
ATUALIZAÇÃO DE CONHECIMENTOS

SOBRE A PATOGÊNESE DA SÍNDROME

PULMONAR E CARDIOVASCULAR

POR HANTAVÍRUS

*Alessandra Abel Borges*¹ e *Luiz Tadeu Moraes Figueiredo*²

RESUMO

A Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavírus (SPCVH) é uma doença grave e com elevada taxa de letalidade. Decorrente da infecção humana por hantavírus, ela vem ocorrendo em número crescente de casos em diversos países das Américas, inclusive no Brasil. A pneumonite intersticial, o edema pulmonar e o choque cardiogênico, que caracterizam a doença, ocorrem, em grande parte, em virtude da ativação da resposta imune, especialmente linfócitos T CD8+ e macrófagos, ambos produtores de citocinas inflamatórias. Embora as células endoteliais, alvos da infecção viral, produzam uma resposta antiviral de interferon, muitas espécies de hantavírus podem inibir ou retardar ativamente tais respostas. Além disso, os hantavírus exercem efeito inibidor sobre receptores celulares responsáveis pela manutenção da integridade vascular. Quadros clínicos de maior gravidade também têm sido associados a elevadas cargas virais. Inversamente, anticorpos neutralizantes parecem exercer um efeito protetor contra as formas graves. Neste artigo são tratados, de forma detalhada, aspectos relevantes da patogênese da SPCVH.

DESCRITORES: Hantavírus. Síndrome Pulmonar e Cardiovascular. Patogênese. Resposta imune. Imunopatologia.

INTRODUÇÃO

A Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus* (SPCVH) é resultante da infecção por espécies de hantavírus encontradas em diversos países das Américas. A doença foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1993, e o vírus causador foi chamado *Sin Nombre* (SNV). No mesmo ano, no

-
- 1 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Curso de Medicina, Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL)
 - 2 Centro de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP)

Endereço para correspondência: Profa. Dra. Alessandra Abel Borges, Universidade do Sul de Santa Catarina, Curso de Medicina. Av. José Acácio Moreira, 787 – Dheon. CEP 88704-901, Tubarão, SC, Brasil. E-mail: alessandra.borges@unisul.br

Recebido para publicação em: 17/10/2007. Aceito em: 3/12/2007.

Brasil, ocorreram os três primeiros casos da doença em Juquitiba (SP) (Iverson et al., 1994) e, desde então, a SPCVH tem sido observada nas cinco regiões do país (40), com mais de 900 casos notificados ao Ministério da Saúde (Marília Lavocat Nunes, Área Técnica de Hantavirose, COVEV/CGDT/DEVEP/SVS/MS, comunicação pessoal). Atualmente, os estados brasileiros com maior incidência da SPCVH são MG, SC, PR, MT e SP. Os genótipos de hantavírus associados à síndrome no Brasil são: Juquitiba, Araraquara (ARAV), Castelo dos Sonhos, Laguna Negra e Anajatuba (Iverson et al., 1994; Johnson et al., 1999; Mendes et al., 2004; Rosa et al., 2005). Nos Estados Unidos, atualmente são conhecidas as seguintes espécies de hantavírus patogênicos: Sin Nombre (SNV), New York-1 (NY-1), Bayou e Black Creeck Canal (Nichol et al., 1993; Morzunov et al., 1995; Ravkov et al., 1995). Na Argentina e no Chile, o vírus Andes (ANDV) é o causador da SPCVH (López et al., 1996; Martinez et al., 2005).

Os vírus de RNA, esféricos e envelopados, do gênero *Hantavirus* são os únicos da família *Bunyaviridae* que não são transmitidos por artrópodos (Nichol, 2001). A infecção humana por hantavírus ocorre, principalmente, pela inalação de aerossóis contendo material infeccioso viral oriundo da urina e de outras excretas de roedores silvestres infectados (Nichol, 2001). Entretanto, pode haver transmissão viral por contato físico direto com os roedores e a transmissão inter-humana tem sido descrita para ANDV na Argentina e no Chile (Padula et al., 1998; Martinez et al., 2005). De modo geral, os indivíduos adultos da área rural apresentam maior risco de infecção (Nichol, 2001).

A DOENÇA

Quando ocorreram os primeiros casos de infecção por hantavírus nos EUA, os proeminentes sintomas respiratórios da doença levaram à denominação Síndrome Pulmonar por Hantavírus. Entretanto, como a infecção produz extravasamento capilar e também depressão miocárdica, a doença passou a ser referida, nos anos recentes, como uma Síndrome Pulmonar e Cardiovascular, a SPCVH (Peters e Khan, 2002; Figueiredo et al., 2003). A SPCVH é caracterizada por pneumonite intersticial e edema pulmonar que pode progredir em 4 a 24 horas para extensa inundação alveolar com grave insuficiência respiratória. A dispnéia leva o paciente a procurar assistência médica, tipicamente, entre o terceiro e o quarto dia de doença e, com o rápido agravamento, freqüentemente requer suporte de UTI (Figueiredo et al., 2000). O óbito por SPCVH no Brasil ocorre em, aproximadamente, 39% dos casos, sobretudo em decorrência de choque cardiogênico (Figueiredo et al., 2003, Saggiaro et al., 2007).

O período de incubação da SPCVH varia de 9 a 33 dias, com uma média de 14 a 17 dias (Jeor, 2004). O período prodromico, com duração de três a cinco dias, caracteriza-se por febre, mialgia e mal-estar. Cefaléia, vertigem, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal podem estar presentes. Nesta fase, as

manifestações clínicas podem ser confundidas com as de outras doenças virais, tornando difícil o seu reconhecimento. Ao final da fase prodrômica, instala-se a síndrome de extravasamento capilar e, como conseqüência, inicia-se um edema pulmonar que produz tosse seca e taquidispnéia (Enria et al., 2001). Uma vez instalado o edema intersticial pulmonar, a doença progride rapidamente, podendo levar ao óbito dentro de 24 horas por insuficiência respiratória e por choque cardiogênico que surge nesta fase (Saggiaro et al., 2007). Os sobreviventes de SPCVH, sem febre e em condições hemodinâmicas normalizadas, passam por uma fase diurética, que elimina os líquidos retidos especialmente no pulmão (Enria et al., 2001). A fase convalescente pode durar dois meses, com recuperação aparentemente completa dos pacientes. Contudo, evidências preliminares sugerem que a disfunção pulmonar e outras anormalidades podem se manifestar precocemente em alguns pacientes (Campos et al., 2007).

Laboratorialmente, a infecção por hantavírus é acompanhada de trombocitopenia e hemoconcentração na maioria dos pacientes (Figueiredo et al., 2000). A contagem de leucócitos pode estar normal ou elevada na admissão, mas, freqüentemente, revela-se mais elevada nos casos fatais (Enria et al., 2001), o que poderia ser usado como critério prognóstico (Campos et al., 2005). No hemograma, durante a fase de edema pulmonar, observam-se neutrófilos jovens e 10% de linfócitos atípicos (Enria et al., 2001).

O exame radiográfico de tórax dos pacientes com SPCVH costuma mostrar comprometimento pulmonar bilateral intersticial, que progride com tendência a confluir e a produzir infiltração alveolar. Concomitante, com o agravamento da insuficiência respiratória, o velamento pulmonar misto torna-se denso e acomete praticamente todos os campos pulmonares. O padrão evolutivo de pneumonia bilateral de tipo intersticial ou misto e que evolui com extensa alveolização, produzindo imagens que lembram SARA, é sugestivo de SPCVH (Figueiredo et al., 2000).

OS ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

O exame anatomopatológico dos pulmões de casos fatais por SPCVH costuma mostrar edema alveolar difuso, membranas hialinas e infiltrado intersticial mononuclear (Zaki et al., 1995; Nolte et al., 1995). O estado preservado em que se encontram as células endoteliais nos pulmões, associado à hemoconcentração e, em alguns casos, à presença de derrames pleurais, sugere que a SPCVH se manifesta com extravasamento de líquidos dos capilares para o interstício e alvéolos. As células endoteliais não são lisadas pelos hantavírus, embora células do sistema imune sejam recrutadas para o endotélio infectado (Zaki et al., 1995; Mori et al., 1999). Nos interstícios pulmonares, nos espaços portais hepáticos, no baço, e no sangue, encontram-se células semelhantes a linfócitos atípicos, denominadas imunoblastos (Zaki et al., 1995; Nolte et al.,

1995). Tem sido descrita a presença de partículas virais e antígenos de hantavírus no interior do endotélio capilar de indivíduos infectados, primariamente nos pulmões, mas também nos endotélios renal, cardíaco e hepático, além de elevada densidade de antígenos virais nos folículos linfóides esplênicos e, em menor densidade, nos linfonodos, pâncreas, músculo esquelético, intestino, glândula adrenal, bexiga, cérebro e em tecido adiposo (Nolte et al., 1995; Zaki et al., 1995; Saggiore et al., 2007). Também foram encontrados antígenos virais no interior de macrófagos localizados nos pulmões, coração, sinusóides hepáticos e medula óssea (Zaki et al., 1995; Saggiore et al., 2007). Além das células endoteliais e macrófagos, as células dendríticas foliculares (FDCs) e as células dendríticas (DCs) derivadas de monócitos, do sangue periférico e da célula progenitora CD34+ também permitem a replicação de hantavírus *in vivo* e *in vitro* (Zaki et al., 1995; Raftery et al., 2002).

Os estudos realizados por Mori et al. (1999), com técnicas de imunistoquímica, demonstraram a presença de células produtoras de citocinas, tanto monócitos/macrófagos quanto linfócitos T ativados, nos tecidos de pulmões, rins, fígado e baço de pacientes que foram a óbito por SPCVH associada à infecção por SNV. A maior concentração dessas células foi encontrada nos pulmões, onde se detectaram as citocinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e TNF- β no interior das paredes alveolares e nos espaços aéreos alveolares.

Embora o edema intra-alveolar de líquido seroso semelhante ao plasma sanguíneo seja um elemento caracterizador da SPCVH, a morte por esta doença está freqüentemente relacionada a complicações cardiovasculares ainda pouco estudadas. Saggiore et al. (2007), analisando o exame necroscópico de 14 corações, observaram discreta dilatação dos ventrículos com flacidez da parede miocárdica. Buscando melhor caracterizar as alterações cardíacas nestes pacientes por técnicas de microscopia, inclusive eletrônica e imunistoquímica, observaram expansão da área média do interstício e redução da área do compartimento muscular, sugerindo que, durante a fase aguda da SPCVH, ocorre expansão do espaço intersticial e um conseqüente distanciamento de fibras miocárdicas em virtude do extravasamento capilar de líquido de edema para o interstício (Saggiore et al., 2007).

Um predomínio de macrófagos produtores de TNF- α foi detectado no interstício miocárdico de casos fatais por SPCVH e também um importante afluxo de células linfomonucleares CD45 RO+ (Saggiore et al., 2007) - um fenótipo de linfócitos T CD8+ ativados (van Lier et al., 2003). Além disso, o número de linfócitos T CD8+ no miocárdio de pacientes com SPCVH mostrou correlação direta com o número de células *Natural Killer* (NK) (Saggiore et al., 2007). Esses achados indicam a ocorrência de miocardite na SPCVH. O quadro de choque que ocorre na SPCVH apresenta um padrão misto de choque hipovolêmico e cardiogênico com elevada resistência vascular periférica e baixo débito cardíaco (diferindo do observado no choque séptico clássico) (Peters e Khan, 2002).

OS ELEMENTOS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA SPCVH

Viremia

Hantavírus são observados no sangue de pacientes com a SPCVH durante a fase aguda da doença (Terajima et al., 1999; Moreli et al., 2004; Xiao et al., 2006). Terajima et al. (1999) estudaram a carga de hantavírus no soro de pacientes com SPCVH, observando que cargas de RNA viral eram mais elevadas nos casos fatais do que nos sobreviventes ($10^{6.7 \pm 1.4}$ versus $10^{5.8 \pm 1.3}$ RNA cópias/ml). Nesse estudo, as mais elevadas cargas virais correlacionavam-se com valores mais elevados de hematócrito e menores números de plaquetas no sangue. Recentemente, Xiao et al. (2006), estudando 27 casos, confirmaram a associação de altas cargas de hantavírus com gravidade da SPCVH. Os autores observaram na SPCVH leve 27.800 cópias/mL do RNA de hantavírus e, na grave, 438.545 cópias/mL (Xiao et al., 2006).

Receptores celulares e interações célula-hantavírus

Os trabalhos de Gavrilovskaya et al., (1998 e 1999) demonstraram que a entrada do hantavírus na célula é mediada por receptores β_3 integrinas presentes na superfície de células endoteliais, plaquetas, macrófagos, células dendríticas e células musculares lisas (Paraskevas, 1999; Raftery et al., 2002). As integrinas são proteínas heterodiméricas formadas por polipeptídeos alfa e beta acoplados por ligações não covalentes - classificadas em famílias de acordo com a cadeia beta que expressam -, que se encontram em diversos estados de ativação, dependendo dos sinais estimuladores do ambiente. Essas proteínas compõem as *tight-junctions* que unem as células endoteliais, fecham a barreira alvéolo-capilar e são centrais para a regulação da função plaquetária e a permeabilidade vascular (Mackow e Gavrilovskaya, 2001). Os hantavírus patogênicos utilizam as integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ (CD41, CD61) e $\alpha_v\beta_3$ (CD51, CD61) como receptores para infectar as células, ao passo que os hantavírus não patogênicos (espécies que não estão relacionadas à doença humana) parecem utilizar $\alpha_5\beta_1$ (Gavrilovskaya, et al., 1998; Gavrilovskaya, et al., 1999; Mackow e Gavrilovskaya, 2001). A integrina $\alpha_v\beta_3$ foi originalmente descrita como receptor celular para a vitronectina (proteína da matriz extracelular). A ligação desse receptor com seus ligantes naturais (vitronectina, Fator von Willebrand, fibrinogênio e trombospondina) ocorre por reconhecimento das seqüências do tripeptídeo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) presentes nestes ligantes (Paraskevas, 1999). Entretanto, os hantavírus causadores de SPCVH associam-se a $\alpha_{IIb}\beta_3$ e $\alpha_v\beta_3$ integrinas de forma independente de RGD, o que é consistente com a ausência de seqüência RGD nas glicoproteínas de superfície G1 e G2 de todos os hantavírus (Gavrilovskaya et al., 1998).

A SPCVH está associada a mudanças na permeabilidade vascular e a trombocitopenia aguda, o que sugere a ocorrência de mudanças funcionais induzidas

por hantavírus no endotélio e nas plaquetas (Nichol, 2001; Zaki et al., 1995; Nolte et al., 1995). Tais mudanças poderiam estar relacionadas ao uso das β_3 integrinas como receptor para entrada celular por hantavírus. A migração de células endoteliais dirigida pela interação das $\alpha_v\beta_3$ integrinas com a vitronectina na matriz extracelular é uma função essencial para o reparo dos vasos e a manutenção da integridade vascular (Palecek et al., 1999). Gavrillovskaya et al. (2002) mostraram que a habilidade das células endoteliais em migrar sobre a vitronectina é seletivamente inibida pela infecção com hantavírus patogênicos, o que não ocorre na infecção por hantavírus não patogênicos, indicando que os primeiros inibem a função da $\alpha_v\beta_3$ integrina. Assim, as interações hantavírus-integrina podem alterar funcionalmente a barreira endotelial e contribuir para a síndrome de extravasamento capilar na SPCVH (Gavrillovskaya et al., 2002).

Anticorpos neutralizantes

A maioria dos pacientes na fase prodrômica da SPCVH já possuem anticorpos das classes IgM e IgG detectáveis contra os antígenos N e G1 dos vírus SNV, ARAV e ANDV (Jenison et al., 1994; Bharadwaj et al., 2000; Moreli et al., 2005; Tischler et al., 2005). Uma forte resposta de anticorpos neutralizantes é, provavelmente, essencial para suprimir a disseminação do hantavírus e, conseqüentemente, evitar a doença fatal (Bharadwaj et al., 2000; Borges et al., 2006). Alguns estudos têm mostrado que casos de SPCVH com elevados títulos de anticorpos neutralizantes contra SNV e ANDV na fase aguda da infecção apresentam um melhor prognóstico (Bharadwaj et al., 2000; Tischler et al., 2005). Uma intensa resposta de anticorpos neutralizantes contra hantavírus pode melhorar a eficácia do *clearance* viral e a recuperação da infecção, independentemente dos epítomos alvos (Tischler et al., 2005). Além de fornecerem proteção durante a infecção aguda, os anticorpos neutralizantes também protegem contra a reinfeção por hantavírus. Uma evidência de que a infecção por hantavírus induz uma resposta humoral estável foi a presença de anticorpos neutralizantes com títulos entre 1:100 a 1:3.200 no soro de indivíduos convalescentes de SPCVH até quatro anos após a doença (Ye et al., 2004).

Resposta antiviral

Os interferons (IFNs) são citocinas com potentes atividades antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora (Lohoff e Mak, 2005). Os IFNs são importantes reguladores da resposta imune inata, sendo a primeira linha de defesa contra infecções virais, além de atuarem na maturação da resposta imune adquirida (Lohoff e Mak, 2005). Existem duas classes principais de IFNs: tipo I (IFN- α e IFN- β) e tipo II (IFN- γ). O IFN do tipo I medeia a resposta antiviral e parece ser importante na SPCVH. Observou-se uma resposta induzida por IFN do tipo I

após infecção *in vitro* de células endoteliais microvasculares pulmonares humanas (HMVEC-Ls) com SNV e Hantaan (HTNV, uma espécie de hantavírus patogênico asiático). Disso resultou a translocação de fatores nucleares de transcrição como fator nuclear- κ B (NF κ B), fator 1 regulador de interferon (IRF-1), IRF-3 e IRF-7, tanto nas células infectadas quanto nas células vizinhas (Sundstrom et al., 2001). A família do NF- κ B tem um papel-chave no controle das respostas imunes inatas e adquiridas. Após ativação, as proteínas NF- κ B translocam para o núcleo, ligando-se a sítios cognatos do DNA que regulam a transcrição de grande número de genes, entre eles o do IFN do tipo I. Tanto IRF-3 quanto IRF-7 estão envolvidos na ativação da transcrição dos genes de IFN α/β e são bem conhecidos por serem mediadores intracelulares de efeitos dos IFNs (Lohoff e Mak, 2005).

Após serem ativados os fatores de transcrição pela infecção viral, os efeitos antivirais dos IFNs do tipo I são mediados por, pelo menos, três sistemas de proteínas distintos: 2',5'-oligoadenilato sintetase (que tem atividade de RNAase), proteína quinase ativada por RNA de dupla fita (PKR), e proteína Mx. A proteína Mx humana é caracterizada como citoplasmática de 76-kDa, com atividade antiviral de GTPase que inibe inúmeros vírus de RNA(-), inclusive hantavírus (Kanerva et al., 1996). Experimentos *in vitro* mostraram que ANDV estimula a expressão da proteína MxA-induzida por IFN- β em células endoteliais e que a proteína MxA é co-localizada com a proteína N do ANDV em células infectadas, sugerindo uma interação da MxA com a proteína do nucleocapsídeo, o que inibe a produção de novas partículas virais (Khaiboullina et al, 2005). Em outro estudo, observou-se que a replicação do hantavírus não patogênico Prospect Hill (PHV) foi bloqueada em células endoteliais humanas, assim como foram inibidas a expressão do RNA e a síntese protéica viral dois a quatro dias após a infecção (Alff et al., 2006). Entretanto, a mesma ação não ocorreu em experimentos similares com os hantavírus patogênicos NY-1 e HTNV (Alff et al., 2006). Observou-se ainda nesse estudo que os hantavírus patogênicos regulam as respostas de IFN à jusante da fosforilação do IRF-3, na cascata de ativação celular induzida pela infecção viral, utilizando elementos contidos na cauda citoplasmática da glicoproteína viral G1. Esses elementos seriam um fator de virulência próprio dos hantavírus patogênicos, ausente nas cepas não patogênicas (Alff et al., 2006).

Estudos comparativos entre a resposta antiviral de hantavírus patogênicos e não patogênicos têm demonstrado que um retardo na indução da resposta mediada por IFN- β , em células endoteliais infectadas com hantavírus patogênicos, fornece mais tempo para uma replicação viral eficiente (Kraus et al., 2004; Spiropoulou et al., 2007). A expressão *in vitro* da proteína MxA não foi induzida em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) até 24 horas após a infecção com HTNV. Em contraste, HUVECs infectadas com Tula vírus, um hantavírus não patogênico, produziram a proteína MxA 16 horas após a infecção (Kraus et al., 2004). Outro hantavírus não patogênico, o PHV, induziu uma resposta robusta de IFN- β em células endoteliais pulmonares humanas primárias, precocemente

após a infecção, ao passo que o mesmo efeito não foi observado com o hantavírus patogênico ANDV (Spiropoulou et al., 2007). No mesmo estudo, o nível de indução do IFN se correlacionou com a ativação de IRF-3, e a translocação nuclear do IRF-3 foi detectada na infecção por PHV, mas não naquela por ANDV. Desse modo, a indução precoce da resposta antiviral parece ser de fundamental importância prognóstica na infecção por hantavírus. Os hantavírus patogênicos para o homem parecem ter evoluído de modo que evitem, ou ao menos retardem, as respostas protetoras mediadas pelo IFN.

Quimiocinas e citocinas

A infecção do endotélio pulmonar e cardíaco por hantavírus provavelmente resulta na liberação de quimiocinas atraentes de mononucleares, como sugerem a pneumonite e a miocardite observadas na SPCVH (Zaki et al., 1995; Saggiaro et al., 2007). Níveis detectáveis das quimiocinas RANTES (*regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*) e IP-10 (*interferon- γ inducible protein 10 kDa*) foram observados nas células HMVEC-Ls até 72 horas após infecção com SNV, os quais foram associados com translocação nuclear de IRF-3 e IRF-7 (Sundstrom et al., 2001). A ativação seletiva das quimiocinas RANTES e IP-10 produz um mecanismo pelo qual a infecção por hantavírus pode direcionar a resposta imune efetora contra o endotélio microvascular infectado. Tanto RANTES quanto IP-10 são, predominantemente, quimiotáticas para monócitos/macrófagos e linfócitos. IP-10 pode promover a migração de subpopulações de linfócitos T ativados (CD4-, CD8+, CD29+) e, em elevadas concentrações, RANTES induz ativação de células T de forma similar à dos mitógenos (Appay et al., 2000). A produção local de citocinas por linfócitos T e monócitos ativados nos pulmões e coração é importante na patogênese da SPCVH (Mori et al., 1999). Sabe-se que o TNF- α desempenha proeminente papel como causador do extravasamento capilar (Kelley, 1990). Essa citocina pode induzir o rearranjo dos filamentos de actina em células endoteliais, causando dano celular e perda das *tight junctions*, o que leva ao extravasamento capilar (Stephens et al., 1988). Também o TNF- α produz efeito inotrópico negativo no miocárdio e hipotensão (Meldrum, 1998), por isso é considerado como um dos principais mediadores solúveis envolvidos no choque cardiogênico que ocorre na SPCVH (Zaki et al., 1995; Nolte et al., 1995; Peters e Khan, 2002). Neste contexto, Saggiaro et al. (2007), estudando as alterações cardíacas de 14 pacientes falecidos por SPCVH, descreveram miocardite onde predominavam macrófagos produtores de TNF- α no interstício miocárdico destes indivíduos (Zaki et al., 1995; Nolte et al., 1995; Mori et al., 1999; Saggiaro, 2007). Além disso, o TNF- α é potente indutor de óxido nítrico sintase (iNOS), enzima catalizadora do óxido nítrico (NO), o qual, por sua vez, produz lesão celular e disfunção contrátil do coração, deprimindo a função miocárdica (Meldrum, 1998). Davis et al. (2002) observaram NO em teores elevados nos pulmões de pacientes com SPCVH; portanto é possível que o dano

cardíaco mediado por NO seja um fator causal de mortalidade nesta doença. Células produtoras de iNOS foram encontradas no miocárdio de casos fatais de SPCVH no estudo realizado por Saggioro et al. (2007).

Além do TNF- α , outras citocinas encontradas nos linfócitos presentes em pulmões de pacientes com SPCVH são a IL-2 e o IFN- γ . A IL-2 promove aumento da permeabilidade vascular *in vivo* (Thijs et al., 1990). O IFN- γ produzido por linfócitos T ativados é conhecido por potencializar a produção de TNF- α e exacerbar o choque (Nedwin et al., 1985).

Linfócitos T CD8+ ativados

As análises de citometria de fluxo de sangue periférico dos pacientes com SPCVH e de efusões pleurais mostram células grandes semelhantes a imunoblastos, que são predominantemente CD8+ (Nolte et al., 1995; Ennis et al., 1997; Kilpatrick et al., 2004). Foi evidenciada a ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ específicos para o hantavírus SNV, pela utilização de tetrâmeros de HLA carregados com epítopos do SNV encontrados no sangue periférico obtido de pacientes na fase aguda precoce da SPCVH (Ennis et al., 1997). Outro estudo mostrou que a maioria das células T CD8+, específicas para o vírus, é CD38+, indicando um fenótipo ativado (Kilpatrick et al., 2004). Nesse estudo, ficou demonstrado que concentrações mais elevadas de células T CD8+ SNV-específicas estão presentes na SPCVH, em comparação com outras infecções virais tais como: vírus da hepatite B, vírus da imunodeficiência humana, vírus da hepatite C, dengue virus e vaccinia virus. A frequência de células T CD8+ vírus-específicas na SPCVH é comparável somente àquela relatada para mononucleose infecciosa por Epstein-Barr virus (Kilpatrick et al., 2004). Além disso, a magnitude da resposta de célula T vírus-específica demonstrou ser significativamente maior em pacientes com SPCVH grave (frequência > 44,2% de célula T CD8+) do que naqueles com a doença moderada (> 9,8% de célula T CD8+). Tais resultados sugerem que células T CD8+ vírus-específicas contribuem para o prognóstico da doença (Kilpatrick et al., 2004). Um excesso de TNF- α e IFN- γ , produzido pelas células T ativadas específicas para hantavírus, é provavelmente crítico na patogênese da SPCVH e na falência respiratória conseqüente ao extravasamento capilar em leito vascular pulmonar. Portanto, a gravidade da doença pode ser conseqüência de uma intensa resposta de células T CD8+ nos pulmões (Kilpatrick et al., 2004; Borges et al., 2006).

Células T reguladoras

Como as citocinas exercem efeitos estimuladores e inibidores sobre as células imunes, a resposta imune global pode ser avaliada pelas concentrações das diferentes citocinas no local da ativação imune. Sabe-se que as células T reguladoras, produtoras de citocinas supressoras, têm papel crucial na supressão de

respostas imunes e no controle da infecção, prevenindo a agressão imune e a autoimunidade (Mills, 2004). É muito provável que essas células reguladoras estejam presentes nos tecidos e no sangue dos pacientes com SPCVH, o que necessita ser investigado. A presença de células produtoras de IL-4 (citocina supressora produzida por alguns tipos de células T reguladoras) nos pulmões, rins, fígado e baço de casos fatais de SPCVH (Mori et al, 1999) pode ser uma evidência da presença dessas células. Finalmente, é possível que indivíduos com maior atividade de células T reguladoras durante a SPCVH possam desenvolver formas mais brandas da doença. Um estudo recente realizado com roedores (reservatório de hantavírus) pode dar suporte a esta hipótese. Sabe-se que a infecção desses animais por hantavírus se dá de forma persistente e parece ocorrer com ausência de doença (Lee et al., 1981). Há muito se tem questionado e investigado, sem sucesso, o(s) fator(es) envolvido(s) na persistência da infecção e na ausência de doença nos roedores-reservatório. Shountz et al. (2007) demonstraram que as células T de animais persistentemente infectados são, em sua maior parte, T reguladoras. Essa observação sugere a possibilidade de que elas desempenhem importante papel limitador da extensão e da gravidade da imunopatologia nos roedores-reservatório. A presença predominante dessas células também explicaria a infecção persistente nesses animais, uma vez que linfócitos efetores, capazes de eliminar vírus e causar doença grave, estariam sob o controle das células T reguladoras.

CONCLUSÃO

A patogênese da SPCVH vem sendo paulatinamente desvendada, embora ainda permaneça não explicada em grande parte. Mesmo sendo uma doença conhecida há menos de duas décadas, desde as primeiras necropsias em casos fatais da SPCVH, supôs-se que a resposta imune estaria envolvida e desempenhando importante papel na patogênese. Tal suposição foi sendo testada em diversos aspectos, e, de fato, hoje se sabe que o recrutamento de células imunes, especialmente dos linfócitos T CD8+ ativados, para os órgãos alvo da infecção (pulmão e coração) é um importante determinante do extravasamento capilar pulmonar e da depressão miocárdica que caracterizam a síndrome. Esses efeitos devem-se muito mais às citocinas produzidas localmente do que à atividade citotóxica sobre o endotélio infectado. Essas citocinas seriam produzidas não só por linfócitos, mas também por macrófagos teciduais e atuariam aumentando a permeabilidade dos vasos e deprimindo a função miocárdica. Contudo, seria de se esperar, e de fato ocorre, uma resposta imune benéfica ao indivíduo com SPCVH. Trata-se da resposta antiviral, induzida pela secreção de IFNs no endotélio infectado. Vários trabalhos mostraram a ação inibidora destas citocinas, ou de seus produtos induzidos, sobre a replicação viral. Entretanto, os hantavírus patogênicos evoluíram expressando moléculas que inibem ou retardam a liberação dos IFNs e, portanto, atuam como fator de virulência que influi na patogênese da SPCVH. Além disso, há que se considerar o efeito patogênico direto da infecção

por hantavírus sobre as células endoteliais, por meio da interação com receptores β_3 integrinas. Essa interação parece inibir a função fisiológica desses elementos reguladores da permeabilidade vascular e da ativação plaquetária.

Dois fatores que podem determinar a gravidade da doença e que atuam em campos opostos são a carga viral e os anticorpos neutralizantes. Altas cargas virais induzem doença de maior gravidade, ao passo que títulos mais elevados de anticorpos neutralizantes abrandam os sintomas e a letalidade da SPCVH. Finalmente, um campo de estudo pouco explorado, porém promissor, é o da participação das células T reguladoras na SPCVH, provavelmente com efeito protetor.

Por conseguinte, pode-se afirmar que a patogênese da SPCVH é complexa, multifatorial e envolve elementos relativos ao hospedeiro e ao vírus. Embora ainda não se disponha de um tratamento antiviral específico para os pacientes com SPCVH, os conhecimentos atuais sobre os mecanismos múltiplos pelos quais os hantavírus levam à doença podem ser úteis no desenvolvimento de novas terapias para a síndrome e, assim, reduzir a dramática letalidade da SPCVH.

ABSTRACT

Updating knowledge about Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome pathogenesis

Hantaviruses are emerging viruses in the Americas that cause Cardiopulmonary Syndrome (HCPS) with high lethality. HCPS is a complex syndrome resulting from multiple pathogenic factors. These factors include viral load, viral interactions with $\alpha_v\beta_3$ integrins on endothelial cells inhibiting endothelial cell barrier functions, and burden of immune activation, especially of macrophages and CD8+ T cells. The humoral immune response with neutralizing antibodies seems to be essential for recovery from infection. This review discusses each current related-factor of HCPS pathogenesis.

KEY WORDS: Hantavirus. Cardiopulmonary Syndrome. Pathogenesis. Immune-response. Immunopathology.

REFERÊNCIAS

1. Alff PJ, Gavrilovskaya IN, Gorbunova E, Endriss K, Chong Y, Geimonen E, Sen N, Reich NC, Mackow ER. The pathogenic NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail inhibits RIG-I- and TBK1-directed interferon responses. *J Virol* 80:9676-9686, 2006.
2. Appay V, Dunbar PR, Cerundolo V, McMichael A, Czaplewski L, Rowland-Jones S. RANTES activates antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in a mitogen-like manner through cell surface aggregation. *Int Immunol* 12: 1173-1182, 2000.
3. Bharadwaj M, Nofchissey R, Goade D, Koster F, Hjelle B. Humoral immune responses in the Hantavirus cardiopulmonary syndrome. *J Infect Dis* 182:43-8, 2000.
4. Borges AA, Campos GM, Moreli ML, Souza RLM, Aquino VH, Saggiore FP, Figueiredo LTM. Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome: immune response and pathogenesis. *Microbes and Infection* 8:2324-2330, 2006.

5. Campos GM, Borges AA, Moreli ML, Souza RLM, Badra SJ, Figueiredo LTM. Prognosis of hantavirus cardiopulmonary syndrome based on analysis of white blood cells. [abstract]. *Virus Rev Res 10(suppl 1)*:151, 2005.
6. Campos GM, Borges AA, Terra J, Maciel B, Bellucci A, Paula J, Figueiredo LTM. Clinical evaluation of surviving patients of Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome (HCPS). [abstract]. Abstract book of VII International Conference on HFRS, HPS and Hantaviruses. Buenos Aires: 49-49, 2007.
7. Davis IC, Zajac AJ, Nolte KB, Botten J, Hjelle B, Matalon S. Elevated generation of reactive oxygen/nitrogen species in hantavirus cardiopulmonary syndrome. *J Virol 76*: 8347-8359, 2002.
8. Ennis FA, Cruz J, Spiropoulou CF, Waite D, Peters CJ, Nichol ST, Kariwa H, Koster T. Hantavirus pulmonary syndrome: C8+ and CD4+ cytotoxic T Lymphocytes to epitopes on Sin Nombre virus nucleocapsid protein isolated during acute illness. *Virology 238*: 380-390, 1997.
9. Enria DA, Briggiler AM, Pini N, Levis S. Clinical Manifestations of New World Hantaviruses. In: Schmaljohn CS and Nichol ST. (eds). *Hantaviruses*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany, 2001.
10. Figueiredo LT, Moreli ML, Campos GM, Sousa RL. Hantaviruses in São Paulo State, Brazil. *Emerg Infect Dis 9*:891-892, 2003.
11. Figueiredo LTM, Forster AC, Fulhorst C, Rodrigues EMS, Koster F, Campos GM, Katz G, Felipe JS, Pereira LE, Iversson LB, Simão M, Padula P, Felix P, Vasconcelos P, Bradley R, Shope R, Oliveira RC, Hinrichsen SL. Contribuição ao conhecimento sobre a hantavirose no Brasil. *Informe Epidemiológico do SUS 9*: 167-178, 2000.
12. Gavrilovskaya IN, Shepley M, Shaw R, Ginsberg MH, Mackow ER. β_3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc Natl Acad Sci 95*: 7074-7079, 1998.
13. Gavrilovskaya IN, Brown E, Ginsberg MH, Mackow ER. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by β_3 integrins. *J Virol 73*: 3951-3959, 1999.
14. Gavrilovskaya IN, Peresleni T, Geimonen E, Mackow ER. Pathogenic hantaviruses selectively inhibit β_3 integrin directed endothelial cell migration. *Arch Virol 147*:1913-1931, 2002.
15. Iversson LB, Travassos da Rosa APA, Rosa MDB. Infecção humana por hantavírus nas regiões sul e sudeste do Brasil. *Rev Assoc Méd Bras 40*:85-92, 1994.
16. Jenison S, Yamada T, Morris C, Anderson B, Torrez-Martinez N, Keller N, Hjelle B. Characterization of human antibody responses to Four Corners hantavirus infections among patients with hantavirus pulmonary syndrome. *J Virol 68*: 3000-6, 1994.
17. Jeor SC. Three-week incubation period for hantavirus infection. *Pediatr Infect Dis J 23*: 974-975, 2004.
18. Johnson AM, Souza LTM, Ferreira IB, Pereira LE, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ, Nichol ST. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *J Med Virol 59*: 527-535, 1999.
19. Kanerva MK, Melen K, Vaheri A, Julkunen I. Inhibition of puumala and tula hantaviruses in Vero cells by MxA protein. *Virology 224*: 55-62, 1996.
20. Kelley J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis 141*:765-788, 1990.
21. Khaiboullina SF, Rizvanov AA, Deyde VM, St. Jeor SC. Andes virus stimulates interferon-inducible MxA protein expression in endothelial cells. *J Med Virol 75*: 267-275, 2005.
22. Kilpatrick ED, Terajima M, Koster FT, Catalina MD, Cruz J, Ennis FA. Role of specific CD8+ T cells in the severity of a fulminant zoonotic viral hemorrhagic fever, Hantavirus Pulmonary Syndrome. *J Immunol 172*: 3297-3304, 2004.
23. Kraus AA, Raftery MJ, Giese T, Ulrich R, Zawatzky R, Hippenstiel S, Suttorp N, Krüger DH, Schönrich G. Differential antiviral response of endothelial cells after infection with pathogenic and nonpathogenic Hantaviruses. *J Virol 78*: 6143-6150, 2004.
24. Lee HW, French GR, Lee PW, Baek LJ, Tsuchiya K, Foulke RS. Observations on natural and laboratory infection of rodents with the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg 30*: 477-482, 1981.

25. Lohoff M, Mak TW. Roles of Interferon Regulatory Factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 5: 125-135, 2005.
26. López N, Padula P, Rossi C, Lázaro ME, Franze-Fernández MT. Genetic identification of a new hantavirus causing severe pulmonary syndrome in Argentina. *Virology* 220: 223-226, 1996.
27. Mackow ER, Gavrilovskaya IN. Cellular receptors and Hantavirus Pathogenesis. *Curr Trop Microbiol Immunol* 256:91-115, 2001.
28. Martínez VP, Bellomo C, San Juan J, Pinna D, Forlenza R, Elder M, Padula PJ. Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerg Infect Dis* 11:1848-1853, 2005.
29. Meldrum DR.. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* 274: R577-R595, 1998.
30. Mendes WS, Da Silva AA, Aragao LF, Aragao NJ, Raposo M L, Elkhoury MR, Suzuky A, Ferreira IB, De Sousa LT, Pannuti CS. Hantavirus infection in Anajatuba, Maranhao, Brazil. *Emerg Infect Dis* 10:1496-8, 2004.
31. Mills KHG. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4:841-855, 2004.
32. Moreli ML, Sousa RLM, Figueiredo LTM. Detection of Brazilian Hantavirus by reverse transcription polymerase chain reaction amplification of N gene in patients with Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:633-638, 2004.
33. Moreli ML, Souza RLM, Borges AA, Campos GM, Figueiredo LTM. Padronização de um ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos da classe IgM contra Hantavirus utilizando a proteína N recombinante do vírus Araraquara. In: XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38: 482:482, 2005.
34. Mori M, Rothman AL, Kurane I, Montoya JM, Nolte KB, Norman JE, Waite DC, Koster FT, Ennis FA. High levels of cytokine-producing cells in the lung tissues of patients with fatal hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis* 179: 295-302, 1999.
35. Morzunov SP, Feldmann H, Spiropoulou CF, Semenova VA, Rollin PE, Ksiazek TG, Peters CJ, Nichol ST. A newly recognized virus associated with a fatal case of hantavirus pulmonary syndrome in Louisiana. *J Virol* 69:1980-1983, 1995.
36. Nedwin GE, Svedersky LP, Bringman TS, Palladino MA Jr, Goeddel DV. Effect of interleukin 2, interferon- γ , and mitogens on the production of tumor necrosis factors α and β . *J Immunol* 135:2492-2497, 1985.
37. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262: 914-917, 1993.
38. Nichol ST. Bunyaviruses. In: Knipe DM, Howley PM. (eds). *Fields Virology*. vol.2, fourth edition, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2001.
39. Nolte KB, Feddersen RM, Foucar K, Zaki SR, Koster FT, Madar D, Merlin TL, McFeeley PJ, Umland ET, Zumwalt RE. Hantavirus Pulmonary Syndrome in the United States: A pathological description of a disease caused by a new agent. *Human Pathol* 26: 110-120, 1995.
40. Organización Panamericana de la Salud. Informe OPS/CD/A/427/06. IV Reunión conjunta de las redes subregionales de vigilancia de enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes. *Rev Patol Trop* 36 (supl. 1): 71-73, 2007.
41. Padula PJ, Edelstein A, Miguel SDL, López NM, Rossi CM, Rabinovich RD. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: Molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* 241: 323-330, 1998.
42. Palecek SP, Horwitz AF, Lauffenburger DA. Kinetic model for integrin-mediated adhesion release during cell migration. *Ann Biomed Eng* 27: 219-235, 1999.
43. Paraskevas F. Clusters of Differentiation. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. (editors). *Wintrobe's Clinical Hematology*: vol 1, 10th edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 1999.
44. Peters CJ, Khan AS. Hantavirus Pulmonary Syndrome: The New American Hemorrhagic Fever. *Clin Infect Dis* 34:1224-1231, 2002.

45. Raftery MJ, Kraus AA, Ulrich R, Krüger DH, Shönrich G. Hantavirus Infection of Dendritic Cells. *J Virol* 76:10724-10733, 2002.
46. Ravkov EV, Rollin PE, Ksiazek TG, Peters CJ, Nichol ST. Genetic and serologic analysis of Black Creek Canal virus and its association with human disease and *Sigmodon hispidus* infection. *Virology* 210:482-489, 1995.
47. Rosa ES, Mills JN, Padula PJ, Elkhouri MR, Ksiazek TG, Mendes WS, Santos ED, Araujo GC, Martinez VP, Rosa JF, Edelstein A, Vasconcelos PF. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5: 11-19, 2005.
48. Saggiaro FP, Rossi AM, Duarte MIS, Martin CCS, Alves VAF, Moreli ML, Figueiredo LTM, Moreira JE, Borges AA, Neder L. Hantavirus infection induces a typical myocarditis that may be responsible for myocardial depression and shock in Hantavirus Pulmonary Syndrome. *J Infect Dis* 195:1541-1549, 2007.
49. Shountz T, Prescott J, Cogswell AC, Oko L, Mirowsky-Garcia K, Galvez AP, Hjelle B. Regulatory T cell-like responses in deer mice persistently infected with Sin Nombre virus. *Proc Natl Acad Sci* 104:15496-15501, 2007.
50. Spiropoulou CF, Albarrío CG, Ksiazek G, Rollin PE. Andes and Prospect Hill hantaviruses differ in early induction of interferon although both can downregulate interferon signaling. *J Virol* 81:2769-2776, 2007.
51. Stephens KE, Ishizaka A, Larrick JW, Raffin TA. Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. Comparison to septic acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 137:1364-1370, 1988.
52. Sundstrom JB, McMullan LK, Spiropoulou CF, Hooper WC, Ansari AA, Peters CJ, Rollin PE. Hantavirus infection induces the expression of RANTES and IP-10 without causing increased permeability in human lung microvascular endothelial cells. *J Virol* 75: 6070-6085, 2001.
53. Terajima M, Hendershot I, Kariwa H, Koster FT, Hjelle B, Goade D, Defronzo MC, Ennis FA. High levels of viremia in patients with the hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis* 180: 2030-2034, 1999.
54. Thijs LG, Hack CE, van Schijndel RJM. Activation of the complement system during immunotherapy with recombinant IL-2. Relation to the development of side effects. *J Immunol* 144: 2419-2424, 1990.
55. Tischler ND, Galenoc H, Roseblatta M, Valenzuela PDT. Human and rodent humoral immune responses to Andes virus structural proteins. *Virology* 334: 319- 326, 2005.
56. van Lier RAW, Berge IJM, Gamadia LE. Human CD8+ T-Cell differentiation in response to viruses. *Nature Reviews Immunology* 3: 1-8, 2003.
57. Xiao R, Yang S, Koster F, Ye C, Stidley C, Hjelle B. Sin Nombre viral RNA load in patients with Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. *J Infect Dis* 194: 1403-1409, 2006.
58. Ye C, Prescott J, Nofchissey R, Goade D, Hjelle B. Neutralizing antibodies and Sin Nombre virus RNA after recovery from Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. *Emerg Infect Dis* 10:478-481, 2004.
59. Zaki SR, Greer PW, Coffield LM, Goldsmith CS, Nolte KB, Foucar K, Feddersen RM, Zumwalt RE, Miller GL, Khan AS, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST, Mahy BWJ, Peters CJ. Hantavirus pulmonary syndrome: Pathogenesis of a new emerging infectious disease. *Am J Pathol* 146:552-579, 1995.