



Departamento de Biologia

Disciplina de Imunologia

Licenciatura em Biologia

# Factor Inibitório de Migração dos Macrófagos (MIF) – Um Regulador da Imunidade Inata

Ana Oliveira, nº 16269

Catarina Silva, nº 16573

Évora, 28 de Junho de 2004

## **Índice:**

<b>Imunidade Inata</b>	<b>3</b>
<b>Reacção Inflamatória</b>	<b>5</b>
<b>Características Gerais da MIF</b>	<b>5</b>
<b>Estrutura do gene e proteína da MIF</b>	<b>6</b>
<b>Modo de acção da MIF</b>	<b>9</b>
<b>Receptor da MIF</b>	<b>9</b>
<b>Activação das vias de transdução de sinal de ERK1/ERK2</b>	<b>10</b>
<b>Inibição da actividade da JAB1</b>	<b>11</b>
<b>Regulação da expressão de TLR4</b>	<b>12</b>
<b>Supressão da actividade da p53</b>	<b>14</b>
<b>MIF e Imunidade Inata</b>	<b>15</b>
<b>MIF e Bactérias Gram-negativas</b>	<b>15</b>
<b>MIF e Bactérias Gram-positivas</b>	<b>16</b>
<b>MIF e inflamação</b>	<b>16</b>
<b>MIF e a Imunidade Adquirida</b>	<b>18</b>
<b>Aplicações terapêuticas da MIF</b>	<b>20</b>
<b>Sepsia</b>	<b>20</b>
<b>ARDS</b>	<b>21</b>
<b>Considerações Finais</b>	<b>22</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>23</b>

## **Imunidade Inata:**

A imunidade define-se como a reacção a microorganismos estranhos, assim como a macromoléculas, por exemplo, proteínas e lipopolissacáridos, tendo em conta as consequências fisiológicas e patológicas dessa reacção (Abbas & Lichtman, 2003).

A imunidade inata constitui a primeira defesa do organismo contra a entrada de substâncias estranhas, e consiste nos mecanismos celulares e bioquímicos inerentes à infecção, bem como na defesa e erradicação da mesma (Abbas & Lichtman, 2003). Estes mecanismos respondem sempre da mesma forma a infecções repetidas, e unicamente a microorganismos (Abbas & Lichtman, 2003). Os principais componentes da imunidade inata são: a) as barreiras físicas e químicas; b) células fagocitárias e células NK (“natural killer”); c) elementos do complemento e outras moléculas inflamatórias; d) e citocinas (Abbas & Lichtman, 2003). Esta linha de defesa também é detentora de inúmeras características e propriedades importantes, tais como a especificidade relativamente a estruturas partilhadas por determinados grupos de microorganismos; a diversidade limitada; não possui memória; e não apresenta reacção contra o *self* (Abbas & Lichtman, 2003).

As barreiras epiteliais do organismo são compostas por interfaces entre a superfície epitelial e o microorganismo e encontram-se maioritariamente na pele, e nas mucosas do tracto respiratório e gastrointestinal. Ocorre secreção de antibióticos naturais por parte do epitélio, sendo que este também alberga populações de linfócitos B e T de diversidade limitada. Estes linfócitos B intraepiteliais produzem, na sua grande maioria, IgM, ou seja, anticorpos específicos de polissacáridos e lípidos – os chamados anticorpos naturais - como, por exemplo, a fosforilcolina ou o LPS (Abbas & Lichtman, 2003).

As principais células efectoras da imunidade inata são os neutrófilos, fagócitos mononucleares e células NK. Estas são responsáveis pelo ataque aos microorganismos que ultrapassam as barreiras naturais do hospedeiro e penetram nos tecidos, ou na circulação (Abbas & Lichtman, 2003). Algumas destas são responsáveis pela secreção de citocinas que activam as células efectoras e estimulam a inflamação (Abbas & Lichtman, 2003).

As citocinas são proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adquirida, funcionando como mediadores de muitas funções das células que as libertam

(Abbas & Lichtman, 2003). São produzidas maioritariamente em resposta a microorganismos e outros antigénios, sendo que diferentes citoquinas estimulam respostas diferentes envolvidas na imunidade e inflamação (Abbas & Lichtman, 2003). Durante as fases efectoras da imunidade inata, as citoquinas activam diferentes células efectoras que participam na eliminação de microorganismos e outros antigénios (Abbas & Lichtman, 2003). Por outro lado, em medicina, as citoquinas constituem importantes agentes terapêuticos, funcionando também como alvos de antagonistas específicos em inúmeras doenças imunitárias, bem como em inflamações (Abbas & Lichtman, 2003).

As citoquinas apresentam também algumas propriedades bastante importantes na regulação de reacções inflamatórias e imunitárias, e possuem uma acção, que é muitas vezes pleiotrópica (capacidade de agir sobre diferentes tipos de células) e redundante (muitas citoquinas podem exercer a mesma função) (Abbas & Lichtman, 2003). Por outro lado, as citoquinas promovem a síntese de novas citoquinas, estimulando uma continuação da resposta inflamatória, podendo ter acção autócrina, parácrina ou endócrina (Abbas & Lichtman, 2003). As respostas celulares à maioria das citoquinas consistem em mudanças na expressão genética em células-alvo, resultando na expressão de novas funções e, algumas vezes, na proliferação das células-alvo – muitas das mudanças na expressão genética induzidas pelas citoquinas resultam na diferenciação de linfócitos B ou T e na activação de células efectoras como os macrófagos (Abbas & Lichtman, 2003).

Os fagócitos mononucleares, divididos em neutrófilos e macrófagos, são células efectoras da imunidade inata que tem como função identificar, ingerir e destruir microorganismos. Os neutrófilos constituem a população mais abundante de glóbulos brancos da corrente sanguínea e são os principais mediadores da resposta inflamatória, sendo, por isso, chamados até aos locais de infecção por quimiotaxia mediada por quimioquinas (Abbas & Lichtman, 2003). Por outro lado, os macrófagos apresentam um papel mais central na imunidade inata e adquirida, sendo considerados como elementos fundamentais na eliminação de microorganismos. Assim, encontram-se localizados estrategicamente em potenciais “portas de entrada” do organismo (Abbas & Lichtman, 2003).

## **Reacção Inflamatória:**

A inflamação consiste no recrutamento de leucócitos e na difusão de proteínas do complemento para os locais de infecção, assim como na activação dos leucócitos para eliminar o agente infeccioso. Pode também ser responsável pelos danos que surjam nos tecidos normais, sujeitos à infecção (Abbas & Lichtman, 2003).

Em primeiro lugar, os neutrófilos e leucócitos são recrutados da corrente sanguínea, através da acção de moléculas de adesão (quimiotaxia) produzidas em resposta à infecção (Abbas & Lichtman, 2003). Este recrutamento é feito através de TNF e IL-1, que actuam sobre as células endoteliais, favorecendo a acumulação de monócitos e macrófagos (Abbas & Lichtman, 2003). Esta reacção é o componente principal da inflamação. Estas moléculas efectoras destinam-se à fagocitose e eliminação dos agentes infecciosos (Abbas & Lichtman, 2003). Por sua vez, os macrófagos activados induzem a produção de novas citocinas, tanto como estímulo para a resposta inflamatória, como na indução de uma resposta imunitária adquirida (Abbas & Lichtman, 2003).

## **Características Gerais da MIF:**

A *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF) foi descoberta na década de 60 e foi inicialmente definida como uma substância que inibia a migração de células peritoniais normais, presumivelmente macrófagos (David, 1966, Lubetsky *et al.*, 2002). Esta substância seria libertada por linfócitos, na presença de antígeno, em resultado a uma reacção imunológica específica (David, 1966). Apesar de a MIF ter sido a primeira citocina a ser descoberta (Nguyen *et al.*, 2003), as suas actividades biológicas só foram desvendadas através da clonagem do DNA complementar da MIF humana em 1989 (Calandra & Roger, 2003).

Esta citocina foi redescoberta em 1991, devido ao seu papel regulador da resposta inflamatória, tendo sido então sugerido que esta poderia ser uma citocina de ligação entre os sistemas endócrino e o imunitário, uma vez que foi observada a sua libertação por células da glândula pituitária anterior após exposição a LPS (*endotoxin lipopolysaccharide*) (Calandra & Roger, 2003). A partir de 1999 foram desenvolvidos estudos utilizando ratos MIF-*knockout*, que permitiram clarificar o seu papel na

imunidade inata, bem como o seu envolvimento em doenças autoimunes (sepsia) e na tumorigénese (Rossi *et al.*, 1998, Burger-Kentisher *et al.*, 2002, Lubetsky *et al.*, 2002, Bochud & Calandra, 2003, Calandra & Roger, 2003, Leng *et al.*, 2003).

Hoje em dia a MIF é considerada uma citocina reguladora da imunidade inata, principalmente ao nível da resposta inflamatória (Rossi *et al.*, 1998, Yabunaka *et al.*, 2000, Morand *et al.*, 2002, Calandra & Roger, 2003, Fingerle-Rowson *et al.*, 2003, Nguyen *et al.*, 2003).

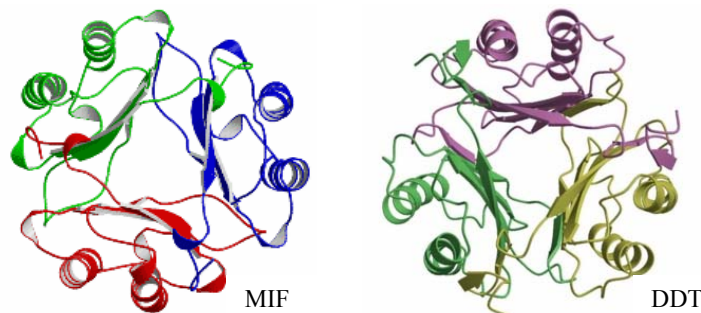
Neste trabalho discutimos o papel da MIF na imunidade inata, principalmente ao nível da inflamação, como reguladora positiva, ou negativa, de diversas moléculas envolvidas nas respostas do sistema imunitário, e explorar as suas possíveis aplicações em terapêuticas de doenças humanas.

### **Estrutura do gene e da proteína MIF:**

O gene MIF apresenta uma homologia de cerca de 90% em todos os mamíferos e, nos humanos, está localizado no cromossoma 22, que tem uma conservação sintética com o cromossoma 10 do rato que possui o gene *Mif* (Calandra & Roger, 2003). Foram ainda encontrados homólogos em galinhas, peixes, plantas (*A. thaliana*) e cianobactérias (Calandra & Roger, 2003, Fingerle-Rowson *et al.*, 2003).

O único gene homólogo do MIF nos humanos encontrado foi o gene DDT (*D-dopachrome tautomerase*), também localizado no cromossoma 22, o que indica que estes dois genes poderão ser duplicações do mesmo gene ancestral (Esumi *et al.*, 1998, Calandra & Roger, 2003). Esta hipótese é corroborada pelo facto da MIF mediar a actividade da DDT (Calandra & Roger, 2003).

Após a tradução, o gene MIF produz apenas um mRNA de, aproximadamente, 0,8 kb, que codifica para uma proteína não-glicosilada de 114 aminoácidos, com um peso molecular de 12,5 kDa (Calandra & Roger, 2003, Denkinger *et al.*, 2003). Estudos de cristalografia, sobre a MIF humana e dos ratos, indicam que esta proteína é o homotrímero, tal como a DDT (fig. 1 e 2) (Sugimoto *et al.*, 1999, Calandra & Roger, 2003).



Figuras 1 e 2: Estruturas da MIF e DDT, obtidas por cristalografia.

O gene MIF apresenta dois polimorfismos associados a doenças humanas: uma mutação de G em C na posição -175 na extremidade 5', que está associada a algumas formas de artrite juvenil (Donn *et al.*, 2001); e a repetição do tetranucleótido CATT na posição -794, que está correlacionada com a gravidade da artrite reumatóide (fig. 3) (Baugh & Bucala, 2002, Calandra & Roger, 2003).

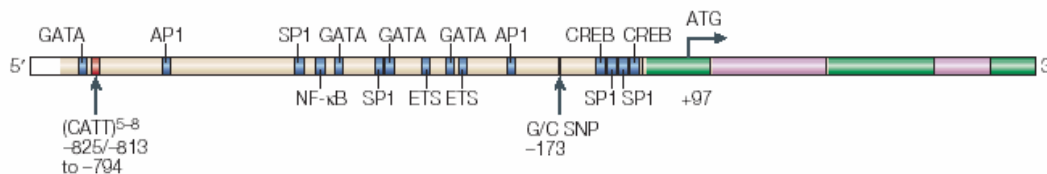


Figura 3: Estrutura do gene MIF humano, com indicação dos locais de polimorfismo relacionados com doenças humanas (setas).

A MIF é também conhecida por GIF (*Glycosylation-inhibiting factor*), tendo sido sugerido que possui uma actividade supressora específica do antígeno e que inibe a síntese de IgE (Lubetsky *et al.*, 2002, Ishizaka *et al.*, 2000 in Calandra & Roger, 2003).

Apesar de se saber que a MIF possui diversas actividades enzimáticas (por exemplo, tautomerase Pro<sup>2</sup> dependente, e Cys<sup>57</sup>-Ala<sup>58</sup>-Leu<sup>59</sup>-Cys<sup>60</sup> (CALC)-dependente oxidoreductase), ainda não foi clarificada a sua importância a nível biológico (Hermanowski-Vosatka *et al.*, 1999, Lubetsky *et al.*, 2002, Calandra & Roger, 2003, Nguyen *et al.*, 2003). Por um lado, em experiências em que foi retirado o resíduo prolina amino-terminal (essencial para a actividade enzimática), a MIF manteve os mesmos efeitos de inibição da quimiotaxia e migração de macrófagos (Hermanowski-Vosatka *et al.*, 1999), o que parece indicar que a actividade catalítica da MIF não será essencial para a sua actividade biológica, tendo sido sugerido que representa apenas

uma característica vestigial (Calandra & Roger, 2003). Por outro lado, há estudos, em mutantes em que a actividade catalítica foi suprimida, que apontam para uma correlação entre as funções enzimáticas e biológicas da MIF (Lubetsky *et al.*, 2002). A existência de uma homologia estrutural tri-dimensional da MIF com enzimas microbianas (*oxalocrotonate tautomerase*, *5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase* e *chorismate mutase*) (Sugimoto *et al.*, 1999, Lubetsky *et al.*, 2002, Calandra & Roger, 2003) e a manutenção do resíduo prolina amino-terminal parecem apoiar a segunda hipótese (Calandra & Roger, 2003).

Inicialmente, consideravam-se os linfócitos T como a principal fonte da MIF (David, 1966, Calandra & Roger, 2003). No entanto, a MIF é uma proteína ubíqua (fig. 4) (Lolis & Bucala, 2003), que além de ser encontrada na maioria das células do sistema imunitário (monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e basófilos), tem também uma função nos tecidos periféricos, sendo expressa nos órgãos em contacto com o meio externo (pulmões, tecido epitelial da pele, tractos gastrointestinal e genito-urinário), bem como em órgãos do sistema endócrino, envolvidos nas respostas de stress, como o hipotálamo e glândulas pituitária e adrenal (Calandra & Roger, 2003).

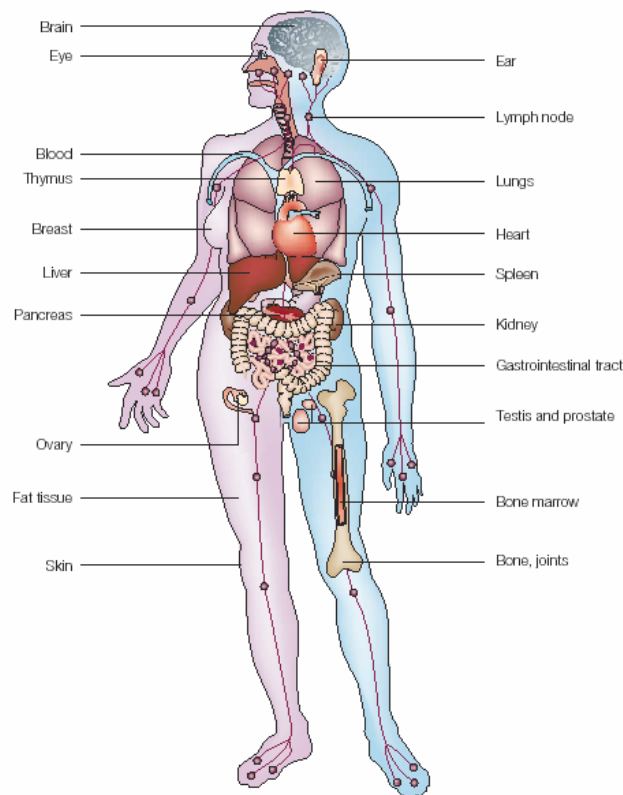


Figura 4: Padrões de expressão da MIF.



Ao contrário da maioria das citocinas, a MIF é constitutivamente expressa, sendo armazenada nas células, que a secretam quando estimuladas (Calandra & Roger, 2003). Não tem sequência líder amino-terminal, o que indica que a sua libertação das células dá-se por um mecanismo de secreção não convencional (Calandra & Roger, 2003).

## Modo de acção da MIF

### Receptor da MIF

As citocinas iniciam a sua actividade através da ligação a receptores específicos na membrana das células-alvo (Abbas & Lichtman, 2003, Calandra & Roger, 2003).

Actualmente, ainda não há consenso sobre a existência de um receptor celular para a MIF. Contudo, foi demonstrado por Leng *et al.* que, na activação da ERK1/ERK2 e na produção de PGE<sub>2</sub> (prostaglandina E2) mediadas pela MIF, é necessária a expressão de CD74 (fig. 5), que consiste na cadeia invariável das moléculas MHC tipo II, sendo expresso nas células B, nos monócitos e nos macrófagos (Abbas & Lichtman, 2003, Leng *et al.*, 2003).

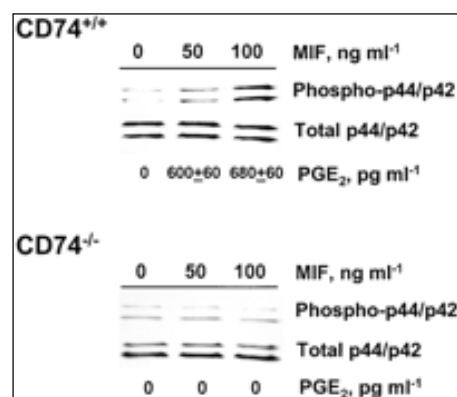


Figura 4: Resultados obtidos por Leng *et al.* com experiências em ratos CD74-knockout (CD74<sup>-/-</sup>), em que, utilizando diferentes concentrações de MIF, se comparou a quantidade de ERK1 e ERK2 (p44 e p42, respectivamente) e de PGE<sub>2</sub> destes com ratos do tipo selvagem (CD74<sup>+/+</sup>).

Apesar destas evidências, não está ainda claro se este é, de facto, o receptor da MIF, uma vez que a conformação do domínio intracelular do CD74 não parece ser

adequada para a interacção com moléculas de transdução de sinal (Calandra & Roger, 2003).

### Activação da via de transdução de sinal ERK1/ERK2:

O ERK (*Extracellular receptor-activated kinase*) é um protótipo da família das MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), cuja activação resulta de uma cascata enzimática induzida pelo Ras•GTP (através da activação sequencial de, pelo menos, três quinases diferentes) (Abbas & Lichtman, 2003). O ERK activado fosforila uma proteína chamada Elk que, assim, estimula a transcrição da Fos, um componente da AP-1 (*activator protein 1*) (Abbas & Lichtman, 2003).

A AP-1 é um factor de transcrição implicado no crescimento celular, transformação e morte celular (Calandra & Roger, 2003), encontrado em diversos tipos de células e é composto pelas proteínas Fos e Jun (Abbas & Lichtman, 2003). A sua activação envolve geralmente a síntese da proteína Fos e a fosforilação da proteína Jun pré-existente (Abbas & Lichtman, 2003).

Por outro lado, uma cascata enzimática paralela chamada Rac•GTP dá origem a outra MAPK activada chamada JNK (*JUN N-terminal kinase*) que, assim, fosforila cJun, o segundo componente da AP-1 (Abbas e Lichtman, 2003) (fig. 6). As actividades da ERK e JNK terminam com a acção de fosfatases tirosina/trionina que são induzidas e activadas pelos próprios ERK e JNK, proporcionando um mecanismo de *feedback* negativo que finaliza a activação das células T (Abbas e Lichtman, 2003).

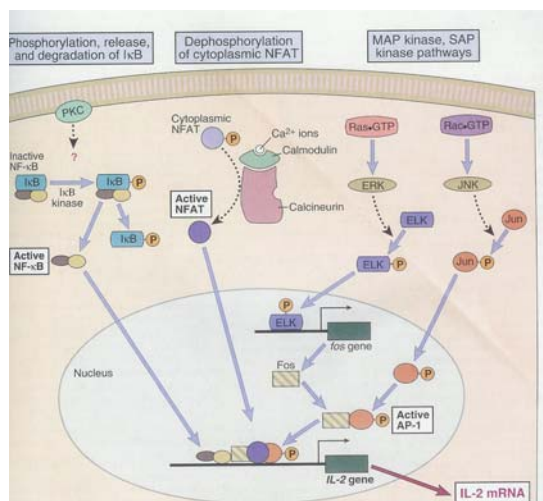


Figura 6: Representação esquemática das vias de activação MAPK (ERK e JNK), resultando na activação dos factores de transcrição NF-κB e AP-1.

Estudos sobre a proliferação de fibroblastos quiescentes estimulados com MIF mostraram que esta induz a rápida (30m) e consistente (24h) fosforilação e activação da via ERK1/ERK2/MAPK e da proliferação celular (fig. 8) (Mitchell *et al.*, 1999 in Calandra & Roger, 2003). Esta activação é dependente da *protein kinase A*, estando associada ao aumento da actividade enzimática da PLA2 (*phospholipase A2*) (Abbas & Lichtman, 2003, Calandra & Roger, 2003). A PLA2 é importante na activação da cascata pro-inflamatória, nomeadamente através da produção de *arachidonic acid*, sendo também um alvo-chave na função anti-inflamatória dos glucocorticóides (Calandra & Roger, 2003). Assim, a indução de PLA2, mediada por ERK1/ERK2, poderá ser um dos mecanismos utilizados pela MIF para antagonizar os efeitos imunossupressores dos esteróides (Mitchell *et al.*, 1999 in Calandra & Roger, 2003).

### **Inibição da actividade da JAB1:**

Kleemann *et al.* comprovaram a função intracelular da MIF no crescimento celular através da inibição da JAB1 (*Jun activation domain binding protein 1*), também conhecida por CSN5 (*COP9 signalosome subunit 5*), que está implicado em vias de sinalização e na degradação de proteínas (Fingerle-Rowson *et al.*, 2003, Nguyen *et al.*, 2003). A JAB1 activa a JNK, que fosforila a cJUN, funcionando, assim, como um co-activador da AP1 (Calandra & Roger, 2003, Fingerle-Rowson, *et al.*, 2003, Nguyen *et al.*, 2003). Apresenta diversas outras funções que incluem a degradação do inibidor do ciclo celular (KTP1) e da p53 (Calandra & Roger, 2003). Parece haver uma contradição uma vez que, a MIF inibe a via MAPK ERK e activa a via MAPK JNK, as duas envolvidas na activação da AP1 (Calandra & Roger, 2003). Assim, segundo o artigo publicado por Kleemann *et al.*, sobre a inibição da JAB1 pela MIF, esta apresentaria propriedades anti-inflamatórias e inibidoras de crescimento, o que entra em contradição com todo o conhecimento anterior sobre esta citoquina (Calandra & Roger, 2003). Estas observações paradoxais poderão ser explicadas por diferenças na concentração da MIF, ou por diferentes estados da célula, onde esta actua (Calandra & Roger, 2003).

A JAB1 constitui um co-activador de transcrição que foi identificado como sendo a molécula-alvo da acção da MIF (Burger-Kentisher *et al.*, 2002). Após a endocitose da MIF, esta interage especificamente com a JAB1 não só em células do sistema imunitário, ocorrendo também em células produtoras de MIF (Nguyen *et al.*, 2003). Sabe-se que o domínio CALC, relacionado com a actividade oxirreductase da

MIF, é importante para, pelo menos algumas actividades da MIF mediadas pelo JAB1 (Nguyen *et al.*, 2003).

### Regulação da expressão de TLR4:

A família de receptores TLR (*Toll-like receptors*) apresenta um papel fulcral nas respostas celulares a LPS (Abbas & Lichtman, 2003). No reconhecimento desta endotoxina, o TLR4 associa-se fisicamente ao complexo LPS-CD14 (no qual o CD14 é o receptor específico para LPS), ocorrendo ainda a ligação de uma proteína acessória extracelular, chamada MD2 (Abbas & Lichtman, 2003). Este receptor utiliza uma via de transdução de sinal que consiste no recrutamento de várias proteínas intracelulares (MyD88, IRAK e TRAF-6) que vão desencadear as vias JNK e ERK da cascata MAPK, envolvidas na activação dos factores de transcrição AP-1 e NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*), favorecendo a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória (fig. 7) (Abbas & Lichtman, 2003 Bochud & Calandra, 2003).

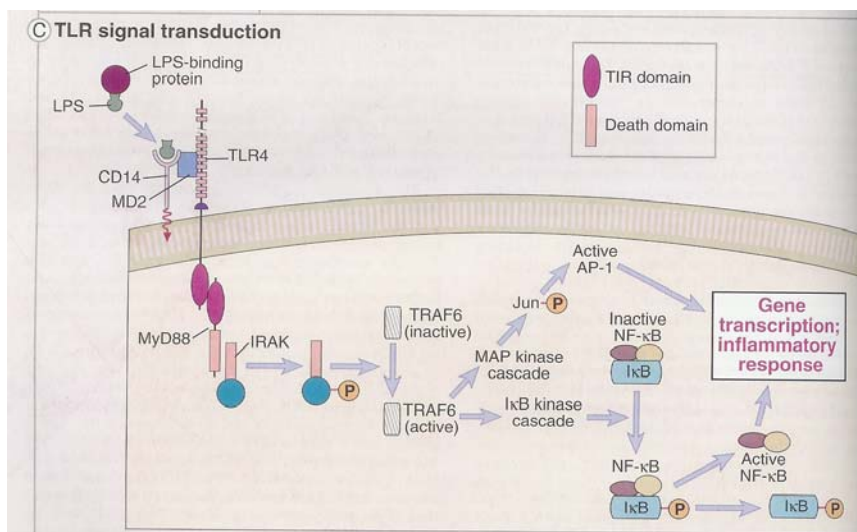


Figura 7: Representação esquemática da influência de TLR4 nas vias de activação de NF- $\kappa$ B e AP-1.

O NF- $\kappa$ B é um factor de transcrição que é activado em resposta a sinais de TCR e que é essencial na síntese de citocinas (Abbas e Lichtman, 2003). As proteínas NF- $\kappa$ B são importantes na transcrição de muitos genes em vários tipos de células, particularmente nas células do sistema imunitário (Abbas e Lichtman, 2003). Nas células T inactivadas, o NF- $\kappa$ B está presente no citoplasma formando um complexo com outras proteínas, chamadas inibidores de  $\kappa$ B (IκBs) que bloqueiam a entrada de NF- $\kappa$ B para o

núcleo (Abbas & Lichtman, 2003). A fosforilação de I $\kappa$ B pela via MAPK, cálcio ou PKC e a sua proteólise (desencadeada pela ligação da proteína ubiquitina), fazem com que o NF- $\kappa$ B seja libertado e translocado para o núcleo onde contribui para a activação transcripcional de múltiplos genes de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, TNF, entre outras) e de receptores de citocinas (Abbas & Lichtman, 2003).

Foi descrito que, a supressão de MIF nos macrófagos, provoca uma redução da resposta ao LPS e a bactérias Gram-negativas, demonstrada pelo decréscimo da actividade de NF- $\kappa$ B e da produção de TNF- $\alpha$  (Roger *et al.*, 2003). Estes estudos indicam que a MIF regula positivamente a expressão de TLR4, actuando na família de factores de transcrição ETS, essenciais para a expressão de TLR4 (fig. 8) (Calandra & Roger, 2003).

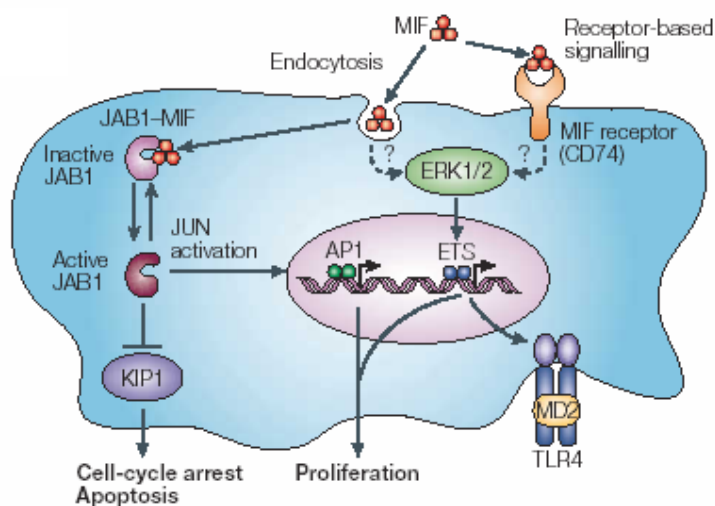


Figura 8: Representação esquemática dos modos de entrada da MIF, das vias de activação de ERK, JAB1 e ETS (envolvida na expressão do TLR4).

Assim, a MIF facilita a detecção de endotoxinas, permitindo que as células que se encontram próximo das “portas de entrada” respondam rapidamente a bactérias invasoras (Calandra & Roger, 2003). Foi ainda demonstrado que ratos MIF-*knockout* foram incapazes de controlar o crescimento do patógeno intracelular *Salmonella typhimurium* (Koebernick *et al.*, 2002 in Calandra & Roger, 2003), devido ao decréscimo de TNF, IL-12 e IFN- $\gamma$  (Calandra & Roger, 2003). Estes dados indicam que a MIF promove uma resposta imunitária das células T<sub>H</sub>1 contra *S. typhimurium* (Calandra & Roger, 2003).

Estas observações, tomadas em conjunto, dão uma possível explicação para a expressão constitutiva desta citocina nos tecidos próximos do ambiente externo (Calandra & Roger, 2003).

### **Supressão da actividade da p53:**

A p53 é um oncogene recessivo, também chamado de gene supressor de tumor, que medeia a repressão activa da divisão celular através da inactivação de proteínas celulares responsáveis pela mesma (Wagner & Hewlett, 2004). Por outro lado, nas células que escapam a esta repressão, ocorre um aumento da concentração de p53 na forma livre, acima de um nível crítico, fenómeno que induz a apoptose celular (morte celular programada) (Wagner & Hewlett, 2004).

Sabe-se que a generalidade das células tumorais exprime níveis elevados de MIF (Calandra & Roger, 2003). Recentemente, foi descrito o papel da MIF na inibição da actividade da p53, ao nível da inibição do crescimento celular e da indução de apoptose (Hudson *et al.*, 1999, Fingerle-Rowson *et al.*, 2003). Esta observação fornece uma ligação entre inflamação, crescimento celular e tumorigénese (Calandra & Roger, 2003). O facto de a MIF suplantar o efeito da p53 pode ter vantagens para o hospedeiro ao limitar a perda de células, permitindo a proliferação celular local para a reparação de tecidos, que tenham sido afectados pela resposta inflamatória (Hudson *et al.*, 1999).

A função pro-inflamatória (produção de TNF IL-1 $\beta$  e PGE2) e a viabilidade dos ratos deficientes em MIF, diminui em relação aos do tipo selvagem quando é administrado LPS, mas a produção de NO (óxido nítrico) é igual (Calandra & Roger, 2003). Contudo, a MIF inibe a acumulação intracelular de p53 mediada por NO e, consequentemente, a apoptose de macrófagos estimulados com LPS (fig.9) (Calandra & Roger, 2003). Esta inibição envolve a activação sequencial de ERK1/ERK2, PLA2, COX2 e PGE2 (Calandra & Roger, 2003). Em concordância com estes resultados, foi descoberto que a MIF interfere na via E2F-p53 de forma a manter o crescimento celular (Petrenko *et al.*, 2003 in Calandra & Roger, 2003).



Abe *et al.*, 2001, Roger *et al.*, 2001, Calandra & Roger, 2003). Foram detectados níveis elevados de MIF nos tecidos e no sangue de ratos com sepsia e, neutralizando a MIF com anticorpos específicos, reduziu-se a produção de TNF, protegendo-se os ratos do choque endotóxico letal e da sepsia induzida por *E. coli* ou CLP (*Caecal Ligation and Puncture*), mesmo quando o tratamento com anticorpos específicos para a MIF foi iniciado após o desenvolvimento de peritonite bacteriana (Calandra *et al.*, 2000, Roger *et al.*, 2001, Calandra & Roger, 2003).

### **MIF e as Bactérias Gram-positivas:**

As bactérias Gram-positivas provocam 40 a 50% dos casos de choque séptico nos EUA (Martin *et al.*, 2003 in Calandra & Roger, 2003). As exotoxinas (actuando como superantígenos microbianos) e compostos da parede celular (peptidoglicanos e outros) de *Staphylococcus* e *Streptococcus* podem induzir o choque através da estimulação de macrófagos e de células T que induz a libertação de mediadores pró-inflamatórios (Bochud & Calandra, 2003). Pequenas quantidades de TSST1 (*staphylococcal toxic-shock syndrome toxin 1*) ou SPEA (*streptococcal pyrogenic exotoxin A*) induzem a produção de MIF pelos macrófagos, o que pode provocar respostas inflamatórias letais (Calandra & Roger, 2003). A mortalidade pode ser prevenida pela administração de anticorpos específicos da MIF (Calandra *et al.*, 1998 in Calandra & Roger, 2003), tendo sido confirmado experimentalmente que a falta de MIF está associada a uma crescente resistência ao choque causado pela enterotoxina B8 de *Staphylococcus* (Bozza *et al.*, 1999 in Calandra & Roger, 2003). Estes dados comprovam que a MIF desempenha um papel importante na patogénese de bactérias Gram-positivas (Calandra & Roger, 2003).

### **MIF e inflamação**

A MIF é um componente integral das respostas inflamatórias, sendo rapidamente libertada pelas células imunes quando estas são expostas a produtos microbianos, a outras citocinas pró-inflamatórias ou a uma resposta específica do antígeno (imunidade adquirida) e tem um potente efeito autócrino e parácrino que promove o crescimento e a sobrevivência celulares (Calandra & Roger, 2003). Foi demonstrado, usando células sem MIF, que esta citocina promove, directa ou indirectamente, a



expressão de um vasto conjunto de moléculas pro-inflamatórias, incluindo citocinas, (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 e IL-8) NO, COX2 e produtos que intervêm na via do *arachidonic acid* (como a PGE2) e metaloproteinasas (Calandra & Roger, 2003).

A recente descoberta de que as hormonas glucocorticóides induzem a secreção da MIF (Calandra *et al.*, 1995) parecia contradizer os efeitos pro-inflamatórios da MIF (Calandra & Roger, 2003), uma vez que a síntese e libertação da maioria das citocinas proinflamatórias é inibida por glucocorticóides (Morand *et al.*, 2002). Contudo, esta observação paradoxal levou à descoberta de que a MIF anula os efeitos imunossupressivos dos glucocorticóides (fig. 10) (Calandra *et al.*, 1995, Rossi *et al.*, 1998, Lubetsky *et al.*, 2002, Morand *et al.*, 2002, Calandra & Roger, 2003, Fingerle-Rowson *et al.*, 2003).

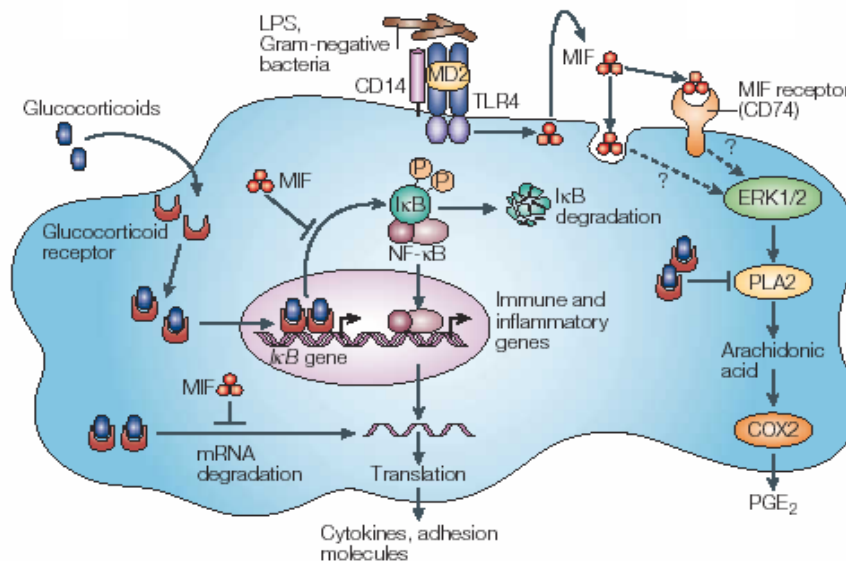


Figura 10: Representação esquemática da MIF na inibição dos glucocorticóides.

Foi observado, *in vitro*, que a MIF possui a capacidade de reverter a acção dos glucocorticóides, ao nível da inibição: a) da síntese de TNF, IL-1, IL-6, IL-8 pelas células mononucleares sanguíneas periféricas (Calandra *et al.*, 1995), b) da actividade da PLA2 citossólica, c) da libertação de *arachidonic acid* pelos fibroblastos (Mitchell *et al.*, 1999 *in* Calandra & Roger, 2003) e d) da proliferação de células T (Bacher *et al.*, 1996).

A concentração de MIF circulante, geralmente semelhante à dos glucocorticóides, aumenta nas inflamações, infecções e stress (Calandra *et al.*, 2000,

Calandra & Roger, 2003). A análise dos mecanismos moleculares da MIF e, as interacções com os glucocorticóides, demonstraram que a MIF interfere nestes ao nível transcripcional e pós-transcripcional, nomeadamente em relação à produção de citocinas (fig. 10) (Calandra & Roger, 2003). Daun e Cannon mostraram que a MIF antagoniza os efeitos da hidrocortisona na via do I $\kappa$ B, uma vez que contraria a indução do I $\kappa$ B $\alpha$ , mediada por esteróides (Daun & Cannon, 2000 *in* Calandra & Roger, 2003).

Assim, difundiu-se recentemente o conceito de que a MIF é um antagonista fisiológico dos glucocorticóides, interagindo com estes na regulação das respostas imunitárias inata e adquirida (Calandra & Roger, 2003, Fingerle-Rowson *et al.*, 2003). Esta concepção foi corroborada por estudos que indicam que a MIF tem influência na patogénese das inflamações agudas ou crónicas e doenças auto-imunes (Calandra & Roger, 2003).

### **MIF e a Imunidade Adquirida:**

Apesar de a MIF ter sido descoberta com um factor libertado por linfócitos activados, até agora sabe-se pouco sobre o seu papel na imunidade adquirida (Calandra & Roger, 2003). Sabe-se que os linfócitos T exprimem a MIF constitutivamente, sendo a sua libertação estimulada por anticorpos específicos de CD3 e glucocorticóides, entre outras (Calandra & Roger, 2003). Foi referido que a MIF promove a activação e proliferação de células T (Bacher *et al.*, 1996). Há ainda estudos que indicam que a MIF é necessária para a expressão de IL-2 durante a activação de linfócitos T e para a produção de anticorpos pelos linfócitos B (Abe *et al.*, 2001). Além disso estimula a produção de outras citocinas, tais como, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12 (Abe *et al.*, 2001, Calandra & Roger, 2003). A TNF- $\alpha$  interfere na resposta inflamatória aguda, a IL-2 na activação das células T e B e ocorre um ciclo de feedback positivo entre IL-12 e IFN- $\gamma$ , no sentido de estimular a fagocitose por parte dos macrófagos, bem como aumentar a actividade citolítica das CTL (*Cytolytic T lymphocyte*), também designadas de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Abbas & Lichtman, 2003). A MIF tem ainda um papel importante na migração de macrófagos e de linfócitos, sendo, por isso, considerada uma citocina linfotrópica (Calandra & Roger, 2003).

Conhecem-se também outras citocinas que possuem o efeito contrário, como a IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  (Abe *et al.*, 2001). Estas suprimem a diferenciação das CTL ou a

sua actividade citolítica e, nomeadamente, a IL-4 inibe a secreção de IFN- $\gamma$  por parte das células T CD8<sup>+</sup>, enquanto que a IL-10 inibe os macrófagos activados (Abe *et al.*, 2001, Abbas & Lichtman, 2003).

Por outro lado, foram realizados estudos que demonstram que a neutralização da MIF pode promover a actividade das CTL, bem como das células T CD4<sup>+</sup> (fig. 11), inibir o crescimento de tumores, e aumentar a adesão de linfócitos T aos locais de invasão tumoral *in vivo* (Abe *et al.*, 2001).

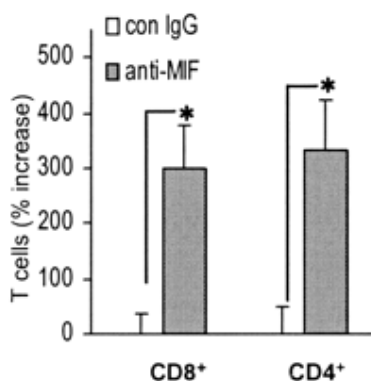


Figura 11: Gráfico que compara a produção de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em ratos portadores de tumores em que foram aplicados dois tipos de tratamento: controlo de IgG e anti-MIF.

Estes resultados que a MIF pode exercer efeitos tumorogénicos pela regulação negativa das respostas anti-tumorais de linfócitos T (Abe *et al.*, 2001).

O aumento da citotoxicidade das células T, através da neutralização de MIF, não pode ser atribuído ao incremento da proliferação das células T CD8<sup>+</sup>, mas sim a um aumento da sobrevivência da população de células T CD8<sup>+</sup> citolíticas (Abe *et al.*, 2001).

Há estudos que sugerem que a expressão da MIF é regulada positivamente durante a resposta por CTL e a inibição da MIF, usando anticorpos específicos, promove a actividade das CTL *in vitro* e *in vivo*, não afectando a secreção de IL-2 ou a proliferação de células T CD8<sup>+</sup>, induzida por antígenos (Abe *et al.*, 2001). A actividade das CTL deve ser mantida para assegurar a regressão dos tumores (Abe *et al.*, 2001). Para tal, a inibição da MIF actua no prolongamento do tempo de vida das CTL, assegurando as suas actividades anti-tumorais (Abe *et al.*, 2001).

A observação de que o tratamento anti-MIF aumenta a migração de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> para a massa tumoral, poderá indicar a existência de outros mecanismos na alteração da função das células T anti-tumor, devido ao tratamento anti-MIF, que

podem envolver mecanismos como quimioquinas alteradas, ou receptores de quimioquinas alterados (Abe *et al.*, 2001).

Apesar da variedade de células imunitárias efectoras que participam na morte de células tumorais, as CTL específicas do antígeno tumoral são muito eficientes na mediação de mecanismos de morte tumoral, mesmo com baixas concentrações de antígeno (Abe *et al.*, 2001). Levanta-se, assim, a possibilidade de uma terapêutica anti-tumor baseada no aumento das CTL pela imunoneutralização da MIF (Abe *et al.*, 2001).

### **Aplicações terapêuticas da MIF:**

Como já foi descrito anteriormente, a MIF está implicada na patogénese de inúmeras doenças inflamatórias crónicas e agudas, tais como a sepsia, a ARDS (*acute respiratory distress síndrome*), a asma, a artrite, a glomerulonefrite, a dermatite atópica, rejeição de transplantes, a artrite reumatóide (Morand *et al.*, 2002) e a arteriosclerose.

### **Sepsia**

Trata-se de uma complicação provocada por bactérias Gram-negativas, podendo resultar em choque séptico, e é caracterizada por um colapso vascular, coagulação intravascular disseminada e distúrbios metabólicos (Manuila *et al.*, 1999, Abbas & Lichtman, 2003). Constitui uma manifestação clínica aguda resultante de uma desregulação das respostas imunitárias inatas, durante o processo de inflamação (Calandra & Roger, 2003). Ocorre devido à produção de TNF e outras citocinas, por indução de LPS, incluindo IL-1, IL-12 e IFN- $\gamma$  (Abbas & Lichtman, 2003). Esta doença pode estar associada ao facto de outras citocinas apresentarem as mesmas respostas que TNF, ou seja, um exemplo de redundância (Abbas & Lichtman, 2003).

Esta doença auto-imune representa a décima causa de morte mais comum nos EUA e a segunda causa de morte mais comum em unidades de cuidados intensivos (excluindo os dedicados a doenças coronárias), apesar do aumento dos cuidados hospitalares (Bochud & Calandra, 2003, Calandra & Roger, 2003). Quase metade dos casos de sepsia grave é provocada por infecções derivadas de bactérias Gram-positivas (Bochud & Calandra, 2003).

As respostas imunitárias inatas têm de ser altamente reguladas, senão podem resultar em reacções imunitárias e inflamatórias que resultam em crescimento microbiano descontrolado, ou respostas inflamatórias devastadoras com lesão dos tecidos, colapso vascular e falha de diversos órgãos (Bochud & Calandra, 2003).

As propriedades pro-inflamatórias intrínsecas da MIF, o facto de ter uma elevada produção nas células do sistema imunitário inato e o seu papel crucial nas respostas dos macrófagos a invasões microbianas, apoiam uma influência da MIF na sepsia (Rossi *et al.*, 1998, Burger-Kentisher *et al.*, 2002, Lubetsky *et al.*, 2002, Calandra & Roger, 2003). Esta hipótese foi testada em vários modelos animais, que mostraram que uma produção excessiva de MIF é prejudicial na fase aguda da sepsia, tendo sido encontrados níveis elevados desta citocina no sangue de doentes com sepsia grave ou choque séptico (Calandra & Roger, 2003). A neutralização da MIF ou a deleção do gene diminuem a actividade inflamatória e a mortalidade destas doenças (Calandra & Roger, 2003). Estão, actualmente, em desenvolvimento vários ensaios clínicos para testar a eficácia de anticorpos específicos da MIF no tratamento de pacientes com sepsia (Calandra & Roger, 2003).

## **ARDS**

A sepsia causa, frequentemente, ARDS, a mais grave e mortífera lesão pulmonar aguda (Rossi *et al.*, 1998, Calandra & Roger, 2003), caracterizada por uma ruptura do epitélio alveolar e do endotélio microvascular (Calandra & Roger, 2003). A activação de neutrófilos e a morte celular são os componentes importantes da resposta inflamatória responsável por esta doença (Rossi *et al.*, 1998, Calandra & Roger, 2003).

Em pulmões normais, a MIF é constitutivamente expressa no epitélio bronquial, no endotélio alveolar e nos macrófagos alveolares (Calandra & Roger, 2003). Contudo, em pacientes com ARDS, a expressão de MIF é incrementada, difundindo-se para os espaços alveolares e potenciando respostas inflamatórias alveolares (Calandra & Roger, 2003). A imunoneutralização da MIF reduz a secreção de TNF e IL-8 em culturas de macrófagos alveolares retirados de pacientes com ARDS (Calandra & Roger, 2003). Por outro lado, a adição de MIF recombinante tem o efeito contrário, potenciando a inflamação pulmonar (Calandra & Roger, 2003).

## **Considerações Finais:**

A MIF é actualmente considerada uma importante molécula efectora do sistema imunitário inato. Ao contrário da maioria das citocinas, A MIF é expressa constitutivamente por células imunes, endócrinas e epiteliais em contacto com o meio externo, apontando a MIF como reguladora das respostas do hospedeiro à infecção e ao stress, o que é consistente com a observação de que esta incrementa a expressão de TLR4 nos macrófagos, sendo esta a molécula de transdução de sinal do complexo receptor das endotoxinas das bactérias Gram-negativas (Calandra & Roger, 2003). Os produtos microbianos e outras citocinas pró-inflamatórias induzem a libertação da MIF pré-formada (Calandra & Roger, 2003).

São características distintivas desta citocina a sua capacidade de regular negativamente os efeitos imunossupressivos dos glucocorticóides e de manter a actividade inflamatória através da inibição da apoptose de macrófagos p53-dependente. Devido às suas propriedades pro-inflamatórias e imunoreguladoras, a MIF contribui para a patogenicidade da sepsia, da ARDS e de doenças auto-imunes, havendo uma correlação entre os níveis de MIF e a severidade destas patologias. Dado o papel central da MIF na regulação da imunidade inata e adquirida, a manipulação da actividade da MIF poderá fornecer novas possibilidades de tratamento para diversas patologias (Calandra & Roger, 2003).

## Referências Bibliográficas:

- 📖 Abbas A. K. & Lichtman A. H. *Cellular and Molecular Immunology*. 5<sup>th</sup> Edition. Saunders. Elsevier Science. USA. 2003;
- 📖 Abe, R., Peng, T., Sailors, J., Bucala, R. & Metz, C.N. *Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor*. J. Immunol. **166**, 747-753. 2001 ;
- 📖 Bacher, M. et al. *An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T cell activation*. Prop. Natl. Acad. Eci. USA. **93**, 7849-7854. 1996 ;
- 📖 Baugh, J.A., Bucala, R. *Macrophage migration inhibitory factor*. Crit. Care Med. **30**, S27-S35. 2002 ;
- 📖 Bendrat, K. et al. *Biochemical and mutational investigations on the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor*. Biochemistry. **36**, 15356-15362. 1997 ;
- 📖 Bochud, P.Y., Calandra, T. *Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatments*. BMJ. **326**, 262-266. 2002;
- 📖 Burger-Kentischer, A. et al. *Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis*. Circulation. **105**, 1561-1566. 2002 ;
- 📖 Calandra, T. et al. *MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production*. Nature. **377**, 68-71. 1995 ;
- 📖 Calandra, T. et al. *Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor*. Nature Med. **6**, 164-170. 2000;
- 📖 Calandra, T. & Roger, T. *Macrophage migration Inhibitory Factor: A regulator of innate immunity*. Nature. **3**, 791-800. 2003;
- 📖 David, J.R., *Delayed Hipersensitivity in vitro: it's mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction*. Proc. Natl. Sci. USA. **56**, 72-77. 1966 ;
- 📖 Denkinger, C. M., Denkinger, M., Kort, J.J., Metz, C. & Forsthuber, T. G. *In vivo blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates acute experimental autoimmune encephalomyelitis by impairing the homing of*

- encephalitogenic T cells to the central nervous system. J.Immunol.* **170**, 1274-1282. 2003;
- 📖 Donn, R.P., Shelley, E., Ollier, W.E. & Thomson, W.. *A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. Arthritis Rheum.* **44**, 1782-1785. 2001 ;
- 📖 Esumi, N. *et al.* *Conserved gene structure and genomic linkage for D-dopachrome tautomerase (DDT) and MIF. Mamm. Genome.* **9**, 753-757. 1998 ;
- 📖 Fingerle-Rowson, G. *et al.* *Regulation of macrophage migration inhibitory factor expression by glucocorticoids in vivo. Am. J. Pathol.* **162**, 47-56. 2003 ;
- 📖 Hermanoski-Vosatka, A. *et al.* *Enzymatically inactive macrophage migration inhibitory factor inhibits monocyte chemotaxis and random migration. Biochemistry.* **38**, 12841-12849. 1999 ;
- 📖 Hudson, J. D. *et al.* *A pro-inflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. J. Exp. Med.* **190**, 1375-1382. 1999;
- 📖 Ishizaka, K., Ishii, Y., Nakano, T. & Sugie, K.. *Biochemical basis of antigen-specific suppressor T cell factors: controversies and possible answers. Adv. Immunol.* **74**, 1-60. 2000 ;
- 📖 Leng, L. *et al.* *MIF signal transduction initiated by binding to CD74. J. Exp. Med.* **197**, 1467-1476. 2003;
- 📖 Lolis, E. & Bucala, R.. *Macrophage migration inhibitory factor. Expert Opin. Ther. Targets.* **7**, 153-164. 2003 ;
- 📖 Lubetsky, J.B. *et al.* *The Tautomerase activity of MIF is a potencial target for discovery of novel anti-inflammatory agents. J. Biol. Chem.* **277**, 24976-24982. 2002 ;
- 📖 Manuila, L., A. Manuila, P. Lewalle, e M. Nicoulin, 1999. Dictionnaire Médical. Masson Éditeur; Paris, França.
- 📖 Morand, E. F. *et al.* *Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis : clinical correlations. Rheumatol.* **41**, 232-237. 2002 ;
- 📖 Nguyen, M.T., *et al.* *The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. J.Immunol.* **170**, 3337-3347. 2003 ;



- 📖 Roger, T., David, J., Glauser, M. P. & Calandra, T. *MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4*. Nature. **414**, 920-924. 2001 ;
- 📖 Roger, T., Froidevaux, C. Martin, C. & Calandra, T. *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4)*. J. Endotoxin Res. **9**, 119-123. 2003;
- 📖 Rossi, E. J. et al. *Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potencial role in asthma*. J. Clin. Invest. **101**, 2869-2874. 1998 ;
- 📖 Sugimoto, H. et al. *Crystral structure of human D-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution*. Biochemistry. **38**, 3268-3279. 1999 ;
- 📖 Wagner, E. K. & Hewlett, M. J. *Basic Virology*. 2<sup>th</sup>. Blackwell Science Ltd. USA. 2004;
- 📖 Yabunaka, N. et al. *Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes*. Diabetes care. **23**, 256-258. 2000.