

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

**Papel da citocina MIF em modelos de respostas
inflamatórias sistêmicas**

Flávio Almeida Amaral

Belo Horizonte
2006

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Papel da citocina MIF em modelos de respostas inflamatórias sistêmicas

Flávio Almeida Amaral

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação Fisiologia e Farmacologia
do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito para a obtenção do grau
de mestre em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Danielle da
Glória de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Martins
Teixeira

Belo Horizonte

Julho 2006

Aos meus pais, Antônio e Maria José, pelo fundamental apoio na minha vida. São responsáveis por tudo que sou hoje. Muito obrigado.

Aos meus irmãos, Déa, Sérgio e Adriana por me incentivarem e acreditarem em mim em todos os momentos e à minha sobrinha Alice.

A Bruninha por sempre estar ao meu lado em todos os momentos.

A Deus, por me guiar nas difíceis decisões tomadas durante o curso.

AGRADECIMENTOS

AGRADEÇO

Ao Professor Mauro Martins Teixeira pela oportunidade de trabalho, onde me forneceu as ferramentas necessárias para a realização desse projeto, além de sabedoria e incentivo.

A Professora Danielle da Glória de Souza por ter me aceitado como aluno de iniciação científica e agora como aluno de mestrado, sempre me orientando de modo competente. Obrigado por sua amizade.

A Professora Maria Salete de Abreu Castro, por contribuir com seus conhecimentos tanto no lado científico quanto no pessoal. Apresentou-me pessoas fundamentais na minha vida acadêmica.

Ao amigo Caio pelo companheirismo e fundamental participação neste trabalho, seja na parte experimental ou nas discussões dos resultados.

A Landa e Carla, pelo apoio nos experimentos de Dengue.

Aos demais colegas do laboratório de Imunofarmacologia: Adriana, Adriano, Aline, Amanda, Angélica, Antônio, Carol, Cristiana, Dani Sachs, Daniel, David, Eduardo, Ester, Fernanda, Flávio Lopes, Ildeu, Juliana, Kátia, Márcia, Marina, Michele, Pedro, Rafael, Remo, Rodrigo, Tiça, Vanessa Pinho, Vanessa Mendonça, Vinícius, Vivian.

Aos meus amigos de graduação, sempre presentes nos corredores do ICB e também nos momentos de lazer.

A Milena Soares, do Instituto Gonçalo Muniz – Fiocruz/BA, pelo fornecimento dos animais deficientes em MIF utilizados nesse trabalho.

A Ilma, Valinéria e Dora pelo apoio técnico.

Aos técnicos do CEBIO, em especial ao Gilmar e Elmo.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E
SÍMBOLOS**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP: Trifosfato de adenosina

COX: Ciclooxigenase

DEN 2: Dengue sorotipo 2

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

g: grama

°C: graus Celsius

ICAM: Moléculas de adesão intercelulares

IFN- γ : Interferon- γ

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravascular

I/R: Isquemia e reperfusão intestinal

KC: Keratinocyte-derived chemokine

KI: Iodeto de potássio

LTB₄: Leucotrieno B₄

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógenos

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1

MIF: Fator inibitório da migração de macrófagos

MIF^{-/-}: Animais deficientes em MIF

MIP-2: Macrophage inflammatory protein-2

MKP-1: MAP *kinase phosphatase*-1

MMP-2: Metaloproteinase-2

µg: micrograma

µm: micrômetro

MPO: Mieloperoxidase

mg: miligrama

NaCl: Cloreto de sódio

NF-κB: Fator nuclear - kappa B

NI: Animais não infectados

NK: célula *Natural Killer*

nm: nanômetro

NO: Oxido Nítrico

IL: Inteleucina

OD: Densidade óptica

PAF: fator de agregação plaquetária

PBS: Phosphate Buffered Saline

PFU: Unidades formadoras de placas

RANTES: Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted

RNA: Acido ribonucléico

SFB: Soro fetal bovino

Th: Linfócito T auxiliar

TNF-α: Fator de necrose tumoral- α

TNFR: Receptor do fator de necrose tumoral

VCAM: Moléculas de adesão de células vasculares

WHO: Organização mundial de saúde

WT: animais do tipo selvagem

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado mostrando o processo de desencadeamento da resposta inflamatória mediante isquemia e reperfusão.....	32
Figura 2 – Ciclo de vida do vírus da Dengue.....	34
Figura 3 – Concentração de MIF no soro de animais selvagens.....	53
Figura 4 – Comparação de parâmetros inflamatórios após isquemia e reperfusão intestinal (I/R) entre animais selvagens (WT) e deficientes em MIF (MIF ^{-/-}).....	55
Figura 5 – Concentração de TNF- α tecidual e no soro após isquemia e reperfusão intestinal.....	57
Figura 6 – Avaliação do infiltrado neutrofílico no intestino e pulmão após isquemia e reperfusão intestinal.....	59
Figura 7 – Análise histológica no intestino entre os animais selvagens e deficientes em MIF após isquemia e reperfusão intestinal.....	61
Figura 8 – Análise histológica no pulmão entre os animais selvagens e deficientes em MIF após isquemia e reperfusão intestinal.....	62
Figura 9 – Curva de letalidade entre os animais selvagens (WT) e deficientes em MIF (MIF ^{-/-}) após isquemia e reperfusão intestinal.....	64
Figura 10 – Concentração da citocina MIF no soro de animais infectados com o vírus da Dengue.....	66
Figura 11 - Análise da concentração de citocinas em diferentes órgãos após infecção pelo vírus da Dengue.....	69
Figura 12 Análise da concentração das quimiocinas MCP-1 e de RANTES no baço e fígado, respectivamente, após a infecção pelo vírus da Dengue.....	70

Figura 13 – Avaliação do infiltrado neutrofílico e da concentração das quimiocinas MIP-2 e KC no pulmão após infecção pelo vírus da Dengue.....	72
Figura 14 – Determinação do valor de hematócrito e da concentração de plaquetas circulantes após infecção pelo vírus da Dengue.....	74
Figura 15 – Quantificação de unidades formadoras de placas (PFU) presente no sangue e no baço dos animais infectados com o vírus da Dengue.....	76
Figura 16 – Curva de letalidade dos animais após infecção pelo vírus da Dengue.....	78

ÍNDICE

ÍNDICE

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 JUSTIFICATIVA.....	39
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
3.2.1 Analisar a participação da citocina MIF no modelo de inflamação induzido por isquemia e reperfusão intestinal através dos seguintes estudos.....	41
3.2.2 Demonstrar a importância da citocina MIF no modelo de infecção pelo vírus da dengue mediante os seguintes testes.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 Isquemia e reperfusão intestinal.....	44
4.1.1 Animais.....	44
4.1.2 Protocolo experimental.....	44
4.1.3 Avaliação da permeabilidade vascular.....	44
4.1.4 Quantificação de MPO.....	45
4.1.5 Quantificação de citocinas.....	46
4.1.6 Quantificação de hemoglobina.....	46

4.1.7 Histologia.....	47
4.1.8 Análise estatística.....	47
4.2 Infecção pelo vírus da Dengue.....	48
4.2.1 Vírus.....	48
4.2.2 Titulação do vírus da Dengue.....	48
4.2.3 Animais.....	49
4.2.4 Quantificação de citocinas.....	49
4.2.5 Quantificação dos níveis de plaquetas circulantes.....	49
4.2.6 Análise do índice de hematócrito.....	49
4.2.7 Análise estatística.....	50
5 RESULTADOS.....	52
5.1 Participação da citocina MIF no modelo de isquemia e reperfusão intestinal.....	52
5.1.1 Os níveis da citocina MIF encontram-se aumentados após isquemia e reperfusão intestinal.....	52
5.1.2 Animais deficientes em MIF apresentam menor resposta inflamatória após isquemia e reperfusão intestinal.....	54
5.1.3 Animais deficientes em MIF apresentam diminuição da concentração de TNF- α no intestino, pulmão e soro quando submetidos à isquemia e reperfusão intestinal.....	56
5.1.4 Apesar da diminuição dos parâmetros inflamatórios após isquemia e reperfusão intestinal, a ausência de MIF não interfere no influxo de neutrófilos.....	58
5.1.5 Os cortes histológicos retratam os ensaios biológicos: menor lesão em animais deficientes em MIF, porém com grande infiltrado celular.....	60
5.1.6 A diminuição na taxa de letalidade espelha à menor da inflamação dos animais deficientes em MIF.....	63
5.2 Importância da citocina MIF no modelo de infecção pelo vírus da Dengue.....	65

5.2.1 A infecção pelo vírus da Dengue leva a um aumento da liberação da citocina MIF circulante.....	65
5.2.2 Animais deficientes em MIF respondem com menor produção de citocinas e quimiocinas após infecção.....	67
5.2.3 Animais deficientes em MIF apresentam menor recrutamento celular no pulmão após infecção pelo vírus da Dengue.....	71
5.2.4 Animais deficientes em MIF mantêm valores basais de hematócrito e de plaquetas.....	73
5.2.5 Animais deficientes em MIF apresentam menor viremia e carga viral no baço.....	75
5.2.6 Animais deficientes em MIF apresentam um atraso na letalidade após infecção pelo vírus da Dengue.....	77
6 DISCUSSÃO.....	80
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

RESUMO

RESUMO

A citocina MIF tem sido amplamente estudada devido às suas importantes ações na patogênese de diversas doenças de origem inflamatória. Seu mecanismo de ação, embora não totalmente elucidado, consiste na indução de uma série de mediadores responsáveis pela instalação do processo inflamatório. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi investigar a importância da citocina MIF na resposta inflamatória em modelos de inflamação sistêmica. Tanto no modelo de isquemia e reperfusão intestinal (I/R) quanto no modelo de infecção pelo vírus da Dengue houve aumento de MIF circulantes nos animais selvagens. Em I/R, animais deficientes em MIF apresentaram menor resposta inflamatória, como verificada por menor permeabilidade vascular, nível de hemorragia e produção de TNF- α em relação aos animais selvagens. De forma surpreendente, essa menor resposta não decorre de menor infiltrado neutrofílico. Em relação à infecção pelo vírus da Dengue, animais deficientes em MIF apresentaram diminuição no nível de citocinas, quimiocinas e no infiltrado neutrofílico. Manteve valores basais de hematócrito e no número de plaquetas circulantes. Em vista da menor resposta inflamatória observada nos animais deficientes em MIF, houve diminuição ou atraso na letalidade após as lesões. Os dados demonstram que MIF contribui de modo muito importante para o desencadeamento da patogênese em ambos os modelos, onde uma intervenção de sua ação pode ser de grande relevância para a diminuição da resposta inflamatória instalada.

ABSTRACT

ABSTRACT

Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is a potent pro-inflammatory cytokine, which may induce TNF- α release and play an important role in innate immune and inflammatory responses. The aim of this work was to assess the role of MIF in two murine models of systemic inflammatory responses: intestinal ischemia and reperfusion (I/R) and dengue infection. There was an increase in circulating levels of MIF in both animal models. After I/R, vascular permeability, hemorrhage and production of TNF- α in the intestine and lungs were lower in MIF-deficient (MIF^{-/-}) than in wild type (WT) mice. Lethality was partially prevented in MIF^{-/-} mice. The reperfusion-associated neutrophil accumulation in the intestine and lungs was similar in WT and MIF^{-/-} mice. Thus, MIF mediates tissue injury and lethality but not the influx of neutrophils, suggesting that an effect on the activation of neutrophils, rather than on recruitment, mediates the effects of MIF in the system. In an experimental model of Dengue infection, MIF^{-/-} mice showed reduced levels of cytokines and chemokines, and prevention of infection-associated hemoconcentration and thrombocytopenia. The latter findings were associated with a delayed lethality in MIF^{-/-} mice, but all animals eventually succumbed to the infection. IN conclusion, our results suggest that there is production of MIF during systemic inflammation. More importantly, it appears that MIF plays an important role in the pathogenesis of both reperfusion-associated injury and lethality and dengue infection. Blockers of MIF function may provide an interesting therapeutic approach for the treatment of diseases with a systemic inflammatory component.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A ciência como um todo tem por objetivo investigar os fenômenos que nos circundam. Contidos a ela, um leque de ramificações se especializam em assuntos mais diversificados onde, desde séculos atrás, filósofos, astrólogos ou alquimistas buscavam explicações para as constantes dúvidas da humanidade. Dentre as áreas da saúde, a Farmacologia (do grego *Farmacon* = droga, *logos* = estudo) pode ser considerada uma ciência relativamente nova (Wikipedia Encyclopedia). Para muitos, o alquimista iatroquímico Theophrastus Phillipus Aureolus Bombastus von Hohenheim (Paracelsus – 1493 - 1542) é considerado o pai da Farmacologia Moderna. Ele tinha como propósito estudar as ações de compostos presentes na natureza e no organismo. Os principais assuntos em que se concentrava compreendiam as ações do mercúrio, do enxofre e de sais diversos no organismo. Como teoria, Paracelsus reconhecia que todas as drogas poderiam ser malélicas ao sistema, onde o conhecimento da dose utilizada iria determinar um efeito terapêutico ou tóxico (Cockayne, 2002).

Seguindo a constante busca por explicações, especialidades se afinam com o objetivo de tornar mais minucioso o processamento de informações sobre um determinado assunto. Assim, dentre os ramos da Farmacologia, o estudo da resposta inflamatória de um organismo adquiriu caráter individual, hoje compreendido como um braço da Farmacologia Moderna. Um processo inflamatório pode ser definido como uma resposta de um tecido vivo e vascularizado contra um agente infeccioso, um antígeno ou mesmo um estímulo irritante de natureza física ou química (Rang *et al*, 2004). Dessa forma, o organismo reage com o aparecimento de sinais e sintoma característicos, ou seja, rubor, calor, turgor, dor e perda de função tecidual, os quais variam de intensidade de acordo com a magnitude e a natureza do estímulo, determinando a gravidade da resposta. Esses

indicativos ocorrem em virtude de um conjunto de alterações tanto ao nível celular quanto molecular. Assim, modificações no fluxo sanguíneo local, alterações nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, aumento de extravasamento de componentes do plasma bem como a infiltração celular para o tecido atingido pela lesão, aliados à grande produção de mediadores inflamatórios são os responsáveis em promover toda essa resposta complexa e estereotipada (Rang *et al.*, 2004).

Dentre os mediadores envolvidos, um grupo de compostos recebe especial atenção devido à ampla capacidade de regular variadas funções do sistema. Essas moléculas, as citocinas, compreendem um conjunto de mediadores polipeptídios produzidos e liberados por vários tipos celulares em resposta a microrganismos e outros antígenos, onde contribuem para o desenvolvimento de uma resposta imunológica e inflamatória adequada (Hanada & Yoshimura, 2002). Essas proteínas podem apresentar atividades antiinflamatórias ou pró-inflamatórias, desempenhando funções pleiotrópicas, redundantes, sinérgicas ou totalmente antagônicas umas das outras, onde o determinante dessa variação será o estímulo para a secreção e também o órgão alvo. Além disso, determinadas citocinas podem apresentar comportamentos ambíguos, ou seja, atuam tanto como antiinflamatórias quanto pró-inflamatórias, dependendo do tipo de estímulo (Cavaillon, 2001). As citocinas são capazes de exercer suas ações ao atuarem em receptores específicos presentes nas membranas das células alvo. A ligação ao receptor é feita com alta especificidade na porção extracelular, a partir de onde ocorre uma sinalização intracelular envolvendo proteínas da porção citossólica (Hanada & Yoshimura, 2002).

Vários estudos têm demonstrado que a citocina MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*) possui um importante papel como mediadora em processos inflamatórios (Bozza *et al.*, 1999; Calandra *et al.*, 2000; Radstake *et al.*, 2005). MIF foi primeiramente descrita como uma linfocina liberada a partir de células T ativadas (David,

1966; Bloom & Bennett, 1966). Nestes trabalhos, onde os pesquisadores estudavam reações de hipersensibilidade do tipo tardia, foi constatado que esta molécula era a responsável pela inibição da migração randômica de macrófagos para o local atingido pela lesão. Dessa forma, essas células passavam a ser direcionadas de maneira ordenada sob a orientação de MIF. Entretanto, como ocorre com outras citocinas, o nome atribuído não faz justiça ao amplo espectro de ações das quais participam. Posteriormente, a esta citocina foram atribuídas importantes funções na resposta imune como um todo (Calandra *et al.*, 1994).

Em reações inflamatórias, MIF é liberada principalmente por macrófagos (Calandra *et al.*, 1994), células T (Calandra *et al.*, 1994; Bacher *et al.*, 1996; Bozza *et al.*, 1999), neutrófilos (Riedemann *et al.*, 2004), células endoteliais (Shimizu *et al.*, 2004) e pela hipófise anterior (Bucala, 1996). MIF pode ser considerada uma proteína ubíqua, uma vez que pode ser encontrada em uma grande variedade de células, tanto aquelas responsáveis pela resposta imune quanto em células não relacionadas diretamente com essa atividade (Calandra & Roger, 2003). Em vista da presença de MIF em células não associadas ativamente com o mecanismo de defesa do organismo, atribui-se a essa citocina uma função fisiológica (Ohkawara *et al.*, 2005). Por exemplo, MIF já foi encontrada em grandes quantidades em células parietais do estômago, onde estaria contribuindo para a secreção ácida neste local (Maaser *et al.*, 2002). Também são encontrados níveis elevados de MIF em células β -pancreáticas, interferindo na liberação de insulina (Waeber *et al.*, 1997).

MIF apresenta uma série de características peculiares, o que a torna distinta em vários aspectos quando é comparada a outras citocinas. Neste contexto, uma importante característica dessa molécula, aqui salientando seu papel crucial em respostas inflamatórias agudas, consiste em seu processo de liberação. MIF já se encontra pré-formada e armazenada no interior de glândulas e células, necessitando apenas do estímulo para ser

liberada (Calandra & Roger, 2003). Outro interessante aspecto de MIF diz respeito à sua estreita relação com glicocorticóides, importantes agentes esteróides liberados pelas supra-renais e que desempenham potente atividade antiinflamatória e imunossupressora (Barnes, 2006). Alguns trabalhos demonstraram que MIF é capaz de ser induzido e liberado por glicocorticóides em baixas concentrações (Daun, 2000; Fingerle-Rowson *et al.*, 2003). Um trabalho recente demonstra que essa interação entre MIF e glicocorticóide pode ocorrer através de uma regulação na cascata de fosforilações na via das MAPK (mitogen-activated protein kinase), mais especificamente ao nível de MKP-1 (MAP kinase phosphatase 1), um regulador do processo de fosforilação (Aeberli *et al.* 2006).

Como agente pró-inflamatório, MIF participa da indução da resposta inflamatória em vários modelos experimentais de inflamação. Dentre os modelos estudados, podemos citar a artrite reumatóide (Leech *et al.*, 2003; Onodera *et al.*, 2004), infarto do miocárdio (Yu *et al.*, 2003), sepse (Bozza *et al.*, 1999; Calandra *et al.*, 2000), colite (Ohkawara *et al.*, 2005), imunopatogênese da asma (Mizue *et al.*, 2005) e desenvolvimento de tumores (Wilson *et al.*, 2005). Através do uso de várias e distintas ferramentas de estudo, pesquisadores mostraram que, em vários modelos experimentais, MIF age na produção ou expressão de outras moléculas de caráter pró-inflamatório, tais como algumas citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8) (Calandra *et al.*, 1994), liberação de NO (Bozza *et al.*, 1999), ativação da via de ciclooxigenase 2 (COX-2) (Mitchell *et al.*, 1999) e expressão de matriz de metaloproteinases (MMP)-2 (Meyer-Siegler, 2000).

Mediante ao importante papel que essa citocina representa em um processo inflamatório, é de grande interesse o conhecimento de qual o seu mecanismo de ação. Assim, vários estudos são desenvolvidos com o propósito de elucidar todo o mecanismo intracelular desencadeado por MIF. Foi verificado que MIF se liga com grande afinidade a uma molécula de membrana, identificada como CD74 (Leng *et al.*, 2003). Porém, essa

proteína não possui um domínio citossólico capaz de transduzir um sinal intracelular (Leng *et al.*, 2003). Em um estudo posterior, foi observado que a ligação de MIF com esse receptor se faz mediante uma prévia interação com outra proteína de membrana, o CD44, a qual possui uma propriedade de ativação de tirosina quinase (Meyer-Siegler *et al.*, 2005). Outro fato visto por pesquisadores em relação à atividade de MIF é o fato de que não é necessária a ligação dessa citocina com uma proteína de membrana com conseqüente sinalização intracelular. MIF pode ser endocitada pela célula alvo (Calandra & Roger, 2003). Seja por um modo ou por outro, um dos mecanismos de nível intracelular induzido por MIF diz respeito a cascatas de fosforilação da via de sinalização ERK MAPK (Mitchell *et al.*, 1999; Leng *et al.*, 2003; Lue *et al.*, 2006). MIF tem importante papel na superexpressão de receptor tipo *Toll* (TLR)-4 em macrófagos, onde pode haver a ativação do fator de transcrição NF- κ B, com a produção de citocinas pró-inflamatórias (Roger *et al.*, 2001). Através da fosforilação da proteína ERK, MIF promove a ativação da fosfolipase A₂, promovendo a síntese dos produtos do ácido araquidônico, como a prostaglandina E₂ (Mitchell *et al.*, 1999). Porém, as vias de sinalização intracelulares necessitam ser melhores compreendidas.

Todo esse prévio conhecimento a respeito da citocina MIF incentivou vários pesquisadores a buscarem maneiras de impedir que essa molécula exerça seu papel pró-inflamatório em várias doenças. Assim, testes com as ferramentas utilizadas até o momento, como anticorpos anti-MIF ou pequenas moléculas inibidoras do sítio ativo de MIF, poderiam ser utilizadas como terapêutica para o controle de várias patologias associadas com a lesão inflamatória (Morand, 2005). Outras maneiras para inibir a ação de MIF seria o desenvolvimento de antagonistas intracelulares ou a produção de espécies solúveis de CD74. Dessa forma, as ações de MIF podem ser inibidas tanto ao nível intracelular, onde MIF age diretamente em proteínas intracelulares, quanto

extracelularmente, onde impediriam sua ligação ao CD74 de membrana (Morand *et al.*, 2006). Acredita-se que essas opções terapêuticas estão diretamente associadas com uma redução de níveis de RNA mensageiro da citocina TNF- α e também menor ativação do fator de transcrição NF- κ B (Al-Abed *et al.*, 2005).

TNF- α é uma citocina com potente atividade pró-inflamatória, associada a múltiplos efeitos biológicos em vários tipos celulares. Está envolvida na estimulação da expressão de moléculas de adesão tanto em células polimorfonucleares circulantes quanto em células endoteliais, atua estimulando a síntese de outras citocinas, age em células endoteliais induzindo a síntese de prostaciclina, ativa fibroblastos, osteoclastos e condrócitos (Aggarwal, 2003). Age, ainda, causando febre e liberação de proteínas de fase aguda (Montrucchio *et al.*, 2000). Sua ação baseia-se na ligação a dois distintos receptores de membrana, TNF-R1 e TNF-R2 (também chamados p55 e p75, respectivamente), onde os processos de sinalização intracelular culminam na ativação do fator de transcrição NF- κ B e também do oncogene c-jun. Assim, há uma indução da transcrição de genes diretamente relacionados com uma resposta inflamatória (Chen *et al.*, 2002). A produção inapropriada de TNF- α está implicada na patogênese de um amplo espectro de importantes doenças, como sepse (Carvalho *et al.*, 2005), câncer (Szlosarek *et al.*, 2006), artrite reumatóide (Bongartz *et al.*, 2006) e em doenças do trato gastrointestinal (Wang & Fu, 2005). Dessa forma, estratégias terapêuticas que possam impedir a ação ou mesmo bloquear a síntese exacerbada dessa citocina tornaram-se alvo de grande investimento entre os pesquisadores e indústrias relacionadas.

Muitos dos mediadores inflamatórios, como TNF- α , estão envolvidos em lesões de ordem aguda, como por exemplo, isquemia e reperfusão de um órgão (Souza *et al.*, 2001, 2002). A redução prolongada do fluxo sanguíneo (isquemia) que irriga um órgão ou um vaso pode levar a uma significativa lesão tecidual com conseqüente morte celular. As

conseqüências posteriores a esse fenômeno estão entre as principais causas de morbidade e de mortalidade no mundo (Carden e Granger, 2000). Dando ênfase à isquemia e reperfusão intestinal, as principais situações em que há potencial interrupção do fornecimento sanguíneo para o intestino são aneurisma da artéria aorta abdominal, estrangulamento oriundo de hérnia e transplante intestinal (Collard & Gelman, 2001). Em outras situações como choque séptico e hipovolêmico, este processo também pode ser instalado (Mallick *et al.* 2004). A interrupção do fornecimento de oxigênio ao tecido desencadeia um conjunto de alterações nas células endoteliais bem como nos enterócitos e células lábeis da mucosa intestinal. Essas mudanças incluem tanto variações de ordem física, como fluidez de membrana e desorganização de citoesqueleto, quanto à produção de agentes bioativos. A opção terapêutica para revitalizar o tecido isquêmico é a restauração do fluxo sanguíneo (reperfusão), seja por método cirúrgico (revascularização de urgência) ou clínico (uso de agentes trombolíticos). Entretanto, essa restauração do fluxo sanguíneo, embora necessária para a revitalização da função e mecanismos de reparação do tecido, acaba por exacerbar a lesão já iniciada, pela exacerbação da resposta inflamatória, sendo comumente denominada lesão (“injúria”) de reperfusão (para revisão ver Souza & Teixeira, 2005).

A partir do momento da instalação do processo de isquemia e reperfusão intestinal, alguns fatores importantes explicam, de modo geral, como esta resposta sistêmica leva a um grave desequilíbrio do organismo. Uma das graves conseqüências deste quadro refere-se a disfunções no processo de absorção de nutrientes por parte das células intestinais, o que pode contribuir com a alta taxa de mortalidade (Kuenzler *et al.*, 2002). Outro considerável aspecto diz respeito a uma translocação bacteriana, ou seja, a passagem de bactérias do trato gastrointestinal para outros locais por meio da mucosa epitelial, provocado por uma hiperpermeabilidade intestinal (Cicalese *et al.*, 2001). Com isso, a probabilidade de disseminação de bactérias para todo o sistema é muito alta, onde o quadro de sepse,

choque e falência múltipla dos órgãos pode ser instalado. Somado aos itens acima, pode ocorrer também sérias lesões em órgãos distantes. Dependendo da intensidade da reação inflamatória a partir do local onde houve o processo de isquemia e posteriormente de reperfusão, os mediadores inflamatórios atingem a circulação sanguínea e alcançam órgãos como o pulmão e o sistema cardiocirculatório (Souza *et al.*, 2003a; Tian *et al.*, 2006).

Dentre os mediadores responsáveis por estas lesões, as espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio e íon superóxido) e as citocinas pró-inflamatórias têm crucial participação. A disseminação dessas moléculas pelo organismo pode levar à síndrome de resposta inflamatória sistêmica, o que pode prosseguir para uma falência múltipla de órgãos (Mallick *et al.*, 2004). Grande parte da produção dessas espécies reativas de oxigênio resume-se à ação da enzima xantina oxidase, a qual está aumentada nos processos isquêmicos (Wattanapitayakul & Bauer, 2001). Uma outra enzima, a hipoxantina, oriunda da catabolização do ATP, também se encontra em maior quantidade neste período. Com a chegada de oxigênio, mediante o processo de reperfusão, tanto a hipoxantina quanto a xantina oxidase reagem com o íon O_2^- , levando à produção dos radicais livres (Wattanapitayakul & Bauer, 2001). Como consequência das ações dessas moléculas, há uma série de eventos que podem levar ao início de uma resposta inflamatória ou mesmo a uma exacerbação do processo já instalado. Dentre suas ações, pode ser citada a produção do fator de ativação plaquetária (PAF), formação de moléculas do sistema de complemento e ativação de fatores de transcrições, com a formação de moléculas de adesão (Carden & Granger, 2000).

Todo o desenvolvimento da resposta inflamatória após isquemia e reperfusão intestinal, além de interferir na parte física das células, como vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular, contribui de forma marcante no recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão e também em órgãos distantes (Carden & Granger,

2000). Assim, os neutrófilos, principais células envolvidas, migram de maneira ativa e coordenada (processo de rolamento, adesão e transmigração), com crucial participação das moléculas de adesão (selectinas, integrinas, ICAMs e VCAMs) e dos fatores quimioatraentes, como o leucotrieno B4 (LTB4), moléculas do sistema de complemento, PAF e quimocinas. Uma vez ativadas, estas células contribuem ainda mais para a exacerbação da inflamação devido à liberação de uma série de outros mediadores inflamatórios, como as citocinas, produção de radicais livres e secreção de enzimas proteolíticas.

Nosso grupo, nos últimos anos, tem se dedicado ao estudo de estratégias que diminuam lesões induzidas por isquemia e reperfusão intestinal em modelos animais (para revisão ver Souza & Teixeira, 2005). Esses estudos incluem o estudo da citocina TNF- α , onde a utilização de anticorpos anti-TNF- α (Souza *et al.*, 2001) foi eficaz na redução do infiltrado neutrofilico, na produção de mediadores inflamatórios e prevenção da letalidade. Outras estratégias basearam-se na utilização de compostos que bloqueiam o recrutamento de neutrófilos, como a fucoidina, que inibe a expressão de moléculas de adesão (selectinas) (Souza *et al.*, 2000), e a repertaxina, antagonista de CXCR2 (Souza *et al.*, 2004a). Ainda, a utilização de camundongos deficientes do receptor de PAF e também a utilização de antagonistas deste receptor evidenciaram a importante participação do PAF no processo inflamatório provocado por isquemia e reperfusão, onde houve diminuição de TNF- α e aumento de IL-10 (Souza *et al.*, 2000, 2003b).

Todos estes fatores que levam ao desenvolvimento da resposta inflamatória encontram-se esquematizado de forma sucinta na figura 1.

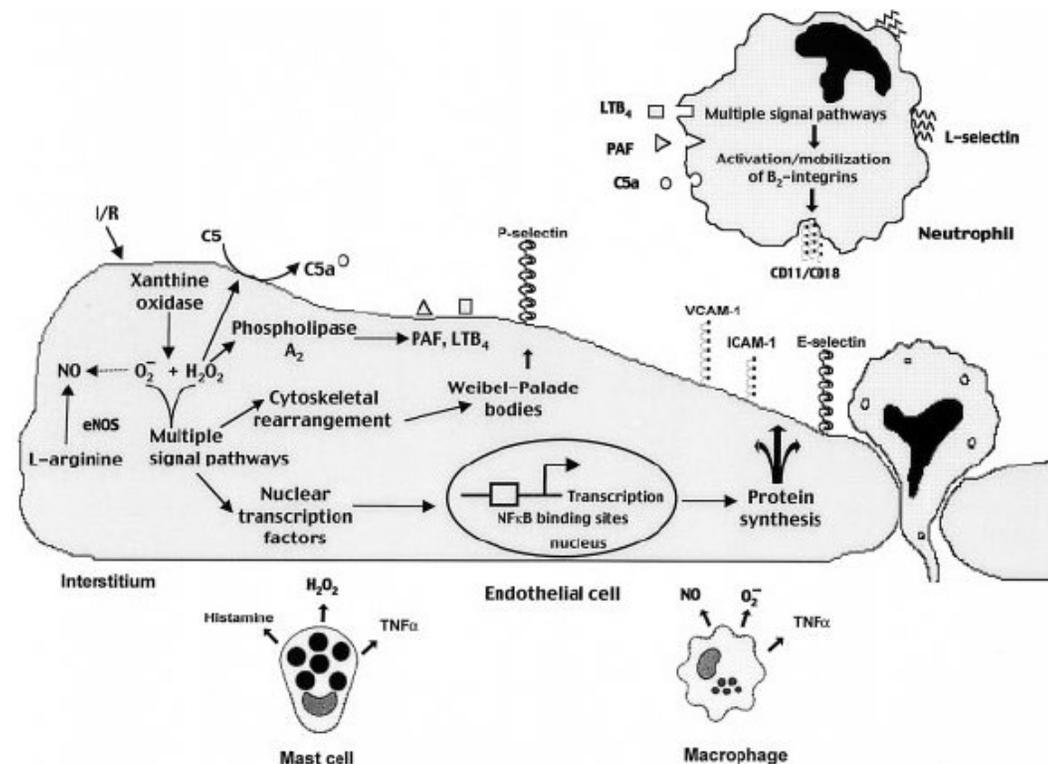


Figura 1: Esquema mostrando o processo de desencadeamento da resposta inflamatória após isquemia e reperfusão. O processo de isquemia e reperfusão leva a uma disfunção na produção de espécies reativas de oxigênio, com conseqüente produção de fatores quimiotáticos pelas células endoteliais, os quais são responsáveis pelo infiltrado de neutrófilos no tecido lesado. Retirado da revisão de Carden, 2000.

Conforme mostrado acima, vários estudos relacionados à isquemia e reperfusão descrevem a importância da citocina TNF- α como responsável por grande parte da lesão. Uma vez liberada essa citocina é capaz de induzir a produção de mediadores inflamatórios no local e em órgãos distantes, promovendo um recrutamento de neutrófilos para essas áreas (Souza *et al.*, 2000, 2004; Cavriani *et al.*, 2004). Estas ações pró-inflamatórias da citocina TNF- α também são constantemente observadas em casos de infecções, seja por

bactérias, vírus ou outros parasitas (Schluter & Deckert, 2000). Mais especificamente, já foi demonstrado uma importante participação dessa citocina no desencadeamento da resposta inflamatória induzida por infecção pelo vírus da Dengue, tanto em modelos com animais de experimentação (Atrasheuskaya *et al.*, 2003), quanto em casos clínicos (Lei *et al.*, 2001). Dessa forma, o tratamento com anticorpo anti-TNF- α foi eficaz na redução de mortalidade em camundongos infectados com o vírus da Dengue (Atrasheuskaya *et al.*, 2003).

A dengue é uma doença que vem recebendo especial atenção pelo setor de saúde em virtude do aumento espantoso do número de pessoas infectadas em todo o mundo ao longo das últimas décadas. Estima-se que cerca de 50 a 100 milhões de pessoas sejam infectadas a cada ano pelo vírus da dengue e que, dentre esses casos, 250 a 500 mil pessoas desenvolvem a forma mais grave da doença, ou seja, a forma hemorrágica (Shresta *et al.*, 2004). Dados da Organização Mundial de Saúde registraram em 2005 o número superior a 158.000 casos de dengue no Brasil, sendo que houve 25 mortes entre os contaminados (WHO). Em Belo Horizonte, até o mês de Maio deste ano, já foram confirmados 105 casos de Dengue clássico, com 782 casos notificados (<http://www.pbh.gov.br/smsa/bhdengue/>).

O vírus da Dengue pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Ele é composto por um filamento único de ácido ribonucléico (RNA), de sentido positivo, sendo revestido por 3 proteínas de ordens estruturais que dão um formato icosaédrico. São representados por quatro sorotipos distintos, nomeados em ordem numérica de 1 a 4 (Mukhopadhyay, 2005). Até meados de 2005, o sorotipo 4 não se encontrava circulante pelas limitações do território brasileiro. Porém, no final do mesmo ano, pesquisadores já alertaram sobre a presença desse sorotipo, oriundo, provavelmente, através da fronteira com a Venezuela (<http://www.unb.br/fm/noticias/not171105.htm>). É classificado como um arbovírus, uma vez que é transmitido para o ser humano através da picada de fêmeas de

duas espécies distintas, *Aedes aegypti* e *A. albopictus*, sendo que esta última não se encontra no continente americano (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

O ciclo de transmissão do vírus da Dengue tem início a partir da picada do mosquito em uma pessoa contaminada, onde o vírus presente na circulação é ingerido pelo artrópode. Uma vez dentro do mosquito, o vírus se multiplica no intestino médio e, posteriormente, são encontrados vírus também no ovário, sistema nervoso e, finalmente, nas glândulas salivares, local este por onde o vírus é transmitido através da picada do vetor. O vírus da Dengue, quando cai na circulação sanguínea, passa a se multiplicar em órgãos específicos, como o baço, fígado e tecidos linfáticos. Após este período, que varia de quatro a sete dias, retorna à circulação sanguínea, onde há o aparecimento dos primeiros sintomas.

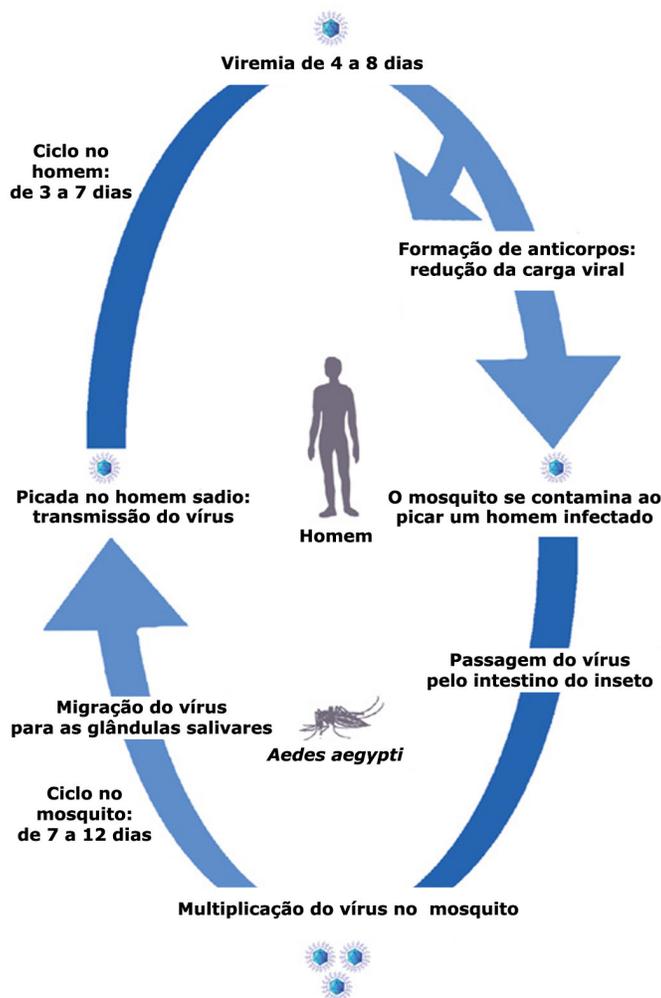


Figura 2: Ciclo de vida do vírus da Dengue. A transmissão do vírus da Dengue ao homem (hospedeiro definitivo) ocorre através da picada do mosquito infectado (hospedeiro intermediário), que, por sua vez, se contamina ao picar um homem infectado. Em cada hospedeiro, o vírus infecta órgãos específicos, nos quais ocorre multiplicação viral.

Há consideráveis motivos que explicam um número tão alto de casos de dengue pelo mundo. A transição rural-urbana que ocorreu em vários países na busca de melhores perspectivas de vida culminou em um desordenado alojamento de pessoas nas grandes cidades. Uma vez que estas cidades não estavam estruturalmente preparadas para atender uma demanda tão alta de migrantes, carências no saneamento básico, como fornecimento adequado de água, coleta de lixo e rede de esgoto adequados contribuíram para a multiplicação do vetor e conseqüente disseminação do vírus (Rigau-Perez *et al.*, 1998). Isso, aliado à falta de educação ambiental da população, como o armazenamento de garrafas plásticas, potes, pneus, dentre outros, em locais inapropriados, aumentou consideravelmente o número de criadouros do mosquito transmissor.

A infecção pelo vírus da Dengue pode desencadear dois tipos de respostas: a primeira caracteriza-se pela forma clássica, onde são observados sinais e sintomas comuns a outras doenças, como dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, eritema, leucopenia e trombocitopenia (Lei *et al.*, 2001). A segunda forma, extremamente grave, é conhecida como dengue hemorrágico, onde há uma síndrome de aumento permeabilidade vascular aguda acompanhada por anormalidades na hemostasia, o que pode levar ao quadro de choque em virtude de hemoconcentração e de considerável trombocitopenia (Lei *et al.*, 2001). O quadro clínico inclui vazamento plasmático, tendência a sangramento (Lei *et al.*, 2001) e envolvimento hepático (Paes *et al.*, 2002). Em raras circunstâncias, a forma hemorrágica seguida pela síndrome de choque pode envolver sintomas graves no sistema nervoso central, como perda de consciência, convulsões e encefalite (Ramos *et al.*, 1998; Solomon *et al.*, 2000).

A principal hipótese que explica o desencadeamento do quadro de dengue hemorrágico seria uma reinfecção viral com um sorotipo diferente ao previamente diagnosticado. Dessa forma, uma produção de anticorpos contra o primeiro sorotipo

aumentaria as possibilidades de entrada na célula por um outro sorotipo (Lin, *et al.*, 2002; Rothman, 2004). Esta facilitação estaria relacionada com o receptor da porção Fc (FcR) do anticorpo, presente em alguns tipos celulares (Huang *et al.*, 2006), onde a interação Fc-FcR provocaria um aumento da infecção. Porém, uma infecção primária pode desenvolver o quadro de dengue hemorrágico, variando de indivíduo para indivíduo, com mecanismos ainda não esclarecidos.

A partir do momento em que uma pessoa ou animal são infectados pelo vírus da Dengue, o organismo responde com uma grande produção de moléculas pró-inflamatórias (Chaturvedi *et al.*, 2000; Lei *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2002). Há um aumento na expressão de citocinas (IFN- γ , IL-6, TNF- α), quimiocinas (RANTES, IL-8), moléculas do sistema de complemento e moléculas de adesão. Em um estudo com o vírus causador da Encefalite Japonesa, pertencente à mesma família do Dengue, foi verificada uma importante participação da citocina MIF no desencadeamento da resposta inflamatória (Suzuki *et al.*, 2000). Neste trabalho, os pesquisadores observaram a presença de MIF no cérebro dos camundongos infectados e também um aumento na expressão de TNF- α no mesmo local. Em estudo mais recente, foi diagnosticado que, em pacientes infectados com dengue, há um elevado nível circulante de MIF, onde seu aparecimento se sobrepõe com os casos mais graves da doença (Chen *et al.*, 2006).

Um outro aspecto que acompanha a evolução dessa doença é uma lesão em células endoteliais. Devido a isso, plaquetas presentes na circulação são passíveis de seqüestro pelas células danificadas, contribuindo para o desenvolvimento de trombocitopenia. Além do mais, a infecção pelo vírus da Dengue em células endoteliais induz a produção de citocinas e altera a expressão de moléculas de adesão (Dewi *et al.*, 2004). Células ativas do sistema imune também são alvos da infecção pelo vírus da dengue. Tais células englobam as células dendríticas, células *Natural Killer* (NK), linfócitos T e B, macrófagos e

monócitos (Lei *et al.*, 2001). Assim, uma gama de mediadores inflamatórios é produzida, os quais podem tanto proteger quanto prejudicar o organismo, de acordo com variações individuais ou número de infecções.

Além de pesquisas em busca de fármacos que diminuam os sintomas da Dengue, há intenso estudo pela busca de medidas profiláticas que visam reduzir o número de infecções por este vírus. Neste contexto, o desenvolvimento de vacinas seria de grande importância. Porém, ainda não foi desenvolvida qualquer vacina que combata, de maneira eficaz, essa enfermidade. O grau de dificuldade baseia-se no fato de que é preciso desenvolver uma vacina contra os quatro sorotipos diferentes, visto que uma vacina que combata apenas um sorotipo pode ser muito perigosa no caso de uma reinfecção com outro sorotipo, exacerbando a resposta inflamatória (Chaturvedi *et al.*, 2005). Konishi *et al.* (2006) desenvolveram um tipo de vacina tetravalente. Contudo, apesar da indução de anticorpos contra os quatro sorotipos, é necessário muito estudo para estabelecer uma efetividade satisfatória. Voltando a atenção para o vetor, há também intensa pesquisa em impedir que o vírus da Dengue se multiplique no mosquito transmissor (Clayton, 2006). Nesse último caso, ferramentas como RNAi contra o material genético deste vírus já estão em estudo.

Outra questão debilitante enquadra-se na ausência de modelos experimentais adequados para o estudo de infecção pelo vírus da Dengue. Embora vários modelos animais sejam sugeridos, modelos que mimetizam de forma equivalente ao que acontecem em humanos precisam ser melhores estudados. As limitações encontradas nos modelos propostos na literatura se devem principalmente a alta carga viral injetada em camundongos adultos (cerca de 10^8 LD₅₀) ou a utilização de camundongos recém nascidos, os quais não apresentam sistema imune maduro.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A citocina MIF tem sido amplamente estudada em vários modelos de inflamação, onde são demonstrados uma crucial participação dessa molécula no desencadeamento de respostas inflamatórias. Seu mecanismo de ação ainda permanece não totalmente elucidado, o que torna interessante o estudo em outros modelos experimentais para mais esclarecimentos. Dessa forma, propusemos um estudo em dois modelos inflamatórios distintos: o primeiro, de origem não infecciosa, é representado por isquemia e reperfusão intestinal. O segundo tem origem a partir de uma infecção pelo vírus da dengue. Ambos os modelos representam dois importantes problemas de saúde pública, uma vez que atinge grande parcela da população. Além disso, não há um tratamento eficiente para as doenças associadas com esses modelos, o que torna de extrema relevância o estudo de mediadores que podem, potencialmente, gerar estratégias terapêuticas a serem utilizadas no tratamento das mesmas.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral: investigar a importância da citocina MIF na resposta inflamatória em modelos de inflamação sistêmica.

3.2 Objetivos específicos e abordagem experimental

Os modelos que utilizamos para avaliar o papel da citocina MIF são: isquemia e reperfusão intestinal e resposta inflamatória desencadeada pela infecção com o vírus da dengue.

3.2.1 Analisar a participação da citocina MIF no modelo de inflamação induzido por isquemia e reperfusão intestinal através dos seguintes estudos:

- verificar a produção de MIF nos animais selvagens após isquemia e reperfusão intestinal;
- verificar a taxa de letalidade utilizando animais deficientes em MIF (MIF^{-/-}) e compará-los com animais selvagens;
- analisar os parâmetros inflamatórios (permeabilidade vascular, hemorragia, níveis de citocinas e infiltração de neutrófilos) no intestino e pulmão dos animais (MIF^{-/-} e selvagens) submetidos a isquemia e reperfusão intestinal e compará-los com animais falso-operados (sham).

3.2.2 Demonstrar a importância da citocina MIF no modelo de infecção pelo vírus da dengue mediante os seguintes testes:

- verificar a produção de MIF nos animais selvagens após infecção com o vírus da Dengue;
- comparar a taxa de letalidade dos animais MIF^{-/-} e selvagens após infecção pelo vírus da Dengue;

- analisar os parâmetros inflamatórios devido à infecção com o vírus do dengue. Serão avaliados os níveis de citocinas e quimiocinas e infiltração de neutrófilos. Analisar o nível de hematócrito e também o número de plaquetas circulantes.
- após a infecção pelo vírus, verificar a quantidade de vírus pela formação de placas em células Vero em animais MIF^{-/-} e compará-los com animais selvagens.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

1. Isquemia e reperfusão intestinal

1.1 Animais

Foram utilizados camundongos das linhagens SV129 e C57/BL6 (selvagens – WT e deficientes em MIF – MIF^{-/-}), provenientes do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz - Fiocruz/BA e do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais utilizados eram machos, com idade entre 8 a 10 semanas, e mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia com livre acesso à água e ração.

1.2 Protocolo experimental

Camundongos foram anestesiados com uretana (1400 mg/Kg, i.p.) e submetidos à laparotomia. A artéria mesentérica superior (AMS) foi isolada e a isquemia foi induzida por total oclusão da AMS por 60 minutos. Após este período de isquemia, a reperfusão foi iniciada por remoção da oclusão e, 60 minutos após, os animais foram sacrificados e houve remoção dos tecidos para as análises. Animais falso-operados (sham) foram utilizados como controle para as lesões induzidas por reperfusão pós-isquemia. Neste grupo, após a anestesia, os animais eram submetidos à laparotomia, a MAS era isolada, porém sem a sua oclusão.

1.3 Avaliação da permeabilidade vascular

O extravasamento de Azul de Evans para o tecido foi usado como índice de aumento de permeabilidade vascular (De Matos *et al.*, 1999). Azul de Evans (2%) foi administrado (1 mL/kg, i.v.) pela veia caudal 5 minutos antes da reperfusão do leito

isquêmico. Após o sacrifício dos animais, um fragmento de 10 cm de duodeno foi cortado e colocado em placa de Petri para secagem por 24 horas em estufa a 37°C. Em seguida, foi adicionado 1 mL de formamida por 24 horas para extração do corante no tecido seco. O corante extraído do tecido foi quantificado em leitor de ELISA (comprimento de onda de 620 nm) e a concentração determinada através de curva padrão de 0.375 a 10 µg/mL de Azul de Evans. Os resultados foram expressos como quantidade de Azul de Evans por 100 mg de tecido seco.

1.4 Quantificação de mieloperoxidase (MPO)

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos no intestino e pulmão, foi utilizado o método de quantificação da atividade de mieloperoxidase como descrito previamente (De Matos *et al.*, 1999; Ivey *et al.*, 1995). Brevemente, um fragmento de intestino e parte do pulmão direito (lavado com 10 mL de solução salina, através de perfusão retrograda da veia pulmonar) foram pesados e picados, suspensos a 5% em salina EDTA, submetido à homogeneização e centrifugação (3000 g, 10 minutos) .

O sobrenadante foi desprezado e o componente residual (pellet) ressuspendido em 1,5 mL de NaCl 0.2% gelado e 1,5 mL de NaCl 1.6% com glicose 5% gelada para cada 100 mg de tecido. Realizou-se nova centrifugação a 3000 g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em tampão fosfato com HTAB a 5% e re-homogenizado por 30 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente (3 vezes) em nitrogênio líquido, submetidas novamente a centrifugação (3.000 g por 15 minutos) e os sobrenadantes coletados para ensaio de MPO. A atividade de mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de leitor de ELISA (450 nm) usando tetramethylbenzine (1.6 mM) e H₂O₂ (0.5 mM). Os resultados foram expressos

unidades relativas por comparação da O.D. do sobrenadante do tecido com neutrófilos do peritônio de camundongos processados da mesma maneira.

1.5 Quantificação de citocinas

Os níveis de citocinas foram medidos no soro, intestino e pulmão através de ELISA (Rees *et al.*, 1999). O soro foi obtido por coagulação do sangue (15 minutos a 37° C seguidos de 30 minutos a 4° C), centrifugado a 3000rpm por 15 minutos e estocados a -20° C para posterior análise. Cem miligramas de duodeno ou pulmão de animais sham e de animais submetidos à isquemia e reperfusão foram homogeneizados com PBS contendo antiproteases (0.1 mM PMSF, 0,1 nM benzethonium clorídrico, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween20. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 3000 g e o sobrenadante utilizado para o ensaio de ELISA com diluições variadas de tecido para tecido. O ensaio de ELISA foi realizado mediante instrução do fabricante (R&D System) e a absorbância obtida em leitor de ELISA a 492 nm.

1.6 Quantificação de hemoglobina

O nível de hemoglobina foi utilizado como índice de hemorragia tecidual. Após lavagem e perfusão do intestino para remover excesso de sangue do espaço intravascular, uma amostra de aproximadamente 100 mg de duodeno foi retirada e homogeneizada com reagente de cor Drabkin (Analisa, Belo Horizonte). A suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 3000 g e filtrada com filtro de 0.2 µm. A solução resultante foi lida em leitor de ELISA com o comprimento de onda de 520 nm. A curva padrão foi feita utilizando o padrão de hemoglobina. As concentrações utilizadas foram de 400 a 25 mg de hemoglobina.

1.7 Histologia

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados e o intestino e o pulmão foram retirados e armazenados em Formol Tamponado (10% em PBS) por 18 horas e em álcool (70%) até o processamento das amostras. Para o processamento, os tecidos sofreram passagens subsequentes em etanol em diferentes concentrações (80%, 90%, absoluto 1 e 2 – 30 minutos cada), xilol (1 e 2 – 20 a 30 minutos cada) e em parafina líquida (Paraplast Sigma; 1 e 2 – 30 minutos).

Após a solidificação da parafina (24 horas), foram realizados os cortes dos tecidos em micrótomo (espessura de 5 μ m). Os cortes foram colocados em água morna e, em seguida, postos em lâminas de vidro. Após essa fase, os cortes foram desparafinizados (xilol – 20 minutos; álcool absoluto, 90%, 80% e 70% – 5 imersões; água). Os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris (20 segundos) e Eosina (8 segundos). Em seguida, houve desidratação (álcool 70, 80, 90% e absoluto 1 e 2 – 5 imersões; xilol 1 e 2 – 5 imersões) e montagem das lâminas com Bálsamo do Canadá sintético.

1.8 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm EPM (erro padrão da média) por grupo de 4 a 5 animais. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste t não paramétrico ou a análise de variância a um critério (ANOVA ONE-WAY), seguido de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Os níveis de significância foram estabelecidos em $p < 0,05$.

2. Infecção pelo vírus da dengue

2.1 Vírus

Neste projeto foi utilizado o sorotipo 2 (DEN 2). O vírus foi isolado de amostra clínica pelos Dr. George Ignatyev do Vector Institute da Rússia depositado no banco de dados do Gene Bank sob o número de acesso AY927231.

Para aumentarmos a virulência dos isolados no hospedeiro murino, o vírus foi injetado intracerebralmente em camundongos. No quinto dia após a infecção, os cérebros foram retirados destes animais, foi feito um homogenato e, novamente, injetado intracerebralmente em outro animal. Várias passagens foram realizadas como descrito anteriormente (Atrasheuskaya *et al.*, 2003).

2.2 Titulação do vírus da Dengue

Células Vero foram crescidas em meio DMEM com 5% de SFB, sendo implantadas em placa de seis poços a uma densidade de $1,5 \times 10^6$ células/poço. 450 μ L de uma série de diluições seriadas contendo o vírus a ser titulado foram inoculados em células com monocamadas recém fechadas, sendo que como controle foi utilizado um poço com células não infectadas. Após uma hora de incubação do inóculo, o meio foi desprezado, e as células lavadas com PBS. Em seguida, foi adicionado meio DMEM contendo 1.5% de carboximetilcelulose e as placas incubadas a 37°C por 7 dias. As placas foram coradas com solução 1% (p/v) de cristal violeta em PBS 1X para a determinação do título das amostras, as quais foram expressos em PFU/mL (unidades formadoras de placas por mililitro).

2.3 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c (8 semanas; selvagens – WT e deficientes em MIF – MIF^{-/-}). Os animais foram infectados com o sorotipo 2 do dengue (1LD₅₀/100µL/animal) e mantidos em micro-isoladores com livre acesso a água e ração. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética animal da UFMG. Os animais foram sacrificados no 3º, 5º e 7º dia após a infecção para análise dos parâmetros inflamatórios.

2.4 Quantificação de citocinas

Níveis de citocinas foram medidos no soro, fígado e baço através de ensaio enzimático (ELISA). O soro foi obtido por coagulação do sangue (15 minutos a 37° C seguidos de 30 minutos a 4° C) e estocado a -20° C para posterior análise. Cem miligramas de fígado ou baço foram homogeneizados com PBS contendo antiproteases (0.1 mM PMSF, 0,1 nM benzethonium clorídrico, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween20. O ensaio de ELISA foi realizado de acordo com instruções do fabricante (R&D System) e lido em leitor de ELISA a 492 nm.

2.5 Quantificação dos níveis de plaquetas circulantes

No momento do sacrifício dos animais, 150µL de sangue heparinizado foram coletados e levados para quantificação de plaquetas em laboratório de análises clínicas, em aparelho Coulter Counter S-Plus JR

2.6 Análise do índice de hematócrito

Uma pequena amostra de sangue de cada animal foi retirada por meio de um capilar de vidro, o qual foi centrifugado em uma centrífuga específica (rotação por 10 mim).

Depois disso, foi feita uma proporção entre o comprimento das porções vermelha (concentração de elementos do sangue) e branca (concentração de plasma), através de uma

regra de três simples: Branco + Vermelho _____ 100

Vermelho _____ X

Quanto maior o valor obtido, maior será a concentração de hemácias no sangue.

2.7 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm EPM por grupo de 4 a 5 animais. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância a um critério (ANOVA ONE-WAY), seguido de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Os níveis de significância foram estabelecidos em $p < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Participação da citocina MIF no modelo de isquemia e reperfusão intestinal

5.1.1 Os níveis da citocina MIF encontram-se aumentados após isquemia e reperfusão intestinal

Em virtude da grave lesão causada por isquemia e reperfusão intestinal (I/R) demonstrado em outros trabalhos do grupo (Souza *et al.*, 2002, 2003a, b, 2004a) e de acordo com trabalhos em diferentes modelos de inflamação, nos quais a citocina MIF é responsável pela liberação de variadas moléculas pró-inflamatórias (Bozza *et al.*, 1999; Mitchell *et al.*, 1999; Meyer-Siegler, 2000), nosso primeiro passo foi verificar se o processo de isquemia e reperfusão intestinal leva a um aumento da liberação dessa citocina no soro de animais submetidos à I/R.

Conforme demonstrado na Figura 3, há significativo aumento dos níveis de MIF após I/R quando comparados com os animais falso-operados. Este primeiro dado indica uma possível participação de MIF no desencadeamento da resposta inflamatória neste modelo experimental. Baseado neste resultado, o nosso próximo passo foi verificar o papel dessa citocina no processo de isquemia e reperfusão intestinal, utilizando animais deficientes em MIF.

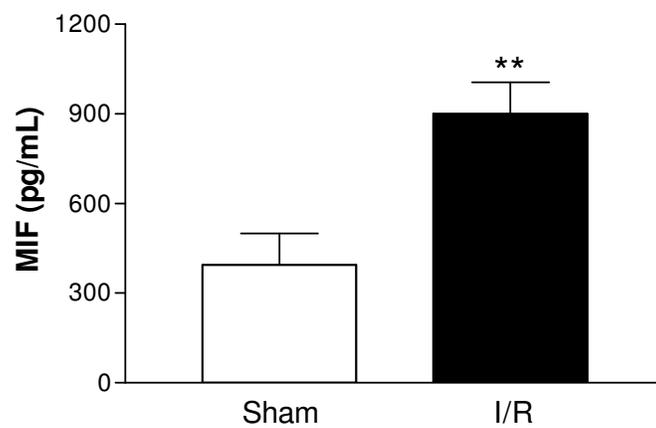


Figura 3: Concentração de MIF no soro de animais selvagens. Esta figura mostra um aumento nos níveis de MIF no soro quando os animais são submetidos à isquemia e reperfusão intestinal em relação aos animais falso operados. ** p<0,01.

5.1.2 Animais deficientes em MIF apresentam menor resposta inflamatória após isquemia e reperfusão intestinal

O procedimento de isquemia e reperfusão intestinal promove uma resposta inflamatória local e sistêmica, onde podem ser observados, dentre outros fatores, um aumento da permeabilidade vascular e também um quadro de hemorragia (Carden *et al.*, 2000). Conforme demonstrado na Figura 4, os animais selvagens apresentaram significativo aumento de permeabilidade vascular (caracterizado por aumento na concentração do corante Azul de Evans no tecido) bem como aumento no nível hemorrágico (caracterizado pelo aumento dos níveis de hemoglobina no tecido) no intestino. Estes aumentos não foram observados nos animais deficientes em MIF. Uma vez que a inibição destes parâmetros inflamatórios é quase total nos animais MIF^{-/-} (em relação aos animais falso-operados), estes resultados sugerem a citocina MIF possui papel crucial no desencadeamento da resposta inflamatória induzida por isquemia e reperfusão intestinal.

Como relatado anteriormente, o processo de isquemia e reperfusão intestinal acomete o organismo de modo sistêmico, fato esse representado por alterações em órgãos distantes, como o pulmão (Souza *et al.*, 2003a, 2004b; Tian *et al.*, 2006). Nossos dados demonstram que a ausência da citocina MIF também reduz o aumento na permeabilidade vascular no pulmão de animais submetidos à isquemia e reperfusão intestinal (Figura 4B). Estes dados reforçam a participação de MIF neste modelo.

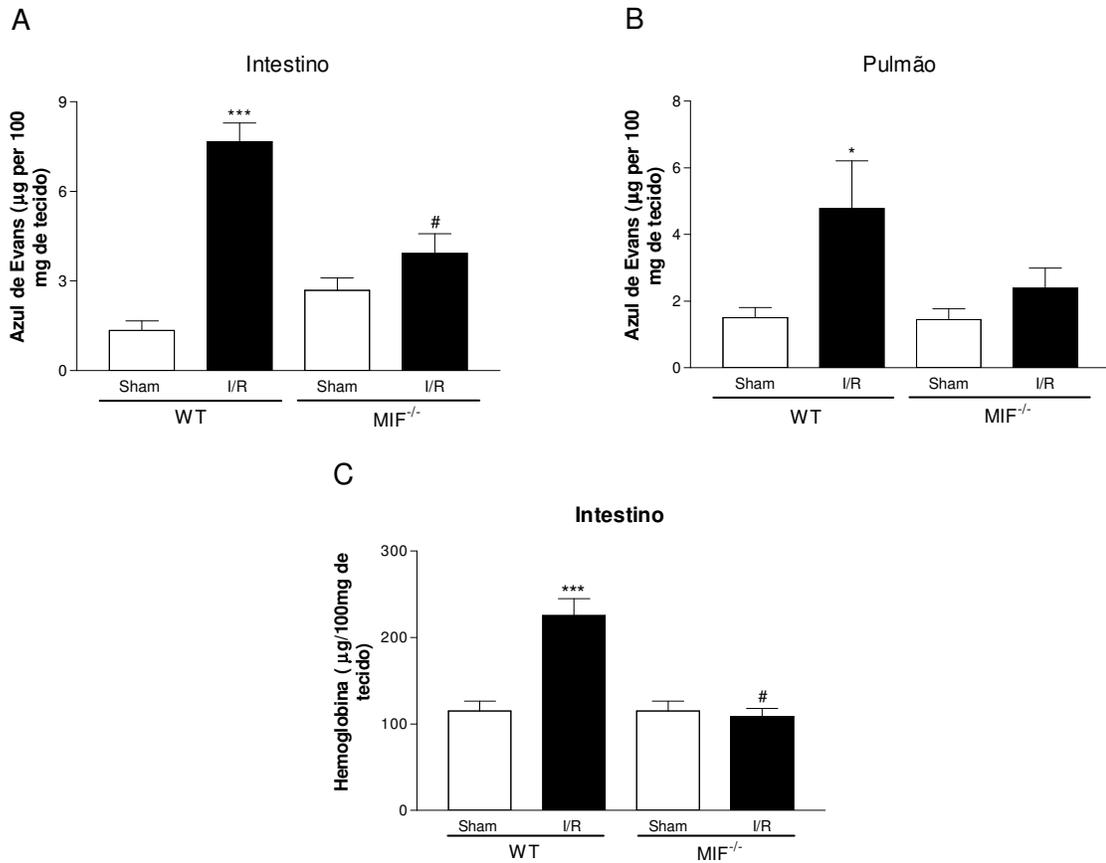


Figura 4: Comparação de parâmetros inflamatórios após isquemia e reperfusão intestinal (I/R) entre animais selvagens (WT) e deficientes em MIF (MIF^{-/-}). Após (I/R), os animais WT apresentaram significativo aumento de permeabilidade vascular tanto no intestino (A) quanto no pulmão (B) e aumento de hemorragia no intestino (C) quando comparados com os animais falso-operados. Nos animais MIF^{-/-}, não foi observado aumento nestes parâmetros inflamatórios, mantendo os valores em níveis basais. * p<0,01; *** p<0,001 (Sham x IR – WT) e # p<0,001 (IR – WT x IR – MIF^{-/-}).

5.1.3 Animais deficientes em MIF apresentam diminuição da concentração de TNF- α no intestino, pulmão e soro quando submetidos à isquemia e reperfusão intestinal

Em vista da importante participação da citocina TNF- α no desenvolvimento da resposta inflamatória neste modelo (Souza *et al.*, 2002) e da participação de MIF na produção dessa citocina (Bozza *et al.*, 1999; Al-Abed *et al.*, 2005), nosso próximo passo foi avaliar a participação de MIF na produção de TNF- α após I/R.. De acordo com a Figura 5, pode-se verificar um significativo aumento na quantidade de TNF- α citocina no intestino, pulmão e soro dos animais selvagens submetidos a I/R em relação aos falso-operados. Em contrapartida, os animais deficientes em MIF não apresentaram esse aumento, ficando com os níveis de TNF- α na mesma proporção que os animais controle. Esses dados reforçam um importante envolvimento da citocina MIF na indução da liberação de TNF- α neste modelo.

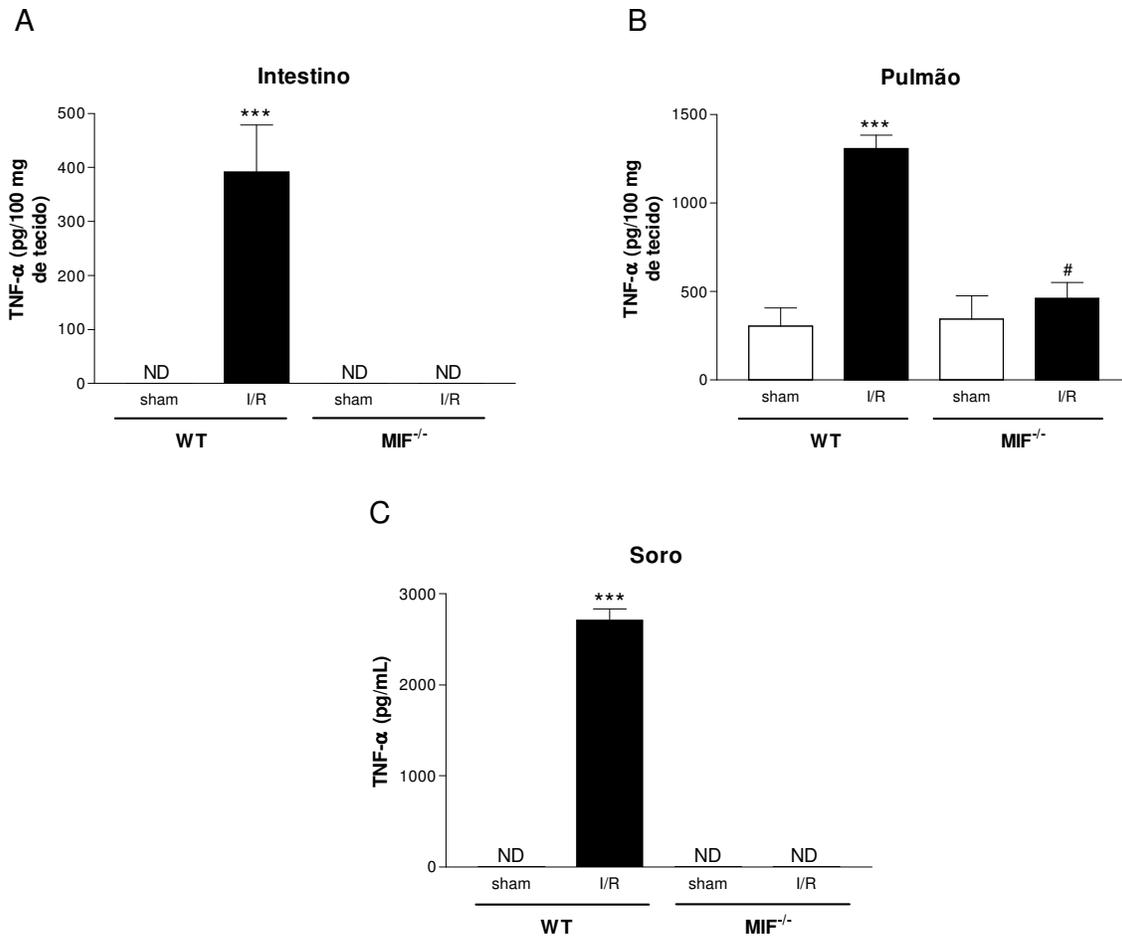


Figura 5: Concentração de TNF- α tecidual e no soro após isquemia e reperfusão intestinal. Os animais selvagens (WT) apresentam elevados níveis dessa citocina no intestino (A), pulmão (B) e soro (C) após isquemia e reperfusão intestinal. Em contrapartida, os animais deficientes em MIF (MIF^{-/-}) não apresentaram aumento da produção de TNF- α após esta lesão. *** $p < 0,001$ (Sham x IR – WT) e # $p < 0,001$ (IR – WT x IR – MIF^{-/-}).

5.1.4 Apesar da diminuição dos parâmetros inflamatórios após isquemia e reperfusão intestinal, a ausência de MIF não interfere no influxo de neutrófilos

Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstram a participação de neutrófilos no desencadeamento da resposta inflamatória induzida por isquemia e reperfusão intestinal (Souza *et al.*, 2000, 2004a). Dessa forma, nossos dados sugerem que o infiltrado celular estaria contribuindo para a liberação de mediadores inflamatórios para a região inicial da lesão e também em órgãos distantes. No presente trabalho, os animais selvagens apresentaram aumento no infiltrado celular tanto no intestino quanto no pulmão após isquemia e reperfusão intestinal. De forma inesperada, também houve um aumento no infiltrado neutrofílico nos animais deficientes em MIF após isquemia e reperfusão intestinal (Figura 6).

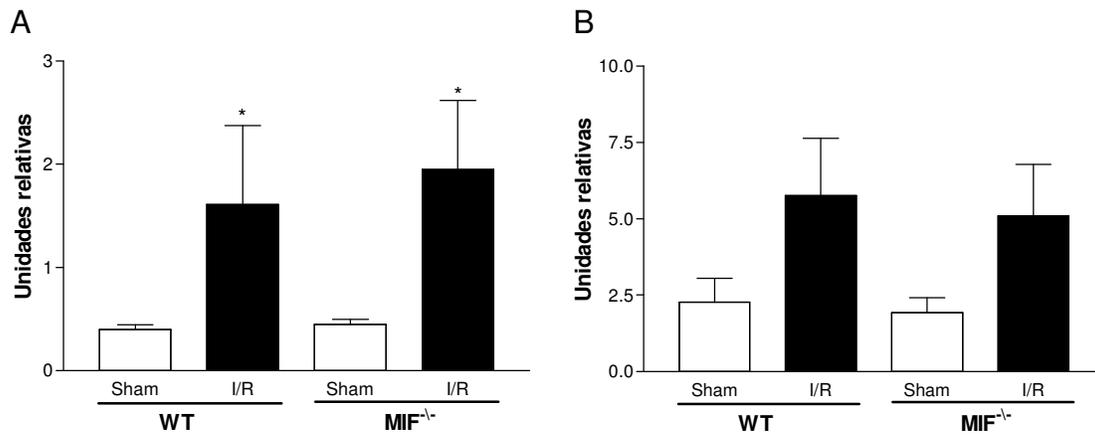


Figura 6: Avaliação do infiltrado neutrofílico no intestino e pulmão após isquemia e reperfusão intestinal. Após a lesão, tanto os animais selvagens (WT) quanto os animais deficientes em MIF (MIF^{-/-}) possuem aumento de neutrófilos no intestino (A) e pulmão (B) quando comparados com os animais falso-operados. * p<0,05 (Sham x IR).

5.1.5 Os cortes histológicos retratam os ensaios biológicos: menor lesão em animais deficientes em MIF, porém com grande infiltrado celular

Após a indução de isquemia e reperfusão intestinal, foram retirados fragmentos do intestino e do pulmão para a análise histológica. Conforme visualizado nas Figuras 7 e 8, há considerável perda estrutural tanto do intestino (Figura 7) quanto do pulmão (Figura 8) nos animais selvagens (WT), com grande preservação nos animais deficientes em MIF ($MIF^{-/-}$). Após a lesão, podem se observar grandes focos de edema e de hemorragia em ambos os tecidos nos animais WT, sendo que, nos animais $MIF^{-/-}$, estes parâmetros encontram-se bastantes reduzidos. Em ambos os animais, podem ser verificados um grande número de infiltrado celular nos órgãos estudados, tendo como parâmetro analítico os animais falso-operados. Isso retrata o que foi diagnosticado através do ensaio de MPO (Figura 6).

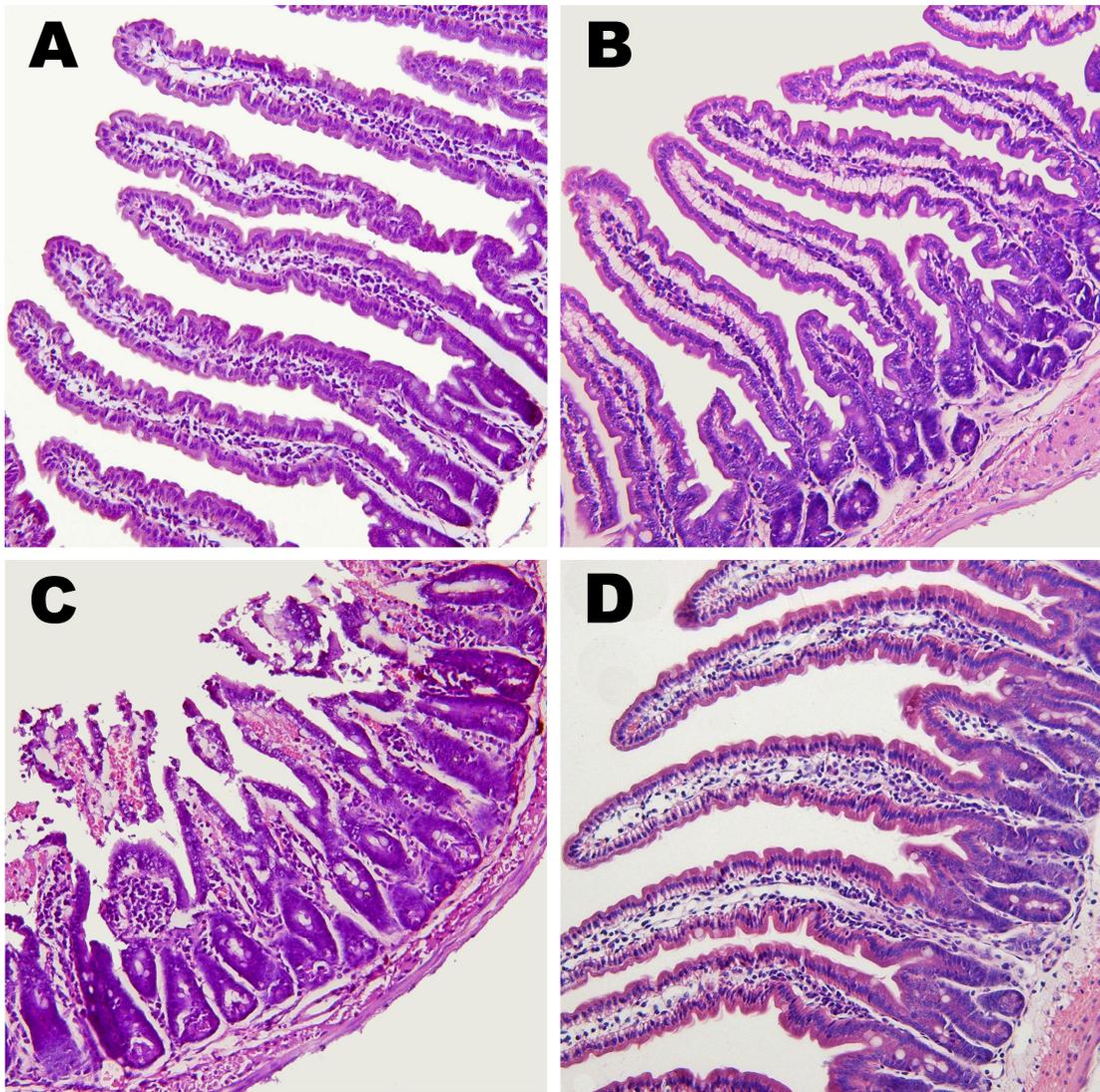


Figura 7: Análise histológica no intestino entre os animais selvagens e deficientes em MIF após isquemia e reperfusão intestinal. Após a lesão, os animais selvagens apresentam considerável perda da integridade física, aumento de infiltrado celular e pontos de hemorragia no intestino quando comparados com os animais falso-operados. Em relação aos animais deficientes em MIF, observa-se uma preservação da integridade física do órgão estudado, reduzidos focos de hemorragia, porém com considerável aumento no infiltrado celular. **A:** sham selvagem; **B:** sham deficiente em MIF; **C:** IR selvagem; **D:** IR deficiente em MIF. (aumento de 40X)

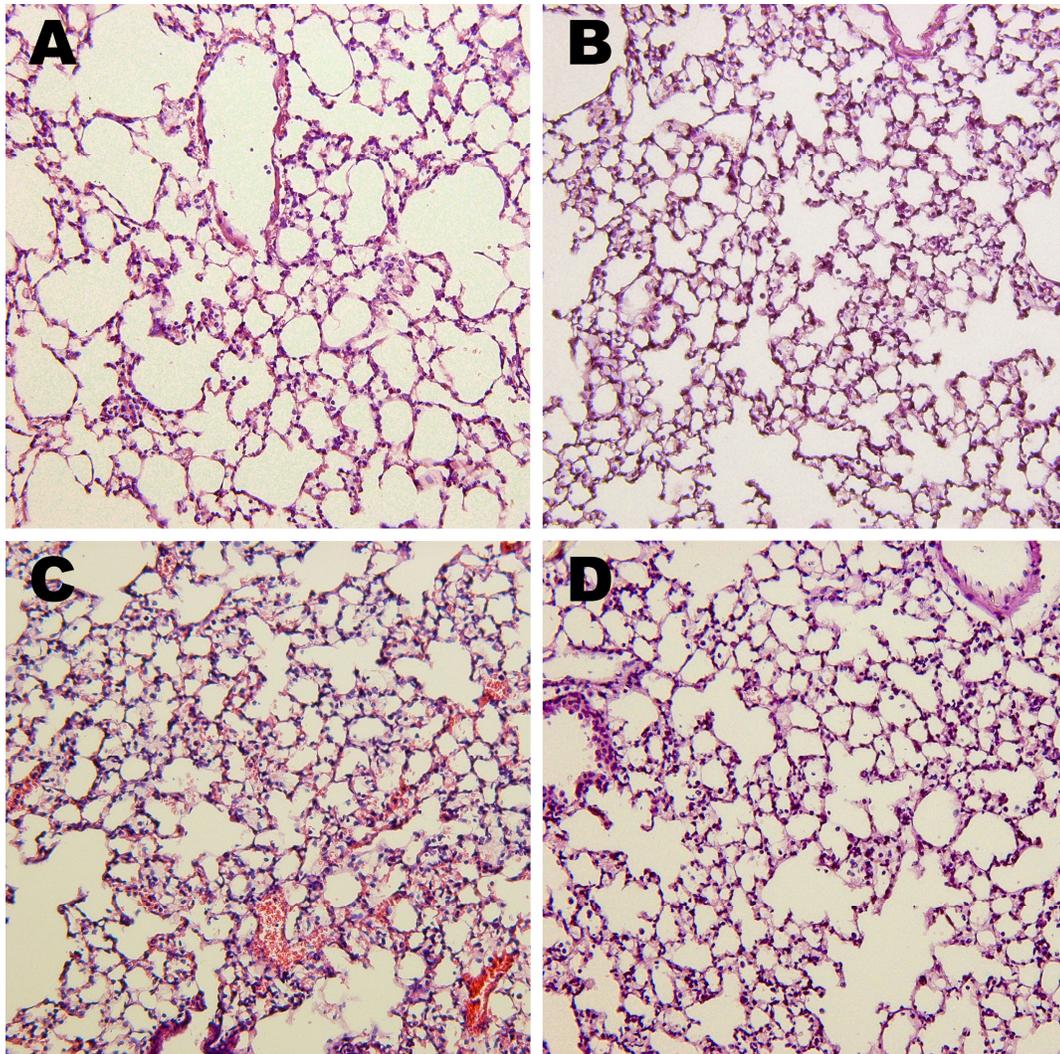


Figura 8: Análise histológica no pulmão entre os animais selvagens e deficientes em MIF após isquemia e reperfusão intestinal. Após a lesão, os animais selvagens possuem considerável perda da integridade física, aumento de infiltrado celular e pontos de hemorragia no pulmão quando comparados com os animais falso-operados. Em relação aos animais deficientes em MIF, observam-se uma preservação da integridade física do órgão, reduzidos focos de hemorragia, porém com considerável aumento no infiltrado celular. **A:** sham selvagem; **B:** sham deficiente em MIF; **C:** IR selvagem; **D:** IR deficiente em MIF. (aumento de 40X).

5.1.6 A diminuição na taxa de letalidade espelha à menor da inflamação dos animais deficientes em MIF

Em conformidade com a considerável diminuição de lesão nos animais deficientes em MIF, após o procedimento de isquemia e reperfusão intestinal, há uma diminuição na taxa de letalidade quando comparado com o grupo representado por animais selvagens (Figura 9). Após 120 minutos de reperfusão, cerca de 80% dos animais selvagens não sobreviveram, ao passo que, no mesmo período, aproximadamente 80% dos animais deficientes em MIF ainda permaneceram vivos.

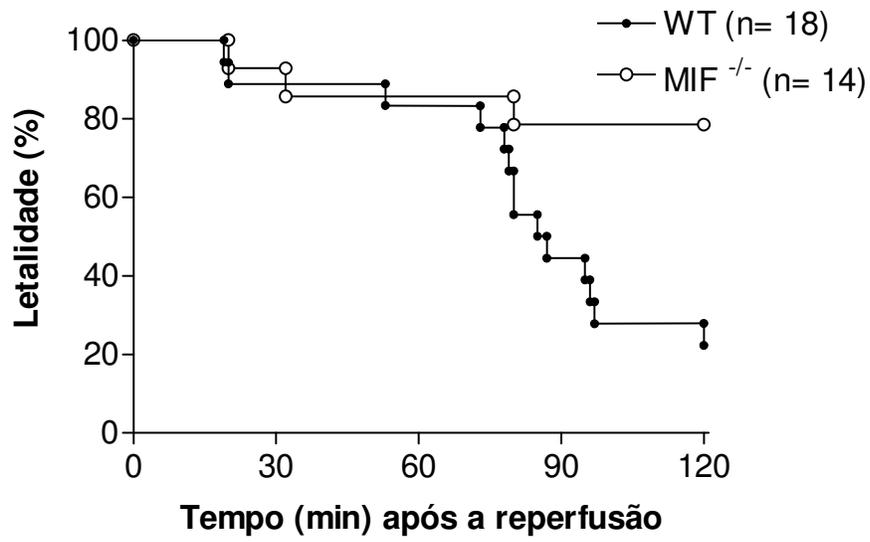


Figura 9: Curva de letalidade entre os animais selvagens (WT) e deficientes em MIF (MIF^{-/-}) após isquemia e reperfusão intestinal. Após a lesão, os animais deficientes em MIF apresentam maior sobrevivência quando comparados com os animais selvagens.

5.2 Importância da citocina MIF no modelo de infecção pelo vírus da Dengue

5.2.1 A infecção pelo vírus da Dengue leva a um aumento da liberação da citocina MIF circulante

É sabido que a infecção pelo vírus da Dengue causa uma grave resposta inflamatória no organismo, com a produção de variados mediadores inflamatórios, principalmente quando a doença envolve o quadro de Dengue Hemorrágico (Lei *et al.*, 2001). Neste contexto, Chen *et al* (2006) demonstraram um aumento da concentração da citocina MIF no soro de pacientes infectados com esse vírus, além de correlacionar a presença dessa citocina como indicativo de maior gravidade dessa doença.

No presente, trabalho foi avaliado a concentração de MIF no soro de animais selvagens infectados com o vírus da Dengue. Conforme pode ser visto na Figura 10, no sétimo dia após a infecção, há um significativo aumento dos níveis dessa citocina quando comparado com os animais não infectados. Esse dado sugere que a citocina MIF participa no desenvolvimento da resposta inflamatória induzida por essa infecção.

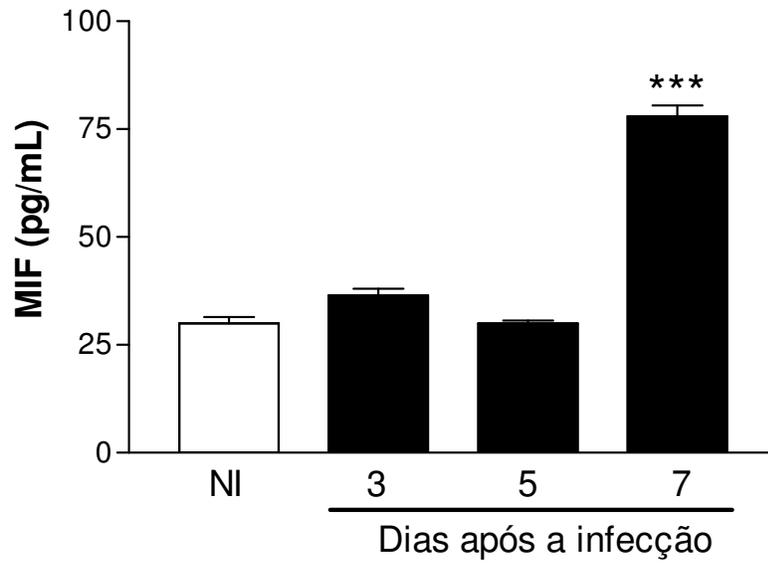


Figura 10: Concentração da citocina MIF no soro de animais infectados com o vírus da Dengue. No sétimo dia após a infecção, os níveis de MIF no soro tiveram seus valores significativamente aumentados em relação ao grupo de animais não infectados e também quando comparados com o terceiro e o quinto dias após a infecção. *** $p < 0,001$.

5.2.2 Animais deficientes em MIF apresentam menor produção de citocinas e quimiocinas após infecção

A produção de mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias e também quimiocinas, responsáveis pelo recrutamento celular para o local da inflamação, é essencial para o combate às infecções que acometem um organismo (Schluter & Deckert, 2000). Porém, uma exacerbação dessa resposta inflamatória compromete a integridade desse organismo, o que, em muitos casos, pode levar ao óbito do paciente. Após a infecção pelo vírus da Dengue neste modelo, há aumento na produção de várias citocinas e quimiocinas, principalmente no dia 7 após a infecção (Figuras 11 e 12).

Dentre as citocinas e quimiocinas já descritas por terem importante participação na patogênese da Dengue, avaliamos nesse trabalho a produção de:

(i) Interferon (IFN)- γ : O IFN- γ possui função pró-imune em alguns modelos (Samuel, 2001), uma vez que tem fundamental papel na ativação de macrófagos. Em nosso modelo, pudemos verificar um aumento significativo da concentração de IFN- γ no soro e no baço no sétimo dia após a infecção em animais selvagens (Figuras 11A e 11B). Nos animais deficientes em MIF, os níveis de IFN- γ mantiveram-se ao nível basal em todos os dias analisados tanto no baço quanto no soro.

(ii) Interleucina (IL)- 6: Já foi demonstrado um aumento de IL-6 no soro de pacientes com Dengue (Lei *et al.*, 2001) sendo que essa é liberada principalmente por linfócitos B e monócitos (Lin *et al.*, 2002). De acordo com a figura 11C, há um significativo aumento dessa citocina nos animais selvagens no sétimo dia após a infecção em relação aos animais não infectados. Este aumento não foi observado nos animais deficientes em MIF nos dias analisados.

(iii) Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α : Trabalhos mostram que a citocina TNF- α tem importante participação no desencadeamento da resposta inflamatória após a infecção pelo vírus da Dengue (Chaturvedi *et al.*, 2000; Atrasheuskaya *et al.*, 2003). No presente estudo, houve um aumento dos níveis de TNF- α em todos os grupos de animais após a infecção (Figura 11D). Não houve diferença na quantidade de TNF- α entre os animais deficientes em MIF e selvagens em todos os dias analisados.

(iv) MCP-1: De acordo com a figura 12A, houve um aumento na quantidade de MCP-1 (CCL2) no 3º dia após a infecção tanto nos animais selvagens quanto nos animais deficientes em MIF. No 5º e no 7º dias analisados, houve uma redução desses valores nos animais deficiente em MIF enquanto que os mesmos permaneceram elevados nos animais selvagens em relação aos animais não infectados.

(v) RANTES: Já foi descrito a participação da quimiocina RANTES (CCL5), na patogênese da Dengue (Lei *et al.*, 2001) e também na infecção pelo vírus da Encefalite Japonesa, representante da mesma família do dengue (Chen *et al.*, 2004). No presente estudo, houve aumento significativo desta quimiocina nos animais selvagens a partir do 5º dia após a infecção (Figura 12B). Nos animais deficientes em MIF não houve esse aumento em nenhum dos dias analisados.

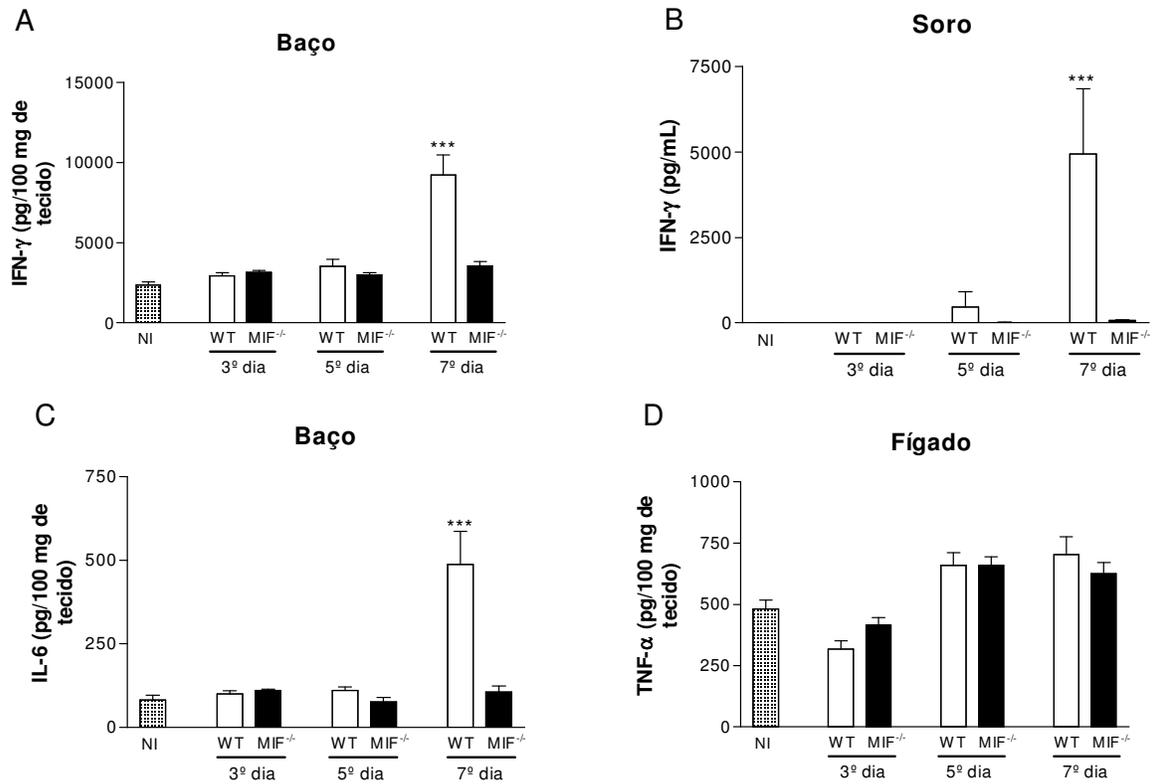


Figura 11: Análises da concentração de citocinas em diferentes órgãos após infecção pelo vírus da Dengue. Foi verificado um aumento na concentração de IFN- γ tanto no baço (A) quanto no soro (B) apenas nos animais selvagens (WT) no sétimo dia após a infecção. Da mesma forma, houve um aumento dos níveis de IL-6 no baço. Em relação à citocina TNF- α , houve um crescente aumento ao longo dos dias analisados, sendo que não houve diferença entre os animais WT e deficientes em MIF (MIF^{-/-}) *** $p < 0,001$ (WT x NI ou MIF^{-/-}). NI: animais não infectados.

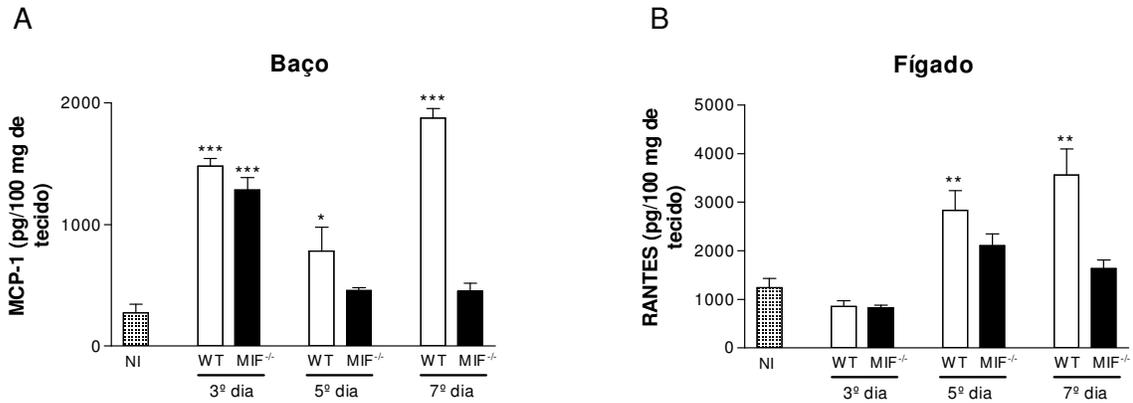


Figura 12: Análise da concentração das quimiocinas MCP-1 e de RANTES no baço e fígado, respectivamente, após a infecção pelo vírus da Dengue. No 3º dia após a infecção, há um significativo aumento de MCP-1 (A) em ambos os grupos estudados, sendo que estes valores diminuem nos animais deficientes em MIF (MIF^{-/-}) a partir do 5º dia, mantendo-se assim no último dia analisado, enquanto que nos animais selvagens (WT), os níveis continuam elevados. No sétimo dia após a infecção, os animais WT apresentaram alta concentração de RANTES (B) em relação aos animais não infectados. * p<0,05 e ** p<0,01 (WT x NI) e *** p<0,001 (WT ou MIF^{-/-} x NI). NI: animais não

5.2.3 Animais deficientes em MIF apresentam menor recrutamento celular no pulmão após infecção pelo vírus da Dengue

O pulmão é um órgão com altas probabilidades de comprometimento de suas funções após uma resposta inflamatória sistêmica devido à sua arquitetura (Burns *et al.*, 2003). Conforme observado na Figura 13, os animais selvagens infectados com o dengue apresentaram grande influxo neutrofilico (expresso em unidades relativas no ensaio de MPO) no pulmão no sétimo dia após a infecção. Nos animais deficientes em MIF, a quantidade de neutrófilos permaneceu baixa em todos os dias analisados. Este aumento de infiltrado celular nos animais selvagens pode ser explicado pelo aumento também nas concentrações das quimiocinas MIP-2 e KC, importantes para o recrutamento de neutrófilos. Em acordo com a inibição do recrutamento de neutrófilos nos animais deficientes em MIF, não houve aumento nos níveis dessas quimiocinas em nenhum dos dias analisados, mantendo-se em valores basais.

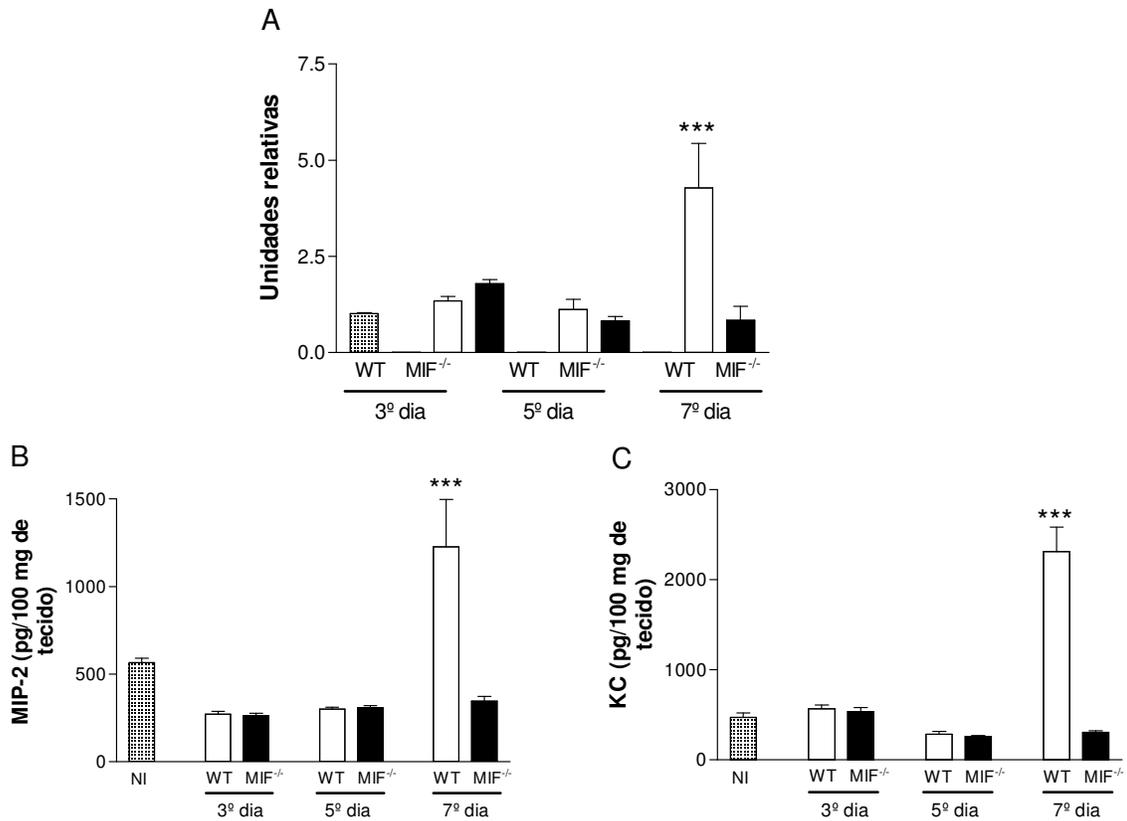


Figura 13: Avaliação do infiltrado neutrofílico e da concentração das quimiocinas MIP-2 e KC no pulmão após infecção pelo vírus da Dengue. Os animais selvagens (WT) infectados apresentaram aumento do infiltrado de neutrófilos (A) no pulmão no sétimo dia após a infecção. Em concordância com este dado, há aumento dos níveis tanto de MIP-2 (B) quanto de KC (C) no último dia analisado em comparação aos animais não infectados. Em relação aos animais deficientes em MIF (MIF^{-/-}), não houve aumento significativo nos níveis das quimiocinas analisadas bem como no infiltrado de neutrófilos em todos os dias analisados. *** p<0,001. NI: animais não infectados.

5.2.4 Animais deficientes em MIF mantêm valores basais de hematócrito e de plaquetas

A forma mais grave da Dengue, ou seja, a Dengue Hemorrágica, tem como manifestações clínicas um comprometimento da permeabilidade vascular acompanhada por anormalidades na hemostasia (Lei *et al.*, 2001). A hemoconcentração é um indicativo de perda de volume intravascular, o que pode levar à síndrome de choque. Esse sinal pode ser diagnosticado através do teste de hematócrito, onde o aumento de seu valor corresponde a um aumento na perda de líquido para o tecido. Como podem ser verificados na Figura 14A, os animais selvagens apresentaram um valor crescente de hematócrito após a infecção pelo vírus da Dengue, fato esse não observado nos animais deficientes em MIF, onde os valores foram equivalentes aos observados nos animais não infectados.

Outra característica que acompanha o quadro de Dengue Hemorrágico é uma diminuição no número de plaquetas circulantes. É sugerido que, após a infecção pelo vírus da Dengue, há uma redução na síntese plaquetária pela medula óssea, resultando em trombocitopenia (Saito *et al.*, 2004). Conforme visto na Figura 14B, a partir do quinto dia após a infecção, a quantidade de plaquetas apresentou maior redução nos animais selvagens (aproximadamente 60%) em relação aos animais deficientes em MIF (aproximadamente 21%) quando comparados com o valor obtido nos animais não infectados. Isso demonstra que a presença de MIF no organismo contribui de maneira intensa no desenvolvimento de alterações comuns em situações clínicas causadas por essa infecção.

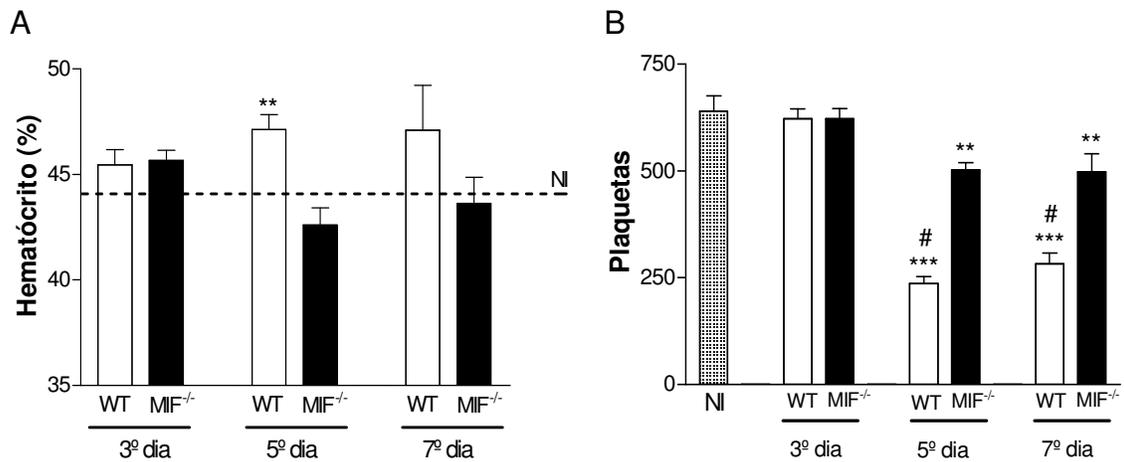


Figura 14: Determinação do valor de hematócrito e da concentração de plaquetas circulantes após infecção pelo vírus da Dengue. Os animais deficientes em MIF (MIF^{-/-}) mantiveram valores basais de hematócrito (A) após a infecção com o vírus da Dengue em todos os dias analisados, ao passo que os animais selvagens (WT) apresentaram este valor aumentado no quinto dia de infecção. Em relação à quantidade de plaquetas circulantes (B), foi observada pequena queda nos animais MIF^{-/-} (5º e 7º após a infecção) em relação aos animais não infectados (NI) quando comparados com os animais WT, onde houve diminuição bastante acentuada neste valor em relação ao grupo controle (5º e 7º após a infecção). ** p<0,01 (WT x NI – hematócrito ou MIF^{-/-} x NI – número de plaquetas; *** p<0,001 (WT x NI) e # p<0,001 (WT x MIF^{-/-}).

5.2.5 Animais deficientes em MIF apresentam menor viremia e carga viral no baço

A partir do momento da infecção, o vírus começa a se replicar em vários órgãos, como por exemplo, o baço. Esse período de incubação dura cerca de quatro a sete dias em humanos até que o vírus volte à corrente sanguínea, instalando-se a viremia. O aumento da gravidade da doença é acompanhado também por um aumento no índice de viremia, principalmente quando há o quadro de Dengue Hemorrágico (Vaughn *et al.*, 2000).

De acordo com a Figura 15A, pode-se perceber que há menor viremia no sétimo dia após a infecção em camundongos deficientes em MIF em relação aos animais selvagens. Da mesma forma, no baço também houve menor quantidade de vírus nos animais deficientes em MIF ao longo dos dias analisados (Figura 15B).

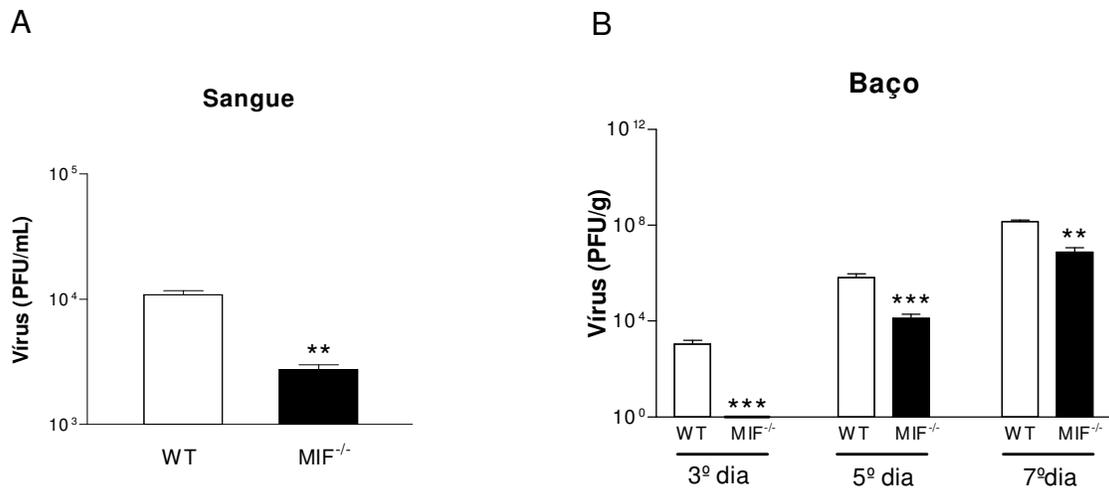


Figura 15: Quantificação de unidades formadoras de placas (PFU) presente no sangue e no baço dos animais infectados com o vírus da Dengue. No sétimo dia após a infecção pelo vírus da Dengue, os animais deficientes em MIF (MIF^{-/-}) apresentaram menor viremia no soro (A) em comparação com os animais selvagens (WT). Em relação ao baço (B), em todos os dias analisados, houve menor quantidade de vírus nos animais MIF^{-/-} em comparação com os animais WT. quando comparados com os animais selvagens (WT). ** p<0,01 (WT x MIF^{-/-}) e *** p<0,001 (WT x MIF^{-/-}).

5.2.6 Animais deficientes em MIF apresentam um atraso na letalidade após infecção pelo vírus da Dengue

Analisando os resultados apresentados anteriormente em relação à infecção pelo vírus da Dengue, é nítido que há uma grande redução de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, redução nos sinais clínicos, como hemoconcentração e plaquetopenia, e também redução no infiltrado celular em animais deficientes em MIF quando comparados com animais selvagens. Estes dados nos indicam que MIF parece contribuir de maneira significativa para o desenvolvimento da resposta inflamatória provocada por essa infecção. Assim, foi realizado um teste de letalidade, onde os animais foram observados por até 13 dias após a infecção pelo vírus da Dengue.

Conforme pode ser verificado na Figura 16, os animais deficientes em MIF apresentaram um atraso na letalidade quando comparados com o grupo controle. No oitavo dia após a infecção, todos os animais selvagens já estavam mortos, ao passo que no mesmo período, aproximadamente 65% dos animais deficientes em MIF ainda permaneciam vivos. Apenas entre o décimo segundo e o décimo terceiro dias após a infecção é que houve a morte dos demais animais.

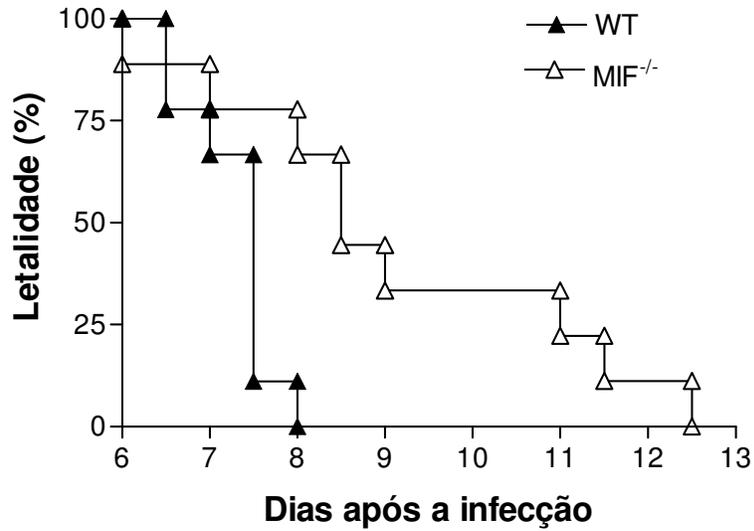


Figura 16: Curva de letalidade dos animais após infecção pelo vírus da Dengue. Os animais deficientes em MIF (MIF^{-/-}) apresentam um atraso na letalidade após a infecção com o vírus da Dengue. No oitavo dia após a infecção, nenhum animal selvagem (WT) sobreviveu enquanto que, no mesmo período, aproximadamente 70% dos animais MIF^{-/-} ainda permaneciam vivos.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Baseado em vários trabalhos na literatura, onde são atribuídas a MIF importantes funções no desencadeamento de variadas respostas inflamatórias (Calandra *et al.*, 1994; Bozza *et al.*, 1999; Ohkawara *et al.*, 2005), neste trabalho foi avaliada a participação de MIF nos processos inflamatórios induzidos por isquemia e reperfusão intestinal e também por infecção pelo vírus da Dengue. Ambos os modelos estudados compartilham mediadores com potenciais atividades inflamatórias. Dentre esses mediadores, a citocina TNF- α recebe especial atenção, haja vista sua importante participação na patogênese de ambos os processos, onde o tratamento experimental com anticorpo anti-TNF- α foi eficaz na diminuição de lesão em ambos os modelos (Souza *et al.*, 2001; Atrasheuskaya *et al.*, 2003). Outro aspecto em comum em ambos os modelos é a disfunção de células endoteliais. Estas células são altamente susceptíveis a processos isquêmicos e também a infecção pelo vírus da Dengue, os quais podem provocar alterações na permeabilidade vascular (Carden *et al.*, 2000; Lei *et al.*, 2001; Dewi *et al.*, 2004). A lesão endotelial em ambos os modelos leva à produção de variados mediadores inflamatórios, os quais agem de maneira autócrina, parácrina ou endócrina. Em casos mais graves, quadros de hemorragia e grande produção de mediadores inflamatórios (I/R e Dengue) e também de hemoconcentração (Dengue) são fatores importantes no quadro de choque, situação responsável pelo alto índice de mortalidade dessas duas doenças (Souza & Teixeira, 2005; Lei *et al.*, 2001).

Por definição, a síndrome de choque é caracterizada por uma falha no sistema circulatório, resultando em uma inapropriada perfusão tecidual, o que resulta em hipóxia celular (Graham & Parke, 2005). Pode ocorrer devido a uma hemorragia, falha no sistema cardíaco, em caso de sepse e também por anafilaxia. A citocina MIF parece contribuir de

maneira importante na indução desse quadro, principalmente em casos de sepse, onde é capaz de promover a formação de variados mediadores (Calandra *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005).

Em relação aos modelos estudados nesse trabalho, já foi relatada a presença de MIF no tecido miocárdio após isquemia e reperfusão cardíaca (Yu *et al.*, 2002) e também no soro de pacientes infectados pelo vírus da Dengue (Chen *et al.*, 2006). Neste contexto, foi verificado, no presente trabalho, que tanto nos animais submetidos à isquemia e reperfusão intestinal quanto nos animais infectados pelo vírus da Dengue houve um considerável aumento nos níveis de MIF circulantes (Figuras 3 e 10). Baseado nas atividades pró-inflamatórias relatadas a essa citocina e também na presença dela em modelos semelhantes, o aumento em relação aos níveis basais sugere a participação de MIF nas respostas inflamatórias instaladas.

Conforme citado acima, lesões a células endoteliais resultam em alterações na permeabilidade dos vasos sanguíneos em ambos os modelos. A participação de mediadores inflamatórios, como as citocinas (Hopkins, 2003), produtos do ácido araquidônico (Bogatcheva *et al.*, 2005) e moléculas do sistema de complemento (Bossi *et al.*, 2004) são importantes para esse processo. Em relação à isquemia e reperfusão intestinal, alterações na produção ou ativação de alguns mediadores como moléculas de adesão (Souza *et al.*, 2000), síntese de citocinas via ativação do fator de transcrição NF- κ B (Souza *et al.*, 2005; Tial *et al.*, 2006), ativação de moléculas do sistema de complemento e também a síntese de produtos do ácido araquidônico (Mallick *et al.*, 2004) contribuem diretamente no processo de infiltração celular. Uma vez no tecido, os neutrófilos, além de promoverem a liberação de citocinas no local, liberam compostos potencialmente tóxicos (radicais livres e/ou enzimas com atividade de peroxidase) que acabam danificando a estrutura das células

endoteliais com conseqüente amplificação da resposta inflamatória (Souza *et al.*, 2000, 2004a).

Em acordo com trabalhos anteriores (Souza *et al.*, 2003a, b, 2003b), os animais selvagens, após o processo de isquemia e reperfusão intestinal, apresentaram um aumento significativo na permeabilidade vascular tanto no intestino quanto no pulmão e elevado nível de hemorragia no intestino, ao passo que os animais deficientes em MIF se comportaram de maneira análoga aos animais falso-operados, mantendo os valores ao nível basal. Nos cortes histológicos, um aumento desses parâmetros inflamatórios também está mais evidente nos animais selvagens, com grande preservação nos animais deficientes em MIF. Esses dados sugerem uma participação de MIF em células endoteliais, onde haveria uma ação direta ou mediante a liberação de outros compostos, como TNF- α .

É comum neste tipo de lesão o comprometimento de órgãos distantes, no caso o pulmão (Souza *et al.*, 2000, 2003a ; Tian *et al.*, 2006). Nesse órgão, modificações como o aumento do infiltrado celular, podem levar ao desenvolvimento da síndrome de angústia respiratória aguda, devido a liberação de mediadores, principalmente pelo neutrófilo recrutado, os quais provocam lesões estruturais importantes (Mallick *et al.*, 2004). Acredita-se que essas alterações ocorrem, principalmente, devido à estrutura do tecido pulmonar. Esse órgão possui capilares sanguíneos com o lúmen extremamente estreito, o que facilita a diapedese de neutrófilos para o tecido, com menor participação de moléculas de adesão em relação a outros órgãos (Burns *et al.*, 2003). Assim, com o desenvolvimento de uma inflamação sistêmica, aumenta-se o número de mediadores inflamatórios na circulação e, como conseqüência, um maior infiltrado celular pode comprometer a estrutura dos vasos locais em virtude da liberação de mais mediadores inflamatórios.

Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstram uma importante participação de neutrófilos no desencadeamento do processo inflamatório induzido por isquemia e

reperfusão intestinal (Souza *et al.*, 2001, 2004a). Assim, foi avaliada a quantidade de neutrófilos (através do ensaio enzimático de mieloperoxidase) infiltrados no intestino e no pulmão após essa lesão. Conforme esperado, o número de neutrófilos infiltrados no intestino e no pulmão foi maior nos animais selvagens após a lesão de reperfusão em comparação com os animais falso-operados. De forma surpreendente, o infiltrado celular no intestino e no pulmão também foi maior entre os grupos de animais deficientes em MIF quando comparados com o grupo falso-operados. Esse dado é representado nos cortes histológicos, onde há maior infiltrado celular em ambos os órgãos tanto nos animais selvagens quanto nos animais deficientes em MIF em relação ao grupo falso-operado. Em concordância com esse resultado, foi observado um aumento na concentração da quimiocina KC, importante para o recrutamento de neutrófilos (Abbas & Lichtman, 2005), no intestino após a lesão de reperfusão (WT: $103,3 \pm 3 \times 1069 \pm 79$; MIF^{-/-}: $105 \pm 56 \times 828 \pm 139$ pg/mL no grupo falso-operado em relação ao grupo de isquemia e reperfusão intestinal, respectivamente).

O aumento no infiltrado celular observado nos animais deficientes em MIF após isquemia e reperfusão intestinal se contrapõe com alguns dados publicados na literatura. Gregory *et al.* (2004) demonstraram o envolvimento de MIF na indução de P-selectina após a administração de LPS, onde animais deficientes em MIF apresentavam menor expressão dessa molécula de adesão com conseqüente redução no infiltrado leucocitário. Em outro trabalho foi demonstrado que MIF atrasa o processo de apoptose de neutrófilos *in vitro* (Bauman *et al.*, 2003). Em recente trabalho, pesquisadores observaram que a superexpressão de MIF aumenta a quantidade de MPO no intestino em modelo de colite (Ohkawara *et al.*, 2006). O aumento no infiltrado celular nos animais deficientes em MIF não condiz com um maior número de células circulantes em relação aos animais selvagens, visto que não houve diferença no número de células totais observadas através de esfregaço

sanguíneo (dado não mostrado). Assim, uma explicação para o que foi observado compreenderia em uma diminuição da ativação dos neutrófilos infiltrados. Essas células, ao migrarem para o tecido, fazem interação com células residentes mediante a liberação de alguns mediadores (Lefkowitz & Lefkowitz, 2001), dentre eles o PAF (Souza *et al.*, 2003b). Dessa forma, uma perda de capacidade dessa interação poderia reduzir a liberação de TNF- α por macrófagos.

Modificações na permeabilidade vascular são bastante comuns na infecção pelo vírus da Dengue, sendo mais notória no quadro de Dengue Hemorrágico. O vírus da Dengue é capaz de infectar células endoteliais levando a produção de citocinas e quimiocinas como IL-6, IL-8 e RANTES, potenciais mediadores no aumento da permeabilidade vascular (Huang *et al.*, 2000). Outro fator importante refere-se a uma diminuição da produção de plaquetas (Saito *et al.*, 2004) e também a presença de anticorpos anti-plaquetários (Lei *et al.*, 2001), instalando-se o quadro de trombocitopenia. De acordo com a figura 14, pode-se observar que o modelo mimetiza o quadro de Dengue Hemorrágico, com considerável aumento de hematócrito e também na diminuição de plaquetas circulantes nos animais selvagens. Nos animais deficientes em MIF não houve variação significativa no número de plaquetas e no valor de hematócrito em relação ao grupo não infectado, o que sugere que MIF é importante para essa alteração provocada pela infecção.

Clinicamente, são bem descritas manifestações como hemoconcentração, principalmente no quadro de dengue hemorrágico (Rigau-Perez & Laufer, 2006). Basicamente, isso ocorre devido um aumento de permeabilidade vascular, onde um extravasamento de plasma para o tecido provocaria uma maior concentração de hemácias no sangue. Com o quadro de hemoconcentração, a circulação de elementos sanguíneos fica prejudicada pela perda de mobilidade dos mesmos. O seqüestro de plaquetas para o tecido

aumenta a possibilidade de hemorragia, uma vez que essas células são fundamentais para o processo de coagulação. Por isso, não é recomendável a administração de ácido acetilsalicílico para combater os sintomas da Dengue, que são comuns a outras doenças. A aspirina contribui para a redução da produção de tromboxano A₂, principalmente em plaquetas. Este produto do ácido araquidônico tem papel importante na agregação plaquetária, por auxiliar no processo de coagulação (Rang *et al.*, 2004).

Em relação ao infiltrado leucocitário, após a infecção pelo vírus da Dengue, foi demonstrado que houve um aumento significativo de neutrófilos no pulmão de animais selvagens no sétimo dia após a infecção. As quimiocinas analisadas neste órgão, KC e MIP-2, importantes para o recrutamento de neutrófilos (Abbas & Lichtman, 2005), encontram-se aumentadas apenas no sétimo dia após a infecção nos animais selvagens, o que se superpõe com o observado no infiltrado celular. Em relação aos animais deficientes em MIF, a quantidade de neutrófilos no órgão permaneceu baixa nos três dias analisados. Esse resultado pode ser explicado pelos valores basais de KC e MIP-2 após a infecção pelo vírus da Dengue.

Com os resultados acima, é notório a contradição entre o aumento de infiltrado de neutrófilos após isquemia e reperfusão intestinal e a permanência de valores basais após infecção pelo vírus da Dengue nos animais deficientes em MIF. Como citado anteriormente, uma disfunção na interação neutrófilo-macrófago diminuiria a capacidade do macrófago de produzir TNF- α e conseqüentemente diminuir lesões e letalidade induzida por isquemia e reperfusão intestinal nos animais deficientes em MIF. Em relação à infecção pelo vírus da Dengue, o maior infiltrado de neutrófilos no sétimo dia analisado nos animais selvagens pode ser uma resposta à produção de quimiocinas (KC e MIP-2), sendo uma resposta secundária ao aumento na quantidade de vírus presente na circulação desses animais.

A detecção dos níveis de citocinas e quimiocinas teciduais e circulantes é um importante meio para se entender diversos processos inflamatórios, seja em modelos experimentais, seja em casos clínicos. Essas classes de proteínas são subdivididas em anti- e pró-inflamatórias, em que a análise de suas concentrações é útil para um diagnóstico (Hanada & Yoshimura, 2002). Em relação à isquemia e reperfusão intestinal, foi verificado um considerável aumento na quantidade de TNF- α no intestino, pulmão e soro de animais selvagens após a lesão, fato este que não aconteceu nos animais deficientes em MIF. Pelo contrário, nestes últimos, os níveis de TNF- α permaneceram baixos ou não detectáveis, como nos animais falso-operados. Este dado é condizente com outros trabalhos que relatam um importante papel de MIF na indução da liberação de TNF- α (Bozza *et al.*, 1999; Al-Abed *et al.*, 2005). Por sua vez, TNF- α contribui para um aumento na permeabilidade vascular (Souza *et al.*, 2004a, 2005). São capazes de induzir a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, contribuindo para o recrutamento celular e estimulam a liberação de produtos do ácido araquidônico, como as prostaciclina, que provocam vasodilatação (potencialmente importante no aumento de permeabilidade vascular) (Aggarwal, 2003). A presença de elevadas quantidades de TNF- α na circulação sanguínea compromete o funcionamento normal de órgãos distantes, onde a denominação de síndrome da resposta inflamatória sistêmica é parcialmente atribuída a essa citocina (Souza *et al.*, 2002). Dessa maneira, a menor resposta inflamatória desencadeada nos animais deficientes em MIF após isquemia e reperfusão intestinal pode estar relacionada às concentrações basais de TNF- α observadas.

No caso da infecção pelo vírus da Dengue, foi avaliada a quantidade de citocinas e de quimiocinas em órgãos que são susceptíveis a infecção por esse vírus. O vírus da Dengue é capaz de infectar tanto o baço quanto o fígado, onde há liberação de mediadores inflamatórios na circulação (Khongphatthanayothin *et al.*, 2005). No baço, importante

órgão linfóide, e também no soro, nota-se que há uma grande liberação de IFN- γ no sétimo dia de infecção nos animais selvagens, com baixa quantidade nos animais deficientes em MIF em todos os dias analisados. A família dos Interferons pode ser dividida em duas classes: tipo I (IFN- α e β) e tipo II (IFN- γ). Estas moléculas são reconhecidas como potentes agentes anti-virais, principalmente os do tipo I, e vários tipos celulares são capazes de induzi-las quando há uma infecção viral (Samuel, 2001). O aumento observado de IFN- γ no sétimo dia após a infecção apenas nos animais selvagens pode ser relatado como uma resposta secundária à alta concentração de vírus nesses animais.

Ainda no baço, nota-se que há um grande aumento de IL-6 no sétimo de após a infecção nos animais selvagens, o que não aconteceu entre os animais deficientes em MIF. Semelhante a esse dado, Lin *et al* (2002) demonstraram que células B e monócitos infectados pelo vírus da Dengue são capazes de induzir a liberação de IL-6. Nesse contexto, os níveis de MCP-1, importante quimiocina para o recrutamento de monócitos (Abbas & Lichtman, 2005), estão elevados nos três dias analisados nos animais selvagens, enquanto que apenas no terceiro dia após a infecção houve um aumento desses valores no grupo de animais deficientes em MIF. Dessa forma, a chegada dessas células no tecido contribuirá para um aumento na liberação de mediadores inflamatórios, como IL-6, promovendo uma amplificação da resposta inflamatória. Assim, a modulação do recrutamento de monócitos e da produção de citocinas relatadas são pontos importantes através dos quais MIF exerce seu papel pró-inflamatório, uma vez que tanto IL-6 quanto MCP-1 são potenciais moléculas pró-inflamatórias.

Outro órgão estudado foi o fígado. Vários trabalhos na literatura apontam o fígado como um dos alvos do vírus da Dengue (Jessie *et al.*, 2004; Shresta *et al.*, 2004; Khongphatthanayothin *et al.*, 2005). Dessa forma, pode ser diagnosticado hepatomegalia e um aumento de proteínas do fígado no soro após a infecção (Seneviratne *et al.*, 2006).

Ainda, alterações de ordem histológica como esteatose microvesicular, necrose hepatocelular, destruição e hiperplasia de células de Kupffer bem como grande infiltrado celular são comuns nesse órgão em pacientes infectados com Dengue (Seneviratne *et al.*, 2005). Assim, o fígado é um importante órgão para a liberação de mediadores inflamatórios após a infecção, como demonstrados através de estudos *in vitro* e *in vivo* (Lin *et al.*, 2000; Quaresma *et al.*, 2006)

Dentre os mediadores analisados neste estudo, houve um aumento significativo nos níveis da quimiocina RANTES no fígado a partir do quinto dia após a infecção nos animais selvagens, enquanto que nos animais deficientes em MIF, o aumento observado não foi significativo em relação aos animais não infectados. Essa quimiocina está diretamente envolvida na patogênese de várias infecções virais (Huang *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004). Tem por função a quimioatração por células T, monócitos, eosinófilos e também basófilos (Abbas & Lichtman, 2005). Em concordância com os nossos dados, uma alta expressão dessa quimiocina foi vista em estudo *in vitro* com o sorotipo 2 do dengue (Lin *et al.*, 2000) e também em grande quantidade em culturas de células neuronais após infecção pelo vírus da Encefalomielite Japonesa, pertencente à mesma família do Dengue (Chen *et al.*, 2004).

Em relação à citocina TNF- α , houve um crescente aumento na sua concentração após a infecção pelo vírus da Dengue tanto nos animais selvagens quanto nos animais deficientes em MIF ao longo dos dias analisados. Este dado contradiz aos dados da literatura onde MIF é importante indutor da liberação de TNF- α (Bozza *et al.*, 1999; Al-Abed *et al.*, 2005). Este dado também é contraditório com o observado após a resposta inflamatória induzida por isquemia e reperfusão intestinal, onde os animais deficientes em MIF apresentaram valores basais de TNF- α após a lesão. Dados da literatura demonstram que o vírus da Dengue pode se multiplicar em vários tipos celulares, como células dendríticas (Kwan *et al.*, 2005), células endoteliais (Dewi *et al.*, 2004), monócitos,

macrófagos, células T e B (Lin *et al.*, 2002) bem como células hepáticas (Seneviratne *et al.*, 2006). Dessa forma, um aumento na produção de TNF- α não envolveria a participação da citocina MIF.

Outra análise realizada foi a quantificação viral. Além da viremia, órgãos como o baço, são susceptíveis ao ataque do vírus da Dengue. Para que haja a replicação viral, é preciso uma susceptibilidade e permissividade da célula em questão, ou seja, a célula deve se submeter a dois fatores: é preciso que o vírus entre na célula e também é necessário que mediadores intracelulares capacitem o vírus a se multiplicar (Fields *et al.*, 1996). Para infectar um determinado tipo celular, o vírus da Dengue precisa, primeiramente, atacar a superfície celular. Um importante fator para a infecção do vírus da Dengue seria a participação de células dendríticas, as quais, através da expressão de uma proteína de membrana específica (DC-SIGN), permitem a entrada do vírus, estabelecendo um contato inicial dessas células com células T (Navarro-Sánchez *et al.*, 2005). Em casos de nova infecção com outro sorotipo, o receptor da porção Fc de anticorpo na superfície celular parece facilitar a entrada do vírus na célula (Stephenson, 2005).

Os animais deficientes em MIF apresentaram menor viremia (detectável apenas no sétimo dia após a infecção) além de apresentarem menor carga viral no baço (em todos os dias estudados) quando comparados com os animais selvagens. Essa maior carga viral detectada nos animais selvagens pode ser uma consequência do processo inflamatório instalado após a infecção, ou seja, uma elevada e desordenada resposta inflamatória iniciada a partir do momento da infecção pode comprometer importantes mecanismos de defesa do hospedeiro, como por exemplo, as células endoteliais. Vaughn *et al* (2000) demonstraram que uma alta concentração do vírus da Dengue no soro de pacientes infectados está diretamente relacionada com uma maior gravidade da doença. Conforme observado no conjunto de parâmetros inflamatórios estudados, onde níveis de citocinas,

quimiocinas e hematócrito estão, de maneira geral, aumentados nos animais selvagens, nos quais também há o quadro de trombocitopenia grave, pode haver um comprometimento na resposta imune do organismo para combater a infecção. O quadro de choque instalado compromete a circulação de células diretamente envolvidas no combate às infecções, ou seja, há uma produção exarcebada de mediadores inflamatórios que culmina em lesões por todo o organismo (Wang *et al.*, 2005). Dessa forma, haveria uma deficiência no combate à replicação viral pelo organismo, em que o vírus da Dengue consegue escapar do sistema imune, fazendo assim, uma multiplicação facilitada. Em virtude da redução de viremia nos animais deficientes em MIF, ferramentas como anticorpos contra essa citocina podem ser de grande valia no combate à replicação viral.

Toda a resposta inflamatória instalada, tanto no modelo de isquemia e reperfusão intestinal quanto na infecção pelo vírus da Dengue, está relacionado com a letalidade dos animais. Com isso, a observação desse fato tem grande impacto face ao desenvolvimento de medicamentos que combatam ou diminuam a ação dos mediadores responsáveis pela patogênese dessas doenças. Em relação ao modelo de isquemia e reperfusão intestinal, os animais deficientes em MIF apresentam significativa diminuição na letalidade após a lesão quando comparados com os animais selvagens. Este dado pode estar diretamente envolvido com os níveis de TNF- α presentes no soro de animais selvagens, ausentes nos animais deficientes em MIF. Esse dado está de acordo com estudos prévios que demonstram uma relação direta entre a produção sistêmica de TNF- α e letalidade (Souza *et al.*, 2001, 2002). Em relação ao modelo de infecção pelo vírus da Dengue, onde os animais deficientes em MIF apresentaram menor resposta inflamatória quando comparados com os animais selvagens, houve um atraso na letalidade nesses animais em relação ao outro grupo (animais selvagens). O fato de que não houve diminuição na letalidade nos animais deficientes em MIF pode ser explicado por um aumento em comum (WT e MIF^{-/-}) nos

níveis de TNF- α . Esse dado deve ser observado de maneira satisfatória, uma vez que no oitavo dia de infecção, todos os animais selvagens já haviam morrido, enquanto que aproximadamente 70% dos animais deficientes em MIF continuavam vivos.

Outro fator que poderia explicar apenas um atraso na letalidade, e não uma prevenção, seria a ausência da própria citocina MIF. Esse fato contraditório resume-se assim: MIF é extremamente importante para o desencadeamento de uma resposta inflamatória através da liberação de vários mediadores importantes para isso (Calandra & Roger, 2003). Nos primeiros momentos da infecção, a ausência de MIF impediria uma exacerbada resposta inflamatória provocada pelo vírus, o que pode ser explicado pela menor produção de mediadores inflamatórios em animais deficientes em MIF quando comparados a animais selvagens. A partir desse momento, quase todos os animais selvagens já morreram. Porém, a partir desse ponto (8^o ao 12^o dia após a infecção), o crescente aumento na quantidade de vírus no sangue e no baço nos animais deficientes em MIF observados principalmente no sétimo dia após a infecção estaria contribuindo para a letalidade desses animais. Como esses animais não expressam essa citocina, não haveria, portanto, uma linha de defesa que combata a infecção generalizada e, como consequência, o processo inflamatório se instala, de forma ineficaz, causando a morte dos mesmos. Esta explicação é baseada em um trabalho onde a administração de MIF recombinante em camundongos submetidos à sepse e desafiados com diferentes linhagens de bactérias aumentou a sobrevivência em relação ao grupo que não recebeu MIF recombinante (Pollak *et al.*, 2005).

Conforme visto neste estudo, a citocina MIF é importante no desencadeamento da resposta inflamatória tanto na lesão de reperfusão quanto na infecção pelo vírus da Dengue. As ações dessa citocina contribuem para um aumento nos parâmetros inflamatórios em ambos os modelos analisados. Dessa forma, a redução de inflamação nos

animais deficientes em MIF reflete em menor lesão e diminuição ou atraso na letalidade.

Portanto, no conjunto de resultados na literatura e os obtidos neste trabalho, a citocina MIF mostra-se ser de grande importância para o desenvolvimento de um processo inflamatório. Apesar da instalação do processo inflamatório ser necessária para o controle de uma infecção, uma exacerbação dessa resposta pode causar danos ao organismo. Assim, a utilização de fármacos que modulem a resposta inflamatória, como anticorpos anti-MIF, podem potencialmente ser utilizados como terapia no tratamento de doenças inflamatórias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 5ª Edição. Editora Elsevier. Capítulo 11. p264.

Aeberli D, Yang Y, Mansell A, Santos L, Leech M, Morand EF. Endogenous macrophage migration inhibitory factor modulates glucocorticoid sensitivity in macrophages via effects on MAP kinase phosphatase-1 and p38 MAP kinase. *FEBS Lett* 2006; 580, 974-981.

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; 3, 745-756.

Al-Abed Y, Dabideen D, Aljabari B, Valster A, Messmer D, Ochani M, Tanovic M, Ochani K, Bacher M, Nicoletti F, Metz C, Pavlov VA, Miller EJ, Tracey KJ. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *J Biol Chem* 2005; 280, 36541-36544.

Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 2003; 35, 33-42.

Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93,7849-7854.

Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* 2006; 148, 245-254.

Baumann R, Casaulta C, Simon D, Conus S, Yousefi S, Simon HU. Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *FASEB J* 2003; 17, 2221-2230.

Bloom BR, Bennett B. Mechanism of reaction *in vitro* associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966; 153, 80-82

Bloom R, Sol C, Wertheim-van Dillen P. Rapid purification of ribosomal RNAs from neutral agarose gels. *Nucleic Acids Res.* 1990; 25, 2195.

Bogatcheva NV, Sergeeva MG, Dudek SM, Verin AD. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc Res* 2005; 69, 107-127.

Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA.* 2006; 295, 2275-2285.

Bossi F, Fischetti F, Pellis V, Bulla R, Ferrero E, Mollnes TE, Regoli D, Tedesco F. Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex. *J Immunol* 2004; 173, 6921-6927.

Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, Daved JR. Target disruption of Migration Inhibitory Factor Gene Reveals Its Critical Role in Sepsis. *J. Exp. Med* 1999; 189, 341-346.

Bucala R. MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *FASEB J* 1996; 10, 1607-1613.

Burns AR, Smith CW, Walker DC. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol Rev* 2003; 83, 309-336.

Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is a important and previously unrecognized source of macrophage-migration inhibitory factor. *J. Exp. Med* 1994; 179,1895-1902.

Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, Heumann D, Mannel D, Bucala R, Glauser MP. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* 2000; 6, 164-170.

Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune responses to microbes. *Scand J Infect Dis* 2003; 35, 573-576.

Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3, 791-800.

Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190, 255-66.

Carvalho M, Benjamim C, Santos F, Ferreira S, Cunha F. Effect of mast cells depletion on the failure of neutrophil migration during sepsis. *Eur J Pharmacol* 2005; 525, 161-169.

Cavriani G, Oliveira-Filho RM, Trezena AG, da Silva ZL, Domingos HV, de Arruda MJ, Jancar S, Tavares de Lima W. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2004; 28, 241-249.

Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 28, 183-188.

Chaturvedi UC, Shrivastava R, Nagar R. Dengue vaccines: problems and prospects. *Indian J Med Res* 2005; 121, 639-652.

Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 31, 1634-1635.

Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, Lin YS, Wang ST, Shyu HW, Yeh TM. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74, 142-147.

Cicalese L, Sileri P, Green M, Abu-Elmagd K, Kocoshis S, Reyes J. Bacterial translocation in clinical intestinal transplantation. *Transplantation* 2001; 71, 1414-1417.

Clayton J. Scientists plan field tests for GM mosquitoes. *Lancet Infect Dis* 2006; 6, 191-192.

Cockayne E. Theophrastus Phillipus Aureolus Bombastus von Hohenheim (Paracelsus)--a short biography. *Br J Gen Pract.* 2002 Oct;52(483):876.

Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001; 94, 1133-1138.

David JR. Delayed hypersensitivity *in vitro*: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Nat Acad Sci USA* 1966; 56, 72-77.

Dewi BE, Takasaki T, Kurane I. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J Virol Methods* 2004; 121, 171-180.

Fields BN, Knipe DK, Howley PM. *Virology*. 3^a Edition. Volume 1. Lippincott-Raven Publishers. pp 101-102.

Fingerle-Rowson G, Koch P, Bikoff R, Lin X, Metz CN, Dhabhar FS, Meinhardt A, Bucala R. Regulation of macrophage migration inhibitory factor expression by glucocorticoids in vivo. *Am J Pathol* 2003; 162, 47-56.

Graham CA, Parke TR. Critical care in the emergency department: shock and circulatory support. *Emerg Med J* 2005; 22, 17-21.

Gregory JL, Leech MT, David JR, Yang YH, Dacumos A, Hickey MJ. Reduced leukocyte-endothelial cell interactions in the inflamed microcirculation of macrophage migration inhibitory factor-deficient mice. *Arthritis Rheum* 2004; 50, 3023-3034.

Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13, 413-421.

Hopkins SJ. The pathophysiological role of cytokines. *Leg Med (Tokyo)* 2003; 5, 45-57.

Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63, 71-75.

Huang KJ, Yang YC, Lin YS, Huang JH, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC, Lei HY. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol* 2006; 176, 2825-2832.

Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis* 2004; 189, 1411-1418.

Konishi E, Kosugi S, Imoto J. Dengue tetraivalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. *Vaccine* 2006; 24:2200-2207.

Kuenzler KA, Pearson PY, Schwartz MZ. Interleukin-11 enhances intestinal absorptive function after ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 2002; 37, 457-459.

Kwan WH, Helt AM, Maranon C, Barbaroux JB, Hosmalin A, Harris E, Fridman WH, Mueller CG. Dendritic cell precursors are permissive to dengue virus and human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2005; 79, 7291-7299.

Leech M, Lacey D, Xue JR, Santos L, Hutchinson P, Wolvetang E, David JR, Bucala R, Morand EF. Regulation of p53 by macrophage migration inhibitory factor in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48, 1881-1889.

Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Macrophage-neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunol Cell Biol* 2001; 79, 502-506.

Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* 2001, 8, 377-388.

Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 2003; 197,1467-1476.

Lin YL, Liu CC, Chuang JI, Lei HY, Yeh TM, Lin YS, Huang YH, Liu HS. Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology* 2000; 276, 114-126.

Lin YW, Wang KJ, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Liu CC, Chen SH.. Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J Virol* 2002 76, 12242-12249.

Lue H, Kapurniotu A, Fingerle-Rowson G, Roger T, Leng L, Thiele M, Calandra T, Bucala R, Bernhagen J. Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity. *Cell Signal* 2006; 18, 688-703.

Maaser C, Eckmann L, Paesold G, Kim HS, Kagnoff MF. Ubiquitous production of macrophage migration inhibitory factor by human gastric and intestinal epithelium. *Gastroenterology* 2002; 122, 667-680.

Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 2004; 49, 1359-1377.

Meyer-Siegler K. Macrophage migration inhibitory factor increases MMP-2 activity in DU-145 prostate cell. *Cytokine* 2000; 12, 914-921.

Meyer-Siegler KL, Vera PL. Substance P induced changes in CD74 and CD44 in the rat bladder. *J Urol* 2005; 173, 615-620.

Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained Mitogen-activated Protein kinase (MAPK) and Cytoplasmic Phospholipase A2 Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor. *J Biol Chem* 1999; 274, 18100-18106.

Mizue Y, Ghani S, Leng L, McDonald C, Kong P, Baugh J, Lane SJ, Craft J, Nishihira J, Donnelly SC, Zhu Z, Bucala R. Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102, 14410-14415.

Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G. Role of platelet activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol. Rev* 2000; 80, 1669-1699.

Morand EF. New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor. *Intern Med J* 2005; 35, 419-426.

Morand EF, Leech M, Bernhagen J. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5, 399-410.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 2005 3, 13-22.

Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L. Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res* 2005; 36, 425-435.

Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Asaka M, Sugiyama T. Pathophysiological roles of macrophage migration inhibitory factor in gastrointestinal, hepatic, and pancreatic disorders. *J Gastroenterol* 2005; 40,117-122.

Ohkawara T, Miyashita K, Nishihira J, Mitsuyama K, Takeda H, Kato M, Kondo N, Yamasaki Y, Sata M, Yoshiki T, Sugiyama T, Asaka M. Transgenic over-expression of macrophage migration inhibitory factor renders mice markedly more susceptible to experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 2005; 140, 241-248.

Onodera S, Nishihira J, Koyama Y, Majima T, Aoki Y, Ichiyama H, Ishibashi T, Minami A. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates the expression of interleukin-8 messenger RNA in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients: common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8 and interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 2004; 50, 1437-1447.

Paes MV, Barreto DF, Pinhão AT, Takiya CM, Côrtes LMC, Majerowics S, Barth OM. Ultrastructural aspects of mouse liver infected with dengue-2 virus. *Virus Reviews and Research* 2002; 2, 38-46.

Pollak N, Sterns T, Echtenacher B, Mannel DN. Improved resistance to bacterial superinfection in mice by treatment with macrophage migration inhibitory factor. *Infect Immun* 2005; 73, 6488-6492.

Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Takakura CF, Andrade HF Jr, Vasconcelos PF, Duarte MI. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity. *Virology* 2006; 345, 22-30.

Radstake TR, Sweep FC, Welsing P, Franke B, Vermeulen SH, Geurts-Moespot A, Calandra T, Donn R, van Riel PL. Correlation of rheumatoid arthritis severity with the genetic functional variants and circulating levels of macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum.* 2005 Oct;52(10):3020-9.

Ramos C, Sanchez G, Pando RH, Baquera J, Hernandez D, Mota J, Ramos J, Flores A, Llausas E. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol* 1998; 4, 465-468.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. 5ª Edição. Editora Elsevier. Capítulo 15. pp 246-276.

Riedemann NC, Guo RF, Gao H, Sun L, Hoesel M, Hollmann TJ, Wetsel RA, Zetoune FS, Ward PA. Regulatory role of C5a on macrophage migration inhibitory factor release from neutrophils. *J Immunol* 2004;173, 1355-1359.

Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1998; 19, 971-977.

Rigau-Perez JG, Laufer MK. Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992-1996: diagnosis and clinical alarm signals. *Clin Infect Dis* 2006; 42, 1241-1246.

Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 2001; 414, 920-924.

Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 2004; 113, 946-951.

Saito M, Oishi K, Inoue S, Dimaano EM, Alera MT, Robles AM, Estrella BD Jr, Kumatori A, Moji K, Alonzo MT, Buerano CC, Matias RR, Morita K, Natividad FF, Nagatake T. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clin Exp Immunol* 2004; 138, 299-303.

Schluter D, Deckert M. The divergent role of tumor necrosis factor receptors in infectious diseases. *Microbes Infect* 2000; 2, 1285-1292.

Seneviratne SL, Malavige GN, de Silva HJ. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100, 608-614.

Shimizu T, Nishihira J, Watanabe H, Abe R, Honda A, Ishibashi T, Shimizu H. Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279, 13729-13737.

Shresta S, Kyle JL, Robert Beatty P, Harris E. Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology* 2004; 20, 262-273.

Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LT, Raengsakulrach B, Loan HT, Day NP, Farrar J, Myint KS, Warrell MJ, James WS, Nisalak A, White NJ. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet* 2000; 25, 1053-1059.

Souza DG, Cara DC, Cassali GD, Coutinho SF, Silveira MR, Andrade SP, Poole SP, Teixeira MM. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol* 2000; 131, 1800-1808.

Souza DG, Cassali GD, Poole S, Teixeira MM. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 2001; 134, 985-994.

Souza DG, Soares AC, Pinho V, Torloni H, Reis LF, Teixeira MM, Dias AA. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol* 2002; 160, 1755-1765.

Souza DG, Guabiraba R, Pinho V, Bristow A, Poole S, Teixeira MM. IL-1-driven endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *J Immunol* 2003a; 170, 4759-4766.

Souza DG, Pinho V, Soares AC, Shimizu T, Ishii S, Teixeira MM. Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. *Br J Pharmacol* 2003b; 139, 733-740.

Souza DG, Bertini R, Vieira AT, Cunha FQ, Poole S, Allegretti M, Colotta F, Teixeira MM. Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 2004a; 143, 132-142.

Souza DG, Lomez ES, Pinho V, Pesquero JB, Bader M, Pesquero JL, Teixeira MM. Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. *J Immunol* 2004b; 172, 2542-2548.

Souza DG, Vieira AT, Pinho V, Sousa LP, Andrade AA, Bonjardim CA, McMillan M, Kahn M, Teixeira MM. NF-kappaB plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 2005; 145, 246-254.

Souza DG, Teixeira MM. The balance between the production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 determines tissue injury and lethality during intestinal ischemia and reperfusion. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 1, 59-66.

Stephenson JR. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull World Health Organ* 2005; 83, 308-314.

Suzuki T, Ogata A, Tashiro K, Nagashima K, Tamura M, Yasui K, Nishihira J. Japanese encephalitis virus up-regulates expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) mRNA in the mouse brain. *Biochim Biophys Acta* 2000; 15, 100-106.

Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer* 2006; 42, 745-750.

Tian XF, Yao JH, Li YH, Zhang XS, Feng BA, Yang CM, Zheng SS. Effect of nuclear factor kappa B on intercellular adhesion molecule-1 expression and neutrophil infiltration in lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12, 388-392.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000; 181, 2-9.

Waeber G, Calandra T, Roduit R, Haefliger JA, Bonny C, Thompson N, Thorens B, Temler E, Meinhardt A, Bacher M, Metz CN, Nicod P, Bucala R. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94, 4782-4787.

Wang F, Gao F, Jing L. Is macrophage migration inhibitory factor (MIF) the "control point" of vascular hypo-responsiveness in septic shock? *Med Hypotheses* 2005, 65, 1082-1087.

Wang J, Fu YX. Tumor necrosis factor family members and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 2005; 204:144-55.

Wattanapitayakul SK, Bauer JA. Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 2001; 89, 187-206.

Wilson JM, Coletta PL, Cuthbert RJ, Scott N, MacLennan K, Hawcroft G, Leng L, Lubetsky JB, Jin KK, Lolis E, Medina F, Brieva JA, Poulosom R, Markham AF, Bucala R, Hull MA. Macrophage migration inhibitory factor promotes intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* 2005; 129, 1485-1503.

Yu CM, Lai KW, Chen YX, Huang XR, Lan HY. Expression of macrophage migration inhibitory factor in acute ischemic myocardial injury. *J Histochem Cytochem* 2003; 51, 625-631.

World Health Organization (<http://www.who.int/en/>)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Pharmacology>

<http://www.pbh.gov.br/smsa/bhdengue/>

<http://www.unb.br/fm/noticias/not171105.htm>