Paraguay)	HCPS
Lechiguanas	<i>Oligoryzomys flavescens</i> (Argentina)	HCPS
Maporal	<i>Oligoryzomys delicatus</i> (América del Sur)	HCPS
Monongahela	<i>Peromyscus leucopus</i> (América del Norte)	HCPS
Neembucu	<i>Oligoryzomys chacoensis</i> (América del Sur)	HCPS
New York	<i>Peromyscus leucopus</i> (América del Norte)	HCPS
Oran	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i> (Argentina)	HCPS
Paranoa	Vector desconocido (América del Sur)	HCPS
Río Mamoré	<i>Oligoryzomys microtis</i> (Bolivia, Perú)	HCPS
Sin Nombre	<i>Peromyscus maniculatus</i> (América del Norte)	HCPS
Andes Virus	<i>Oligoryzomys</i> (principalmente <i>O. longicaudatus</i>) (América del Sur)	HCPS
Rio Mearim	<i>Holochilus sciureus</i> (Brasil)	HCPS

PATOLOGÍA

Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (HFRS).

Los síntomas del Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH) suelen aparecer entre 1 y 2 semanas después de la exposición al material infeccioso, aunque en casos poco comunes pueden tardar hasta 8 semanas en manifestarse. Estos síntomas iniciales se presentan súbitamente e incluyen dolores de cabeza intensos, dolor intenso en la espalda y el abdomen, fiebre, escalofríos, náuseas y visión borrosa. Algunas personas pueden experimentar enrojecimiento facial, inflamación o enrojecimiento en los ojos, o una erupción cutánea. Con el tiempo, los síntomas pueden progresar a presión arterial baja, shock agudo, pérdida vascular y fallo renal agudo, lo que puede resultar en una grave sobrecarga de líquidos. La gravedad de la enfermedad varía dependiendo del virus que causa la infección; las infecciones por los virus Hantaan y Dobrava tienden a ser más severas, mientras que las causadas por los virus Seoul, Saaremaa y Puumala son generalmente más moderadas. La recuperación completa puede llevar semanas o incluso meses.

Dependiendo del virus que esté causando el HFRS, la muerte ocurre en menos del 1% hasta hasta el 15% de los pacientes. La mortalidad oscila entre el 5% y el 15% para la HFRS causada por el virus Hantaan, y es menos del 1% para la enfermedad causada por el virus Puumala.

Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus (HCPS).

El síndrome cardiopulmonar por hantavirus (HCPS) es una enfermedad grave y potencialmente mortal. Las manifestaciones clínicas del HCPS incluyen síntomas como disnea, fiebre, tos, dolor de cabeza, taquicardia y presión arterial baja, con tasas de mortalidad que superan el 50% en algunas regiones.

INFECCIÓN

Mecanismo de entrada del virus.

Las células que son la puerta de entrada del virus son las células endoteliales, pero no es la replicación del virus lo que aparentemente daña estos tejidos, sino que el deterioro de este tejido viene dado por una respuesta inmune innata exacerbada que, además, determina el peor pronóstico de la enfermedad cuanto más descontrolada sea (Hepojoki, J. *et al.*, 2014) (Schönrich, G. *et al.*, 2015).

La entrada del hantavirus en las células huésped implica procesos de unión, internalización y fusión de membranas y se produce gracias a unas proteínas en forma de espina que están

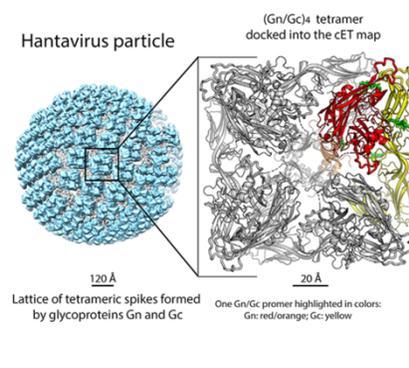


Imagen 5. Serris et al., 2020. Tetrámero proteico Gn/Gc.

formadas por un heterotetrámero Gn/Gc que se unen a la membrana del huésped y comienzan la fusión. Las glicoproteínas Gn/Gc de la superficie viral desempeñan un papel crucial en la mediación de la unión a receptores celulares como las integrinas, el DAF/CD55, el GC1qr y el PCDH1, e inician la internalización mediante mecanismos similares a los de la macropinocitosis o mediados por la clatrina (Mittler E. *et al.*, 2019) (Dieterle, M. E. *et al.*, 2021).

Durante la entrada, la proteína Gc interactúa con los receptores de las células huésped, como las integrinas y la protocadherina-1 (PCDH1), que son fundamentales para la internalización

del virus a través de mecanismos mediados por la clatrina (Mittler *et al.*, 2019). El proceso de fusión depende del pH y requiere condiciones ácidas dentro de los endosomas para desencadenar la transición de la proteína Gc de su conformación previa a la posterior a la fusión, lo que facilita la fusión de las membranas viral y endosómica (Guardado-Calvo *et al.*, 2016) (Yahoua *et al.*, 2018). Esta transición implica la inserción de bucles de fusión de la proteína Gc en la membrana diana, un proceso que se estabiliza mediante interacciones polares y electrostáticas a un pH bajo (Guardado-Calvo *et al.*, 2016). Además, los péptidos inhibidores pueden atacar el ectodominio de la proteína Gc, en particular el dominio III y la región madre, para bloquear la fusión a la membrana y la entrada del virus, lo que demuestra su potencial como objetivo terapéutico (Gonzalo *et al.*, 2016). La función de la proteína Gc va más allá de la penetración, ya que también participa en el ensamblaje y la estabilidad del virión mediante interacciones con la proteína Gn y otros componentes virales (Bignon *et al.*, 2019) (Tischler *et al.*, 2019). Los estudios estructurales han revelado que Gc puede formar homodímeros y heterodímeros con la proteína Gn, y estas interacciones son cruciales para la estabilidad y el funcionamiento de los picos virales (Bignon *et al.*, 2019) (Tischler *et al.*, 2019).

Una vez internalizado, el virus se traslada a los endosomas donde se produce la fusión con la membrana endosómica, facilitada por el colesterol y el pH ácido de los endosomas, que provoca un cambio conformacional de las glicoproteínas Gn/Gc, provocando su disociación

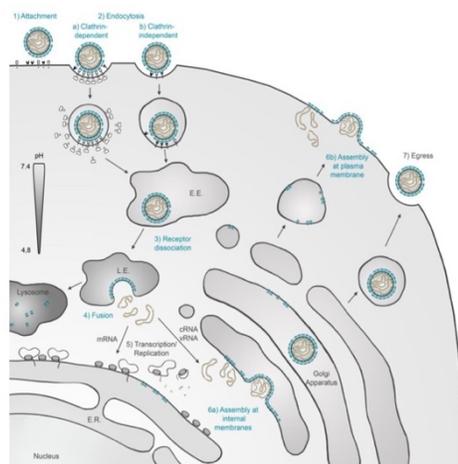


Imagen 5, Cifuentes-Muñoz, *et al.*, 2014. Distintas funciones que desempeñan las glicoproteínas Gn/Gc en el ciclo de los Hantavirus.

(Serris *et al.* 2020) y liberando así el contenido viral dentro de la célula. Se han identificado múltiples vías de entrada, incluidas las que dependen de la clatrina, la dinamina y el colesterol, lo que pone de manifiesto la complejidad de los mecanismos de entrada del hantavirus (Chiang *et al.*, 2016).

La cola citoplasmática de la proteína Gn también participa en el ensamblaje y la gemación de nuevos viriones al interactuar con las ribonucleocápsidas virales y facilitar su incorporación a las partículas en gemación (Cifuentes-Muñoz *et al.*, 2014). Además, las mutaciones en la proteína Gn pueden mejorar significativamente la infectividad viral y la propagación célula a célula al relocalizar la proteína del complejo de Golgi a la superficie celular, aumentando así su incorporación a los viriones en ciernes (Slough *et al.*, 2019) (Slough *et al.*, 2018). Además, la proteína Gn está sujeta a una degradación autofágica, un proceso que el virus aprovecha para regular su ciclo de replicación. Se ha demostrado que la inhibición de la autofagia reduce la replicación viral, lo que indica que la eliminación autofágica del Gn es necesaria para una replicación eficaz del virus (Hussein *et al.*, 2012).

Algo que es muy necesario para el virus y también para la virulencia es la integrina $\beta 3$. Para que el virus pueda introducirse necesita una interrupción de la barrera endotelial y se ha propuesto que esto está mediado por la acción de la integrina $\beta 3$ (Mackow E. R., Graviloskaya I. N., 2009). En un estudio sobre el virus Sangassou (SANGV), se vio que es capaz de infectar humanos, pero no producir la enfermedad y se cree que es debido a que no utiliza la misma integrina, sino que es dependiente de la integrina $\beta 1$ (Klempa *et al.*, 2012) (Klempa *et al.*, 2010). Otra integrina, la $\beta 2$ se cree que está relacionada con el reclutamiento y activación de los neutrófilos (Schörinch *et al.*, 2015).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es de suma importancia para que el virus pueda introducirse en la célula debido a que aumenta la permeabilidad y la fuga vascular por la internalización de la CDH5 o cadherina vascular endotelial (Gavard y Gutkind, 2006). También, en las células endoteliales, las integrinas $\alpha V\beta 3$ se unen al receptor 2 de VEGF (VEGFR2) y este complejo formado regula los efectos de la permeabilidad vascular (Borges *et al.*, 2001).

Un factor muy importante en la infección por hantavirus es la protocadherina 1 (PCDH1) una proteína de membrana que es diferencial en cuanto a la severidad del SPH, ya que una perturbación de la depresión o su localización en la membrana puede llevar a una mala función de la barrera epitelial al aumentar la permeabilidad celular. Esto se comprobó mediante un estudio en hámsteres, unos PCDH1-KO (knock out) y otros WT (wild type), los cuales fueron expuestos al virus. Como resultado se observó que los animales KO tenían menores niveles de ARN viral y antígeno respecto a los de tipo salvaje. Además, sólo presentaban una pequeña inflamación y ligero daño tisular, lo que lleva a pensar que PCDH1 podría estar estrechamente relacionada con la patogénesis del SPH (Jangara *et al.*, 2018).

Mutaciones en los receptores.

Se cree que algunas mutaciones detectadas en la integrina humana $\beta 3$ pueden desencadenar distintos pronósticos en el paciente. Una mutación de aspartato a asparagina en la posición 39 (DN39) de la integrina $\beta 3$ dificulta la infección por NY-1V (New York Virus) (Raymond *et al.*, 2005). Otros casos son los de la presencia de un residuo de leucina en la posición 33 (L33) y la mutación de prolina (L33P), que afectan a la infección por ANDV (Andes Virus) (Matthys *et al.*, 2010). En un estudio, se comprobó que los individuos con el polimorfismo L33 tienen una mayor prevalencia (89%) que los contactos cercanos sin la mutación (Martínez-Valdebenito *et al.*, 2019).

Mecanismo de replicación.

Al desintegrarse el virión dentro del lisosoma, liberan tres partículas virales al citoplasma, los segmentos S, M y L. Seguidamente la RdRp inicia la transcripción, generando un ARNm por cada segmento. La traducción de los ARNm derivados de los segmentos S y L ocurre en los ribosomas y los del segmento M en el retículo endoplasmático rugoso (Jin *et al.*, 2002). La replicación en el compartimento intermedio del retículo endoplasmático y del aparato del Golgi (ERGIC) implica un proceso de “cap-snatching” o “robo de caperuza” mediado por la proteína N y la polimerasa dependiente de ARN (Mir *et al.*, 2008) (Olschewski *et al.*, 2020).

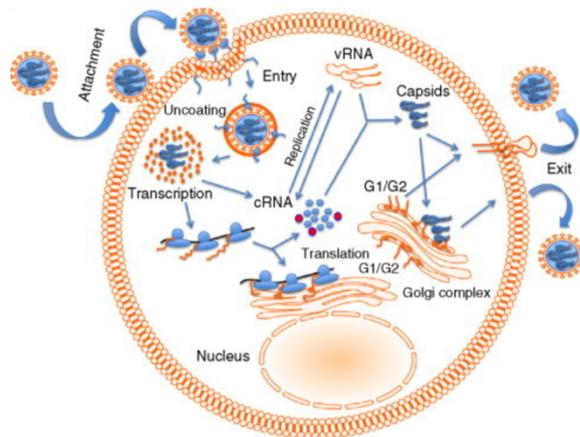


Imagen 6, Hussein et al., 2011. Replicación del hantavirus. Los virus se unen a los receptores de integrina de la superficie celular para que pueda suceder la entrada. Después de la entrada, ocurre el desencapsidamiento y la síntesis de ARNm por la RdRp. El genoma viral es sintetizado a través de un ARN complementario intermedio y se introduce en nuevas partículas virales que salen de la célula huésped.

Una vez formadas las proteínas Gn y Gc se transportan al complejo de Golgi antes de ser ensambladas. Después de las primeras rondas de transcripción, la RdRp genera tres ARN genómicos virales que se encapsulan con la proteína N para formar tres nucleocápsides que se transportan hasta los puntos donde se encuentran las proteínas Gn y Gc en el aparato de Golgi. Se desconoce el mecanismo por el que los viriones son ensamblados, pero se sospecha que los hantavirus del Nuevo Mundo son ensamblados en la membrana plasmática (Ravkov y Compans, 2001) (Hussein *et al.*, 2011). Una vez realizada la transcripción, la replicación y la síntesis de nuevas proteínas virales, las glucoproteínas median el ensamblaje, la gemación del virus y su salida por la vía secretora (Cifuentes-Muñoz, N. *et al.*, 2014).

Papel de la proteína N.

La proteína N facilita la traducción de los ARNm virales frente a los de los productos celulares del huésped (Klempa *et al.*, 2008). El mecanismo de iniciación de la traducción mediada por la proteína N es diferente al utilizado por las células del huésped y, probablemente, pueda iniciar la traducción del ARNm sin la necesidad del complejo eIF4F (Panganiban y Mir, 2009).

Se cree que la proteína N puede residir en los cuerpos de procesamiento (P-bodies) para rescatar ARNm celulares de la degradación para su posterior uso como cebadores por la RdRp viral.

Regulación del interferón como factor de virulencia.

Las citoquinas IFN α/β son claves en la respuesta a la infección viral, regulando la replicación. Se activan por el reconocimiento de ARN viral por los receptores de tipo Toll o helicasas de ARN. Por ello, los hantavirushan desarrollado mecanismos sofisticados para modular la respuesta del interferón (IFN) del huésped, un componente fundamental del sistema inmunitario innato.

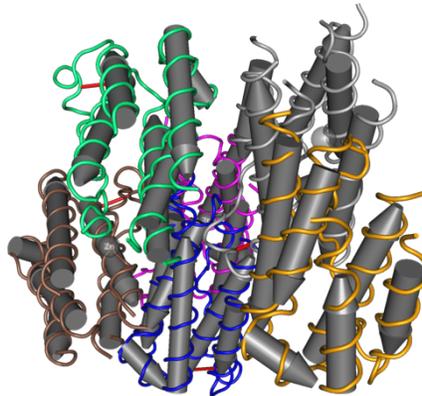


Imagen 7. Protein Data Bank. Interferón alfa humano.

Las proteínas no estructurales NS del virus Puumala (PUUV) y otros ortohantavirus inhiben fuertemente la inducción del promotor del interferón tipo I (IFN-I), siendo la región N-terminal de 20 aminoácidos de los NS particularmente crucial para esta inhibición (Binder *et al.*, 2021). Además, las proteínas NSs del PUUV, el virus de Tula (TULV) y el virus de Prospect Hill (PHV) inhiben el promotor del IFN β activado por el RIG-I, aunque solo el precursor de la glucoproteína (GPC) del PUUV y la proteína nucleocápside (N) del TULV también antagonizan al promotor de los elementos de respuesta estimulados por el IFN (ISRE) (Gallo *et al.*, 2021). La proteína N del virus Hantaan (HTNV) presenta una regulación

de la vía del IFN dependiente de la dosis, lo que estimula la respuesta del IFN a dosis bajas pero inhibe la producción de IFN β a dosis altas e inhibe constitutivamente la activación del factor nuclear kappa- β (Pan *et al.*, 2015). La cola citoplasmática de la proteína Gn (Gn-T) de varios hantavirus, incluidos el NY-1V (New York Virus), el virus de los Andes (ANDV) y el TULV, pero no el PHV, interfiere con la formación del complejo STING-TBK1-TRAF3, esencial para la activación del IRF3 y la inducción del IFN (Matthys & Mackow, 2012). La proteína N multifuncional de los hantavirus también desempeña un papel en la modulación de la respuesta inmune del huésped al retrasar la apoptosis celular y facilitar el transporte de la ribonucleoproteína viral, lo que ayuda a evadir la respuesta al IFN (Hussein & Mir, 2013). En concreto, la capacidad de la proteína ANDV N para inhibir la inducción del IFN β está relacionada con su fosforilación única en la serina 386, determinante de su virulencia (Simons *et al.*, 2019). Los hantavirus pueden inhibir los efectos antivirales de todos los tipos de IFN, y los niveles séricos de IFN- α y - β permanecen inalterados en los pacientes infectados por la PUUV, mientras que los niveles de IFN- λ disminuyen durante la fase aguda de la enfermedad (Stoltz, 2011). Los Gn-T de los hantavirus patógenos inhiben la fosforilación del IRF3 dirigida por el RIG-I/TBK1 y la inducción del IFN- β , y residuos específicos como la tirosina 627 del Gn-T del NY-1V son fundamentales para esta función (Matthys *et al.*, 2014). Los hantavirus no patógenos como el PHV no inhiben las respuestas tempranas del IFN y no se replican en las células endoteliales humanas, mientras que el TULV puede regular las respuestas del IFN y replicarse con éxito, lo que pone de relieve la necesidad de regular el IFN para la patogenicidad del hantavirus (Matthys *et al.*, 2011). Por último, los casos graves de HCPS se asocian con una sobreexpresión de la respuesta al IFN, que se correlaciona con el aumento de la carga viral y las citocinas proinflamatorias, lo que sugiere que una respuesta exacerbada al IFN puede contribuir a la gravedad de la enfermedad (Ribeiro *et al.*, 2021).

En un estudio (Alff *et al.*, 2008) se vio como tratando células endoteliales con IFN α se bloqueaba la replicación de los hantavirus, incluso aplicando el tratamiento hasta 12 horas después (después de 15 horas el efecto es muy bajo). Esto lleva a pensar que, efectivamente, los hantavirus necesitan regular la producción de interferón para infectar a las células.

Los hantavirus patogénicos irrumpen la respuesta temprana de IFN, aunque pasados unos días de la infección (1-4 días) empiezan a inducirse la producción de ISG (genes estimulados por interferón), pero sin afectar a la replicación del virus, lo que vuelve a hacer pensar que después de 15 horas, esta respuesta se ve minimizada (Geimonen E, *et al.*, 2002). Esto indica que probablemente los hantavirus desarrollen algún tipo de resistencia a los efectos del interferón pasado este tiempo.

Algunos hantavirus como TULV (Tula Virus), también regula la respuesta del interferón, pero no se conoce que produzca ninguna patología, por lo que la regulación de IFN es necesaria para el éxito del virus, pero no es causa suficiente de la patogenicidad (Matthys *et al.*, 2011).

TERAPIAS

Vacunación.

No existe ninguna vacuna ni ninguna terapia aprobada por las autoridades sanitarias estadounidenses o europeas, pero sí en Corea del Sur (Hantavax™), donde desde 1990 existe una vacuna inactivada con formalina de HNTV (Haantan Virus), aunque no existen ensayos clínicos bien diseñados, tiene una baja eficacia clínica y se desconoce si produce inmunidad a largo plazo (Cho *et al.*, 2002).

Existen estudios de vacunas en los que se utilizan vectores recombinantes de VSV (virus de la estomatitis vesicular) y adenovirus (AdV) que expresan el tetrámero Gn/Gc del hantavirus. En estos estudios con hámsteres sirios la protección duró en torno a los 6 meses y esta pérdida de la inmunidad se correlacionó con una pérdida de la respuesta de nAbs (anticuerpos neutralizantes) (Prescott *et al.*, 2014).

Anticuerpos.

Otra posible terapia es la transferencia pasiva de anticuerpos policlonales de individuos inmunizados con vacunas basadas en Gn/Gc, ya que ha mostrado eficacia en hamsters sirios infectados con ANDV. Por otro lado, la transfusión de sueros hiperinmunes de donantes

convalecientes de ANDV a pacientes con SPH agudo mejoró el pronóstico de la enfermedad y aumentó la cantidad de nAbs (Mittler *et al.*, 2019).

Antivirales.

Tampoco existe una terapia antiviral específica contra el hantavirus, basándose la terapia en terapia de soporte hasta que el propio sistema inmune elimine al virus. El antiviral más ampliamente utilizado es la ribavirina.

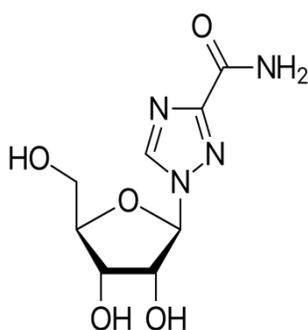


Imagen 8. Merck. Estructura molecular de la ribavirina

Se trata de un nucleósido con una base nitrogenada de triazolcarboxamida. Dentro de la célula sufre un proceso de fosforilación hasta ribavirina monofosfato, que inhibe la síntesis de guanosín monofosfato y la síntesis de ARNm-guanililtransferasa. Esto último inhibe la síntesis de ARNm viral y de la ARN polimerasa (Ortega-Prieto *et al.*, 2013).

La ribavirina, que es un antiviral de amplio espectro, ha mostrado cierta eficacia contra el hantavirus, disminuyendo la titulación viral, la morbilidad y la mortalidad en pacientes con HFRS (Huggings *et al.*, 1991). También ha demostrado eficacia mejorando la prognosis cuando se suministra en las primeras fases de la enfermedad y reduciendo el riesgo de insuficiencia renal (Rusnak *et al.*, 2009).

DISCUSIÓN

Estudiar la estructura de las proteínas del hantavirus es crucial por varias razones, principalmente debido a las graves enfermedades que provoca en los seres humanos, como la fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS) y el síndrome cardiopulmonar por hantavirus (HCPS), que tienen altas tasas de mortalidad (Musalwa *et al.*, 2015). Comprender

la estructura de las proteínas del hantavirus, en particular la nucleoproteína (NP) y las glicoproteínas (Gn y Gc), es esencial para desarrollar vacunas y agentes terapéuticos eficaces. La NP encapsida el genoma viral y forma un complejo de ribonucleoproteínas (RNP) que es vital para la replicación del virus y es un objetivo clave para el diagnóstico serológico.

Los estudios estructurales, como la cristalografía y la microscopía crioelectrónica, han revelado la arquitectura detallada de estas proteínas y han permitido comprender mejor sus funciones e interacciones. Por ejemplo, la estructura cristalina de los dominios centrales de la proteína N del virus Sin Nombre (SNV) y el virus de los Andes (ANDV) ha aclarado los mecanismos de unión al ARN esenciales para la replicación del virus (Guo *et al.*, 2016). Del mismo modo, las glicoproteínas Gn y Gc son fundamentales para la entrada del virus en las células hospedadoras, ya que el Gc actúa como efector de fusión de la membrana. El análisis estructural de la Gc del virus Puumala (PUUV) ha demostrado que se trata de una proteína de fusión por membranas de clase II, que es un objetivo potencial para los inhibidores de la fusión (Willensky *et al.*, 2016). Además, la intrincada red de complejos de picos de glicoproteínas Gn y Gc en la superficie del hantavirus es el objetivo principal para neutralizar de los anticuerpos, y comprender esta estructura puede ayudar en el diseño de vacunas y anticuerpos terapéuticos (Rissanen *et al.*, 2020).

Se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes dirigidos a la proteína Gc se unen a sitios de múltiples dominios, lo que evita los cambios conformacionales necesarios para la fusión de la membrana y, por lo tanto, neutraliza el virus (Rissanen *et al.*, 2020). Estos anticuerpos pueden bloquear la proteína Gc en su estado de prefusión, lo que pone de manifiesto la posibilidad de realizar intervenciones terapéuticas dirigidas a esta proteína. Se ha demostrado también, que el ectodominio de la proteína Gn provoca una respuesta de anticuerpos neutralizantes, con anticuerpos monoclonales específicos dirigidos a distintos epítopos del ectodominio Gn, lo que proporciona información sobre su accesibilidad inmunológica y su potencial para el diseño de vacunas (Risannen *et al.*, 2021) (Risannen *et al.*, 2020).

En general, la multifuncionalidad y las propiedades estructurales de la proteína N la convierten en un actor clave en la patogenidad del hantavirus y en un punto focal para la

investigación destinada a desarrollar estrategias antivirales. La capacidad de la proteína N para formar ribonucleoproteínas y sus interacciones con otras proteínas virales y del huésped subrayan su importancia en el ciclo de vida del hantavirus y su potencial como objetivo de intervenciones terapéuticas (Reuter et al., 2018).

También, los hallazgos sobre la compleja interacción entre los hantavirus y la respuesta del receptor al IFN, revelan múltiples estrategias virales para eludir la detección inmunológica y pone de manifiesto otros posibles objetivos de la intervención terapéutica.

La falta de vacunas aprobadas y tratamientos antivirales específicos para las infecciones por hantavirus hace que esta investigación sea aún más crítica, ya que puede conducir a la identificación de nuevas dianas terapéuticas y al desarrollo de contramedidas eficaces (Meier et al., 2021).

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, por su eterna paciencia.

A mi familia, que siempre ha estado a mi lado.

A Vanessa, por su increíble apoyo.

BIBLIOGRAFÍA.

1 Mitchell, C. (2019, January 11). OPS/OMS: Hantavirus. Retrieved April 25, 2023, from https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14911%3Ahantavirus&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0

2 MacNeil, A., Nichol, S., & Spiropoulou, C. (2011). Hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Research*, 162(1), 138-147.

3 Lee, H. W., (1981). Korean Hemorrhagic Fever. Korea University College Of Medicine Seoul, Grant No. DAMD 17-80-G-9468.

4 Nichol, S. T., Spiropoulou, C. F., Morzunov, S., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Feldmann, H., . . . Peters, C. J. (1993). Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*, 262(5135), 914-917. doi:10.1126/science.8235615.

- 5 Laenen, L., Vergote, V., Calisher, C. H., Klempa, B., Klingström, J., Kuhn, J. H., & Maes, P. (2019). Hantaviridae: Current classification and future perspectives. *Viruses*, *11*(9), 788. <https://doi.org/10.3390/v11090788>
- 6 Guo, W. P., Lin, X. D., Wang, W., Tian, J. H., Cong, M. L., Zhang, H. L., Wang, M. R., Zhou, R. H., Wang, J. B., Li, M. H., Xu, J., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2013). Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS pathogens*, *9*(2), e1003159. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003159>
- 7 Xiao, Wei., Xin-Lou, Li., Shuxuan, Song., Xiaohu, Wen., Tiezhi, Jin., Chenxi, Zhao., Xubin, Wu., Kun, Liu., Zhongjun, Shao. (2022). Trends and focuses of hantavirus researches: a global bibliometric analysis and visualization from 1980 to 2020. *Archives of public health*, doi: 10.1186/s13690-022-00973-5
- 8 Иванова, А. В., Попов, Н. В., Карнауков, И. Г., & Чумачкова, Е. А. (2021). Hantavirus Diseases: a Review of Epidemiological Situation and Epidemiological Risks in the Regions of the World. *Problemy Osobo Opasnyh Infekcij*, *1*, 23-31. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-23-31>
- 9 Qiuwei, Wang., Ming, Yue., Pingping, Yao., Zhu, Changqiang., Ai, Lele., Dan, Hu., Bin, Zhang., Zhang-Nv, Yang., Xiao-Hong, Yang., Fan, Luo., Chunhui, Wang., Wei, Hou., Tan, Weilong. (2021). Epidemic Trend and Molecular Evolution of HV Family in the Main Hantavirus Epidemic Areas From 2004 to 2016, in P.R. China.. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, doi: 10.3389/FCIMB.2020.584814
- 10 Pablo, Vial., Marcela, Ferrés., Cecilia, Vial., Jonas, Klingström., Clas, Ahlm., Rene, Daniel, Mendez, Lopez., Nicole, Le, Corre., Gregory, J., Mertz. (2023). Hantavirus in humans: a review of clinical aspects and management.. *Lancet Infectious Diseases*, doi: 10.1016/s1473-3099(23)00128-7
- 11 Herrero-Cófreces, S., Mougeot, F., Sironen, T., Meyer, H., Rodríguez-Pastor, R., & Luque-Larena, J. (2022). Viral Zoonoses in Small Wild Mammals and Detection of Hantavirus, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, *28*(6), 1294-1296. <https://doi.org/10.3201/eid2806.212508>.
- 12 Muranyi, W., Bahr, U., Zeier, M., & van der Woude, F. J. (2005). Hantavirus infection. *Journal of the American Society of Nephrology*, *16*(12), 3669–3679. doi:10.1681/asn.2005050561
- 13 Bunyaviridae. (n.d.). Retrieved from https://ictv.global/report_9th/RNAneg/Bunyaviridae.
- 14 Mills, J., Ksiazek, T., Peters, C., & Childs, J. (1999). Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: A synthesis. *Emerging Infectious Diseases*, *5*(1), 135-142.
- 15 Glass, G., Cheek, J., Patz, J., Shields, T., Doyle, T., Thoroughman, D., . . . Bryan, R. (2000). Using remotely sensed data to identify areas at risk for hantavirus pulmonary syndrome. *Emerging Infectious Diseases*, *6*(3), 238-247.
- 16 Vapalahti, O., Mustonen, J., Lundkvist, A., Henttonen, H., Plyusnin, A., & Vaheri, A. (2003). Hantavirus infections in Europe. *The Lancet. Infectious diseases*, *3*(10), 653–661. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00774-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00774-6)
- 17 Heyman, P., Vaheri, A., Lundkvist, A., & Avsic-Zupanc, T. (2009). Hantavirus infections in Europe: from virus carriers to a major public-health problem. *Expert review of anti-infective therapy*, *7*(2), 205–217. <https://doi.org/10.1586/14787210.7.2.205>
- 18 Heyman, P., Ceianu, C. S., Christova, I., Tordo, N., Beersma, M., João Alves, M., Lundkvist, A., Hukic, M., Papa, A., Tenorio, A., Zelená, H., Essbauer, S., Visontai, I., Golovljova, I., Connell, J., Nicoletti, L., Van Esbroeck, M., Gjeruldsen Dudman, S., Aberle, S. W., Avšič-Županc, T., . . . Vaheri, A. (2011). A five-year perspective on the situation of haemorrhagic fever with renal syndrome and status of the hantavirus reservoirs in Europe, 2005-2010. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, *16*(36), 19961. <https://doi.org/10.2807/ese.16.36.19961-en>

- 19 Ramsden, C., Holmes, E. C., & Charleston, M. A. (2009). Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. *Molecular biology and evolution*, 26(1), 143–153. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn234>
- 20 Guzmán T, C., Calderón R, A., González Tous, M., & Mattar V, S. (2017). Infecciones por hantavirus. *Revista MVZ Córdoba*, 22(supl), 6101-6117.
- 21 Knust, B., & Rollin, P. E. (2013). Twenty-Year Summary of Surveillance for Human Hantavirus Infections, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 19(12), 1934-1937. <https://doi.org/10.3201/eid1912.131217>.
- 22 Gelse, Mazzoni, Campos., Alessandra, Abel, Borges., Soraya, Jabur, Badra., Glauciane, Garcia, de, Figueiredo., Ricardo, Luiz, Moro, de, Souza., Marcos, Lázaro, Moreli., Luiz, Tadeu, Moraes, Figueiredo. (2009). [Pulmonary and cardiovascular syndrome due to hantavirus: clinical aspects of an emerging disease in southeastern Brazil]. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, doi: 10.1590/S0037-86822009000300009
- 23 Eva, Mittler., Maria, Eugenia, Dieterle., Lara, M., Kleinfelter., Megan, M., Slough., Kartik, Chandran., Rohit, K., Jangra. (2019). Hantavirus entry: Perspectives and recent advances. *Advances in Virus Research*, doi: 10.1016/BS.AIVIR.2019.07.002
- 24 M., Eugenia, Dieterle., Carles, Solà-Riera., Rohit, K., Jangra., Chunyan, Ye., Samuel, M, Goodfellow., Eva, Mittler., Ezgi, Kasikci., Steven, B., Bradfute., Jonas, Klingström., Kartik, Chandran. (2021). Genetic depletion studies define receptor usage by virulent hantaviruses in human endothelial cells. *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.12.30.424861
- 25 Cheng-Feng, Chiang., Mike, Flint., Jin-Mann, S., Lin., Christina, F., Spiropoulou. (2016). Endocytic Pathways Used by Andes Virus to Enter Primary Human Lung Endothelial Cells.. *PLOS ONE*, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0164768
- 26 Alexandra, Serris., Robert, Stass., Eduardo, A, Bignon., Nicolas, A., Muena., Jean-Claude, Manuguerra., Rohit, K., Jangra., Sai, Li., Kartik, Chandran., Nicole, D., Tischler., Juha, T., Huiskonen., Félix, A., Rey., Pablo, Guardado-Calvo. (2020). High-Resolution Description of the Hantavirus Surface Glycoprotein Lattice and Its Membrane Fusion Control Mechanism. *Social Science Research Network*, doi: 10.2139/SSRN.3596593
- 27 Hepojoki, J., Vaheri, A., & Strandin, T. (2014). The fundamental role of endothelial cells in hantavirus pathogenesis. *Frontiers in microbiology*, 5, 727. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00727>
- 28 Schönrich, G., Krüger, D. H., & Raftery, M. J. (2015). Hantavirus-induced disruption of the endothelial barrier: neutrophils are on the payroll. *Frontiers in microbiology*, 6, 222. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00222>
- 29 Mackow, E. R., & Gavrilovskaya, I. N. (2009). Hantavirus regulation of endothelial cell functions. *Thrombosis and haemostasis*, 102(6), 1030–1041. <https://doi.org/10.1160/TH09-09-0640>
- 30 Gavard, J., & Gutkind, J. S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature cell biology*, 8(11), 1223–1234. <https://doi.org/10.1038/ncb1486>
- 31 Borges, E., Jan, Y., & Ruoslahti, E. (2000). Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *The Journal of biological chemistry*, 275(51), 39867–39873. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007040200>

- 32 Klempa, B., Witkowski, P. T., Popugaeva, E., Auste, B., Koivogui, L., Fichet-Calvet, E., Strecker, T., Ter Meulen, J., & Krüger, D. H. (2012). Sangassou virus, the first hantavirus isolate from Africa, displays genetic and functional properties distinct from those of other murinae-associated hantaviruses. *Journal of virology*, 86(7), 3819–3827. <https://doi.org/10.1128/JVI.05879-11>
- 33 Klempa, B., Koivogui, L., Sylla, O., Koulemou, K., Auste, B., Krüger, D. H., & ter Meulen, J. (2010). Serological evidence of human hantavirus infections in Guinea, West Africa. *The Journal of infectious diseases*, 201(7), 1031–1034. <https://doi.org/10.1086/651169>
- 34 Jangra, R. K., Herbert, A. S., Li, R., Jae, L. T., Kleinfelter, L. M., Slough, M. M., Barker, S. L., Guardado-Calvo, P., Román-Sosa, G., Dieterle, M. E., Kuehne, A. I., Muenz, N. A., Wirchnianski, A. S., Nyakatura, E. K., Fels, J. M., Ng, M., Mittler, E., Pan, J., Bharrhan, S., Wec, A. Z., ... Chandran, K. (2018). Protocadherin-1 is essential for cell entry by New World hantaviruses. *Nature*, 563(7732), 559–563. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0702-1>
- 35 Raymond, T., Gorbunova, E., Gavrilovskaya, I. N., & Mackow, E. R. (2005). Pathogenic hantaviruses bind plexin-semaphorin-integrin domains present at the apex of inactive, bent alphavbeta3 integrin conformers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4), 1163–1168. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406743102>
- 36 Mir, M. A., Duran, W. A., Hjelle, B. L., Ye, C., & Panganiban, A. T. (2008). Storage of cellular 5' mRNA caps in P bodies for viral cap-snatching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19294–19299. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807211105>
- 37 Olschewski, S., Cusack, S., & Rosenthal, M. (2020). The Cap-Snatching Mechanism of Bunyaviruses. *Trends in microbiology*, 28(4), 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.12.006>
- 38 Hepojoki, J., Strandin, T., Lankinen, H., & Vaheri, A. (2012). Hantavirus structure--molecular interactions behind the scene. *The Journal of general virology*, 93(Pt 8), 1631–1644. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042218-0>
- 39 Kallio, E. R., Klingström, J., Gustafsson, E., Manni, T., Vaheri, A., Henttonen, H., Vapalahti, O., & Lundkvist, Å. (2006). Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. *The Journal of general virology*, 87(Pt 8), 2127–2134. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81643-0>
- 40 Avšič-Županc, T., Saksida, A., & Korva, M. (2019). Hantavirus infections. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21S, e6–e16. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12291>
- 41 Cho, H. W., Howard, C. R., & Lee, H. W. (2002). Review of an inactivated vaccine against hantaviruses. *Intervirology*, 45(4-6), 328–333. <https://doi.org/10.1159/000067925>
- 42 Prescott, J., DeBuysscher, B. L., Brown, K. S., & Feldmann, H. (2014). Long-term single-dose efficacy of a vesicular stomatitis virus-based Andes virus vaccine in Syrian hamsters. *Viruses*, 6(2), 516–523. <https://doi.org/10.3390/v6020516>
- 43 Mittler, E., Dieterle, M. E., Kleinfelter, L. M., Slough, M. M., Chandran, K., & Jangra, R. K. (2019). Hantavirus entry: Perspectives and recent advances. *Advances in virus research*, 104, 185–224. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.07.002>
- 44 Huggins, J. W., Hsiang, C. M., Cosgriff, T. M., Guang, M. Y., Smith, J. I., Wu, Z. O., LeDuc, J. W., Zheng, Z. M., Meegan, J. M., & Wang, Q. N. (1991). Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. *The Journal of infectious diseases*, 164(6), 1119–1127. <https://doi.org/10.1093/infdis/164.6.1119>

- 45 Rusnak, J. M., Byrne, W. R., Chung, K. N., Gibbs, P. H., Kim, T. T., Boudreau, E. F., Cosgriff, T., Pittman, P., Kim, K. Y., Erlichman, M. S., Rezvani, D. F., & Huggins, J. W. (2009). Experience with intravenous ribavirin in the treatment of hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. *Antiviral research*, 81(1), 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.09.007>
- 46 Hussein, I. T., Haseeb, A., Haque, A., & Mir, M. A. (2011). Recent advances in hantavirus molecular biology and disease. *Advances in applied microbiology*, 74, 35–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387022-3.00006-9>
- 47 Jin, M., Park, J., Lee, S., Park, B., Shin, J., Song, K. J., Ahn, T. I., Hwang, S. Y., Ahn, B. Y., & Ahn, K. (2002). Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology*, 294(1), 60–69. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1303>
- 48 Ravkov, E. V., & Compans, R. W. (2001). Hantavirus nucleocapsid protein is expressed as a membrane-associated protein in the perinuclear region. *Journal of virology*, 75(4), 1808–1815. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.4.1808-1815.2001>
- 49 Panganiban, A. T., & Mir, M. A. (2009). Bunyavirus N: eIF4F surrogate and cap-guardian. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(9), 1332–1337. <https://doi.org/10.4161/cc.8.9.8315>
- 50 Alff, P. J., Sen, N., Gorbunova, E., Gavrilovskaya, I. N., & Mackow, E. R. (2008). The NY-1 hantavirus Gn cytoplasmic tail coprecipitates TRAF3 and inhibits cellular interferon responses by disrupting TBK1-TRAF3 complex formation. *Journal of virology*, 82(18), 9115–9122. <https://doi.org/10.1128/JVI.00290-08>
- 51 Geimonen, E., Neff, S., Raymond, T., Kocer, S. S., Gavrilovskaya, I. N., & Mackow, E. R. (2002). Pathogenic and nonpathogenic hantaviruses differentially regulate endothelial cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13837–13842. <https://doi.org/10.1073/pnas.192298899>
- 52 Matthys, V., Gorbunova, E. E., Gavrilovskaya, I. N., Pepini, T., & Mackow, E. R. (2011). The C-terminal 42 residues of the Tula virus Gn protein regulate interferon induction. *Journal of virology*, 85(10), 4752–4760. <https://doi.org/10.1128/JVI.01945-10>
- 53 Cifuentes-Muñoz, N., Salazar-Quiroz, N., & Tischler, N. D. (2014). Hantavirus Gn and Gc envelope glycoproteins: key structural units for virus cell entry and virus assembly. *Viruses*, 6(4), 1801–1822. <https://doi.org/10.3390/v6041801>
- 54 Ortega-Prieto, A. M., Sheldon, J., Grande-Pérez, A., Tejero, H., Gregori, J., Quer, J., Esteban, J. I., Domingo, E., & Perales, C. (2013). Extinction of Hepatitis C Virus by Ribavirin in Hepatoma Cells Involves Lethal Mutagenesis. *PloS One*, 8(8), e71039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071039>
- 55 Welke, R. W., Sperber, H. S., Bergmann, R., Koikkarah, A., Menke, L., Sieben, C., Krüger, D. H., Chiantia, S., Herrmann, A., & Schwarzer, R. (2022). Characterization of Hantavirus N Protein Intracellular Dynamics and Localization. *Viruses*, 14(3), 457. <https://doi.org/10.3390/v14030457>
- 56 Yu, Guo., Wenming, Wang., Yuna, Sun., Chao, Ma., Xu, Wang., Xin, Wang., Pi, Liu., Shu, Shen., Baobin, Li., Jianping, Lin., Fei, Deng., Hualin, Wang., Zhiyong, Lou. (2016). Crystal Structure of the Core Region of Hantavirus Nucleocapsid Protein Reveals the Mechanism for Ribonucleoprotein Complex Formation. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.02523-15
- 57 Kumiko, Yoshimatsu., Jiro, Arikawa. (2014). Antigenic Properties of N Protein of Hantavirus. *Viruses*, doi: 10.3390/V6083097
- 58 Monika, Reuter., Detlev, H., Krüger. (2018). The nucleocapsid protein of hantaviruses: much more than a genome-wrapping protein.. *Virus Genes*, doi: 10.1007/S11262-017-1522-3

- 59 Musalwa, Muyangwa., Ekaterina, V., Martynova., Svetlana, F., Khaiboullina., Sergey, P., Morzunov., Albert, A., Rizvanov. (2015). Hantaviral Proteins: Structure, Functions, and Role in Hantavirus Infection.. *Frontiers in Microbiology*, doi: 10.3389/FMICB.2015.01326
- 60 Shmuel, Willensky., Hagit, Bar-Rogovsky., Eduardo, A, Bignon., Nicole, D., Tischler., Yorgo, Modis., Moshe, Dessau. (2016). Crystal Structure of Glycoprotein C from a Hantavirus in the Post-fusion Conformation.. *PLOS Pathogens*, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1005948
- 61 Ilona, Rissanen., Robert, Stass., Stefanie, A., Krumm., Jeffrey, Seow., Ruben, J.G., Hulswit., Guido, C., Paesen., Jussi, Hepojoki., Olli, Vapalahti., Åke, Lundkvist., Olivier, Reynard., Viktor, E., Volchkov., Katie, J., Doores., Juha, T., Huiskonen., Thomas, A., Bowden. (2020). Molecular rationale for hantavirus neutralization by a reservoir host-derived monoclonal antibody. *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.04.17.029876
- 62 Kristina, Meier., Sigurdur, R., Thorkelsson., Emmanuelle, R., J., Quemin., Maria, Rosenthal. (2021). Hantavirus Replication Cycle—An Updated Structural Virology Perspective. *Viruses*, doi: 10.3390/V13081561
- 63 Pablo, Guardado-Calvo., Eduardo, A, Bignon., Eva, Stettner., Scott, A., Jeffers., Jimena, Pérez-Vargas., Jimena, Pérez-Vargas., Gérard, Pehau-Arnaudet., Gérard, Pehau-Arnaudet., M., Alejandra, Tortorici., M., Alejandra, Tortorici., Jean, Luc, Jestin., Patrick, England., Patrick, England., Nicole, D., Tischler., Félix, A., Rey., Félix, A., Rey. (2016). Mechanistic Insight into Bunyavirus-Induced Membrane Fusion from Structure-Function Analyses of the Hantavirus Envelope Glycoprotein Gc.. *PLOS Pathogens*, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1005813
- 64 Yaohua, Zhu., Yan, Wu., Yan, Chai., Jianxun, Qi., Ruchao, Peng., Wen-hai, Feng., George, F., Gao. (2018). The Postfusion Structure of the Heartland Virus Gc Glycoprotein Supports Taxonomic Separation of the Bunyaviral Families Phenuiviridae and Hantaviridae.. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.01558-17
- 65 Gonzalo, P., Barriga., Fernando, Villalón-Letelier., Chantal, L., Márquez., Eduardo, A, Bignon., Rodrigo, Acuña., Breyan, H., Ross., Octavio, Monasterio., Gonzalo, A., Mardones., Simon, E., Vidal., Nicole, D., Tischler. (2016). Inhibition of the Hantavirus Fusion Process by Predicted Domain III and Stem Peptides from Glycoprotein Gc.. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0004799
- 66 Eduardo, A, Bignon., Amelina, Albornoz., Pablo, Guardado-Calvo., Félix, A., Rey., Nicole, D., Tischler. (2019). Molecular organization and dynamics of the fusion protein Gc at the hantavirus surface.. *eLife*, doi: 10.7554/ELIFE.46028
- 67 Tischler, Nicole., Bignon, Silva, Eduardo, Andrés., Rey, Félix, Augusto., Guardado, Calvo, Pablo. (2019). Engineered spike proteins of hantaviruses and uses thereof.
- 68 Ilona, Rissanen., Robert, Stass., Antra, Zeltina., Sai, Li., Jussi, Hepojoki., Jussi, Hepojoki., Karl, Harlos., Robert, J.C., Gilbert., Juha, T., Huiskonen., Juha, T., Huiskonen., Thomas, A., Bowden. (2017). Structural Transitions of the Conserved and Metastable Hantaviral Glycoprotein Envelope.. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.00378-17
- 69 Ilona, Rissanen., Stefanie, A., Krumm., Robert, Stass., Annalis, Whitaker., James, E., Voss., Emily, A., Bruce., Sylvia, Rothenberger., Stefan, Kunz., Dennis, R., Burton., Dennis, R., Burton., Juha, T., Huiskonen., Juha, T., Huiskonen., Jason, Botten., Thomas, A., Bowden., Katie, J., Doores. (2021). Structural Basis for a Neutralizing Antibody Response Elicited by a Recombinant Hantaan Virus Gn Immunogen.. *Mbio*, doi: 10.1128/MBIO.02531-20
- 70 Petazzi, R. A., Koikkarah, A. A., Tischler, N. D., & Chiantia, S. (2021). Detection of Envelope Glycoprotein Assembly from Old World Hantaviruses in the Golgi Apparatus of Living Cells. *Journal Of Virology*, 95(4). <https://doi.org/10.1128/jvi.01238-20>

- 71 Slough, M. M., Chandran, K., & Jangra, R. K. (2019). Two Point Mutations in Old World Hantavirus Glycoproteins Afford the Generation of Highly Infectious Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Vectors. *MBio*, 10(1). <https://doi.org/10.1128/mbio.02372-18>
- 72 Megan, M., Slough., Kartik, Chandran., Rohit, K., Jangra. (2018). Two point mutations in the Hantaan virus glycoproteins afford the generation of a highly infectious recombinant vesicular stomatitis virus vector. *bioRxiv*, doi: 10.1101/356055
- 73 Hussein, I. T., Cheng, E., Ganaie, S. S., Werle, M. J., Sheema, S., Haque, A., & Mir, M. A. (2012). Autophagic clearance of Sin Nombre hantavirus glycoprotein Gn promotes virus replication in cells. *Journal of virology*, 86(14), 7520–7529. <https://doi.org/10.1128/JVI.07204-11>
- 74 Binder, F., Gallo, G., Bendl, E., Eckerle, I., Ermonval, M., Luttermann, C., & Ulrich, R. G. (2021). Inhibition of interferon I induction by non-structural protein NSs of Puumala virus and other vole-associated orthohantaviruses: phenotypic plasticity of the protein and potential functional domains. *Archives of virology*, 166(11), 2999–3012. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05159-y>
- 75 Gallo, G., Caignard, G., Badonnel, K., Chevreux, G., Terrier, S., Szemiel, A., Roman-Sosa, G., Binder, F., Gu, Q., Da Silva Filipe, A., Ulrich, R. G., Kohl, A., Vitour, D., Tordo, N., & Ermonval, M. (2021). Interactions of Viral Proteins from Pathogenic and Low or Non-Pathogenic Orthohantaviruses with Human Type I Interferon Signaling. *Viruses*, 13(1), 140. <https://doi.org/10.3390/v13010140>
- 76 Pan, W., Bian, G., Wang, K., Feng, T., & Dai, J. (2015). Effects of Different Doses of Nucleocapsid Protein from Hantaan Virus A9 Strain on Regulation of Interferon Signaling. *Viral immunology*, 28(8), 448–454. <https://doi.org/10.1089/vim.2015.0004>
- 77 Matthys, V., & Mackow, E. R. (2012). Hantavirus regulation of type I interferon responses. *Advances in virology*, 2012, 524024. <https://doi.org/10.1155/2012/524024>
- 78 Hussein, I. T. M., & Mir, M. A. (2013). How hantaviruses modulate cellular pathways for efficient replication. *Frontiers In Bioscience*, E5(1), 154-166. <https://doi.org/10.2741/e604>
- 79 Simons, M. J., Gorbunova, E. E., & Mackow, E. R. (2019). Unique Interferon Pathway Regulation by the Andes Virus Nucleocapsid Protein Is Conferred by Phosphorylation of Serine 386. *Journal Of Virology*, 93(10). <https://doi.org/10.1128/jvi.00338-19>
- 80 Malin, Stoltz. (2011). Hantaviruses - from interferons to development of an in vitro model.
- 81 Matthys, V. S., Cimica, V., Dalrymple, N. A., Glennon, N. B., Bianco, C., & Mackow, E. R. (2014). Hantavirus GnT elements mediate TRAF3 binding and inhibit RIG-I/TBK1-directed beta interferon transcription by blocking IRF3 phosphorylation. *Journal of virology*, 88(4), 2246–2259. <https://doi.org/10.1128/JVI.02647-13>
- 82 Ribeiro, G. E., Duran-Jara, E., Perez, R., Cuiza, A., Leon, L. E., Martínez-Valdebenito, C., Corre, N. L., Ferres, M., Ferreira, L., Rioseco, M. L., Gavilán, J., Arancibia, F., Graf, J., Lopez, R., Perez, J. L., Calvo, M., Mertz, G. J., AVial, P., & Vial, C. (2021). Transcriptomic signature on Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome patients, reveals an increased interferon response as a hallmark of critically ill patients. *medRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2021.07.28.21260540>