SÉRIE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

IMUNOFARMACOLOGIA

Copyright © by Fiocruz, 2014
Todos os direitos desta edição reservados à Fundação Oswaldo Cruz.
Av. Brasil, 4365
Proibida a reprodução total ou parcial deste conteúdo

Editores
Helene Santos Barbosa
Milton Ozorio Moraes
Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

Organizadores
Patricia Machado Rodrigues e Silva
Patricia Torres Bozza

Autores
Alessandra M. Siqueira
Ana Caroline Costa Silva
Bianca T. Ciambarella
Fábio P. M. dos Santos
Kelly G. Magalhães
Priscilla C. Olsen
Rafael M. Cardoso

Revisores
Adriana Lima Vallochi
Andre Miguel Japiassu
Christianne Bandeira de Melo
Claudia Lucia Martins Silva
Emiliano de Oliveira Barreto
José Carlos Alves Filho
Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto
Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques
Miriam Bianchi de Frontin Werneck
Rachel Novaes Gomes
Thereza Christina Barja Fidalgo

Projeto Gráfico, capa e diagramação
Simone Oliveira

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / Fiocruz - RJ

I34 Imunofarmacologia / Alessandra M. Siqueira ... [et al.]. - Rio de Janeiro: IOC, 2014.

164 p. : il. - (Série em biologia celular e molecular)
ISBN: 978-85-99974-08-7

1. Imunologia. 2. Farmacologia. 3. Sistema imune. 4. Imunidade adaptativa. 5. Imunidade inata. 6. Inflamação. I. Siqueira, Alessandra M. II. Título. III. Série.

CDD 615.37

Alessandra M. Siqueira
Ana Caroline Costa Silva
Bianca T. Ciambarella
Fábio P. M. dos Santos
Kelly G. Magalhães
Priscilla C. Olsen
Rafael M. Cardoso

SÉRIE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

IMUNOFARMACOLOGIA

1ª edição
Rio de Janeiro
IOC - Instituto Oswaldo Cruz

Apresentação à coleção

Os cursos de férias no Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) surgiram com o objetivo de oferecer aos estudantes de graduação a oportunidade de estudar em uma Instituição de Pesquisa de excelência, abordando em profundidade temas incomuns à grade curricular da universidade. Agregado a este objetivo principal, a formatação desse curso permitiria o trânsito e vivência dos estudantes no ambientes científico dos diferentes laboratórios do IOC. Além disso, a possibilidade de estimular os estudantes de pós-graduação do IOC a desenvolvem atividades didáticas teórico-práticas, preencheria também uma lacuna importante na formação dos mestres e doutores da novssa instituição que não possui cursos de graduação.

A ideia surgiu em 2007, e desde sua primeira edição, os cursos de férias do IOC versam sobre temas relevantes da área de pesquisa em saúde no Brasil. De 2007 a 2012, foram realizadas 11 edições dos Cursos de Férias, nas versões verão e inverno, tendo sido oferecidas as mais variadas disciplinas, corrdenadas por mais de 50 pesquisadores do IOC, envolvendo centenas de mestrandos e doutorandos e mais de 1.000 alunos oriundos de dezenas de universidades de todo o país.

Desde o início, um estímulo adicional aos professores do curso foi o desenvolvimento de material didático original para servir de apoio às aulas teóricas e práticas. O resultado desse esforço coletivo se traduz nesta coleção. Os textos foram desenvolvidos em linguagem simples e objetiva e conteúdo inovador, abordando temas tranversais em biociências. Assim, desenvolvemos fascílulos para a formação de jovens cientistas na vanguarda do conhecimento em áreas que apresentam hibridismo e multidisciplinaridades absolutamente crusciais para o desenvolvimento científico e tecnológico do país.

Estamos convencidos de que este material permitirá aos leitores acesso rápido e fácil a conteúdos não abordados durante a graduação, além de possibilitar a integração de atividades didáticas e o estímulo à redação científica entre pós-graduandos do IOC.

Boa leitura.

Helene S. Barbosa
Milton O. Moraes
Rubem F. S. Menna-Barreto

Nota dos organizadores

A criação dos Cursos de Férias foi uma importante iniciativa do Instituto Oswaldo Cruz, cuja principal proposta foi minimizar deficiências de disciplinas oferecidas na graduação, bem como estimular o desenvolvimento do pensamento científico em várias áreas da Saúde no país, e possibilitar a experiência em aplicações práticas nos temas abordados.

Esta apostila corresponde à compilação das duas primeiras edições do curso de Imunofarmacologia. Sua estruturação foi voltada para o aprendizado de aspectos básicos em Imunologia e a compreensão de processos patológicos relacionados ao sistema immune, bem como o conhecimento de conceitos de Farmacologia necessários à compreensão das intervenções terapêuticas relevantes na prática clínica .

É o produto final de um extenso trabalho de pesquisa por parte dos professores (alunos de pós-graduação), e também do exercício de discussão com os coordenadores, resultando em um processo rico de troca de informações e amadurecimento mútuo. Contamos, também, com a contribuição inestimável de um grupo de pesquisadores internos e externos à instituição, que realizou um trabalho de revisão bastante criterioso, fazendo desta apostila uma ferramenta útil para consulta de bibliografia básica e didática complementar.

Patrícia Machado Rodrigues e Silva
Patricia Torres Bozza

Sumário

1. SISTEMAIMUNOLÓGICO 10

1.1. Introdução 11

1.2. Origem do Sistema Imunológico 13

1.3. A resposta imune inata 14

1.4. Células que participam do reconhecimento imunológico inato 15

1.5. A Fagocitose 18

1.6. Receptores de reconhecimento padrão 19

1.7. TLRs 19

1.8. Os Inflamassomas 21

2. IMUNIDADE ADAPTATIVA 24

2.1. Definição 25

2.2. Evolução 25

2.3. Inata x adquirida 26

2.4. Componentes celulares da imunidade adaptativa 26

2.4.1. Linfócito T 26

2.4.1.1. MHC 27

2.4.1.2. Linfócito T CD4 auxiliar 28

2.4.1.3. Linfócito T CD8 citotóxico 29

2.4.1.4. Células NKT 29

2.4.2. Linfócito B 30

2.4.2.1. Os anticorpos 30

2.5. Resposta Celular 31

2.5.1. Reconhecimento do Antígeno 31

2.5.2. Ativação das células T 32

2.5.3. Mecanismos efetores das células T 33

2.5.3.1. Th1 33

2.5.3.2. Th2 33

2.5.3.3. Linfócitos TCD8+ 34

2.5.3.4. Formação das células de memória 35

2.6. Resposta humoral 36

2.6.1. Reconhecimento dos antígenos 36

2.6.2. Ativação dos linfócitos B 37

2.6.3. Mecanismos efetores dos linfócitos B 39

2.7. Principais características da resposta imunológica adquirida 39

2.7.1. Especificidade e diversidade 39

2.7.2. Geração da especificidade e diversidade 40

2.7.2.1. Diversidade do MHC 40

2.7.2.2. Diversidade da Ig 41
2.7.2.3. Diversidade do TCR 44
2.7.3. Memória 44
2.7.4. Tolerância a antígenos próprios 46
2.8. Regulação 46
2.9. Falhas na resposta 47

3. INFLAMAÇÃO AGUDA 48

3.1. Bases da inflamação aguda 49
3.2. Sinais cardinais da inflamação aguda 50
3.3. Eventos da inflamação aguda 51
3.3.1. Alterações vasculares 51
3.3.2. Edema 52
3.3.3. Infiltrado inflamatório 53
3.4. Mediadores químicos da inflamação aguda 55
3.5. Resolução da inflamação aguda 55

4. INFLAMAÇÃO CRÔNICA 56

4.1. Bases da inflamação crônica 57
4.2. Causas da inflamação crônica 58
4.3. Classificação 59
4.3.1. Inespecífica 59
4.3.2. Granulomatosa 59
4.4. Reparo 61
4.4.1. Fases do Reparo/Cicatrização 62
4.5. Doenças inflamatórias crônicas 63
4.5.1. Tuberculose 64
4.5.2. Esquistossomose 66
4.5.3. Asma 69
4.5.4. Silicose 71

5. RESPOSTA IMUNE A PATÓGENOS 74

5.1. Imunidade a bactérias extracelulares 76
5.1.1. Imunidade Inata 76
5.1.2. Imunidade Adaptativa 77
5.1.3. Mecanismos de Evasão 77
5.2. Imunidade a bactérias intracelulares 77
5.2.1. Imunidade Inata 78
5.2.2. Imunidade Adaptativa 78
5.2.3. Mecanismos de Evasão 79
5.3. Imunidade a fungos 79
5.3.1. Imunidade Inata 79
5.3.2. Imunidade Adaptativa 79
5.4. Imunidade a vírus 80
5.4.1. Imunidade Inata 80

5.4.2. Imunidade Adaptativa 80
5.4.3. Mecanismos de Evasão 81
5.5. Imunidade a parasitos 81
5.5.1. Imunidade Inata 82
5.5.2. Imunidade Adaptativa 82
5.5.3. Mecanismos de Evasão 83

6. FARMACOLOGIA GERAL 84

6.1. Introdução e Aspectos Históricos 85
6.2. Princípios básicos de Farmacologia 87
6.3. Vias de administração de fármacos 88
6.4. Tipos de Receptores 92
6.5. Introdução à Farmacocinética 92
6.6. Distribuição de fármacos 94
6.7. Metabolização de fármacos 95
6.8. Eliminação de Fármacos 97
6.9. Tipos de interações estabelecidas entre o fármaco e seu alvo 98

7. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS 102

7.1. Mediadores de origem celular 103
7.1.1. Aminas vaso-ativas 103
7.1.1.1. Histamina 103
7.1.1.2. Serotonina 105
7.1.2. Metabólitos do ácido aracdônico 108
7.1.2.1. Eicosanóides 108
7.1.3. Fator de Ativação de Plaquetária (PAF) 109
7.1.4. Citocinas e quimiocinas 112
7.1.4.1. Citocinas 112
7.1.4.2. Quimiocinas 114
7.1.5. Óxido nítrico (NO) 116
7.2. Mediadores de origem plasmática 118
7.2.1. Bradicinina 118
7.2.2. Sistema complemento (C3 – C9) 118
7.2.3. Sistema de coagulação 119

8. ANTI-INFLAMATÓRIOS ESTEROIDAIS 120

8.1. Glicocorticóides 122
8.2. Mecanismo de ação e efeitos fisiológicos 124
8.2.1. Efeitos metabólicos 126
8.2.2. Efeitos anti-inflamatório e imunossupressor 127
8.2.3. Outros efeitos 128
8.3. Glicocorticóides sintéticos 128
8.4. Aplicação dos glicocorticóides 129
8.4.1. Uso para fins de diagnóstico 129
8.4.2. Distúrbios não-supra renais 129

8.4.3. Efeitos adversos e toxicidade....129
8.4.4. Contra-indicações....131
8.4.5. Inibidores de síntese/antagonistas....131

9. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIS.... 132

9.1. Introdução....133

9.2. Anti-inflamatórios Não-Esteroidais (Inibidores de Ciclooxigenase).... 134
9.2.1. Efeito Antipirético.... 136
9.2.2. Efeito Analgésico.... 136
9.2.3. Efeito Anti-inflamatório.... 136

9.3. Principais Efeitos Adversos dos AINEs 137
9.3.1. Efeitos Adversos Decorrentes do Uso de AINEs: (não seletivos) 137
9.3.2. Efeitos Adversos Decorrentes do Uso de AINEs: (COX-2 seletivos) 138

9.4. Os inibidores seletivos de COX-2.... 139

9.5. Outros fármacos utilizados no controle da dor e hipertermia (não-AINEs)....140
9.5.1. Ácido Acetilsalicílico (AAS) 140
9.5.2. Paracetamol (acetaminofeno).... 141

9.6. Inibidores da Ação de Leucotrienos 141
9.6.1. Inibição da 5-Lipoxigenase 142
9.6.2. Antagonistas dos Receptores de Leucotrienos....142

9.7. Outros Fármacos e Abordagens Terapêuticas 142
9.7.1. Manipulação Dietética na Inflamação....142
9.7.2. Nedocromil sódico e Cromocalina.... 143
9.7.3. Ouro.... 143
9.7.4. Uso de Anticorpos Monoclonais (mABs)....144

10. TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA O ESTUDO DA IMUNOFARMACOLOGIA 146

10.2. Citometria de fluxo e FACS (separador de células ativado por fluorescência) 148
10.2.1. Conceito....148
10.2.2. Preparo das amostras.... 150
10.2.3. Análise dos dados 152
10.2.4. Aplicações 154
10.2.5. *Sorting* 154
10.3. Imunofluorescência.... 156
10.4. Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima (ELISA) 158
10.4.1. Conceito....158
10.4.2. Análise dos dados.... 159

10.5. *Immunoblotting* (*Western blotting*)....160

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 162

1. SISTEMA IMUNOLÓGICO

KELLY G. MAGALHÃES

1.1. Introdução

Para facilitar o entendimento de como surgiu o conceito de Imunologia e auxiliar a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imunológica, é importante se compreender melhor como surgiu o termo Imunidade e quais acontecimentos históricos marcaram sua descoberta. Inicialmente, vamos fazer um breve histórico dos principais acontecimentos que cunharam o termo Imunidade. O termo Imunidade é derivado do Latim *immunitas*, que se refere às isenções de taxas oferecidas aos senadores romanos durante seu mandato político, os quais estavam protegidos pela lei, não sendo punidos por não pagar impostos, diferentemente do resto da população. Desta forma, o termo *immunitas* refere-se à proteção. Em 1798, Edward Jenner, um médico inglês, fez as primeiras observações de que mulheres que trabalhavam ordenhando vacas desenvolviam uma forma muito branda da varíola humana, doença que acometia grande parte da população naquele momento e causava grande número de mortes na Europa. Este médico logo relacionou que estas mulheres se infectavam com o vírus da varíola da vaca, processo pelo qual se gerava uma proteção contra a forma grave da varíola humana. A partir daí, ele propôs a inoculação do líquido de pústulas de varíola da vaca em indivíduos saudáveis, que foram posteriormente infectados com o vírus da varíola humana, e não desenvolveram a doença, assim como ele esperava. Edward Jenner desenvolveu, desta forma, a primeira vacina contra a varíola, e cunhou a palavra vacina derivada do latim *vacca*. Portanto, historicamente IMUNIDADE representa proteção a doenças, mais

especificamente contra doenças infecciosas. A IMUNOLOGIA é o estudo da imunidade, ou seja, os eventos moleculares e celulares que ocorrem quando o organismo entra em contato com microrganismos ou macromoléculas estranhas. As barreiras físicas, químicas e biológicas juntamente com as células e seus mediadores efetores responsáveis pela imunidade constituem o SISTEMA IMUNOLÓGICO.

A defesa do hospedeiro contra micro-organismos patogênicos é realizada pelo sistema imunológico, o qual é dividido, para fins didáticos, em dois tipos: imunidade inata e imunidade adquirida. Ambos componentes reconhecem micro-organismos invasores como não-próprios. Esse processo leva a eliminação destes micro-organismos, em decorrência da resposta imune.

A resposta imune inata é mediada por uma variedade de células de origem mielóide (tais como macrófagos, células dendríticas, monócitos, neutrófilos e eosinófilos) e linfóide (células matadoras naturais ou células NK) as quais podem rapidamente exercer suas funções efetoras através de um repertório restrito de receptores. Estes receptores reconhecem padrões moleculares e possuem especificidade limitada . Por exemplo, há receptores que reconhecem RNA fita dupla presente em células infectadas por vírus; qualquer vírus cujo material genético é RNA, não um tipo de vírus em particular. Em contraste, a resposta imune adaptativa é mediada por células de origem linfóide (linfócitos B e T) que expressam clonalmente uma enorme variedade de receptores antigênicos específicos a porções pequenas das moléculas, os denominados epitopos. Assim, há vários clones de células específicas a porções diferentes da mesma molécula de um determinado patógeno. Estes receptores são produzidos por recombinações somáticas sítio-específicas e ocorrem apenas nos linfócitos e são denominados receptores de linfócitos T (TCR) e receptores de linfócitos B (BCR).

A resposta imunológica adaptativa é caracterizada pela seleção clonal de linfócitos antígeno-específicos, os quais geram uma resposta protetora de longa duração contra doenças, denominada memória imunológica. Ao contrário da imunidade adaptativa, a imunidade inata não gera memória imunológica. A função essencial da imunidade inata consiste na sua habilidade em gerar uma rápida resposta, agindo diretamente no patógeno e essencialmente do mesmo modo à infecções repetidas. É importante ressaltar que a resposta imune inata e a adaptativa interagem entre si e atuam em conjunto, compondo assim o sistema imunológico.

A imunidade inata também possui importante papel no controle e modulação da resposta imunológica adaptativa. Receptores celulares não-clonais de neutrófilos e monó-

citos/macrófagos ou ainda de células endoteliais, por exemplo, são capazes de induzir a resposta celular. Essa resposta pode incluir fagocitose, liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como, Fator de Necrose Tumoral (TNF) e interleucina – 1 (IL-1), e nos casos de células apresentadoras de antígenos, o aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras, tais como, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86).

1.2. Origem do Sistema Imunológico

Em termos evolutivos, a resposta imune inata é bem mais antiga do que a resposta imune adaptativa, sendo primeiramente descrita nos invertebrados. Já a imunidade adaptativa foi primeiramente observada nos vertebrados. Embora a resposta imune adaptativa tenha sido um dos principais focos das pesquisas em Imunologia no passado, os recentes avanços no entendimento da imunidade inata como um mecanismo de defesa primitivo têm aumentado cada vez mais o interesse nessa área.

A principal hipótese e mais bem aceita sobre a origem da resposta imune adaptativa é que um grande número de genes, incluindo aqueles codificantes das imunoglobulinas, moléculas de MHC classe I e II, TCRs $\alpha\beta$ e TCRs $\gamma\delta$, bem como os processos celulares e os órgãos que medeiam a imunidade adaptativa, surgiram ao longo de um curto período evolucionário, com um ancestral comum dos vertebrados mandibulados modernos.

Apesar das imunoglobulinas terem sido descobertas há mais de 100 anos atrás, somente na década de 70, começamos a entender melhor como funciona a geração da diversidade das imunoglobulinas ou dos BCRs através da detecção dos genes envolvidos nas hipermutações somáticas e dos rearranjos das regiões VDJ (*Variable Diversity Joining*). Já na década de 80, onde os TCRs foram descobertos, foi um consenso geral que os TCRs e os BCRs compartilhavam um ancestral comum, baseado em seus domínios organizacionais gênicos similares e o mesmo mecanismo de geração de diversidade. Posteriormente, houve a descoberta de que alguns genes codificadores de enzimas que tinham a capacidade de gerar um rearranjo dos genes dos TCRs e BCRs e pela hipermutação dos genes dos BCRs, poderia ocorrer por transferência horizontal. Estas enzimas foram denominadas RAGs (*Recombination Activating Genes)* e foram determinantes no entendimento da origem da resposta imune adaptativa.

A capacidade que o sistema imunológico dos vertebrados tem de responder a inúmeros antígenos de um modo tão específico é, portanto, em decorrência da enorme

diversidade de linfócitos B e T, cada qual com um receptor particular. Essa diversidade é conseqüência da recombinação dos elementos V, D e J, presentes nos *loci* dos genes que codificam para os receptores linfocitários (recombinação V(D)J). Esta reação é catalisada por um conjunto de moléculas ubiquitárias envolvidas na reparação do DNA e pelas recombinases RAGs (RAG-1 e RAG-2). Essas proteínas foram fundamentais para a recombinação e rearranjo gênico das regiões responsáveis pela variabilidade dos receptores de linfócitos B e T, característicos da resposta imunológica.

Mas, como esta diversidade gênica surgiu nos vertebrados ao longo da evolução? Evolutivamente, antes do surgimento dos vertebrados mandibulados, existiam os agnathas (do grego *sem maxilas*), vertebrados mais primitivos onde se agrupavam peixes sem mandíbulas, como por exemplo, as lampréias. Esses animais possuíam um sistema de reconhecimento primitivo, mas capaz de reconhecer uma variedade de patógenos invasores. O aparecimento dos condrictes permitiu o contato desses animais com uma gama ainda maior de patógenos, uma vez que a presença de mandíbulas possibilitou a alimentação de animais maiores. Desta forma, a maior variedade de alimentos alcançada pelos vertebrados mandibulados com o aparecimento da mandíbula, selecionou indivíduos que apresentavam as RAGs inseridas em seu genoma. Acredita-se que os genes das RAGs têm uma origem procariótica ou viral, e que se inseriram, ao longo da evolução, no genoma ancestral dos vertebrados mandibulados por transferência horizontal, há cerca de 450 milhões de anos.

1.3. A resposta imune inata

A resposta imune inata abrange mecanismos que já existem antes da infecção, e que são capazes de rápidas respostas aos micróbios e que reagem essencialmente do mesmo modo à infecções repetidas. Os principais componentes que medeiam a resposta imune inata são: (I) as barreiras físicas, químicas e biológicas, tais como os epitélios e as substâncias antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais; (II) as diferentes células fagocíticas e células NK; (III) as proteínas do sangue incluindo membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação; e (IV) proteínas chamadas citocinas, que regulam e coordenam várias atividades celulares.

Desta forma, no início de um processo infeccioso no organismo, os primeiros obstáculos a serem ultrapassado por patógenos são as barreiras físicas (as quais são constituídas pela pele, muco e cílios), barreiras químicas (as quais são constituídas pela saliva,

suor, lágrimas, enzimas digestivas, lisozimas, urina, lactoferrina) e as barreiras biológicas (as quais são constituídas pela microbiota benéfica endógena do organismo).

Em seguida, os patógenos terão que interagir com as células da resposta imune inata, com seus receptores e com todos os mecanismos inflamatórios que estarão reconhecendo e combatendo a infecção.

1.4. Células que participam do reconhecimento imunológico inato

A hematopoese é o processo de geração de células do sangue, incluindo eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Após o nascimento, essa função hematopoética é exercida pela medula óssea, que contém as células progenitoras comprometidas com todas as linhagens sanguíneas. Células hematopoéticas primordiais são definidas como células que possuem a capacidade de se auto-renovar. Elas também são pluripotentes, ou seja, capazes de se diferenciar em várias linhagens ou tipos celulares. Na medula óssea, esta célula primordial, na presença de células do estroma, matriz extracelular e sob a ação de diversos fatores de crescimento e citocinas, irá originar dois grandes progenitores, que são os mielóides e os linfóides, os quais geram todas as células do sistema imune. Veremos abaixo com mais detalhes, algumas células que participam da resposta imune inata.

- **NEUTRÓFILOS:** são células que apresentam núcleo multilobulado (geralmente com 3 a 5 lóbulos unidos por um filamento delgado). Possuem citoplasma com diferentes grânulos, os quais estão repletos de proteínas pró-inflamatórias e podem ser classificados em 3 tipos: (I) grânulos azurofílicos (primários) que estão diretamente relacionados com a atividade microbicida destas células, e se apresentam bastante elétron-densos e contém mieloperoxidade; (II) grânulos específicos (secundários) os quais contém lactoferrina que tem a capacidade de se ligar ao ferro e tem atividade bactericida; (III) grânulos gelatinase (terciários) os quais contém metaloproteinase 9. Constituem uma das células mais abundantes da resposta imunológica inata e são geralmente as primeiras células a chegarem ao local da infecção ou injúria. Os neutrófilos apresentam também um interessante mecanismo microbicida chamados NET (*Neutrophil Extracellular Traps*) que consiste no extravazamento de componentes nucleares e granulares para o meio extracelular que auxiliam na contenção física do micro-organismo, bem como na sua morte celular.

➢ **EOSINÓFILOS**: são muito menos numerosos do que os neutrófilos, constituindo apenas 2-3% do total de leucócitos. Seu núcleo, em geral, é bilobulado. O citoplasma dos eosinófilos é quase inteiramente ocupado por grânulos específicos. O retículo endoplasmático, as mitocôndrias e o aparelho de Golgi são pouco desenvolvidos. Esta célula exerce importante papel na defesa contra parasitos e em reações alérgicas. Uma vez ativados, os eosinófilos induzem uma resposta inflamatória através da produção e liberação de seus grânulos catiônicos. Os principais componentes de seus grânulos e que exercem uma potente atividade citotóxica em parasitos, mas que também podem causar injúrias teciduais, são: (I) a proteína catiônica básica (as quais apresentam toxicidade a parasitos, induzem desgranulação de mastócitos e basófilos); (II) proteína catiônica eosinofílica (as quais causam poros na membrana da célula alvo, permitindo a entrada de moléculas citotóxicas); (III) neurotoxinas (as quais são ribonucleases com propriedades antivirais), e (IV) peroxidases (as quais formam espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, promovendo o estresse oxidativo na célula alvo, e causando morte celular por apoptose e necrose). Os eosinófilos são células com capacidade de realizar fagocitose e também de apresentar antígenos aos linfócitos T, principalmente aos linfócitos TCD4+ através da expressão de moléculas MHC de classe II. Estudos recentes demonstraram que os eosinófilos também são capazes de formar armadilhas extracelulares semelhantes àquelas observadas em neutrófilos, porém denominadas aqui de EETs (*Eosinophil Extracellular Traps*).

➢ **MACRÓFAGOS**: são células grandes e consistem na forma madura do monócito, são células com altíssimo poder fagocitário, e podem permanecer por um longo período (meses a anos) nos tecidos. Possuem funções de extrema importância para o sistema imunológico como: apresentar antígenos, fagocitar patógenos e restos celulares e produzir citocinas. Os macrófagos podem ser polarizados em dois tipos, conforme o tipo de função efetora que ele exerce e à que ambiente ele foi exposto: macrófagos M1 ou M2. De forma geral, esta nomenclatura foi escolhida porque macrófagos M1 e M2 promovem uma resposta do tipo Th1 e Th2, respectivamente. Macrófagos polarizados em M1 são aqueles que foram expostos a citocinas do tipo Th1. Eles possuem características citotóxicas, secretam grandes quantidade de citocinas pró-inflamatórias como IFNγ e possuem atividade microbicida e tumoricida. Eles não conseguem sintetizar rapidamente arginase e, portanto, são capazes de converter arginina em óxido nítrico, e exercer sua

função microbicida. Já os macrófagos polarizados em M2 são aqueles que foram expostos à citocinas do tipo Th2, estão envolvidos no reparo tecidual através da estimulação de fibroblastos e deposição de matriz extracelular, secretam citocinas do tipo Th2, tais como IL-4, IL-13 e IL-10, sintetizam arginase, a qual inibe a produção de óxido nítrico e, portanto, permite a produção de ornitina (um precursor de hidroxiprolinas e poliaminas).

- **BASÓFILOS**: são células com núcleo volumoso, com forma retorcida e irregular. A membrana plasmática dos basófilos, assim como a dos mastócitos, possui receptores para a imunoglobulina E (IgE). Eles liberam seus grânulos para o meio extracelular, sob a ação dos mesmos estímulos que promovem a expulsão dos grânulos dos mastócitos. No entanto, apesar das semelhanças, basófilos e mastócitos não são formas diferentes do mesmo tipo celular, pois se originam de precursores diferentes.

- **MASTÓCITOS**: são células pouco encontradas na circulação sanguínea, normalmente seus progenitores hematopoéticos migram da medula óssea e se diferenciam *in situ,* de acordo com as características peculiares daquele microambiente. Os mastócitos são células com citoplasma extremamente rico em grânulos que podem armazenar potentes mediadores químicos da inflamação, como a histamina, heparina, ECF-A (fator quimiotáxico dos eosinófilos), SRS-A, serotonina e fatores quimiotáxicos dos neutrófilos. Os mastócitos possuem receptores de superfície com alta afinidade à porção Fc das imunoglobulinas IgE, denominados FcεRI. A ligação deste receptor com a IgE induz uma potente desgranulação desta célula e liberação do seu conteúdo citoplasmático no meio extracelular, causando forte reação inflamatória.

- **CÉLULAS NK**: são células peculiares que possuem um progenitor linfóide e foram inicialmente caracterizadas como linfócitos, mas que participam da resposta imune inata. Estas células possuem atividade citotóxica rápida, induzindo diretamente a morte de células tumorais e células infectadas por vírus. São grandes produtoras de citocinas pró-inflamatórias como IFNγ e TNF, bem como de citocinas imunossupressoras como a IL-10, além de secretar diversos tipos de quimiocinas, como MCP-1, MIP1-α, MIP1-β, RANTES e IL-8. Estas células possuem receptores de ativação e de inibição, os quais controlam seus processos de ativação e desativação, respectivamente.

- **CÉLULAS DENDRÍTICAS**: Células dendríticas podem ser encontradas na sua forma imatura as quais são altamente eficientes em capturar antígenos, ou na sua forma madura

as quais são muito eficientes em apresentar antígenos. São células especializadas em capturar e apresentar antígenos aos linfócitos virgens, e são, portanto, consideradas a ponte entre a imunidade inata e a imunidade adquirida. As células dendríticas residem no tecido periférico, como pele, fígado e intestino onde capturam antígenos, tornam-se ativadas e migram para os linfonodos regionais. Nestes locais ocorre o processamento e a apresentação de antígenos proteicos ou lipídicos aos linfócitos T virgens. Elas possuem diferentes moléculas co-estimulatórias em sua superfície expressas em maior densidade que outras células apresentadoras de antígenos, como CD80, CD86 e CD40, as quais fazem destas células as melhores apresentadoras de antígenos a linfócitos T virgens.

1.5. A Fagocitose

O processo de fagocitose foi primeiramente descrito com os importantes achados de Elie Metchnikoff. Em 1871, Metchnikoff descobriu que larvas de estrelas do mar em contato com espinhos de rosa, apresentavam um mecanismo celular, com a presença de células com a capacidade de englobar patógenos invasores e induzir uma resposta potente e protetora. Desde então, ficou cada vez mais claro que a fagocitose é um dos mais importantes processos que medeiam e controlam as funções efetoras da resposta imune inata.

Células especializadas como macrófagos, monócitos e neutrófilos, cuja principal função é remover grandes patógenos – como bactérias e leveduras ou alternativamente grandes debris celulares e/ou corpos apoptóticos –, utilizam-se primariamente da fagocitose para realizar essa tarefa. Os eventos envolvidos na fagocitose são altamente regulados e envolvem receptores específicos de membrana.

Em células fagocíticas, a captura de patógenos é conduzida pela associação de diversos tipos de moléculas (por exemplo, os anticorpos e as unidades do sistema complemento) à superfície do patógeno (opsonização), seguida pelo reconhecimento destas moléculas por receptores na superfície da célula e fundamentalmente da associação destes receptores às moléculas aderidas ao patógeno (opsoninas). Esta associação promove expansões da membrana celular, dependente de actina, que culmina com o englobamento do patógeno e, conseqüentemente, sua internalização.

Uma vez internalizado, o patógeno é envolvido em uma vesícula (endossoma) que em seguida é fundido com a outra vesícula contendo diversas enzimas, o lisossomo. A atividade enzimática da nova vesícula agora formada (fagolisossomo) destrói o patógeno. De

forma simples, podemos entender que a fagocitose é um mecanismo importantíssimo do organismo que o protege contra a invasão de agentes infecciosos.

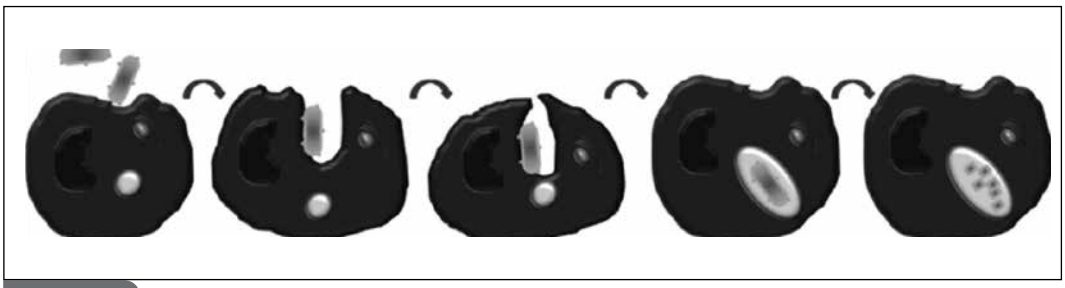


Fig. 1.1 Representação do processo de fagocitose de uma bactéria opsonizada, com a fusão do vacúolo parasitóforo com o lisossoma, formando o fagolisossoma. A ação de enzimas no interior do fagolisossoma destrói a bactéria.

1.6. Receptores de reconhecimento padrão

As células da resposta imune inata apresentam *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) que são responsáveis por detectar a presença de micro-organismos ou a injúria celular e tecidual de um microambiente. Eles são capazes de reconhecer *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs), bem como *Damage-Associated Molecular Pattern Molecules* (DAMPs). Estes receptores têm esta nomenclatura em virtude de possuírem certa especificidade aos seus ligantes. Desta forma, um tipo de receptor reconhece apenas DNAs, ou RNAs, ou determinadas proteínas, ou carboidratos, por exemplo.

Existem diferentes tipos de receptores de reconhecimento padrão, onde podemos ressaltar 4 famílias importantes de PRRs: proteínas transmembranares, tais como, (I) receptores do tipo Toll (TLRs) e (II) receptores de lectina tipo C (CLRs); bem como proteínas citoplasmáticas, como receptores do tipo RIG-I genes induzíveis do ácido retinóico (RLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs). Dentre os PRRs, os TLRs são os mais bem estudados e compreendidos até o momento, e por esta razão vamos analisá-los com mais detalhes.

1.7. TLRs

Em 1996, foi descrito na mosca de frutas, *Drosophila melanogaster*, que o receptor Toll, envolvido com sua polarização dorso-ventral, também era responsável pela resposta imune

na infecção contra fungos. Este estudo possibilitou que imunologistas percebessem que a imunidade inata pode detectar a invasão por microrganismos. Subseqüentemente, foram descritos diversos homólogos do receptor Toll de *Drosophila* em mamíferos, designados agora como receptores do tipo Toll, pertencentes à classe de receptores de reconhecimento de padrões moleculares .

Os TLRs têm a capacidade de reconhecer patógenos ou produtos derivados de patógenos e iniciar uma via de sinalização que leva a ativação da imunidade inata do hospedeiro. Todos os TLRs contém uma região extracelular rica em repetições de leucinas (LRRs) e uma região intracelular similar ao receptor de interleucina-1 (TIR) que pode recrutar proteínas adaptadoras, como por exemplo a MyD88, e ativar uma cascata de sinalização celular, a qual culmina com a produção de citocinas, quimiocinas, eicosanóides e moléculas antimicrobianas. Portanto, a sinalização por TLRs ativa a resposta imune inata e pode consequentemente modular a resposta imune adaptativa.

Existem atualmente 13 tipos de TLRs. Foram identificados em humanos 10 receptores tipo toll (TLR1–10) e 12 TLRs em camundongos (TLR1–9, TLR11–13).

Sua localização celular varia conforme o tipo de receptor: TLR1, TLR2, TLR4 e TLR5, por exemplo, estão localizados na superfície da membrana celular, enquanto TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são receptores intracelulares localizados na membrana de endossomos e lisossomos.

Cada TLR é capaz de reconhecer diferentes padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). TLR4, por exemplo, reconhece lipopolissacarídeo (LPS) derivado da parede de bactérias gram-negativas; TLR2 reconhece peptideoglicano, o qual é abundante em bactérias gram-positivas, além de lipoproteínas e ácido lipoteicóico; TLR3 reconhece fita dupla de RNA proveniente de vírus; TLR7 e TLR8 reconhecem fita simples de RNA viral; TLR5 reconhece flagelina de bactérias; TLR9 reconhece regiões CpG de DNA não metiladas encontradas abundantemente em genomas de procariotos e vírus; TLR11 reconhece profilina de protozoários, TLR13 reconhece RNA ribossomal 23S de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

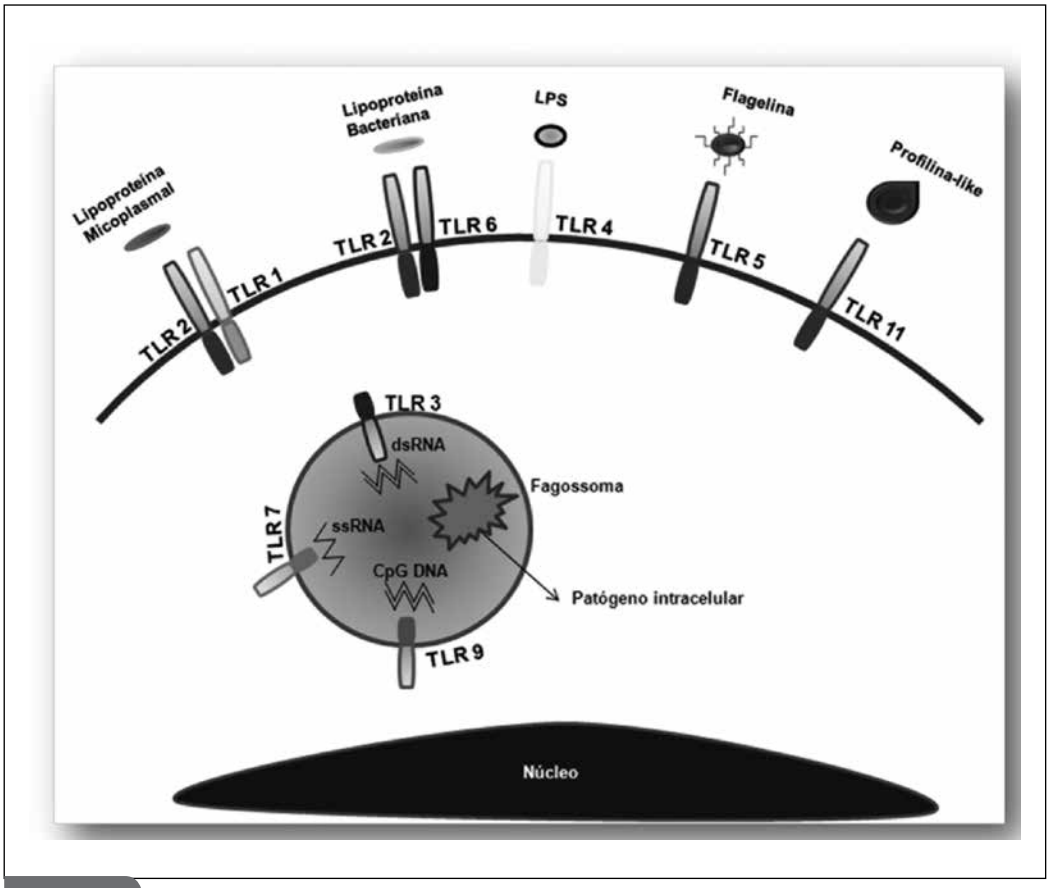


Fig. 1.2 Esquema de reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos extracelulares e intracelulares pelos receptores Toll-like.

1.8. Os Inflamassomas

Além dos TLRs , a imunidade inata também conta com a ação dos membros da família dos receptores do tipo NOD ou NLR (*NOD-like receptors*). Atualmente, cerca de 23 genes da família NLR foram descritos em humanos, enquanto 34 genes já foram identificados em camundongos. A estrutura desses receptores é basicamente dividida em três regiões, que consistem de uma porção C-terminal rica em leucina (LRRs) e uma porção N-terminal de recrutamento de caspase (CARD) ou pirina (PYD); e um domínio central NACHT. Análises filogenéticas revelaram três distintas subfamílias dentro da família NLR: a subfamília dos NODs (NOD1-2, NOD3/NLRC3, NOD4/NLRC5, NOD5/NLRX1, CIITA), a subfamília dos NLRPs (NLRP1-14, também chamados NALPs) e a subfamília do IPAF (NLRC4 e NAIPs). Recentemente, vários estudos têm demonstrado a importância desses recepto-

res na imunidade contra patógenos intracelulares, pois eles são capazes de se oligomerizar e participam na formação de um complexo multiprotéico denominado inflamassoma. Este complexo é responsável pela clivagem e ativação de caspase-1, que exerce um papel fundamental no processamento e secreção das interleucinas (IL) pró-inflamatórias IL-1β e IL-18. Dois sinais são necessários para a produção de IL-1β e IL-18, um deles é a sinalização por PRRs que leva à ativação do fator de transcrição NF-κB, induzindo a síntese de pró-IL-1β e pró-IL-18. O segundo sinal consiste no processamento proteolítico desses precursores em suas formas reativas via caspase-1, a qual é ativada pelo inflamassoma. Além disso, a ativação de caspase-1 também leva à morte celular por piroptose.

Até o momento, 4 inflamassomas foram identificados: NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2. A formação dos inflamassomas NLRP1, NLRC4 e AIM2 é promovida por estímulos específicos. NLRP1, que foi o primeiro inflamassoma a ser descrito, é ativado principalmente pela toxina letal proveniente do *Bacillus anthracis*. Já o inflamassoma AIM2 é ativado por fitas duplas de DNA de vírus e bactérias, enquanto o inflamassoma NLRC4 responde à proteína bacteriana flagelina e PrgJ, um componente do sistema de secreção tipo III. O inflamassoma NLRP3 é atualmente o mais bem caracterizado inflamassoma, o qual responde a inúmeros estímulos físicos e químicos. Dentre estes estímulos, podemos destacar: glicose e ATP extracelulares, cristais de urato monossódico (MSU), colesterol, sílica, asbestos, sais de alumínio, hemozoína malarial, depósitos amilóides e ácidos graxos.

Considerando a diversidade química e estrutural dos ativadores do inflamassoma NLRP3, é mais provável que a ativação do inflamassoma NLRP3 não ocorra via a ligação direta com seus ativadores, e sim através de sinais intracelulares intermediários induzidos por estes ativadores. Podemos citar como exemplos destes sinais intracelulares intermediários: o efluxo de potássio, formação de poros na membrana celular, o dano lisossomal, a elevação da produção de espécies reativas de oxigênio e o dano mitocondrial.

A ativação dos inflamassomas deve ser firmemente controlada, caso contrário haverá o estabelecimento de doenças autoinflamatórias, como por exemplo a febre mediterrânea. Portanto, os inflamassomas devem ser rapidamente ativados e serem capazes de exercer sua atividade efetora de forma eficiente, mas deve em seguida ser regulado negativamente para se evitar danos colaterais desnecessários. A regulação negativa dos inflamassomas pode ser feita através da indução da autofagia, produção de interferons do tipo I e linfócitos T, microRNAs e produção de óxido nítrico.

2. IMUNIDADE ADAPTATIVA

ALESSANDRA M. SIQUEIRA
PRISCILLA C. OLSEN

2.1. Definição

A imunidade adaptativa ou adquirida, diferentemente da inata, apresenta reconhecimento específico de epítopos com distribuição mais restrita, podendo discernir porções diferentes de uma mesma proteína, por exemplo. Além disso, a imunidade adaptativa desenvolve memória de uma resposta ocorrida. Esta última característica viabiliza uma resposta aumentada a cada exposição subsequente a uma determinada molécula. O sistema imunológico adquirido é capaz de reconhecer e reagir a um grande número de substâncias, microbianas ou não, de forma mais específica que o sistema imunológico inato.

As substâncias que induzem uma resposta imunológica específica são chamadas de antígenos, os quais são definidos como qualquer molécula que se liga a um anticorpo ou a um receptor de célula T (TCR). O anticorpo liga-se a antígenos proteicos, lipídicos e polissacarídeos, já o TCR liga-se somente a antígenos de origem proteica. O antígeno que induz a resposta imunológica é denominado de imunógeno. Um imunógeno ou patógeno pode ser formado por vários antígenos e cada antígeno pode conter vários epítopos, a qual é uma porção específica do antígeno reconhecida pelos receptores da imunidade adaptativa. Antígenos que contém apenas um epítopo, frequentemente, não são capazes de promover uma resposta, a menos que estejam ligados a macromoléculas.

2.2. Evolução

Como vimos anteriormente, a imunidade inata é o mecanismo de defesa filogeneticamente mais antigo, existindo em todos os organismos multicelulares. Diferentemente

da inata, a imunidade adaptativa está presente a partir dos vertebrados mandibulados sendo que os vertebrados não mandibulados não apresentam vestígio de imunidade adaptativa.

A evolução da imunidade adaptativa parece ter sido possível devido a invasão de um elemento de transposição carreando um gene semelhante ao gene de imunoglobulina. Esse fenômeno pode ter gerado a habilidade de promover o rearranjo genético, conferindo maior diversidade aos receptores dessa resposta. A persistência da imunidade adaptativa sugeriu que tenha ocorrido uma seleção positiva nos organismos que faziam rearranjo somático dos seus receptores.

Observou-se no fim do século XX que as enzimas recombinases denominadas RAG-1 e RAG-2 participavam na recombinação de fragmentos de DNA, num processo semelhante ao de transposição. Essas enzimas clivam os genes na região V(D)J e promovem a recombinação desses genes, favorecendo uma grande variabilidade nos receptores que participam da imunidade adquirida. Esse processo será melhor detalhado posteriormente.

2.3. Inata x adquirida

É importante ressaltar que as respostas imunes adaptativas são, em sua maioria, dependentes das células que participam da imunidade inata. Podemos pensar na resposta imune adaptativa como um processo que ocorre após a resposta imune inata acentuando os mecanismos de defesa da última.

2.4. Componentes celulares da imunidade adaptativa

2.4.1. Linfócito T

Os linfócitos T são as células que medeiam a resposta imune celular. Originam-se na medula óssea e amadurecem no timo, onde são selecionados com base na sua habilidade de distinguir o que é próprio ou não próprio no hospedeiro. Os linfócitos T são células da imunidade adquirida que possuem receptores membranares denominados TCR capazes de reconhecer peptídeos associados à proteína de membrana denominada complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de uma célula (descrito posteriormente). Diferentemente dos anticorpos, estas células não reconhecem antígenos solúveis. Cada linfócito expressa um receptor de antígeno com especificidade diferente, o que pos-

sibilita o reconhecimento e resposta contra virtualmente qualquer antígeno. Essa diversidade é conferida pelo rearranjo somático dos genes que geram o receptor de célula T (TCR), realizado pelas recombinases RAG-1 e RAG-2. O TCR reconhece em sua maioria antígenos proteicos que antes foram reconhecidos, processados e apresentados como peptídeos, pelo MHC, expressos nas membranas plasmáticas das células apresentadoras de antígenos (APC).

Os linfócitos T são constituídos, principalmente, por duas populações funcionalmente distintas denominadas de linfócitos T CD4 auxiliar (ou *helper*) e linfócitos T CD8 citotóxicos (CTL). As células $TCD4^+$ são chamadas de auxiliares (Th) porque regulam a resposta imune humoral e celular. Os linfócitos Th podem ainda diferenciarem-se em Th1 e Th2 baseado nos seus perfis de expressão de proteínas durante a fase de reconhecimento do antígeno. Mais recentemente foram distinguidas novas subpopulações de células CD4 Th denominadas Th17. Falaremos mais sobre a função destas células posteriormente.

Para melhor compreensão do reconhecimento dos antígenos pelas células T falaremos um pouco sobre o complexo de histocompatibilidade principal.

2.4.1.1. MHC

O MHC é uma proteína heterodimérica expressa na membrana celular de todas as células nucleadas. Essas proteínas ligam-se aos antígenos proteicos presentes nas células e os apresentam na membrana plasmática. O complexo MHC associado ao antígeno pode ser reconhecido pelos receptores TCR das células T. Os MHCs são altamente variáveis, ou seja, possuem grande polimorfismo. As moléculas de MHC podem ser do tipo clássico ou não-clássico. Como as moléculas de MHC não-clássicas estão, em sua maioria, associadas a função de células do sistema imune inato, neste capítulo abordaremos apenas as moléculas de MHC clássicas. Há duas classes de MHC do tipo clássico: MHC de classe I, que são reconhecidos pelos $TCD8^+$, e são expressos em todas as células nucleadas, e o MHC de classe II que são reconhecidos pelos $TCD4^+$, e são expressos apenas nas células apresentadoras de antígenos especializadas como as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos B. Os MHC de classe II também podem ser encontrados em outros tipos celulares, como células endoteliais e epiteliais do timo. Os detalhes sobre a formação da diversidade do MHC serão abordados posteriormente.

2.4.1.2. Linfócito T CD4 auxiliar

O linfócito T CD4 foi denominado linfócito auxiliar, pois interage com diversas células através da secreção de citocinas, orquestrando a resposta imune. Esse subgrupo de linfócitos pode ativar os macrófagos nas respostas imunológicas mediadas por células e promovem a produção de anticorpos, além de promover a ativação e/ou o recrutamento de demais leucócitos.

Quando ativadas, as células T CD4 diferenciam-se em subgrupos de células efetoras, os quais são distinguidos pelo perfil de citocinas que expressam. Rotineiramente divide-se essa população entre células com perfil Th1 e Th2. As células Th1 estão associadas com propriedades microbicidas de células fagocíticas, proteção contra patógenos intracelulares e a indução da produção de anticorpos IgG pelos linfócitos B (IgG2a). As células Th2 estimulam a resposta imunológica humoral através da ativação de linfócitos B e, consequentemente da produção de diversos isotipos de imunoglobulina (IgE, IgG1 e IgA). Além disso, tais células promovem a proteção contra helmintos. Hoje se sabe que além desses subgrupos existem também as células Th17, cuja função recém-estabelecida é a proteção contra bactérias extracelulares. Devemos ressaltar que a exacerbação da ação dessas células pode resultar numa resposta danosa ao organismo como visto em patologias sistêmicas, na alergia, na asma e nas doenças autoimunes.

Algumas células T CD4 não são auxiliares e estão envolvidas na manutenção da tolerância imunológica e na regulação da resposta imune, sendo chamadas de células T regulatórias, ou Tregs. As principais populações de células T regulatórias estudadas são as Treg naturais derivadas do timo (caracterizadas pela expressão de $CD4^{+-}$ $CD25^{+}Foxp3^{+}$) e células Treg induzidas por antígeno na periferia, produtoras de IL-10 e TGF-β (as quais podem ser $Foxp3^{+}$ ou $Foxp3^{-}$). Estas citocinas são mediadores anti-inflamatórios capazes de inibir a resposta celular de diversas células efetoras na inflamação, como linfócitos T CD4 e células dendríticas. Além da produção de citocinas anti-inflamatórias as Treg também induzem a supressão por contato (engajamento de GITR) com as células inflamatórias, como linfócitos

e células dendríticas, através da expressão de moléculas inibitórias como a CTLA-4 e a PD-1. Desta forma, as Treg modulam a ativação de células do sistema imune inato (células NK e células dendríticas) e adaptativo (TCD4, TCD8 e células B).

2.4.1.3. Linfócito T CD8 citotóxico

Os linfócitos T CD8 citotóxicos medeiam a defesa através de sua ação direta em células alvo transformadas bem como em células infectadas por vírus ou outros microrganismos intracelulares. Após o reconhecimento do peptídeo via-MHC essas células são ativadas e podem induzir a morte da célula infectada por dois mecanismos. O primeiro mecanismo é a liberação direta de grânulos que contêm a proteína formadora de poros, perforina, e também diversas proteases como a granzima nas células alvo. A perforina, a qual não é uma protease, pode se polimerizar na membrana lipídica da célula e formar poros nas membranas plasmáticas e vesiculares. A granzima, por sua vez, cliva proteoliticamente enzimas celulares chamadas de caspases, as quais induzem uma cascata de ativação de demais caspases que culminam na apoptose da célula. O segundo mecanismo é mediado pela via do ligante de Fas (FasL)/Fas, o ligante FasL é expresso em células T CD8 ativadas e pode ligar-se ao Fas, uma proteína expressa em diversos tipos celulares. Essa interação também culmina com a ativação de caspases e a apoptose da célula alvo.

2.4.1.4. Células NKT

As células NKT são um subtipo de linfócitos T que têm características funcionais semelhantes aos linfócitos T e também às células *natural killer*. A maioria destas células expressa um TCR parcialmente variante que reconhece antígenos glicolipídicos apresentados pela molécula CD1d das APCs. Estas células se desenvolvem no timo e quando chegam na periferia podem agir rapidamente liberando grande quantidade de citocinas como IL-4 e IFN-γ, influenciando o tipo e a magnitude da resposta imunológica. Participam da resposta imune inata, por isso não serão discutidas a fundo neste capítulo.

2.4.2. Linfócito B

Os linfócitos B originam-se e diferenciam-se na medula óssea. Estas células são responsáveis pela resposta imune mediada por anticorpos, também chamada de resposta imune humoral. Estas células reconhecem o antígeno através de seu receptor específico denominado BCR ou imunoglobulina (Ig) e, após a ativação são capazes de secretar estas imunoglobulinas. As Ig secretadas terão diversas funções na resposta imunológica, como neutralização, opsonização de antígenos, citotoxicidade celular dependente de anticorpo e ativação do sistema complemento. Após interação específica via Ig com um antígeno, as células B podem fagocitá-lo e apresentá-lo via MHC para as células T auxiliares, as quais irão liberar citocinas específicas que induzirão a ativação destas células. Após a ativação, estas células irão diferenciar-se em plasmócitos, células secretoras de anticorpos. Além da recombinação somática do BCR, durante a maturação do linfócito B ocorre, também, a mudança de isotipo e a maturação da afinidade do anticorpo. Estes processos são induzidos pela interação entre CD40L nas células T e CD40 nas células B e orquestrados por citocinas produzidas pelas células Th e são uma característica específica da resposta humoral.

2.4.2.1. Os anticorpos

Os anticorpos ou imunoglobulinas são constituídos de cadeia leve e cadeia pesada. As cadeias pesadas são nomeadas pelas cinco letras gregas: α, δ, ε, γ e μ que correspondem aos cinco tipos de anticorpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Estes isotipos ainda podem apresentar subtipos. Cada cadeia pesada possui dois tipos de regiões: a constante que é semelhante em todos os anticorpos do mesmo isotipo e a variável, que é responsável pelo reconhecimento dos antígenos. A cadeia leve também possui uma região variável e constante. A região Fab é a região de ligação ao antígeno, enquanto a região Fc, liga-se a receptores encontrados em diversas células da resposta imune, permitindo a ativação das mesmas. Mais detalhes sobre os anticorpos serão abordados posteriormente.

2.5. Resposta Celular

A resposta imune celular é mediada pelos linfócitos T que são ativados após contato com uma APC apresentando um antígeno específico para a sequência variável do seu TCR. O TCR reconhece o complexo do peptídeo com o MHC da célula APC. Essa interação é mais provável de ocorrer nos linfonodos, local para onde ambos os tipos celulares são atraídos. Uma vez que essas células T são ativadas, inicia-se a etapa de proliferação e posterior migração para o local da inflamação através de gradientes com concentrações crescentes de agentes quimioatractantes liberados no sítio inflamatório, por outras células inflamatórias, incluindo macrófagos e mastócitos. No sítio da inflamação, as células T exercem suas funções efetoras como: a eliminação de patógenos intracelulares em células fagocíticas, mediante liberação da citocina IFN-γ; indução da morte por apoptose de células infectadas com microrganismos e, a ativação de demais leucócitos numa determinada resposta a microrganismos extracelulares. Descreveremos a seguir os detalhes desta resposta.

2.5.1. Reconhecimento do Antígeno

As células T que nunca encontraram um antígeno são chamadas de virgens ou *naive*. Lembrando que cada célula T virgem carrega um tipo de TCR que reconhece um tipo de antígeno apresentado pelas APCs. Quando as APCs, principalmente, as células dendríticas reconhecem algum antígeno, elas o fagocitam, processam-no em peptídeos, dentro dos seus lisossomos, e os expõem através do MHC de classe II. Após a fagocitose estas células se diferenciam de acordo com os sinais que recebem. Estes sinais podem ser do próprio Ag, das citocinas produzidas por diferentes tipos celulares ou por direta interação com linfócitos T. Quando há reconhecimento de um antígeno pelas APCs nos tecidos, estas o carregam para o linfonodo de drenagem mais próximo ao sítio de infecção. Quando o antígeno é encontrado no sangue, este é levado pelas APCs para o baço. Tanto os linfonodos quanto o baço são conhecidos como órgãos linfóides secundários. Durante a migração para os órgãos linfoides secundários, as APCs amadurecem, passando a expressar altos níveis de moléculas co-estimulatórias, e tornam-se APCs eficientes. No linfonodo estas células apresentam os peptídeos associados ao MHC II para o linfócito $TCD4^+$ específico para aquele antígeno. Este é primeiro sinal para a ativação dos linfócitos T. Ao mesmo tem-

po em que o antígeno está sendo apresentado, ocorre a interação de moléculas CD28 expressas em linfócitos com moléculas co-estimulatórias expressas em APCs, tais como as proteínas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), as quais são responsáveis por enviar o segundo sinal para a ativação da célula T.

2.5.2. Ativação das células T

A ligação do TCR e dos co-receptores aos peptídeos ligados ao MHC nas células APCs inicia eventos de sinalização intracelulares que resultam na ativação de vários genes nas células T. A sinalização pode ser dividida em eventos de membrana, vias de sinalização citoplasmática e transcrição nuclear de genes. Os eventos de membrana se iniciam com a ligação do TCR ao complexo MHC--peptídeo resultando no agrupamento de co-receptores na mesma região da membrana. Este evento leva à fosforilação de resíduos ITAM por cinases da família Src, como a Lck, e ao consequente recrutamento e ativação das proteínas cinases (enzimas que ajudam na fosforilação de resíduos de tirosina de várias proteínas, no complexo do TCR). A enzima Lck está ligada na região citoplasmática dos co-receptores CD4 e CD8, os quais ligam em regiões não-polimórfcas do MHC durante o reconhecimento antigênico. O alvo de ação das Lck são os ITAMs presentes nas regiões citoplasmáticas das proteínas CD3 e ζ, que constituem o complexo do TCR. Os ITAMs fosforilados se tornam sítios de ligação para a tirosina cinase ZAP-70, a qual também será fosforilada pela Lck se tornando ativa. ZAP-70 pode fosforilar proteínas adaptadoras como a SLP-76 e LAT. LAT fosforilada se liga na PLCγ1 e recruta outras proteínas adaptadoras como a própria SLP-76, GADS e Grb-2. Esta última recruta SOS, o qual catalisa a troca de GTP/GDP na proteína Ras formando a Ras-GTP, que vai ativar uma via de cinases chamada MAP, culminando na ativação da última cinase da via, ERK . Grb-2 e SOS também ativam outra via de MAP cinase iniciada pela ativação de Rac, culminando na ativação da enzima JNK e p-38. A fosfolipase PLCγ1 ativada será responsável pela degradação do fosfolipídeo de membrana PIP2 e consequente formação de IP3 e DAG, os quais levam ao aumento de cálcio intracelular e ativação de PKC, respectivamente. As vias de sinalização citoplasmáticas finalmente acarretam na ativação das enzimas efetoras mencionadas ERK, p-38, JNK e PKC e a calcineurina (ativada pelo aumento de cálcio intracelular). Estas, por sua vez, ativam vários fatores de transcrição como NFAT, NFκB e AP-1 que aumentam a expressão de certos genes na célula T estimulada pelos

antígenos, permitindo sua ativação, entrada no ciclo celular e consequente proliferação, e diferenciação em células efetoras.

2.5.3. Mecanismos efetores das células T

As células T efetoras migram para os locais de infecção e são retidas nesses locais onde podem interagir com fagócitos ou com células infectadas. Os mecanismos efetores das células $TCD4^+$ serão tratados a seguir, especialmente as células Th1 e Th2 e também das células $TCD8^+$.

2.5.3.1. Th1

Estimuladas por produtos microbianos, as APCs secretam citocinas, tais como, a IL-12 e IFN-γ, que estimulam a diferenciação das células Th em Th1. Os efetores Th1 produzem a citocina IFN- γ e passam a expressar o ligante de CD40 (CD40L). O CD40L liga-se no CD40 presente nos macrófagos. O IFN- γ ativa os macrófagos induzindo suas funções microbicidas e aumentando sua produção de IL-12. A IL-12 estimula a produção de IL-2 pelo Th1. A IL-2 aumenta a proliferação das Th1, estimulando, ainda mais os macrófagos a exercerem suas atividades microbicidas. Outros mediadores derivados de macrófagos, tal como a IL-18, também estimulam a produção do IFN- γ. Os macrófagos ativados fagocitam os microrganismos ou células e sintetizam espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico que destroem os microrganismos. Essas espécies reativas podem ser liberadas eliminando os microrganismos extracelulares, podendo causar lesão aos tecidos. Os macrófagos também participam da manutenção da inflamação aguda atuando através da secreção de outras citocinas, principalmente IL-1, TNF, quimiocinas e mediadores lipídicos. Estes mediadores inflamatórios auxiliam no recrutamento de mais células inflamatórias e consequente exacerbação da resposta.

2.5.3.2. Th2

As células Th2 são as responsáveis pelas reações alérgicas e pelo combate a infecções helmínticas, atuando através da liberação de citocinas como IL-4 e a IL-13, liberadas pelas células Th2, que induzem a produção de anticorpos IgE para antígenos específicos, enquanto a IL-5 leva à ativação e o recrutamento dos eosinófilos para o local

da inflamação. No caso de infecções helmínticas, IL-4 e IL-13 são responsáveis não apenas pela ativação da produção dos anticorpos IgE helminto-específico, mas também pelo crescimento e ativação dos próprios linfócitos T. A IL-5 é responsável pela ativação dos eosinófilos, que liberam proteínas dos seus grânulos que são tóxicas para os parasitos.

2.5.3.3. Linfócitos TCD8$^+$

O primeiro sinal para ativação das células TCD8$^+$ virgem é o reconhecimento do antígeno, que consiste em um peptídeo associado à molécula do MHC de classe I, derivado de proteínas que foram degradadas no citoplasma, este reconhecimento pode ocorrer em todas as células nucleadas infectadas por microrganismos intracelulares e células tumorais, já que estas passam a apresentar os antígenos estranhos ao do hospedeiro. O segundo sinal pode se dar pela ligação da molécula B7 expressa nas APCs ou pelas Th1, que secretam citocinas como IL-2 ou favorecem a capacidade das APCs em ativar as TCD8$^+$. A sinalização das células TCD8$^+$ é semelhante à das células TCD4$^+$ mencionada anteriormente.

Como mencionado anteriormente, no ataque aos microrganismos, as células TCD8$^+$ liberam enzimas que destroem as células infectadas. Primeiramente há a liberação das perforinas que produzem poros na célula-alvo e, em seguida, as granzimas, que penetram na célula–alvo pelos referidos poros, ativando assim as enzimas intracelulares do tipo caspases. Estas são responsáveis por induzir a morte da célula-alvo através de um mecanismo denominado de apoptose. As TCD8$^+$ também utilizam mecanismo alternativo para destruir as células que é através da expressão de uma proteína de membrana, conhecida como ligante de Fas (FasL) na célula alvo resultando em apoptose. As TCD8$^+$ podem ativar os macrófagos pelos mesmos mecanismos que as Th1.

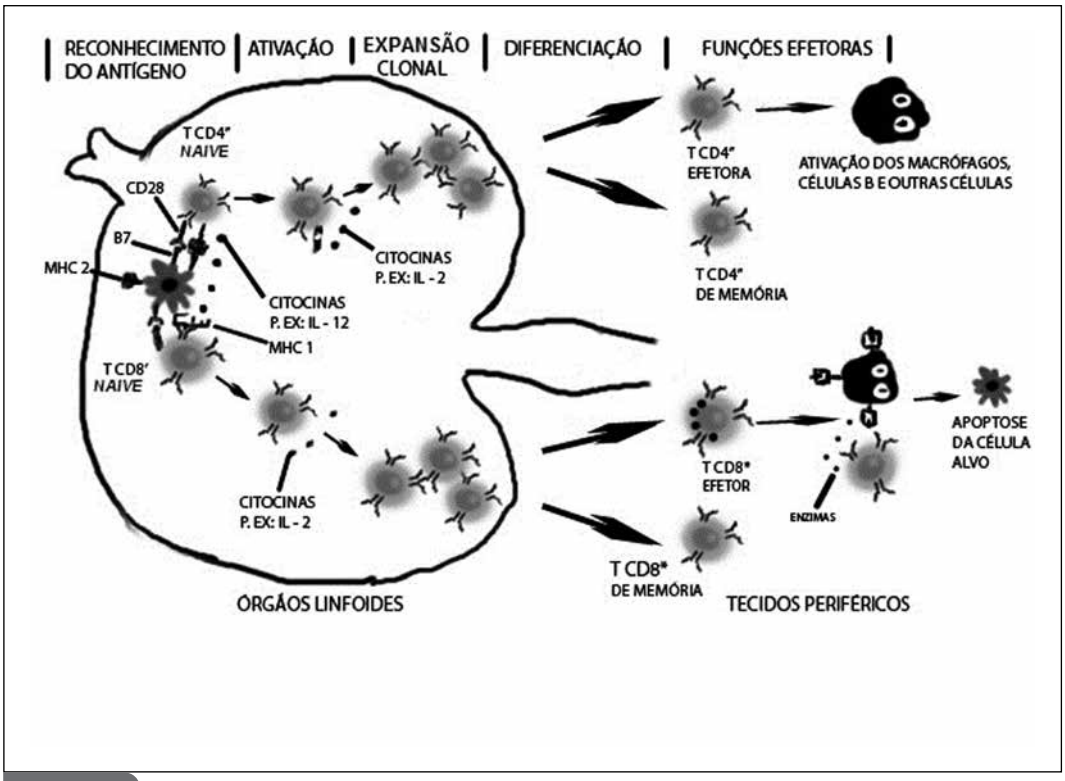


Fig. 2.1 Desenho esquemático das fases da resposta mediada por células.

2.5.3.4. Formação das células de memória

As células T que se destinam às de "memória", adquirem fenótipo característico, saindo progressivamente do ciclo celular e retornando ao estado de repouso. As células T virgens, preferencialmente recirculam pelos órgãos linfoides secundários, enquanto as de memória e efetoras "patrulham" os tecidos periféricos e entram novamente no sangue via vasos linfáticos aferentes. As células de memória são linfócitos antígeno-específicos de longa vida que foram diferenciados durante a resposta primária contra um antígeno e persistem no indivíduo podendo participar de resposta secundária (ou terciária, quaternária, etc.), caso ocorra novo contato com o antígeno. Tanto os linfócitos T CD4 quanto os CD8 podem se diferenciar em células de memória, as quais terão fenótipo mais semelhante às células efetoras ativadas do que às células virgens, mas precisarão ser re-estimuladas antes de atuarem como efetoras. Após o re-estímulo antigênico, as células de memória serão

mais sensíveis e responderão de forma mais rápida e mais intensa do que as células virgens. As células T virgens que foram ativadas podem se diferenciar em dois tipos de células de memória, as quais apresentam estado de ativação distinto, sendo elas chamadas de células de memória efetoras (T_{EM}) e células de memória central (T_{CM}). As células T_{EM} podem rapidamente se diferenciar em células efetoras. O perfil de receptores de quimiocinas e integrinas expresso pelas T_{EM} sugere que estas células sejam especializadas em entrar nos tecidos inflamados. Além de migrar para os sítios inflamatórios, as T_{EM} podem residir em diversos tecidos não-linfoides, incluindo intestino delgado, pele, cérebro, pulmão e glândulas salivares. Nestes sítios, as T_{EM} podem vir a responder de forma rápida e eficiente contra um antígeno que já havia induzido sua diferenciação numa resposta primária anterior. As T_{CM} demoram mais a se diferenciar em células efetoras e são capazes de recircular pelos órgãos linfoides periféricos.

2.6. Resposta humoral

Os anticorpos produzidos pelos linfócitos B contra antígenos microbianos são extremamente eficientes na defesa contra os microrganismos extracelulares, no entanto os microrganismos intracelulares ficam protegidos da ação desses anticorpos na maioria do tempo, já que sua disseminação muitas vezes ocorre pelo fluído extracelular. Sendo assim pode-se inferir que a resposta humoral ocorra para antígenos que estejam no espaço extracelular. A ativação dos linfócitos B e sua diferenciação em plasmócitos são induzidas pelo reconhecimento do antígeno e depende das células Th.

2.6.1. Reconhecimento dos antígenos

O complexo do receptor de antígeno dos linfócitos B é composto de imunoglobulinas de membrana como IgM ou IgD, e moléculas acessórias Igα e Igβ. Quando o BCR liga-se ao antígeno, este sofre agregação para fixação do antígeno, internalização do mesmo em vesículas endossômicas e, se for uma proteína, degradação em peptídeos e apresentação na superfície das células B, pelo MHC II, com consequente reconhecimento por células $TCD4^+$ auxiliares. Quando a origem do antígeno é polissacarídica, glicolipídica ou de ácidos nucleicos, a ativação dos linfócitos B é independente dos Th. Estes antígenos são constituídos por múltiplos epítopos idênticos, correspondendo a um sítio polivalente em cada molécula. Desta for-

ma, esses antígenos estabelecem eficazmente uma agregação de receptores de antígeno das células B, permitindo a transdução de sinais para ativação celular. Estes antígenos não são processados, nem apresentados por moléculas do MHC às células T auxiliares. Em geral os anticorpos produzidos são de baixa afinidade. Os eventos de ativação e ciclo celular são os mesmos da produção de anticorpos dependente das células T. As moléculas co-receptoras B7-2 e o B7-1 nos linfócitos B ligam-se ao CD28 nas células T, que passam a expressar o CD40L. A interação CD40-CD40L estimula a proliferação e estimulação das células B, aumenta a expressão de B7 das células B, ativando as células T, que passam a secretar citocinas como a IL-2, IL-4 e IL-5. Desta forma, os linfócitos B proliferam e se diferenciam em plasmócitos, ou seja, mudam a expressão de Ig de membrana para Ig secretada.

2.6.2. Ativação dos linfócitos B

As Igα e Igβ, que apresentam regiões citoplasmáticas contendo domínios do tipo motivos de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina (ITAMs), encontram-se associadas à Ig de membrana formando o complexo do receptor de Ag de linfócitos B. Quando ocorre a ligação do antígeno na Ig de membrana, a tirosina dos ITAMs nas Igα e Igβ são fosforiladas pela ação das proteínas Lyn, Blk, ou Fyn que estão associadas ao complexo receptor de antígeno. Esse evento leva ao ancoramento da Syk nos ITAMs da Igα e Igβ. A Syk (e outras tirosinas cinases associadas) fosforilam e ativam várias moléculas de sinalização, consecutivamente, como a fosfolipase C1, que cliva o bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) em trifosfato de inositol (PIP_3) e diacilglicerol (DAG). O PIP_3 mobiliza Ca^{2+} das reservas intracelulares induzindo seu aumento no citoplasma, o que leva à translocação de algumas formas de proteínas cinases para a membrana plasmática, onde são ativadas pelo DAG. A Ras também é ativada por fosforilação, induzindo a ativação das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK). As cascatas de sinalização culminam na ativação de fatores de transcrição como Fos, NFκ-B, Myc e outros, que induzem a expressão de genes cujos produtos são necessários para ativação funcional das células B.

A resposta do linfócito B desenvolvida contra um microrganismo pode ser aumentada pela ligação de uma proteína do complemento, que está recobrindo o microrganismo, no receptor de complemento, no mesmo momento que ocorre a ligação do microrganismo ao BCR. O sistema complemento é composto de proteínas plasmáticas que são ativadas tanto pela ligação do complexo antígeno-an-

ticorpo, ou pela ligação direta a alguns polissacarídeos ou ainda na superfície de microrganismos. O principal componente desse sistema é a proteína C3b que se liga ao microrganismo ou ao complexo antígeno-anticorpo. Os linfócitos B possuem receptores para a proteína C3b, o CD21 ou CR2. O CD21 forma um complexo receptor com as proteínas CD19 e a CD81 presentes nas células B. A ligação do CD40 e de citocinas induzem o processo de ativação das células B que expressam IgM e IgD, fazendo com que algumas dessas entrem num processo de troca de cadeia pesada, levando à produção de anticorpos de diferentes classes como α, ε e γ. Após alguns dias da exposição ao antígeno T dependente, algumas células B ativadas migram para o centro germinativo, os quais ocorrem dentro dos folículos dos órgãos linfoides secundários, onde células dendríticas foliculares secretam fatores quimiotáticos para o linfócito B. Dentro dos centros germinativos, as células B ativadas, chamadas centroblastos, proliferam rapidamente, gerando células filhas (centrócitos). As células que possuem maior afinidade pelo antígeno exposto pelas células dendríticas foliculares recebem o sinal de sobrevivência, permanecem no centro germinativo e continuam a maturar até se transformarem em plasmócitos de vida longa e células de memória.

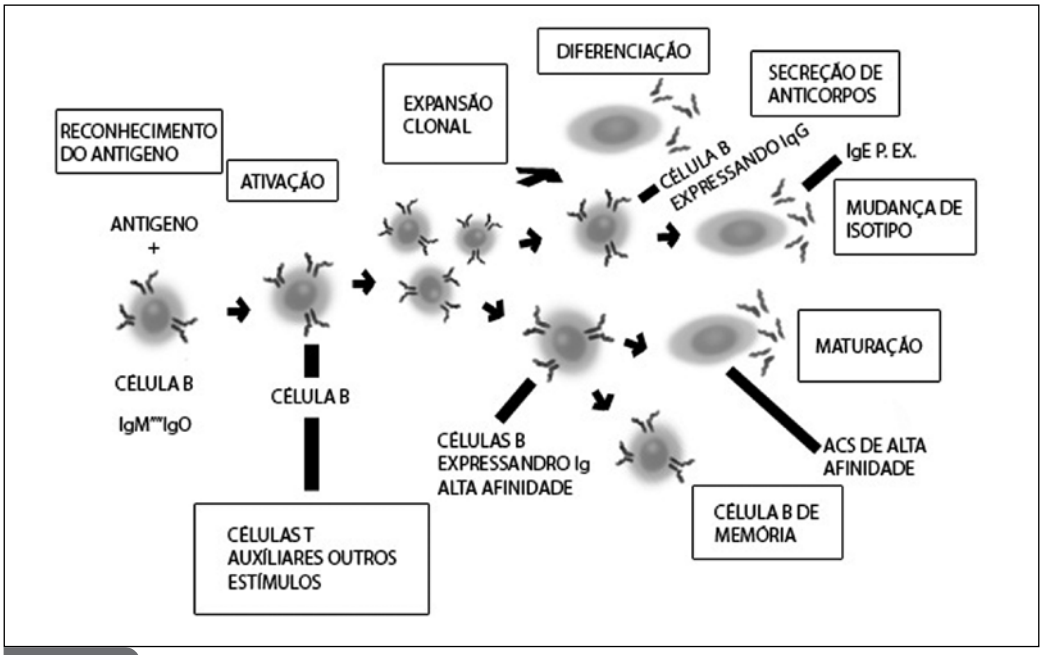


Fig. 2.2 Desenho esquemático das fases de ativação dos linfócitos B.

A maioria dos plasmócitos de vida longa reside dentro da medula óssea, e provavelmente representa a segunda ou terceira geração de descendentes dos centrócitos no centro germinativo. A qualidade e quantidade da população de plasmócitos dependem do tipo de ativação das células B, dependendo também das interações entre os primeiros estágios de desenvolvimento da resposta e regulação no centro germinativo. Plasmócitos podem ser originados a partir de células B de memória e podem persistir por um longo período de tempo na ausência de estimulação contínua dos antígenos.

2.6.3. Mecanismos efetores dos linfócitos B

Os anticorpos liberados pelos plasmócitos entram na circulação sanguínea e chegam ao sítio de infecção onde neutralizam os microrganismos ou as toxinas e, consequentemente, os efeitos deletérios da infecção, interferindo com a capacidade dos mesmos de interagir com os receptores celulares. A maioria dos anticorpos neutralizantes é composta por IgG no sangue e IgA nas mucosas. Os anticorpos IgG também recobrem, ou seja, opsonizam os microrganismos facilitando a fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos, que possuem receptores para a porção Fc desses anticorpos.

2.7. Principais características da resposta imunológica adquirida

2.7.1. Especificidade e diversidade

As respostas da imunidade adquirida são extremamente específicas para cada antígeno, inclusive os receptores das células T e B podem reconhecer diferentes regiões da mesma molécula. A variabilidade da região dos receptores que se liga aos antígenos leva a uma grande diversidade de reconhecimento. Os variados receptores TCR e BCR possuem afinidade para um número muito grande de moléculas e são formados antes mesmo do organismo entrar em contato com o antígeno. Vamos discutir abaixo a geração de diversidade das principais proteínas relacionadas a resposta imunológica adaptativa e como esta variabilidade é importante na resposta contra os diversos patógenos.

2.7.2. Geração da especificidade e diversidade

2.7.2.1. Diversidade do MHC

Como comentado anteriormente, o MHC é uma proteína heterodimérica de membrana codificada por genes em um *locus* chamado de MHC, que se liga a peptídeos especificamente e os expõem na superfície das células. As proteínas de MHC são estruturalmente e funcionalmente divididas em duas classes, classe I e classe II, e estão expressas de forma diferenciada nas células do organismo. MHC de classe I estão presentes na maioria das células nucleadas e as de classe II estão presentes em células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas, linfócitos B), sendo também expressas, em algumas espécies, por células T ativadas e células endoteliais. A principal diferença estrutural entre essas moléculas se deve ao fato da molécula de MHC de classe II possuir duas cadeias polipeptídicas transmembranares, α e β, cada uma delas apresentando dois domínios associados de modo não covalente à membrana celular. A molécula de MHC de classe I é formada por uma única cadeia polipeptídica polimórfica transmembranar, à qual está associada a molécula β2-microglobulina, não polimórfica (Fig. 2.3). As proteínas de MHC de classe I geralmente associam-se e apresentam peptídeos derivados do citoplasma, enquanto as moléculas de MHC de classe II ligam-se a peptídeos que se encontram dentro de vesículas intracelulares. A diferença estrutural também influencia no reconhecimento por diferentes células T, já que o receptor CD4 se liga à região β2 do MHC de classe II e o receptor CD8 se liga à cadeia α3 do MHC de classe I.

O MHC apresenta grande variabilidade devido a três características relacionadas a este grupo gênico. A primeira característica diz respeito à poligenia, a qual indica que existe uma variedade de genes de MHC de classe I e de classe II, permitindo que cada indivíduo tenha um conjunto de moléculas de MHC com diferentes especificidades de ligação de peptídeo. A segunda característica seria o polimorfismo, o que significa que há uma grande variação do *locus* gênico entre indivíduos da mesma espécie, e consequentemente do seu produto proteico. Os genes variantes que ocupam um dado *locus* são chamados alelos. Há mais de 200 alelos de

alguns genes humanos codificando MHC de classe I e de classe II, estando cada alelo presente com uma frequência relativamente alta dentro da população. Portanto, há uma chance pequena de que o *locus* correspondente ao MHC nos dois cromossomos homólogos de um indivíduo tenha o mesmo alelo. Assim, a maioria dos indivíduos é heterozigoto para os *loci* de MHC. Outra característica que favorece essa variabilidade diz respeito ao efeito de co-dominância, os produtos proteicos de ambos os alelos de um *locus* são expressos na célula de um indivíduo. A herança de um alelo do pai e outro da mãe no indivíduo, leva a quatro possíveis combinações de haplótipos que podem ser encontrados na progênie.

Portanto essas três características em conjunto geram a enorme diversidade dessas moléculas.

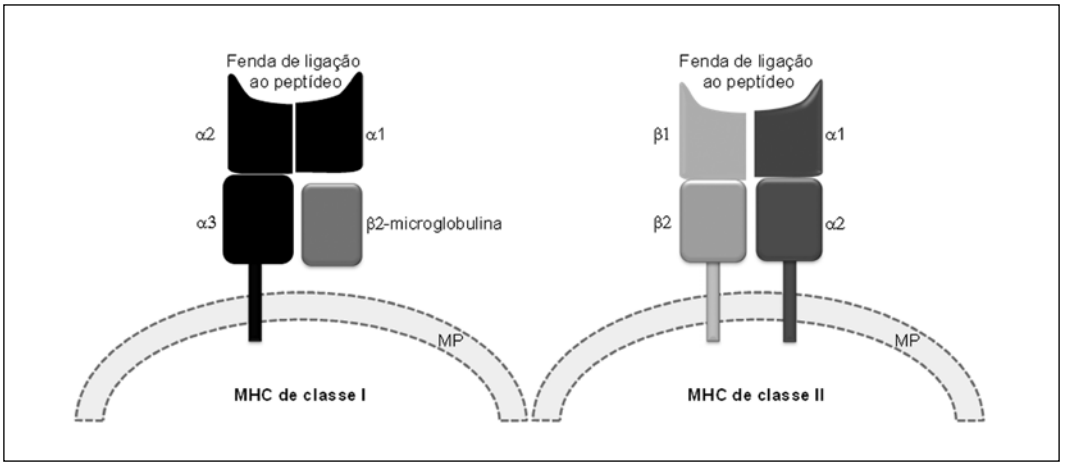


Fig. 2.3 Esquema representativo da estrutura das moléculas de MHC de classe I e de classe II.

2.7.2.2. Diversidade da Ig

As características estruturais básicas dos anticorpos são semelhantes, já que os anticorpos são formados por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas que se associam de forma simétrica. Uma cadeia pesada se liga a outra pesada por pontes dissulfeto e as cadeias leves se ligam cada uma em uma cadeia pesada da mesma forma. As Ig secretadas podem se polimerizar formando dímeros (IgA) ou pentâmeros (IgM), aumentando os sítios de interação com antígenos polivalentes (apresentam epítopos repetitivos). Tanto as cadeias pesadas quanto as leves

possuem uma região amino-terminal variável, chamada de região V e uma região carboxi-terminal constante chamada de região C. As cadeias leves e pesadas possuem apenas um domínio de região variável, local onde ocorre a ligação com os antígenos. A região constante na cadeia leve possui apenas um domínio, enquanto a pesada possui de três a quatro domínios dependendo do isotipo. Entre os domínios 1 e 2 da cadeia pesada há uma região chamada de *hinge* ou dobradiça a qual confere maleabilidade a proteína. A clivagem da proteína na região da dobradiça leva à região Fab, onde situa-se o local onde ocorre a ligação ao antígeno e a região Fc, que confere a funcionalidade da molécula.

A variabilidade da região V das cadeias leves e constantes está principalmente localizada em três regiões hipervariáveis denominadas de CDRs (Regiões Determinantes de Complementaridade) que contém aproximadamente 10 aminoácidos e são intercaladas por regiões extremamente conservadas. Essas regiões hipervariáveis são complementares ao antígeno.

Os anticorpos são divididos em classes e sub-classes de acordo com as diferentes estruturas de Fc, o que confere a cada um, função efetora diferente. Algumas células possuem receptores específicos para um tipo de Fc, determinando onde cada anticorpo se liga. As IgD e as IgM são expressas na membrana de células B ainda inativas. Após a ativação, a célula pode secretar a IgM ou serem estimuladas a trocar de classe, passando a expressar IgG, IgA ou IgE. A IgM é secretada na forma pentamérica e não se liga a receptor de outras células, atuando principalmente na ligação aos microrganismos e ativação da cascata do complemento. A IgA secretada tem sua principal função na imunidade das mucosas, pois sua forma secretada dimérica interage com receptores na mucosa intestinal que fazem seu transporte para o lúmen do intestino. A IgE secretada permanece como monômero e liga-se a receptores FcRε de células inflamatórias. O antígeno associado a este anticorpo que está ligado ao receptor de Fc de mastócitos ou basófilos, por exemplo, desencadeia a ativação celular com consequente liberação de grânulos citoplasmáticos destas células. A IgE está associada à eliminação de helmintos e às reações de hipersensibilidade imediata. A IgG secretada é a imunoglobulina em maior proporção no soro humano sendo dividida em quatro subclasses de Ig. Suas funções

são principalmente opsonização do antígeno, ativação do sistema complemento e a citotoxicidade dependente de anticorpo.

Podem ocorrer mudanças na estrutura dos anticorpos fabricados por um clone de células B durante a maturação da célula e mesmo após o reconhecimento do antígeno. Inicialmente as Ig produzidas encontram-se na forma membranar, porém ocorrem alterações na região carboxiterminal da cadeia pesada que permitem que a proteína seja secretada. As recombinações dos genes VDJ da cadeia pesada e VJ da cadeia leve, promovida pelas recombinases RAG formam as regiões hipervariáveis CDR de reconhecimento do antígeno.

Após o reconhecimento do antígeno as citocinas do microambiente podem induzir os linfócitos B a mudarem o isotipo do anticorpo, alterando a região C expressa e a função do novo anticorpo.

Podem ocorrer também mutações pontuais nas regiões V de um anticorpo específico podendo gerar moléculas de maior afinidade com o antígeno, esse processo é conhecido como maturação de afinidade.

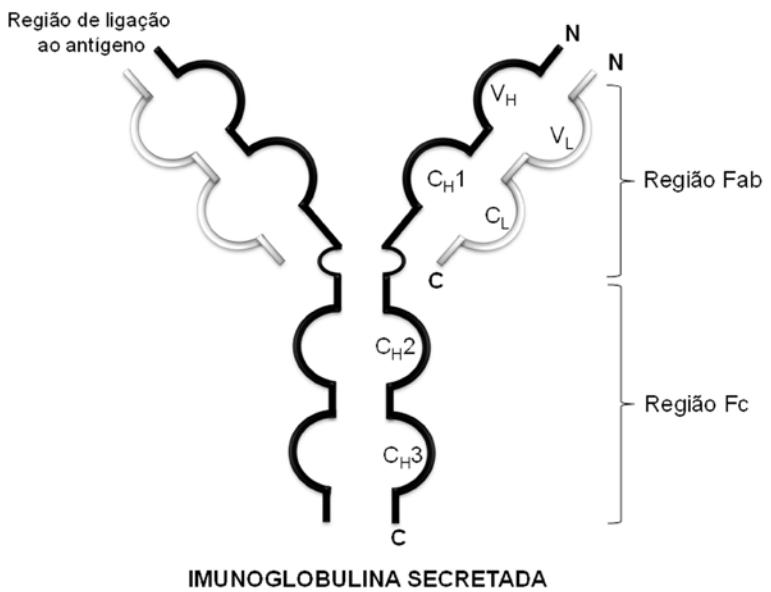


Fig. 2.4 Esquema representativo da estrutura das moléculas de imunoglobulinas.

2.7.2.3. Diversidade do TCR

O receptor de antígenos da célula T, denominado de TCR, é um heterodímero formado por duas cadeias polipeptídicas transmembranares ligadas de forma covalente. O TCR pode ser formado pelas cadeias α e β ou pelas cadeias γ e δ, porém estes últimos são encontrados em uma pequena subpopulação de linfócitos. Cada cadeia possui um domínio V, variável e um domínio C, constante. Na região V de cada cadeia α e β há três regiões CDR formando o local onde ocorre o reconhecimento específico do complexo peptídeo-MHC.

As cadeias α e β do TCR sofrem rearranjo somático durante a maturação do linfócito T, nas sequências gênicas V e J e em V, D e J, respectivamente. Esse processo é dependente da atividade das enzimas RAG. Diferentemente dos receptores das células B, os TCR não sofrem mudanças após a ativação celular.

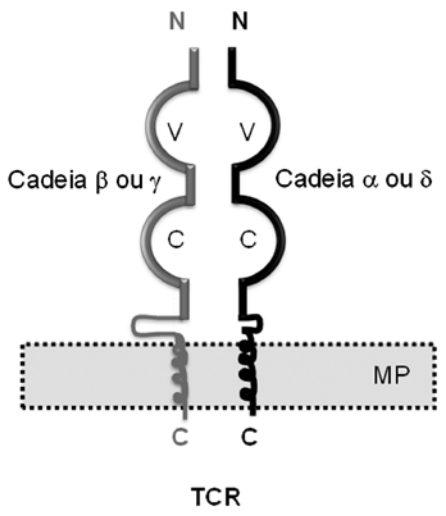


Fig. 2.5 Esquema representativo da estrutura das moléculas de imunoglobulinas.

2.7.3. Memória

As células da imunidade adquirida possuem a vantagem de armazenar uma "memória" do peptídeo que foi reconhecido. Esse processo ocorre porque cada

linfócito é ativado após o reconhecimento antigênico, entra em proliferação aumentando o número de clones responsivos ao antígeno e gera linfócitos efetores, expressando receptores que o endereçam ao local de inflamação, e de memória. Estas são menos ativas e ficando quiescentes por muito tempo, meses ou anos. A população de linfócitos de memória é mantida devido a uma baixa taxa de proliferação, que aparentemente não é estimulada pelo antígeno, e também pela redução da morte dessas células. Alguns estudos demonstram que a sobrevida e pequena proliferação das células de memória são estimuladas pelas citocinas IL-7 e IL-15, as quais induzem o aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas. Um clone de linfócitos de memória pode estar em uma concentração 10-100 vezes maior do que o clone de células virgens que existia antes do reconhecimento antigênico, permitindo uma resposta secundária mais robusta do que a primária.

O fenótipo das células de memória é diferente do fenótipo de células virgens e de efetoras, permitindo sua distinção. Os linfócitos T de memória expressam receptores de superfície que promovem sua migração para os sítios de inflamação, diferente das células virgens que geralmente não são endereçadas para esses sítios. Os linfócitos B virgens expressam IgM e IgD, os linfócitos B de memória, que já passaram pela resposta humoral, geralmente expressam outras classes de Ig como a IgG, IgE ou IgA, como resultado da troca de isotipo. Tanto a troca de isotipo quanto a maturação de afinidade dos anticorpos estão geralmente associados a uma reposta dependente de células T contra antígenos proteicos. Algumas células B de memória podem residir no órgão linfoide onde são geradas, enquanto outras podem recircular entre o sangue e os órgãos linfoides. A ativação de células B de memória culmina na produção de grande quantidade de anticorpo que apresenta alta afinidade ao antígeno e com isotipo trocado.

As células T de memória podem ser rapidamente ativadas por uma APC apresentando o antígeno específico, diferenciando-se em células efetoras sem a necessidade de co-estímulo (como mencionado no item 2.5.3.4). Alguns estudos demonstraram que nas células de memória os genes para citocinas e outras moléculas efetoras como perforina ficam em estado acessível aos fatores de transcrição, permitindo uma resposta efetora rápida. Estas características garantem uma resposta rápida e eficiente (os anticorpos já serão de alta

afinidade para o antígeno) na condição de um segundo contato com o mesmo antígeno.

A capacidade de ter uma "memória" da resposta anterior torna a imunidade adaptativa singular. As células de memória são uma excelente defesa contra patógenos prevalentes no ambiente e que são encontrados repetitivamente. Neste sentido, vale ressaltar que a vacinação contra diversos patógenos tem sido muito eficaz para proteção da população, já que induz a formação de células de memória proporcionando uma resposta efetiva quando o paciente encontrar o patógeno.

2.7.4. Tolerância a antígenos próprios

Uma das principais características do sistema imune é a capacidade de reconhecer uma grande variedade de antígenos não-próprios ou estranhos, e montar uma resposta contra estes culminando na sua eliminação e ao mesmo tempo não responder contra peptídeos próprios. A ausência de reconhecimento de peptídeos próprios é denominada tolerância e existem diversos mecanismos regulatórios que promovem a auto-tolerância. Os linfócitos virgens passam por seleções na medula óssea (linfócitos B) ou no timo (linfócitos T), onde as células com receptores que possuam afinidade muito elevada ou muito reduzida a antígenos próprios são eliminados. Dessa forma os linfócitos auto-reativos são eliminados ou mudam sua especificidade antes de saírem do sítio de maturação. Qualquer anormalidade na manutenção dessa regulação leva a respostas imunológicas contra peptídeos próprios que podem evoluir para danos teciduais e patologias conhecidas como doenças autoimunes.

2.8. Regulação

Até então retratamos como é disparada a resposta imunológica contra um antígeno e como ocorre um processo inflamatório, resumidamente podemos dizer que ocorre o reconhecimento específico do antígeno, a ativação e proliferação de células inflamatórias, a migração direcionada ao sítio inflamatório e a função efetora das células da imunidade adaptativa. Mas, o que ocorre com essas células após a eliminação do antígeno?! Existem mecanismos de regulação que impedem a proliferação descontrolada das células inflamatórias, dentre eles podemos citar o mais importante que seria a atividade da célula

T regulatória, mais conhecida como Treg. Há duas populações mais estudadas de células Treg: as Treg originadas no timo durante a maturação dos linfócitos são chamadas de Treg naturais ou nTreg e as Treg diferenciadas na periferia através de estímulo antigênico são denominadas induzidas ou iTreg. As nTreg se diferenciam a partir de timócitos que reconhecem um auto-antígeno com grande afinidade, sendo capazes de controlar respostas autoimunes na periferia. Já as iTreg se diferenciam na periferia dependendo do microambiente e são importantes também na tolerância a antígenos não-próprios. Outras células que produzem citocinas inibitórias podem agir como regulatórias, incluindo alguns subtipos de células T CD8, células NK, células T $\gamma\delta$, células B, mastócitos e algumas APCs.

Trabalhos recentes divergem quanto ao modo de ação dessas células, alguns sugerem que a ação seja promovida pelo contato com a célula efetora através de moléculas inibitórias como CTLA-4 e PD-1. Outros propõem que a ação seja mediada pela liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF-β. No entanto, sabe-se que elas participam ativamente da resolução da resposta inflamatória. Inibindo de diferentes formas a função de células T efetoras, APCs e células da imunidade inata.

É importante ressaltar que além de reduzir a resposta inflamatória, as células regulatórias têm relevante papel na manutenção da tolerância periférica, impedindo reações exacerbadas contra moléculas inócuas (ex: ácaro, poeira, alimentos que passam pelo trato digestivo) e também no controle na autoimunidade, impedindo a resposta imunológica contra antígenos próprios.

2.9. Falhas na resposta

A resposta imunológica é extremamente regulada, porém qualquer alteração no processo de maturação, seleção, reconhecimento de antígeno, ativação, proliferação, migração e função efetora pode levar a uma falha na resposta antigênica. Muitas dessas falhas são associadas a patologias conhecidas. Sabemos, por exemplo, que uma anormalidade na maturação dos linfócitos, devido à mutação no gene das proteínas RAG, leva a uma alta susceptibilidade a infecções. A exacerbação da resposta imunológica acarreta dano ao tecido do hospedeiro e a falha na seleção clonal promove a geração de doenças autoimunes.

3. INFLAMAÇÃO AGUDA

KELLY G. MAGALHÃES

A inflamação é uma resposta do organismo que ocorre em tecidos vascularizados contra estímulos de natureza diversa. A inflamação tem três papéis fundamentais no combate à agressão. O primeiro é o de recrutar para o sítio da lesão células efetoras (leucócitos) e moléculas pró-inflamatórias para eliminar o agente agressor. O segundo é o de limitar a área que sofreu a agressão, na forma de coagulação microvascular, para prevenir o comprometimento de outros tecidos. O terceiro papel é o de promover o reparo dos tecidos danificados. Portanto, a inflamação é uma reação dos tecidos que consiste principalmente em respostas dos vasos sanguíneos e leucócitos.

As reações vasculares e celulares da inflamação são orquestradas por moléculas pró-inflamatórias que determinam o padrão de resposta tecidual o que influencia na gravidade e manifestações clínicas e patológicas. Por conta disso, há dois padrões básicos do processo inflamatório:

- Inflamação aguda, de curta duração;
- Inflamação crônica, de duração mais longa.

3.1. Bases da inflamação aguda

A inflamação aguda consiste em um processo dinâmico que ocorre em curta duração, durando horas ou alguns poucos dias. Vários fatores podem condicionar o tipo de lesão do processo inflamatório, como por exemplo: tipo de agressor, tempo de atuação, intensidade da resposta inflamatória, e do tecido ou órgão afetado.

Uma das causas mais comuns de inflamação é a infecção microbial. Porém existem outros fatores bem comuns que podem levar a respostas inflamatórias severas, como:

reações de hipersensibilidade, agentes físicos e substâncias químicas irritantes ou corrosivas. Por conta disso, pode ser observado que a resposta inflamatória em seus eventos iniciais mostra-se inespecífica.

Portanto, existem alguns fenômenos básicos que independem do agente inflamatório e que caracterizam a inflamação do tipo aguda em fases. Abaixo são apontadas cinco fases do processo inflamatório agudo, que estão separadas dessa forma apenas por uma questão didática, pois eles ocorrem concomitantemente. São eles:

- Fase irritativa: modificações morfológicas e funcionais dos tecidos agredidos que promovem a liberação de mediadores inflamatórios que são desencadeantes das demais fases inflamatórias.
- Fase vascular: alterações hemodinâmicas da circulação e de permeabilidade vascular no local da agressão.
- Fase exsudativa: característica do processo inflamatório, esse fenômeno compõe-se de exsudato celular e plasmático oriundo do aumento da permeabilidade vascular.
- Fase degenerativa-necrótica: composta por células com alterações degenerativas reversíveis ou não (neste caso, originando um material necrótico), derivadas da ação direta do agente agressor ou das modificações funcionais e anatômicas consequentes das três fases anteriores.
- Fase produtiva-reparativa: relacionada à característica de hipermetria da inflamação, ou seja, exprime os aumentos de quantidade dos elementos teciduais, principalmente de células, e é resultado das fases anteriores. Essa hipermetria da reação inflamatória visa destruir o agente agressor e reparar o tecido injuriado.

3.2. Sinais cardinais da inflamação aguda

Existem cinco sinais, intitulados sinais cardinais, que caracterizam o processo inflamatório agudo. São eles tumor, calor, rubor, dor e perda da função.

1) O tumor é causado principalmente pela fase exsudativa e produtiva-reparativa, representadas pelo aumento de líquido (edema inflamatório) no espaço extravascular, e pela massa física de células inflamatórias que migram para o tecido inflamado.
2) O calor é oriundo da fase vascular, em que se tem hiperemia arterial devido ao fluxo de sangue no local, resultando em vasodilatação e, consequentemente,

aumento da temperatura local. Febre sistêmica, a qual resulta de alguns mediadores inflamatórios, também contribuem para a temperatura local.

3) O rubor ou vermelhidão também é decorrente da dilatação de pequenos vasos dentro da área inflamada.

4) A dor, por sua vez, é originada de mecanismos mais complexos que incluem estimulação das fibras nervosas locais por mediadores derivados do exsudato plasmático e de células. Portanto, engloba pelo menos três fases da inflamação (irritativa, vascular e exsudativa). Alguns dos mediadores químicos da inflamação aguda, incluindo bradicinina, prostaglandinas e serotonina, são conhecidos indutores de dor.

5) A perda de função, por fim, é decorrente da somatório de todos os sinais. O tumor principalmente em articulações impede a movimentação e imobilizando o tecido, e a própria dor, dificultando as atividades locais.

3.3. Eventos da inflamação aguda

A inflamação aguda se caracteriza principalmente por alterações vasculares (aumento do fluxo sanguíneo devido à vasodilatação na área da injúria), edema (aumento da permeabilidade capilar, o que permite um maior movimento de fluído e proteínas sanguíneas para o espaço intersticial) e infiltrado inflamatório constituído predominantemente por polimorfonucleares (processo que envolve, sequencialmente, marginação, rolamento, adesão e diapedese de leucócitos).

3.3.1. Alterações vasculares

A fase inicial de constrição arteriolar é transiente e provavelmente de pouca importância na inflamação aguda. A fase subsequente, a vasodilatação (hiperemia ativa), pode durar de 15 minutos a horas, dependendo da severidade da injúria. Evidências experimentais demonstram que o fluxo de sangue na área inflamada aumenta em 10 vezes. Quando o fluxo de sangue começa a diminuir novamente, células sanguíneas começam a se localizar preferencialmente na zona plasmática da parede vascular. Isso facilita a adesão de leucócitos ao epitélio vascular, o qual é o primeiro passo para a migração de leucócitos para o espaço extravascular. Além disso, a diminuição do fluxo sanguíneo, a qual segue a fase de hiperemia, é devido ao aumento da permeabilidade vascular, permitindo que o plasma escape para os tecidos enquanto

as células sanguíneas estão mais retidas dentro dos vasos. A viscosidade do sangue é, portanto, alterada.

Mastócitos, uma das células residentes no tecido, também exercem um importante papel na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular na inflamação aguda. Uma vez estimulado, o mastócito desgranula, liberando seus grânulos citoplasmáticos contendo, entre outras substâncias, a histamina, um potente indutor de vasodilatação.

Outro ponto importante no que diz respeito às alterações vasculares nos processos inflamatórios agudos, é que elas são mediadas também pela liberação de óxido nítrico (NO) proveniente das células endoteliais. O NO tem duas principais funções: potente indutor de vasodilatação que tem papel fundamental no processo inflamatório, e a como agente citotóxico, contra microrganismos. Além disso, o NO também interfere no processo inflamatório agudo por inibição da adesão/agregação plaquetária e a adesão leucocitária.

3.3.2. Edema

Consiste no acúmulo de líquido rico em proteínas plasmáticas no interstício ou nas cavidades do corpo. O aumento da permeabilidade vascular leva à constituição de edema (presença de líquido no espaço extravascular). O edema é originado pelo desequilíbrio entre os fatores que atuam na dinâmica entre o líquido intersticial e o ambiente intravascular. Esses fatores compreendem a pressão hidrostática (sanguínea e intersticial), a pressão oncótica (sanguínea e intersticial) e os vasos linfáticos (Fig. 3.1).

1) Pressão hidrostática sanguínea: quando essa pressão aumenta, ocorre saída excessiva de líquido do vaso, situação comum em estados de hipertensão e drenagem venosa defeituosa (por exemplo, em casos de varizes, insuficiência cardíaca).

2) Pressão hidrostática intersticial: se diminuída essa força, o líquido não retorna para o meio intravascular, acumulando-se no tecido.

3) Pressão oncótica sanguínea: a redução da pressão oncótica impede o deslocamento do líquido do meio intersticial para o interior do vaso.

4) Pressão oncótica intersticial: um aumento da quantidade de proteínas no interstício favorece a retenção de líquido nesse local. Além disso, o aumento dessa força contribui para a dificuldade de drenagem linfática na região.

5) Vasos linfáticos: são responsáveis pela drenagem de líquido no interstício. Caso a drenagem linfática mostre-se comprometida, haverá o surgimento do edema. Um exemplo patológico que revela a contribuição dos vasos linfáticos na formação do edema é a elefantíase (doença causada pelo helminto *Wuchereria bancrofti*). Nesta situação observa-se obstrução das vias linfáticas.

6) Acúmulo de sódio no interstício: ocorre quando há ingestão de sódio maior do que sua excreção pelo rim, levando ao aumento da pressão osmótica do interstício, provocando maior saída de água do vaso.

O edema pode ainda aparecer sem estar relacionado ao processo inflamatório. Nesta situação onde se observa um acúmulo de líquido no interstício com baixos níveis de proteína podemos denomina-lo de transudato.

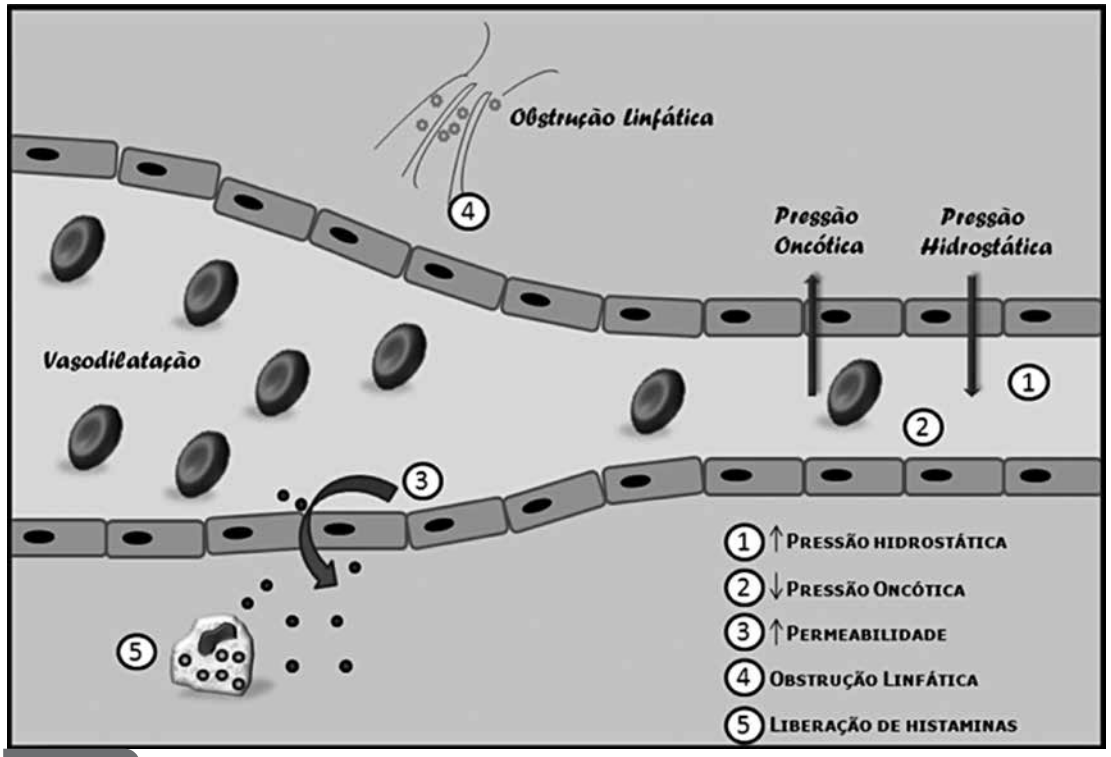


Fig. 3.1 Esquema demonstrando os fatores que induzem a formação do edema e vasodilatação.

3.3.3. Infiltrado inflamatório

O primeiro evento para a migração de leucócito dos vasos sanguíneos para o tecido é a interação entre as células e o endotélio sanguíneo. Essa ligação é mediada por moléculas de adesão celular (MAC) que são encontradas princi-

palmente na superfície dos leucócitos e nas células endoteliais do tecido com a injúria. A interação entre as células ocorre em dois passos. Primeiramente, moléculas de adesão denominadas selectinas aderem o leucócito à parede do endotélio, iniciando dessa forma, o processo de rolamento ao longo da superfície vascular. Em seguida, uma ligação mais forte ocorre entre as células endoteliais e os leucócitos, através da expressão de outra MAC, a integrina. Uma vez aderido ao endotélio, leucócitos alcançam os tecidos, passando por entre as células endoteliais, um processo denominado transmigração, ou diapedese. Após sair dos vasos sanguíneos, os leucócitos são guiados ao sítio da inflamação por diferentes fatores quimioatraentes, como quimiocinas e peptídeo C5a, o qual é liberado quando o sistema de complemento é ativado via imunidade específica ou inata. Contudo, em algumas circunstâncias, o perfil de leucócitos recrutado para o tecido pode alterar a depender da natureza do agente agressor. Por exemplo, eosinófilos são mais predominantes do que neutrófilos na inflamação aguda desencadeada por infecções parasitárias com helmintos. Eosinófilos também liberam diversas moléculas regulatórias que aumentam a permeabilidade endotelial (Fig. 3.2).

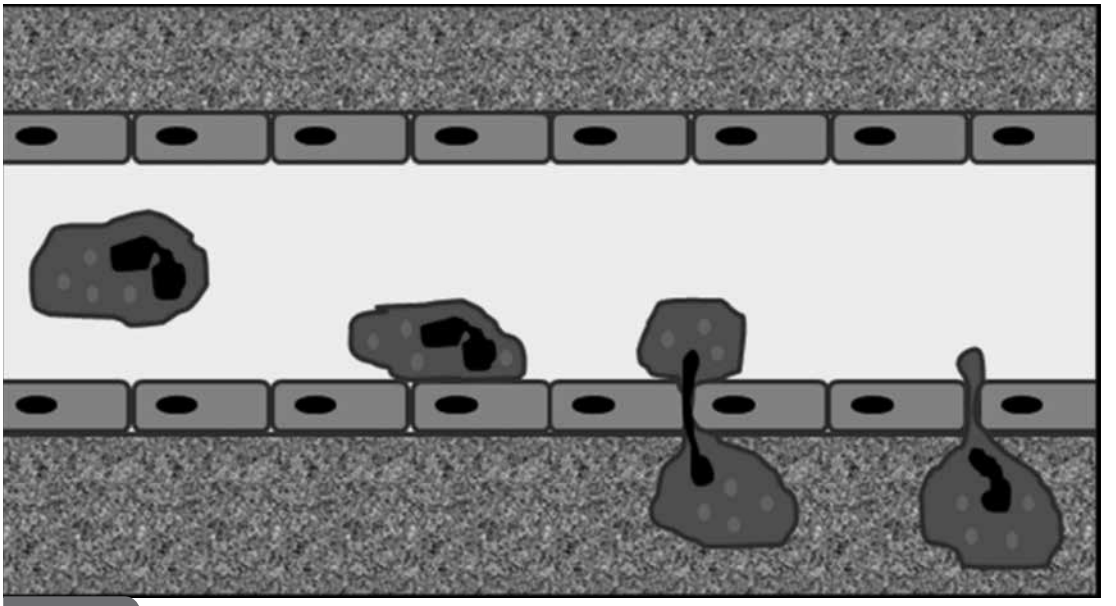


Fig. 3.2 Processo de marginação, rolamento, adesão e diapedese de leucócitos.

3.4. Mediadores químicos da inflamação aguda

A amplificação da resposta inflamatória aguda após a injúria em uma pequena área de tecido sugere que substâncias químicas são liberadas dos tecidos danificados, e espalham-se para outras áreas ainda não danificadas. Essas substâncias, chamadas de mediadores químicos pró-inflamatórios, causam vasodilatação, migração e recrutamento de leucócitos, e aumento da permeabilidade vascular como foi discutido anteriormente. A síntese e ação desses mediadores será melhor estudada nos capítulos posteriores.

3.5. Resolução da inflamação aguda

O termo resolução significa a completa restauração do tecido ao normal após um processo inflamatório agudo. As condições que favorecem a resolução são:

- eliminação dos resíduos de morte celular e dano do tecido;
- rápida destruição do agente agressor (ex: fagocitose de bactéria)
- remoção dos fluídos e debris por um processo de drenagem vascular.

4. INFLAMAÇÃO CRÔNICA

ANA CAROLINE C. SILVA
BIANCA T. CIAMBARELLA

4.1. Bases da inflamação crônica

A inflamação crônica é uma condição patológica persistente caracterizada por um aumento no conteúdo da celularidade e de outros elementos teciduais. Pode ser classificada tanto em termos clínicos quanto biológicos. No primeiro caso, é utilizado o critério cronológico, ou seja, a inflamação com longo período de duração, não sendo visíveis, necessariamente, todos os sinais cardinais de dor, tumor, calor, rubor e perda de função. No segundo, a inflamação crônica é classificada segundo os critérios histopatológicos, através da observação dos elementos teciduais – células mononucleares (monócitos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos), fibroblastos e pouca quantidade ou ausência de fenômenos exsudativos plasmáticos. Normalmente, utilizam-se ambos os critérios como base para o diagnóstico.

Durante esta resposta crônica ocorrem dois processos simultâneos: destruição tecidual, devido à permanência do agente agressor e, portanto, da resposta imunológica contra o mesmo (fase degenerativo-necrótica) e tentativa de reparo tecidual (fase produtivo-reparativa), caracterizada pela formação de vasos sanguíneos (angiogênese) e pela substituição do parênquima (a parte funcional do órgão) por fibrose.

Como descrito acima, as células que participam desse processo incluem, além de macrófagos e linfócitos (descritos nos capítulos 1 e 2), os fibroblastos (Fig. 4.1), que são as principais células do tecido conjuntivo responsáveis pela síntese de componentes da matriz extracelular, como glicoproteínas, glicosaminoglicanos, colágeno e elastina. Essas células são de grande importância principalmente na etapa de tentativa de reparo

tecidual. Além de participarem na definição da estrutura tecidual, os fibroblastos são capazes de modular a resposta imunológica através da produção de citocinas, quimiocinas e prostaglandinas, que irão alterar os tipos celulares presentes no tecido. Quando ativadas podem se diferenciar em diversos tipos celulares como miofibroblastos que possuem um papel central na contração da ferida, produzindo e secretando proteínas de matriz, além de fatores de crescimento. Um exemplo da sua mutabilidade é a capacidade de responder de diferentes formas a estímulos diversos, como, por exemplo, produzindo proteinas de matriz extracelular para respostas do tipo Th1 e Th2.

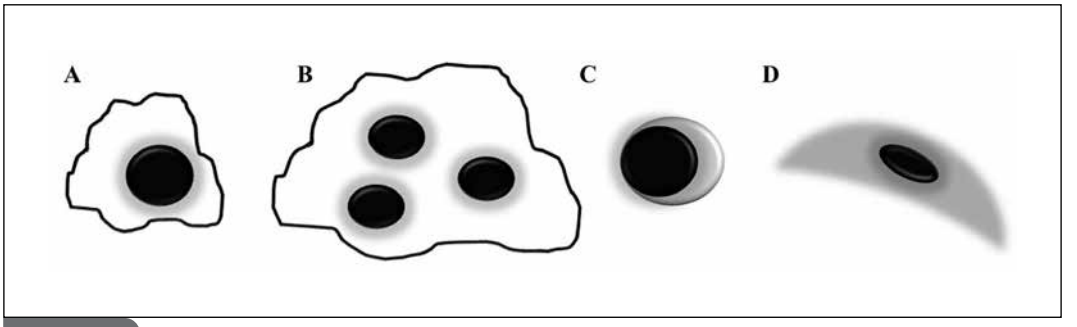


Fig. 4.1 Células principais componentes do granuloma. (A) Macrófagos; (B) Células gigantes; (C) Linfócitos; (D) Fibroblastos.

4.2. Causas da inflamação crônica

Entre as causas endógenas da inflamação crônica inclui-se a persistência da inflamação aguda. As causas exógenas são variadas, podendo incluir:

- infecções persistentes por microrganismos de baixa virulência, isto é, de baixa atividade agressora ao tecido, porém de alto grau de patogenicidade. Ex.: *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae*; *Treponema pallidum* (sífilis); fungos (*Cryptococcus neoformans, Coccidioides immitis, Paracoccidioides braziliensis*); parasitos (*Schistossoma sp., Leishmania braziliensis*);
- exposição prolongada a agentes tóxicos/inorgânicos, exógenos ou endógenos. Ex.: partículas de sílica cristalina (silicose), berílio (beriliose); componentes lipídicos plasmáticos tóxicos endógenos (aterosclerose);
- localização anatômica: antígeno presente em região de difícil acesso, afastado de vias de drenagem (ovário, cérebro, rim) e levando à formação de abcesso. Retirada através de procedimento cirúrgico;

- reações autoimunes (Lupus eritematoso, artrite reumatóide);
- Rejeição a enxerto.

4.3. Classificação

As inflamações crônicas podem ser classificadas de acordo com os seus elementos constituintes, incluindo dois principais tipos: inespecífica e granulomatosa.

4.3.1. Inespecífica

Não apresenta um padrão característico, sendo composta por células mononucleares associadas a outros tipos celulares, sem predominância específica, sendo, em geral, observados linfócitos, plasmócitos e macrófagos.

4.3.2. Granulomatosa

Caracterizada pela presença de granulomas que são estruturas arredondadas compostas por macrófagos, células epitelióides organizadas concentricamente associadas com uma matriz extracelular, linfócitos e granulócitos na porção mais externa (Fig. 4.2). Os macrófagos sofrem modificações estruturais e funcionais para aumentar a eficiência do processo de fagocitose. Esses macrófagos transformam-se em células maiores que possuem aspecto morfológico semelhante a células epiteliais e/ou em células gigantes, que são multinucleadas tendo sua origem a partir da fusão de macrófagos, associando-se também a fibroblastos. Essas células ocupam inicialmente, a porção central do granuloma. As interações entre linfócitos e macrófagos sustentam a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas e citocinas, que juntas estimulam a deposição de elementos do tecido conectivo. Células Th2 parecem participar dos granulomas juntamente com células Th1, atuando possivelmente na regulação da sua atividade e evitando lesões tissulares disseminadas. Perifericamente, proliferam fibroblastos que dão suporte à estrutura granulomatosa, formando uma parede fibrótica, além de vasos sanguíneos que são responsáveis pela nutrição do granuloma. Em algumas doenças, com o decorrer do tempo há o crescimento do granuloma, com a porção central sofrendo necrose caseosa devido à inexistência de vasos nesta região, o que determina a carência nutricional e consequente formação de um centro necrótico. Essa é

uma característica marcante que permite a sugestão do diagnóstico de determinadas doenças mesmo sem a visualização do seu agente causal, como, por exemplo, o granuloma associado ao bacilo de Koch. O granuloma é geralmente uma resposta local a um agente infeccioso, protetora, porém em alguns casos não elimina o patógeno e em outros pode pela resposta exacerbada resultar em fibrose do órgão.

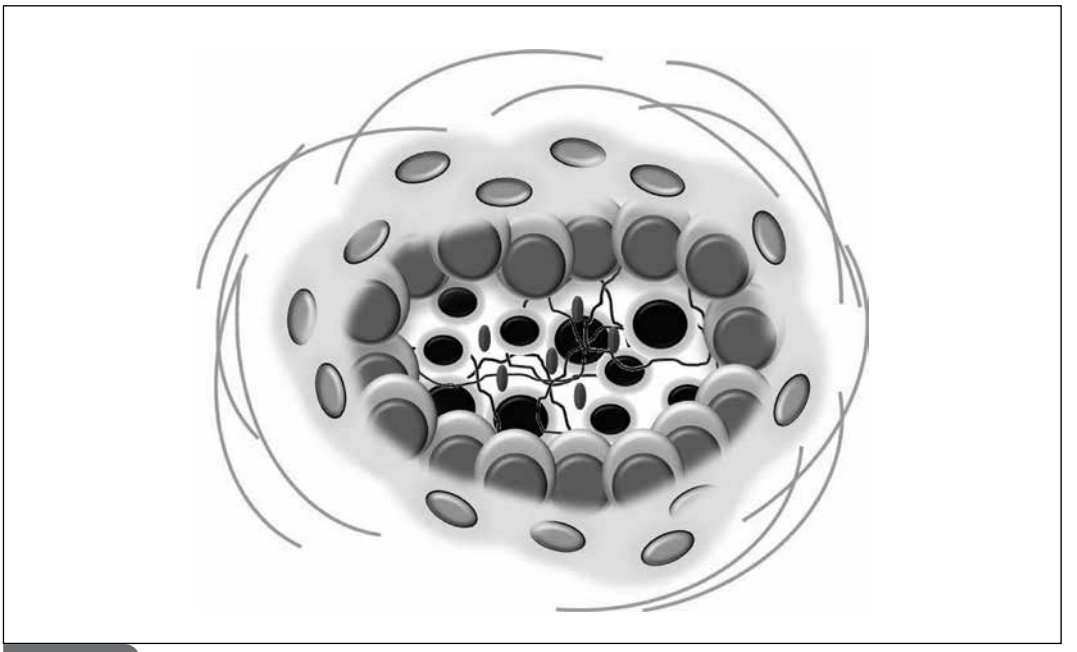


Fig. 4.2 Ilustração esquemática de um granuloma.

Há basicamente dois tipos de granulomas:

- Granuloma de corpo estranho: Produzidos em resposta a agentes exógenos não-vivos como partículas de poeira, silício, berílio e outros materiais, que devido ao grande tamanho não podem ser fagocitadas. Células gigantes são formadas na tentativa de removê-las do local.
- Granuloma imune: Produzidos por partículas insolúveis que são capazes de induzir uma resposta imune mediada por células. Nessa resposta os macrófagos fagocitam o agente patogênico, processam e apresentam parte dele para linfócitos T, ativando-os. As células T ativadas produzem citocinas que estimulam outras células T que atuam perpetuando a resposta. Uma citocina importante é o INF-γ que participa na diferenciação do macrófago em células epitelióides e em células gigantes multinucleadas.

Além desses dois tipos principais de inflamação crônica podem ocorrer ainda as inflamações crônicas produtivas e exsudativas, caracterizadas pelo predomínio de grande quantidade de fibras colágenas e de células e pela presença de pus, respectivamente.

4.4. Reparo

Quando há o desaparecimento do agente causador da inflamação, esta evolui para cura, podendo ocorrer dois tipos de reparo dependendo do estado de destruição do tecido e do grau de transformação sofrido por este durante a inflamação: regeneração, que ocorre quando há reposição de tecido idêntico ao que foi lesionado; ou cicatrização, quando há a substituição do tecido lesionado por tecido conjuntivo fibroso, formando uma cicatriz. Esse processo de reparo ocorre de forma concomitante à inflamação, sendo considerado como finalizado quando há restituição da morfologia e homeostase tecidual. É um mecanismo complexo que envolve os efeitos recíprocos das interações entre as células epiteliais, estromais e inflamatórias.

Mesmo quando ocorre com alta eficiência, o reparo de uma ferida na maioria dos organismos vertebrados, é dominada por uma resposta fibroproliferativa que produz uma cicatriz fibrosa quando ocorre perda importante de tecidos. Apenas em um número bem restrito de espécies de vertebrados e tecidos, por exemplo, o ósseo, a fase inicial do reparo é seguida por uma perfeita restauração ou regeneração do órgão tanto estruturalmente quanto funcionalmente. A taxa de cura é influenciada por diversos fatores como localização da lesão, o tipo de tecido, a característica da eventual infecção, a má circulação sanguínea ou o eventual uso de esteroides, sendo este último utilizado em procedimentos cirúrgicos, principalmente em cirurgias plásticas, de forma a tornar as cicatrizes imperceptíveis na pele.

Uma característica marcante que irá ditar a capacidade de regeneração do tecido consiste nos tipos celulares que o compõe. Nos processos regenerativos, em geral, quanto mais diferenciada for uma célula menor é o grau de multiplicação e regeneração. As células podem ser classificadas segundo sua capacidade proliferativa em:

- Células Lábeis – Possuem alta capacidade proliferativa, estando, portanto, em constante processo de mitose.

Ex.: tecido epitelial, mucosas oral, nasal, vaginal, tecido hematopoiético

- Células Estáveis – Constituem a grande maioria dentre os vários tipos de células do organismo. Possuem menor poder mitótico em relação às células lábeis, sen-

do mais especializadas. Possuem capacidade de regeneração variável de órgão para órgão.

Ex.: osteócito, tecidos cartilaginoso, conjuntivo, adiposo.

- Células Permanentes (ou Perenes) – Diferenciam-se durante o período embrionário, perdendo a capacidade proliferativa após sua conclusão. São altamente especializadas. Em tecidos compostos por esse tipo celular, o reparo advém de outros tipos celulares adjacentes (ex.: células de Schwann no tecido nervoso periférico).

Ex.: neurônio, músculo esquelético e músculo cardíaco.

4.4.1. Fases do Reparo/Cicatrização

Diante de uma lesão severa, ou de uma inflamação complicada manifestada, por exemplo, por uma agressão persistente ou contaminação, ou ainda mediante a destruição de células perenes, há a reposição do tecido destruído por um conjuntivo neoformado não especializado, que caracteriza o processo de cicatrização.

O processo de reparo normal de uma ferida é altamente dinâmico e consiste de diversas fases que se sobrepõem. Didaticamente, ele pode ser dividido em três fases:

1. Fase de inflamação: ocorre logo após a lesão e inicia-se pela agregação plaquetária com formação de uma matriz extracelular provisória formada de fibrina e fibronectina. As plaquetas são responsáveis pela liberação de fatores de crescimento e proteínas de adesão que estimularão a resposta inflamatória, com indução da migração de células como os neutrófilos, que possuem como principal função solubilizar os *debris*, e os monócitos, que no tecido se diferenciarão em macrófagos e fagocitarão os *debris* solubilizados pelos neutrófilos. Além disso, os macrófagos também são responsáveis pela síntese e secreção de citocinas e fatores de crescimento que darão continuidade aos eventos de reparo. Já a matriz extracelular provisória é responsável por evitar o extravasamento sanguíneo e servir de substrato para a migração de células infiltrantes.

2. Fase de crescimento do tecido de granulação (fibroblastos, células inflamatórias, principalmente macrófagos e componentes neovasculares e de matriz extracelular, como fibronectina, laminina, colágeno e glicosaminoglica-

nos): compreende a proliferação de fibroblastos (fibroplasia), a angiogênese (formação de novos vasos), a reinervação e deposição de matriz extracelular. A angiogênese ocorre para suprir o tecido de granulação com nutrientes e oxigênio através dos novos vasos. Concomitante a esses eventos, os fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos, os quais secretam grandes quantidades de fibronectina para promover a aderência adicional de células e a condição favorável para a deposição/orientação das fibrilas de colágeno.

3. Fase de maturação/remodelamento tecidual: inicia-se simultaneamente com a fase anterior, ocorrendo síntese e deposição de colágeno e contração das bordas da ferida para diminuir o tamanho da lesão à custa dos miofibroblastos. Há um remodelamento da matriz, sendo que o tecido granular passa a uma cicatriz madura, com menor celularidade e menos vascularizado que o tecido de granulação. A diminuição do componente celular, incluindo os miofibroblastos, pode ocorrer pela apoptose seletiva ou pela migração celular para fora do sítio da ferida. Essa cicatriz então, sendo pouco vascularizada e com poucas células, é composta principalmente por fibras colagenosas compactadas, podendo adquirir uma coloração esbranquiçada.

A persistência do agente agressor, a síntese excessiva de colágeno e outros componentes de matriz extracelular, além da redução na produção das enzimas que degradam a matriz extracelular, podem levar a desregulação do processo de reparo tecidual, com excessiva deposição dos componentes de matriz, o que resulta na destruição da arquitetura do tecido e consequentemente em um comprometimento da função, o que caracteriza a fibrose tecidual.

4.5. Doenças inflamatórias crônicas

Inúmeras doenças são caracterizadas pelo seu curso crônico devido à persistência do agente agressor, podendo ser esse infeccioso ou não. Podemos citar algumas dessas doenças como: hanseníase, tuberculose, doença de Chagas, leishmaniose, toxoplasmose, esquistossomose, hepatite, doença de Crohn, artrite reumatóide, colite ulcerosa, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), lúpus eritematoso, polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória crônica (CIDP), ateroesclerose, asma, silicose, entre outras.

A seguir serão descritos os aspectos imunopatológicos de algumas das doenças que foram citadas acima e possuem alta prevalência no Brasil e no mundo.

4.5.1. Tuberculose

O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é o agente etiológico da tuberculose (TB) e a Organização Mundial de Saúde estima que um terço da população mundial esteja infectada com Mtb, com aproximadamente 8 milhões de casos novos e 2-3 milhões de mortes descritas anualmente. A incidência global da TB está aumentando aproximadamente 0,4% ao ano, direcionada por fatores como a epidemia da AIDS, a pobreza e o aumento da densidade populacional. Apesar da existência de tratamentos efetivos, o controle da TB é complicado devido à natureza crônica da doença. Somente 5 a 10% dos indivíduos expostos ao Mtb desenvolvem TB ativa nos primeiros dois anos após a exposição. Um elevado percentual de indivíduos expostos se torna infectado e não são capazes de eliminar a micobactéria, apresentando uma infecção latente.

O principal sítio de infecção e desenvolvimento da doença são os pulmões, sendo que as formas extrapulmonares da pleura, linfonodos, ossos, sistema genito-urinário, meninges, peritôneo ou pele ocorrem em 15% dos pacientes. Mais raramente, pode-se desenvolver a tuberculose disseminada (miliar). A transmissão ocorre geralmente pela inalação de partículas com bacilos em suspensão no ar, emitidos por pacientes com tuberculose pulmonar ativa, após a fala, o espirro e, principalmente a tosse. Os sintomas mais evidentes são: tosse crônica, febre, persistência de suores noturnos intensos, perda de peso e fácil cansaço, dores no tórax e falta de apetite.

Sabe-se que a susceptibilidade à doença é multifatorial. Acredita-se que além de fatores sócio-econômicos, a evolução dependa também do indivíduo estar sendo infectado pela primeira vez (primo-infecção) ou reinfectado (reinfecção exógena). A probabilidade de adoecer em uma primo-infecção depende da virulência do bacilo, da fonte infectante e das características genéticas dos indivíduos infectados. Em novo contato, após uma infecção natural ou induzida pela BCG, a resistência dependerá da resposta imunológica. Dependendo de fatores individuais relacionados à imunidade, a resposta inicial do hospedeiro pode ser efetiva e eliminar o bacilo, ou, este pode permanecer latente durante toda a vida do indivíduo infectado. Se a resposta imunológica inicial não controlar a progressão da infecção, o bacilo se multiplica e causa doença clínica. É o crescimento lento do Mtb que condiciona um decurso clínico crônico da infecção.

O evento inicial após os bacilos alcançarem o trato respiratório (bronquíolos e alvéolos) é o seu reconhecimento, por macrófagos através de receptores como *Toll Like Receptors*, de complemento e a porção Fc de imunoglobulinas que permitem aos fagócitos atuarem de forma inespecífica contra agentes infecciosos na resposta imunológica inata. Posteriormente os macrófagos alveolares fagocitam o Mtb, formando o sítio primário da infecção aonde os patógenos irão se multiplicar. Os macrófagos perfazem a primeira linha de defesa contra o Mtb, sendo essenciais para o desenvolvimento da resposta imune mediada por células que se desenvolve com 2 a 6 semanas de infecção após o processamento antigênico, apresentação e ativação dos linfócitos T. A liberação de quimiocinas como IL-8, MIP-1α, MIP-1β e RANTES contribui para o influxo de linfócitos e monócitos para o sítio da infecção, ativação dos monócitos em macrófagos, resultando na formação do granuloma na sua fase inicial constituído por macrófagos ativados e modificados e linfócitos.

Uma vez no interior dos macrófagos, o bacilo pode ser eliminado por vários mecanismos mediados pela interação entre as células fagocíticas, linfócitos e citocinas. Um desses mecanismos envolve linfócitos T e células NK que, através da secreção de IFN-γ, ativam macrófagos a produzirem uma série de substâncias, incluindo espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, que estão envolvidas na inibição do crescimento e na morte do patógeno. No entanto, mesmo os macrófagos ativados falham em erradicar completamente o Mtb de cepas mais virulentas ou na dependência de fatores nutricionais, existência de co-infecção (HIV) ou genéticas do indivíduo (hospedeiro). Os bacilos persistentes evoluem para um estágio de dormência com redução da atividade metabólica, o que facilita sua sobrevivência sob condições de privação de nutrientes e oxigênio. A proeminente necrose no interior do granuloma, principalmente de células epitelióides, o tornam caseoso, rico em material lipídico que serve de fonte de nutrientes para a micobactéria. A destruição adicional desse tipo de granuloma pode levar a liquefação, permitindo então a disseminação do Mtb.

Acredita-se que as subpopulações de células T (T $CD4^+$, T $CD8^+$, além de células T $\gamma\delta$) desempenham diferentes funções na infecção, incluindo memória imunológica para o controle da infecção. A resposta do tipo Th1, caracterizada por elevada produção de IFN-γ e IL-12, parece ser essencial para o desenvolvimento de uma imunidade protetora contra o Mtb.

A despeito da existência de medicamentos eficazes no tratamento da TB, (terapia com múltiplas drogas, compreendendo uma fase inicial de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol diariamente por 2 meses e uma fase de continuidade de rifampicina e isoniazida por 4 meses adicionais) os esforços para tratar os pacientes com doença ativa e controlar a disseminação da doença são dificultados devido à emergência de cepas de Mtb resistentes a múltiplas drogas. A TB multi-resistente é definida como a resistência a isoniazida e a rifampicina, com ou sem resistência a outros agentes, e tem como causas a interrupção do tratamento e os baixos índices de cura observados em pacientes co-infectados com HIV.

Apesar de falar-se em transição epidemiológica, com redução das mortes causadas por agentes infecciosos em todo o mundo, a TB é ainda uma realidade em países em desenvolvimento e, começam a ser relatados casos de extrema resistência a drogas em alguns países, o que justifica a necessidade de estudos direcionados na compreensão da patogênese da doença. A vacina atualmente em uso, o bacilo Calmette-Guérin (BCG) apresenta forte resposta celular contra Mtb, mas os níveis de proteção são altamente variáveis. Desse modo, novas estratégias de vacinação, novos medicamentos, melhores ferramentas de diagnóstico e testes de susceptibilidade a drogas ainda são tema de pesquisas em todo o mundo.

Tratamentos realizados com imunomoduladores como IFN-γ em pacientes resistentes mostraram redução da carga bacilar e melhora clínica, porém, estes são de custo muito elevado. Recentemente, dá-se prioridade a investigação do potencial de novas vacinas com vistas ao desenvolvimento de BCG recombinante, vacinas de DNA e vacinas compostas de subunidades dos principais determinantes antigênicos de Mtb.

4.5.2. Esquistossomose

A esquistossomose, também conhecida como bilharziose, é uma doença parasitária tropical causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*. Três espécies principais são responsáveis pela infecção em humanos: *S. mansoni* (América do Sul e África Subsaariana), *S. haematobum* (África Subsaariana) e *S. japonicum* (Ásia Oriental). Essa doença acomete aproximadamente 200 milhões de pessoas mundialmente, principalmente nos países em desenvol-

vimento e dados epidemiológicos demonstram que as taxas de infecção são maiores em crianças.

Algumas características interessantes são observadas na esquistossomose. De uma forma geral, observa-se que a resposta imune está altamente relacionada com várias mudanças anatomopatológicas que acompanham a infecção e que, mesmo na presença de uma forte resposta imunológica, o parasito sobrevive por anos no hospedeiro. A resposta típica e protetora à infecção helmíntica é do tipo Th2 e, além disso, observa-se que indivíduos infectados podem ter resistência a superinfecção.

A infecção por *S. mansoni* inicia-se pela penetração ativa das cercárias na superfície do corpo com posterior transformação nas formas jovens do parasito – os esquistossômulos. Esses ganham a circulação, passando pelo coração, pulmões e, em seguida, fígado, onde se instalam no sistema porta intra-hepático, desenvolvendo-se em vermes adultos e alimentando-se de hemácias e globulinas. Esses parasitos adultos, geralmente acasalam, e migram para os plexos venosos mesentéricos. Os ovos formados, com envoltório rígido, são liberados pelas fêmeas na vasculatura, alcançando o lúmem intestinal através da liberação de enzimas proteolíticas pelos próprios miracídios contidos nos ovos. Esses ovos são então eliminados nas fezes e podem permanecer viáveis por até sete dias.

Os ovos que ficam retidos na parede intestinal e os que caem na circulação sanguínea mesentérica geralmente ficam retidos no fígado onde serão responsáveis pelo desenvolvimento de granulomas. O mecanismo de migração dos ovos é pouco conhecido, mas acredita-se que haja o envolvimento de componentes imunológicos do hospedeiro, uma vez que pacientes imunocomprometidos possuem redução na excreção de ovos. Além disso, acredita-se que tais componentes, especialmente células T $CD4^+$, também estejam envolvidos no processo de maturação e fecundação dos parasitos.

O contato dos ovos com a água promove a eclosão, com liberação dos miracídios que, através de fototropismo e quimiotropismo, nadam em busca do seu hospedeiro adequado, no caso, os moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria*. Após penetrar nos moluscos, os miracídios transformam-se e multiplicam-se assexuadamente, por poliembrionia, em esporocistos multicelulares e

posteriormente em cercárias. Após abandonarem o hospedeiro invertebrado as cercárias permanecem na água até encontrarem seu hospedeiro vertebrado (homem ou outro animal suscetível), onde completarão sua evolução até vermes adultos.

Durante o curso da doença, podem ser observadas duas fases clínicas principais: aguda (inicial) e crônica. A esquistossomose aguda em humanos é caracterizada por doença febril debilitante (febre de Katayama) que pode ocorrer antes do aparecimento dos ovos em resposta ao esquistossômulo migrante. É determinada por uma resposta Th1-*like* como produção de TNF-α, IL-1β e IL-6, sendo regulada posteriormente e provavelmente pela presença de IL-10, desenvolvendo uma resposta do tipo Th2. A severidade da doença é correlacionada com a incapacidade em alterar o tipo de resposta.

A doença crônica resulta da resposta do hospedeiro ao acúmulo de ovos presos no tecido, decorrente de migração intestinal ou após embolização no fígado, baço, pulmões ou sistema cérebro-espinhal. O fígado é o principal órgão afetado uma vez que os ovos são levados pelo fluxo sanguíneo para ele. A forma mais grave hepatoesplênica é usualmente acompanhada de severa fibrose hepática e periportal, que leva à progressiva oclusão das veias, com hipertensão portal e desvio porto-sistêmico do sangue venoso. Essas lesões são ocasionadas pelo desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2, induzida por antígenos do ovo, com formação do granuloma ao redor do mesmo. Esse granuloma é composto por fibras colágenas e células incluindo linfócitos T $CD4^+$, eosinófilos e macrófagos. A ativação alternativa desses macrófagos por citocinas Th2, principalmente IL-13, leva à indução da expressão de L-arginase, que está relacionada com a formação de colágeno e o padrão extensivamente fibrótico do granuloma.

A persistência de uma resposta Th1 inibe a formação do granuloma, observando-se o desenvolvimento de uma doença hepatotóxica. No entanto, a resposta prolongada do tipo Th2, apesar de proteger o fígado, contribui para o desenvolvimento de fibrose hepática e morbidade crônica. A presença de mecanismos regulatórios em resposta a infecção helmíntica como a produção de IL-10, e possivelmente TGF-β, poderiam contribuir para o balanço da resposta Th1 – Th2 na doença.

O tratamento básico da esquistossomose atualmente é feito pela administração de medicamentos anti-helmínticos. O mais utilizado é o praziquantel, que é ativo contra todas as espécies de *Schistosoma*. Essa droga age através da paralisação do parasito e dano de seu tegumento. Apesar de ocasionar alguns efeitos colaterais, essa droga é de baixa toxicidade. No Brasil é principalmente administrado a oxamniquine, uma outra droga anti-helmíntica que age somente em *S. mansoni*.

Em algumas situações indica-se o uso de praziquantel associado a corticosteróides, como no caso da presença da febre de Katayama ou casos de neuroesqusitossomose. Em casos mais graves de esquistossomose hepatoesplênica, com hipertensão porta e hemorragias, opta-se pelo tratamento cirúrgico.

De qualquer forma, é necessário o controle da doença, evitando-se a incidência de novos casos. A melhor forma para que isto ocorra é através de mudanças comportamentais, sanitização, educação e melhorias no suprimento de água para a população.

4.5.3. Asma

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que acomete cerca de 300 milhões de pessoas mundialmente, principalmente crianças. Sua prevalência tem aumentado significativamente, atingindo proporções epidêmicas. Esse aumento tem sido relacionado à urbanização e desenvolvimento econômico, tendo relatos de maiores taxas de prevalência em países economicamente desenvolvidos. Uma hipótese que tem sido bastante considerada - *hipótese da higiene* – indica que o aumento na prevalência de asma nos últimos 100 anos está relacionado a mudanças nos padrões de higiene e estilo de vida em vários países, além da diminuição da exposição a microrganismos durante a infância. Acredita-se que crianças vivendo em uma sociedade mais moderna, com menores níveis de infecção, apresentam direcionamento da resposta do sistema imune para o fenótipo Th2 ao invés de Th1, aumentando, portanto, o risco de uma doença alérgica.

Além dos fatores ambientais, estariam também relacionados com o desenvolvimento da asma, os fatores genéticos. Estudos de polimorfismo identificaram alguns dos genes que poderiam estar envolvidos, sendo esses basicamente relacionados ao reconhecimento do alergeno e elaboração da resposta

imune, como será discutido posteriormente. Como exemplos, podem ser citados genes relacionados ao desenvolvimento da resposta do tipo Th2, como as IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, além dos genes que codificam o TNF-α, o MHC, a subunidade β do receptor de alta afinidade de IgE, entre outros. É de grande interesse estudar como esses genes que predispõem o indivíduo a ter asma interagem com fatores ambientais para que ocorra o desenvolvimento da doença.

Apesar das causas fundamentais da asma não terem sido complemente elucidadas, os fatores de risco mais associados com seu desenvolvimento envolvem a exposição de pacientes sensíveis a alérgenos inalados como os situados dentro de casa (pequenas quantidades de poeira caseira em roupas de cama, móveis, carpetes, pelos de animais de estimação), os situados ao ar livre (pólen e mofo), fumaça de cigarro, exercícios, irritantes químicos presentes no local de trabalho, dentre outros.

Em termos patológicos, a asma é caracterizada por várias mudanças nas vias aéreas que incluem a presença de infiltrado inflamatório, com predomínio de eosinófilos, hiperresponsividade brônquica, hipersecreção de muco e comprometimento da função pulmonar. Os principais sintomas associados são episódios recorrentes de tosse, dificuldade de respirar, chiado e aperto no peito.

As características imunológicas da asma resumem-se em uma reação inflamatória modulada por diferentes tipos de células, como mastócitos, que quanto ativados secretam vários mediadores vasoativos e pró-inflamatórios, e também linfócitos, eosinófilos, macrófagos e, em menor grau, neutrófilos, além de elementos mesenquimais como fibroblastos, células endoteliais e musculares. É controlada por células do tipo Th2 secretoras de IL-4, IL-5 e IL-13, que vão mediar o aumento na expressão de moléculas de adesão e secreção de quimiocinas, recrutamento das células imunes efetoras, degranulação de eosinófilos, síntese de IgE, e hiperreatividade do músculo liso. Nesse contexto, as células dendríticas têm sido descritas como elementos chaves na sensibilização a alérgenos inalados e também na iniciação e manutenção da inflamação eosinofílica.

A exposição constante ao estímulo alergênico promove o desenvolvimento da inflamação e dano das vias aéreas, levando a consequências severas aos indivíduos portadores de asma brônquica.

A liberação de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas como IL-4, IL-5, TGF-β e CCL5 por células epiteliais ativadas e células inflamatórias, desencadeia o processo na asma de um reparo anormal. Os fibroblastos são as principais células envolvidas nesse processo, podendo diferenciar-se em miofibroblastos. Os principais eventos envolvidos são a angiogênese, o espessamento da membrana basal, a proliferação da camada muscular lisa e a fibrose peribrônquica. A hipertrofia e hiperplasia da massa muscular das vias aéreas aumentam a responsividade brônquica através do aumento da resposta ao estímulo broncoconstritor e redução do diâmetro das vias aéreas.

O tratamento medicamentoso da asma envolve a utilização de drogas pertencentes a diversas classes farmacológicas que, através de mecanismos de ação diferentes visam basicamente relaxamento da musculatura lisa bronquiolar, diminuição da secreção mucosa e infiltrado inflamatório assim como inibição da função mastocitária.

A adoção de terapia que envolve o uso de corticosteroides, broncodilatadores e inibidores de síntese e antagonistas de receptor de leucotrienos (capítulos 8 e9) visa principalmente melhoria da qualidade de vida com término das crises de broncoespasmo, redução de internações e tolerância normal aos exercícios, prevenção da limitação irreversível do fluxo aéreo e principalmente, prevenção de mortalidade pela doença.

4.5.4. Silicose

A silicose é uma doença pulmonar crônica resultante da exposição constante à partículas de sílica cristalina. É a doença de caráter ocupacional que, ainda leva à morte centenas de pessoas todos os anos. Acredita-se que aproximadamente 20 milhões de habitantes estejam expostos a poeira contendo partículas de sílica em todo o mundo. No Brasil, a silicose é uma das pneumoconioses de maior prevalência e estima-se que mais de seis milhões de trabalhadores sejam expostos ao pó contendo partículas de sílica.

A sílica é composta por 1 átomo de silício e 2 átomos de oxigênio (dióxido de silício) e forma-se em condições de aumento de temperatura e pressão. Existe em duas formas, cristalina e amorfa, mas apenas a primeira é tóxica. A sílica livre é encontrada mais facilmente na forma de quartzo, sendo abundante na maioria dos tipos de rochas, principalmente em granitos, arenitos, areia e também no solo.

Os indivíduos comummente acometidos são os profissionais que atuam em diferentes ocupações como fundição de ferro, fabricação de vidros, perfuração de rochas em construção de túneis, estradas e barragens, moagem de quartzo, escavação de poços, mineração, dentre outras.

Alguns fatores estão relacionados com o risco de adquirir silicose: a concentração do pó respirável, a percentagem de sílica livre e cristalina e a duração da exposição. De uma forma geral, o período de latência para a silicose simples (nodular) é inversamente proporcional aos níveis de exposição e é normalmente longo. Além disso, foi observado que a co-exposição com outros tipos de pós-minerais diminuía a incidência dessa doença.

A patogênese da silicose está relacionada fase inflamatória aguda (alveolite) onde verifica-se o depósito de partículas de sílica na superfície epitelial alveolar e consequente ocorrência de dano tecidual e apoptose celular. Além disso, há o estímulo de células residentes como macrófagos alveolares, células epiteliais, fibroblastos e mastócitos que vão liberar uma série de mediadores inflamatórios como espécies reativas do oxigênio (ROS), espécies reativas do nitrogênio (RNS), citocinas dentre outros, que são capazes de recrutar e estimular células inflamatórias como neutrófilos e linfócitos para o tecido.

O reconhecimento das partículas minerais pelas células ainda não está bem estabelecido, mas há relatos da participação de receptores *scavenger* , como o MARCO em macrófagos e mastócitos, que são essenciais no reconhecimento de microrganismos pela imunidade inata, neste processo.

Não há relatos de como os macrófagos ativados pela sílica poderiam estimular as células T. Sabe-se que há uma predominância de células T $CD4^+$ na silicose. No entanto, os dados referentes à polarização do tipo de resposta imune obtidos até agora são bem controversos, indicando um mecanismo complexo onde ambos os tipos de resposta (Th1 e Th2) podem acompanhar a doença sem, contudo, ser necessário para o seu desenvolvimento, podendo ter ainda a participação de células T regulatórias e Th17.

Além do dano inicial direto ocasionado pelas próprias partículas, os fatores liberados pelas células inflamatórias, como derivados reativos do oxigênio e enzimas proteolíticas podem causar danos adicionais ao DNA e à célula, apoptose e quebra da matriz extracelular associada. Esse potencial de dano ao DNA é o que classifica a sílica como uma substância carcinogênica.

Na fase de reparo, há o recrutamento e proliferação de células mesenquimais por diversos mediadores polipeptídicos como citocinas fibrogênicas (TNF-α, IL-1β e TGF-β), fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas – PGDF; fator de crescimento semelhante à insulina – IGF) e fibronectina. Há ainda processo de angiogênese e re-epitelização dos tecidos lesionados.

Apesar de um arsenal terapêutico extenso disponível, até o presente momento não há uma terapia efetiva para a silicose. O uso de esteróides clássicos como a dexametasona, não apresenta grande eficácia, sendo então utilizada uma terapia de suporte que inclui o uso de antitussígenos e broncodilatadores e utilização de oxigênio. Novas terapias têm sido buscadas, muito embora a prevenção é a melhor forma de combate à doença, regulando a exposição profissional a minerais e remoção de pessoas sintomáticas do local de trabalho.

5. RESPOSTA IMUNE A PATÓGENOS

FÁBIO P. M. DOS SANTOS

O desenvolvimento de doenças infecciosas no organismo resulta de interações complexas entre o microrganismo invasor e o organismo do hospedeiro. Dentre os eventos que ocorrem durante a infecção, são considerados eventos principais (i) a invasão e a colonização do sítio do organismo hospedeiro, (ii) escape dos mecanismos de defesa do organismo (barreiras naturais e sistema imune) e, (iii) a perda da função ou, somente, a lesão tecidual decorrente dessa interação.

Como exemplo, podemos citar que alguns microrganismos são capazes de promover o desenvolvimento de doenças sem colonizar uma região extensa do tecido do hospedeiro. Nesses casos, a patogenicidade é alcançada através da liberação de toxinas.

Embora existam eventos característicos do processo infeccioso, os mecanismos de defesa do organismo são numerosos e variados. Dessa forma, algumas características gerais podem ser abordadas:

I) Resposta Inata x Resposta Adaptativa – O sistema imune inato proporciona ao organismo uma defesa imediata, enquanto a resposta imune adaptativa proporciona uma resposta mais duradoura e mais eficaz contra agentes patogênicos. A resposta imune adaptativa induz células efetoras a eliminar microrganismos e induz a formação de células de memória, as quais podem responder mais efetivamente (mais rápido e com mais intensidade) a uma exposição antigênica repetida, ou seja, a uma nova exposição do mesmo antígeno;

II) Resposta específica – Em virtude da grande diversidade de patógenos, o organismo vai responder de maneira diferente (e específica) contra os diferentes tipos de agentes infecciosos.

III) Sobrevivência / Patogenicidade – Tanto a sobrevivência do patógeno no organismo do hospedeiro quanto seu potencial efeito patogênico são influenciados pela capacidade do microrganismo de escapar ou resistir aos mecanismos efetores do sistema imune.

IV) Lesão Tecidual / Doença – Em algumas doenças infecciosas, a injúria tecidual e a doença por si só, podem ser causadas pela resposta do hospedeiro ao patógeno (e seus produtos), ao invés de ser causada pelo próprio patógeno.

Desde organismos muito simples, como os vírus, até organismos multicelulares como os parasitos multicelulares, existe uma grande diversidade de microrganismos capazes de promover patogenias no organismo humano. Esses patógenos pertencem a quatro tipos principais: vírus, bactérias, fungos e parasitos. Em relação aos mecanismos de defesa, o organismo vai responder de maneira diferente em função da biologia do patógeno, ou seja, a resposta será diferente se o agente patogênico for intracelular ou extracelular.

5.1. Imunidade a bactérias extracelulares

As bactérias extracelulares são aquelas capazes de se replicarem fora da célula do hospedeiro. Muitas dessas bactérias são patogênicas e a patologia é causada por dois mecanismos principais, que podem ser: a inflamação, ou através da produção de toxinas, que são responsáveis por exercer diversos efeitos patológicos.

5.1.1. Imunidade Inata

Com relação a estrutura de membrana, dentre os demais constituintes, as bactérias gram-positivas apresentam peptídeoglicano na parede celular e as gram-negativas apresentam lipopolissacarídeo (LPS). Essas estruturas são capazes de ativar a via alternativa do sistema de complemento. Dessa forma, dentre os mecanismos inatos de defesa contra esse tipo de patógeno, destaca-se a ativação do sistema de complemento, que também pode ser ativado por bactérias que expressam manose na sua superfície celular. Fato esse que resultaria na opsonização da bactéria, que culminaria com fagocitose ou com a lise da mesma. Durante o processo de fagocitose, vários receptores podem ser ativados como os receptores de manose, receptores scavenger e receptores *toll-like*. Esses vários receptores, uma vez ativados, promovem a ativação dos fagócitos, que irão secretar citocinas, as quais poderão induzir infiltrado leucocitário para o sítio de infecção, resultando no processo inflamatório.

5.1.2. Imunidade Adaptativa

A principal resposta referente à imunidade adaptativa é a resposta mediada por anticorpos (humoral). Esse mecanismo de defesa tem como objetivo eliminar o patógeno, visto que os anticorpos são específicos contra antígenos bacterianos (presentes na parede bacteriana ou secretados). Além disso, esses anticorpos podem ser específicos contra toxinas (polissacarídeos ou proteínas) produzidas e liberadas por esses patógenos, com a finalidade de neutralizá-las.

Esse tipo de resposta tem como objetivo principal combater a infecção através de neutralização (da bactéria ou da toxina), opsonização (do microrganismo) e auxílio na fagocitose. Além disso, a produção de anticorpos pode promover a ativação do sistema de complemento, pela via clássica. Esse fenômeno é mediado por imunoglobulinas (Igs) dos isotipos A, G e M (IgG, IgA e IgM). Além disso, ocorre a ativação celular por ação do interferon-γ (IFN-γ) e do fator de necrose tumoral (TNF). Essa ativação celular resulta na ativação de macrófagos, que irão secretar citocinas, que poderão levar ao choque séptico. Dentre os mediadores produzidos, o principal é o TNF. Alguns patógenos são capazes de estimular um número elevado (além do normal) de células T, resultando na produção de grandes quantidades de citocinas, sendo similar ao que ocorre no choque séptico. Essas toxinas são chamadas de superantígenos. Dentre essas células, tem papel de destaque as células Th17, que estão associadas na resposta a infecções por patógenos extracelulares, como fungos e bactérias.

5.1.3. Mecanismos de Evasão

O principal mecanismo usado pelas bactérias para escapar da imunidade humoral é a variação genética de antígenos de superfície. Além disso, a virulência de bactérias extracelulares está diretamente relacionada com o número de mecanismos capazes de torná-las resistentes ao sistema imune do hospedeiro. Assim sendo, esses patógenos podem apresentar mecanismos de antifagocitose ou promover a inibição do sistema de complemento.

5.2. Imunidade a bactérias intracelulares

Esses patógenos são capazes de sobreviver e se replicar no interior dos fagócitos. Dessa forma, essas bactérias encontram-se inacessíveis aos anticorpos circulantes e sua eliminação depende de mecanismos de imunidade mediada por célula.

5.2.1. Imunidade Inata

Os principais tipos celulares envolvidos nesse tipo de defesa são os fagócitos e as células natural-killers (NK). A resposta inata contra bactérias intracelulares inicia-se com a ação de fagócitos, inicialmente os neutrófilos e, posteriormente, os macrófagos são os responsáveis por esse tipo de resposta. No entanto, esses patógenos são resistentes a degradação no interior dos fagócitos. Durante essa resposta, são produzidos mediadores inflamatórios como IL-12 e IFN-γ que são fundamentais para a ativação celular e destruição das bactérias fagocitadas.

A imunidade inata pode controlar o crescimento bacteriano durante algum tempo, mas para conseguir a erradicação completa da infecção é necessária a ação complementar do sistema imune adaptativo.

5.2.2. Imunidade Adaptativa

Durante a infecção por bactérias intracelulares, o principal mecanismo de defesa contra esse tipo de patógeno é a imunidade mediada por células. Essa resposta é dependente da ativação de macrófagos por ação de células T ativadas. Isso irá resultar na morte de bactérias fagocitadas e na lise de células infectadas por ação de linfócitos T citotóxicos (CTLs).

Os linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ são capazes de responder aos antígenos protéicos de bactérias fagocitadas. Essas estruturas são apresentadas ao estarem associadas a moléculas de MHC (major histocompatibiliy complex) classe II. Esses dois tipos celulares são capazes de atuar na defesa do organismo através de respostas que se desenvolvem de maneira diferente.

Nesta resposta, células dendríticas e macrófagos ativados são capazes de secretar IL-12, que induzirá a diferenciação das células T $CD4^+$ em linfócitos Th1. Além disso, também há a produção de IFN-γ. Esses mediadores induzem a produção de várias substâncias de ação antibacteriana, como óxido nítrico e enzimas lisossômicas, nos macrófagos, que promoverão a morte da bactéria fagocitada. No entanto, se os antígenos bacterianos forem transportados do fagossomo para citosol ou se a bactéria escapar do fagossomo, indo para o citoplasma da célula infectada, os mecanismos de defesa presentes nos fagócitos não serão mais eficazes. Dessa forma, a infecção só será erradicada através da morte das células infectadas por ação das CTLs.

No entanto, em resposta a alguns patógenos, a ativação dos macrófagos pode causar lesão tecidual, como necrose e fibrose. Isso ocorre, por exemplo, na resposta ao *M. tuberculosis* onde o patógeno, ao resistir por longos períodos dentro do fagócito, causa um acúmulo de células T entorno do microrganismo, caracterizando um granuloma.

5.2.3. Mecanismos de Evasão

Várias são as estratégias desenvolvidas pelas bactérias para resistir e escapar dos fagócitos. No entanto, dentre os mecanismos utilizados destaca-se a capacidade em interferir nos mecanismos fagocíticos e citotóxicos dos fagócitos, como inativar espécies reativas de oxigênio e também impedir a fusão do fagossoma com o lisossoma, permitindo assim a sua sobrevivência no interior celular.

5.3. Imunidade a fungos

As infecções fúngicas são importantes causas de morbidade e mortalidade nos seres humanos. Essas infecções, também conhecidas como micoses, costumeiramente são consideradas endêmicas e são causadas por fungos que estão presentes no meio ambiente. Existe um outro grupo de infecções fúngicas, que são consideradas como oportunistas, visto que esses microrganismos não são capazes de provocar nenhuma patologia em indivíduos saudáveis, mas são capazes de infectar e causar doenças severas em pessoas imunodeficientes, como portadores do vírus HIV.

5.3.1. Imunidade Inata

O principal mecanismo de defesa inato contra infecções fúngicas é através da ação de neutrófilos e macrófagos. Os neutrófilos são capazes de fagocitar os fungos promovendo a morte intracelular, visto que produzem substâncias com ações fungicidas. Além disso, a produção de TNF e de IL-12 é responsável por ativar macrófagos durante essa resposta.

5.3.2. Imunidade Adaptativa

O principal mecanismo da imunidade adaptativa contra infecções fúngicas é a imunidade mediada por célula. Esse tipo de resposta tem como células efetoras os linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, assim como na resposta contra bactérias in-

tracelulares. No entanto, pouco se sabe sobre a imunidade humoral envolvida nesse tipo de resposta. Assim como em relação às bactérias, a resposta mediada pelas células Th17 também é importante nas infecções causadas por fungos.

5.4. Imunidade a vírus

Os vírus são considerados microorganimos intracelulares obrigatórios. Nesse sentido, para se replicarem têm que estar no interior de uma célula, usando toda o maquinário enzimático e proteico, envolvidos no processo de síntese de proteínas da célula do hospedeiro. Esse processo de infecção pode levar a célula do hospedeiro à morte. Dessa forma, isso caracteriza o ciclo lítico, visto que houve lise da célula do hospedeiro. Caso não ocorra a lise celular, o vírus pode permanecer em latência onde o DNA viral permanece nas células do hospedeiro produzindo proteínas que podem, ou não, alterar as funções celulares.

Em linhas gerais, o processo de infecção viral é decorrente da interação da partícula viral com moléculas de superfície de membrana das células do hospedeiro, que vão funcionar como receptores, permitindo assim a entrada dos vírus nestas células.

5.4.1. Imunidade Inata

A produção de IFN do tipo I consiste na principal forma de defesa e de impedimento da infecção por vírus, pois a produção desse mediador, além de impedir a infecção de outras células, impede também a replicação viral. Além disso, células NK são capazes de reconhecer células do organismo que não apresentam MHC de classe I. A ausência dessa molécula de superfície de membrana corresponde a um sinal para a morte dessas células, induzido pelas células NK, pois é uma característica de célula infectada por vírus.

5.4.2. Imunidade Adaptativa

Contra a infecção viral, a resposta da imunidade adaptativa responde inicialmente através de anticorpos e linfócitos T citotóxicos. Os anticorpos são capazes de impedir a ligação dos vírus às células do hospedeiro. Essa defesa é eficaz apenas enquanto os vírus estiverem no estágio extracelular, visto que esse mecanismo pode impedir a infecção, mas não pode erradicar a doença, pois uma vez dentro da célula, o vírus não está mais acessível aos anticorpos. Além disso, os linfócitos T citotóxicos podem eliminar a infecção através da

morte das células infectadas. Isso ocorre pois os linfócitos T $CD8^+$ são capazes de reconhecer antígenos virais que estão presentes no citosol ou associados com MHC de classe I. Para esse processo de reconhecimento são necessárias citocinas produzidas por células T $CD4^+$ ou outros fatores co-estimulatórios expressos pelas células infectadas.

No entanto, em algumas infecções virais, como na infecção pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) a resposta do organismo pode ser responsável por causar a lesão, o que caracteriza a patologia.

5.4.3. Mecanismos de Evasão

Muitos são os mecanismos pelos quais os vírus podem escapar da ação do sistema imune. Dentre todos, destaca-se a variação antigênica como principal deles. Este fenômeno pode ocorrer por mutações pontuais no seu genoma ou por rearranjo no RNA viral. Além disso, os vírus podem impedir a apresentação de antígenos, através de moléculas de MHC classe I. Dessa forma, essas células não serão reconhecidas (nem eliminadas) por linfócitos T citotóxicos (T $CD8^+$), mas se tornam alvo da ação das células NK, pois estas eliminam as células que não apresentam MHC de classe I. Além disso, outros artifícios são utilizados pelos vírus para escapar do sistema imune, como a secreção de moléculas que inibem tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa, assim como infectar e eliminar células imunocompetentes.

5.5. Imunidade a parasitos

A terminologia "infecção parasitária" engloba os processos infecciosos provocados por parasitos como protozoários, helmintos e ectoparasitos. As infecções por parasitos são muito comuns em todas as regiões do planeta. Estima-se que no mundo todo, cerca de 30% da população apresente algum tipo de infestação parasitária e que, só a malária, seja responsável por cerca de 1 bilhão de mortes ao ano, no mundo. Dessa forma, o interesse em desenvolver novos mecanismos que impeçam este tipo de infecção é de interesse mundial.

No entanto, essa grande variedade de organismos apresenta complexos ciclos de vida, com diferentes formas de estágios de desenvolvimento, podendo ser tanto extracelulares quanto intracelulares. Dessa forma, por conta desses diferentes estágios

de desenvolvimento, os parasitos induzem muitas respostas imunológicas diferentes. Além disso, a maioria dos parasitos não pode ser erradicada por completo pela imunidade inata ou pela adaptativa, estabelecendo assim infecções crônicas no hospedeiro.

5.5.1. Imunidade Inata

Embora, os protozoários e os helmintos possam ativar diferentes mecanismos do sistema imune inato, esses organismos são capazes de sobreviver aos ataques do sistema imune. Além de sobreviver, esses patógenos são capazes de se reproduzir no interior do organismo do hospedeiro, por conta de estarem bem adaptados aos mecanismos de defesa.

No entanto, o principal mecanismo de defesa inato é a fagocitose. Isso ocorre em infecções por protozoários. Porém, estes parasitos são resistentes aos fagócitos e podem até mesmo se reproduzir dentro dos macrófagos, caso por exemplo da infecção por *T. cruzi*. Essas mesmas células também atacam helmintos. Como esses patógenos são muito grandes para serem fagocitados, esse mecanismo não surte efeito nesse tipo de infecção. Neste tipo de resposta, destacam-se, os eosinófilos, que correspondem a um grupo de leucócitos efetores que, apesar de possuirem o citoplasma preenchido, quase que na sua totalidade, por grânulos contendo proteínas citotóxicas e mediadores inflamatórios proteicos, não são capazes de matar e eliminar esse parasitos.

5.5.2. Imunidade Adaptativa

Cada parasito é capaz de estimular o desenvolvimento de um tipo de resposta adaptativa específica, visto que existe uma grande variedade de organismos, não existindo uma resposta imune adaptativa geral contra todos os parasitos (protozoários e helmintos). Em linhas gerais, para os protozoários que sobrevivem no interior dos macrófagos, será desenvolvida uma resposta similar àquela envolvida na eliminação de vírus e bactérias. Enquanto que, na resposta contra helmintos, estão envolvidas diferentes respostas mediadas por anticorpos.

Dessa forma, na resposta adaptativa a infecção por protozoários, os quais sobrevivem no interior dos macrófagos, à resposta é mediada por célula, particularmente por ação de macrófagos ativados por citocinas derivadas de células do tipo Th1, como IFN-γ. Além disso, outros tipos celulares como os linfócitos T citotóxicos também estão envolvidos nesse tipo de resposta.

A resposta adaptativa contra a infecção por helmintos é mediada pela ativação de células Th2. Essa ativação irá promover a ativação de células B, que irão secretar anticorpos específicos contra esse patógeno. Esses anticorpos, que são imunoglobulinas da classe IgE, irão possibilitar a ativação de eosinófilos, que uma vez ativados poderão secretar suas proteínas granulares tóxicas, que encontram-se pré-formadas e estocadas nos seus grânulos citoplasmáticos, como a Proteína Básica Principal (MBP), a Proteína Catiônica Eosinofílica (ECP), a Peroxidase Eosinofílica (EPO) e a Neurotoxina Derivada de Eosinófilos (EDN), que embora sejam tóxicas não são capazes de reverter o quadro infeccioso.

5.5.3. Mecanismos de Evasão

Muitas são as formas que os parasitos encontraram de escapar da ação do sistema imunológico, possibilitando a sua permanência no organismo do hospedeiro. Esses artifícios utilizados consistem em (i) produção de componentes de superfície que limitam a ação do sistema de complemento, (ii) secreção de proteases que clivam moléculas de anticorpo e (iii) alteração dos antígenos de superfície.

Em face ao grande número de infestações parasitárias no mundo inteiro, muitos esforços estão sendo concentrados para encontrar uma maneira de elucidar o comportamento do sistema imune frente a esses patógenos, assim como esclarecer e entender os mecanismos de evasão dos parasitos. Com base nesse raciocínio, o desenvolvimento de vacinas vem sendo estudado, mas pouco progresso foi conseguido acerca desse assunto.

6. FARMACOLOGIA GERAL

BIANCA T. CIAMBARELLA
RAFAEL M. CARDOSO

6.1. Introdução e Aspectos Históricos

Farmacologia é classicamente definida como o estudo dos efeitos de substâncias químicas na manutenção, modificação ou restabelecimento do padrão fisiológico do sistema orgânico vivo. Estas substâncias podem fazer parte do grupo de fármacos administrados visando benefício terapêutico ou ainda daquelas relacionadas às drogas de abuso (ou de uso ilícito). A Farmacologia é segmentada por questões simplesmente didáticas (uma vez que se comunicam constantemente) em Farmacologia clínica e toxicológica, sendo esta última destinada à compreensão e minimização dos impactos causados por determinadas substâncias químicas em sistemas biológicos, envolvendo desde efeitos individuais até eventos em ecossistemas inteiros.

Para fins práticos, a farmacologia clínica e toxicológica são ciências intimamente relacionadas já que quase a totalidade dos fármacos com fins terapêuticos podem apresentar efeitos deletérios cuja intensidade é extremamente variável e depende de uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos, destacando-se o perfil genético do paciente, fisiologia, fatores relacionados ao metabolismo, eliminação, idade, massa corporal, nível de atividade física e, sobretudo, a dose de fármaco administrada e posologia deste. Esta afirmação foi classicamente descrita pelo médico, alquimista e astrólogo suíço-alemão Phillipus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, adotante do pseudônimo Paracelsus (1493-1541) como "*Alle Dinge sind Gift und nichts ist ohne Gift; allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist*" ou "*Dosis sola facit venenum*" ("Todas as coisas são veneno e nada é isento de veneno, o que as distingue é a dose" ou "A dose é que faz o veneno" - traduções livres).

Somados, estes parâmetros mostram quão complexo é o estudo da farmacologia básica, experimental e clínica e a dificuldade do desenvolvimento de fármacos clinicamente eficazes e seguros.

O estudo da farmacologia nos moldes atuais representa uma ciência relativamente recente, começando a ter destaque em meados do século XIX. Todavia, o emprego de substâncias com fins medicinais data de aproximadamente 3000 anos antes de Cristo, com uso de extratos de plantas tidas como medicamentosas, apesar de pouco ou nada se saber sobre seus efeitos específicos em cada patologia, sendo algumas ervas utilizadas para controle e tratamento de doenças muito diferentes e cuja eficácia era, no mínimo controversa e seus efeitos tóxicos por vezes letais. Os eventos de cura ainda eram, em grande parte, relacionados a cerimônias religiosas e cultos com emprego de poderes milagrosos e obscuros capazes de promover reabilitação dos habitantes. Em 1600 antes de Cristo alguns apotecários já reuniam coleções de ervas com relatos mais consistentes e descritivos que, apesar de ainda leigos, representavam um avanço enorme na área, propiciando o início do comércio de plantas com fins medicamentosos.

Em meados do século XVII, com o desenvolvimento do conhecimento sobre química e biologia, exemplificado, dentre vários trabalhos, pela publicação de Robert Boyle intitulada "Uma coleção de Remédios de Escolha" de 1692, a ciência da farmacologia teve grande impulso para se destacar de questões espirituais e milagrosas para se tornar a ciência moderna e baseada em evidências dos tempos atuais.

Até a primeira metade do século XIX, os conhecimentos do funcionamento fisiológico e patológico do organismo, ainda eram bastante precários e inadequados para a compreensão total dos mecanismos de ação dos fármacos. Apesar da prática clínica já empregar uma série de compostos e extratos com fins paliativos e curativos, as bases científicas ainda permaneciam distantes. Vários trabalhos seguiram esta época colaborando para construção da lógica terapêutica atual, dentre eles, merecem destaque a visão sobre patologia celular aprofundada por Virchow na segunda metade do século XIX e a descrição das bactérias como agentes causadores de doenças por Louis Pasteur em 1878 ("*Les Microbes organisés, leur role dans la Fermentation, La Putréfaction et la Contagion*"). Todos esses avanços, apesar de óbvios para a ciência atual, desbravaram grandes mistérios propiciando que o campo científico avançasse sobre o da doutrina e fé na prática terapêutica.

A prática de farmacologia estava baseada no estudo de componentes naturais derivados de plantas. Em 1805, Friedrich Sertürner purificou a morfina a partir do ópio e teve

início o campo de identificação de substâncias químicas capazes de ação farmacológica. A partir deste feito pioneiro, um grande número de substâncias teve sua estrutura química elucidada, permitindo o emprego de síntese química e alterações estruturais por laboratórios farmacêuticos para obtenção das mais variadas moléculas com fins diagnósticos e terapêuticos.

Nas últimas décadas, com a identificação de receptores como os responsáveis pela transdução de sinais desencadeados pelos fármacos e o advento da modelagem molecular, tornou-se possível predizer estruturas químicas de moléculas complexas que seriam capazes de se ligar a um ou mais receptores com graus variados de afinidade, atividades intrínsecas e efeitos biológicos.

O estudo da farmacologia tornou-se um vasto campo de pesquisa técnico-científica, criando uma grande rede de interações entre várias áreas de conhecimento, como a biotecnologia, a bioquímica, imunologia, farmacogenética e farmacogenômica, farmacoepidemiologia e farmacoeconomia. O mercado farmacêutico, um dos mais lucrativos do mundo, investe intensamente na busca de novas moléculas (ou alterações nas já existentes) passíveis de utilização na promoção, manutenção ou recuperação da saúde.

6.2. Princípios básicos de Farmacologia

Dado um breve histórico da evolução no estudo da farmacologia, teremos a seguir a descrição de uma série de conceitos essenciais à compreensão dos assuntos que serão abordados neste e nos demais capítulos.

Um dos princípios fundamentais da farmacologia é que uma molécula precisa exercer alterações químicas em um ou mais constituintes celulares no sentido de promover alguma alteração biológica. O enunciado clássico de Paul Ehrlich (1854 – 1915) "Corpora non agunt nisi fixata", que significa que uma substância (ou fármaco) não exercerá efeito biológico a menos que esteja ligada (ao receptor). Muito embora seja uma definição simplista, o enunciado de Paul Ehrlich teve grande repercussão já que dizia que todos os efeitos de alterações metabólicas, bioquímicas ou fisiopatológicas eram devido à ligação e alteração de moléculas afins, contrariando a ideia de que a ação de substâncias químicas dependia de "forças vitais mágicas". O conceito hoje amplamente aceito fora na época controverso já que haveria exigência de uma quantidade enorme de moléculas para exercer tal efeito nos seus respectivos receptores. De fato, algumas toxinas bacterianas são tão potentes e precisas em sua ação que uma única molécula assimilada por uma célula alvo é capaz de matá-la.

Para uma determinada molécula exercer efeito, ela deve ser capaz de interagir de forma satisfatória com seus alvos biológicos. Se tais interações dependessem do encontro ao acaso entre as partes envolvidas em tal processo de interação, a chance da ocorrência do efeito pretendido seria, no mínimo, muito reduzida. Desta forma, para exercer efeito farmacológico, é necessário que o fármaco se distribua de forma conveniente pelos compartimentos corporais e, principalmente, que haja uma concentração efetiva do fármaco no local de ação. Assim, uma série de eventos deve ocorrer desde a administração de um fármaco por determinada via até seu local de ação, que dependem de fatores diversos, dentre os quais as características físico-químicas do fármaco, aspectos fisiológicos e conceitos básicos de biologia celular e molecular. O estudo do processamento dos fármacos no organismo é alvo da farmacocinética, sendo a farmacodinâmica responsável pela compreensão dos efeitos gerados no organismo.

Discutiremos a seguir alguns aspectos farmacocinéticos:

6.3. Vias de administração de fármacos

Conforme mencionado, é necessário que haja distribuição do fármaco pelo organismo para que seja alcançado o efeito biológico por sua interação com o receptor ou molécula-alvo.

Um dos fatores que mais influencia a chegada do fármaco ao seu local de ação é a via pela qual este foi administrado. Em geral, a via mais comum e segura de administração de fármacos é a enteral, particularmente pela via oral. Todavia, outras vias tornam-se necessárias em algumas situações nas quais o fármaco, por exemplo, não é passível de administração oral (devido à irritação gastrintestinal, baixa absorção por esta via, indivíduo incapaz de deglutição ou inconsciente), ou necessita-se de ação mais rápida do fármaco ou ainda o objetivo é ação localizada na superfície corporal, dentre outros (Fig. 6.1).

Abaixo estão relacionadas as principais vias de administração de fármacos:

Oral	Sublingual	Retal	Tópica e Transdérmica	Inalatória
Subcutânea	Intramuscular	Intravenosa	Intratecal	Intra-articular

Fig. 6.1 Principais vias de administração de fármacos

Para analisar o grau (ou extensão) de absorção de determinado fármaco, usa-se o parâmetro farmacocinético de biodisponibilidade, que se relaciona diretamente à proporção do fármaco que atinge a circulação sistêmica na forma intacta após administração de uma única dose da substância, independente da via de administração escolhida. Este é um dos parâmetros farmacocinéticos considerados para ajuste de doses administradas visando alcançar concentração terapêutica correta do fármaco (i.e., posologia), ou mesmo fazer ajustes quando é necessário substituir a via de administração de um determinado medicamento. A análise da biodisponibilidade é ainda essencial para comparação entre formulações farmacêuticas de medicamentos e classificação daqueles que apresentem os mesmos perfis de biodisponibilidade com os medicamentos de referência guardando, portanto, intercambialidade com estes (medicamentos genéricos).

O processo de absorção de fármacos administrados pela via oral depende do transporte passivo através da membrana da mucosa gastrointestinal. Alguns fatores relacionados a natureza do fármaco influenciam este tipo de absorção, como o grau de ionização e sua lipossolubilidade. Outros fatores podem influenciar a velocidade ou extensão da absorção gastrintestinal tais como a motilidade gastrintestinal, fluxo sanguíneo esplâncnico, interações com outros fármacos e alimentos, o tamanho da partícula e apresentação farmacêutica (drágeas, cápsulas, comprimidos revestidos, comprimidos de liberação retardada, de liberação prolongada, dentre outros). Em geral, a redução da motilidade gastrintestinal limita a velocidade de absorção de fármacos e, consequentemente, sua concentração plasmática se eleva de forma mais lenta. A alimentação também pode exercer efeito significativo na absorção de fármacos devido à redução da motilidade gastrintestinal, além de promover alterações de pH (influenciando o balanço de ionização de moléculas). Também podem haver interações químicas entre fármacos e constituintes dos alimentos, inativando o fármaco ou impedindo sua absorção.

Em geral fármacos são ácidos e bases fracas e seus graus de ionização serão determinados diretamente pelo pKa e pelo pH do meio. Sabe-se que a forma não-ionizada de fármaco atravessa melhor barreiras biológicas seguindo seu gradiente de concentração. De forma sucinta, moléculas com caráter ácido fraco serão menos absorvidas quanto maior for o pH pois maior será sua fração ionizada. Assim, em teoria, ácidos fracos deveriam ser mais bem absorvidos no estômago (pH ácido) ao passo que bases fracas deveriam ser mais absorvidas no intestino delgado. Todavia, o epitélio estomacal apresenta reduzida superfície de absorção e é recoberto por espessa camada de muco que dificulta o transporte da molécula através da parede estomacal. Por outro lado, a porção duodenal

apresenta grande extensão, sendo um importante local para a absorção de fármacos por via oral. Assim, o grau de ionização da molécula não é o único fator capaz de determinar a extensão de sua absorção, mas sim o conjunto de fatores acima descritos.

Outra característica importante da administração de fármacos pela via oral é o efeito de eliminação pré-sistêmica (efeito de primeira passagem). Após o processo de absorção através do epitélio intestinal, o fármaco é conduzido pelo sistema porta ao fígado antes de atingir circulação sistêmica. Embora uma fração do metabolismo possa ocorrer na própria parede do intestino, o fígado é o principal local responsável pelas reações de metabolização. Para alguns fármacos o metabolismo de primeira passagem é muito significativo no que tange a biodisponibilidade do fármaco e pode decretar a necessidade de ajuste da dose administrada visando alcançar concentrações necessárias à sua ação (em torno de 65% da morfina sofre metabolização hepática antes de atingir a circulação sistêmica quando administrada pela via oral).

A absorção pela via sublingual é de extrema importância para administração de determinados fármacos em situações especiais. Apesar de sua reduzida superfície de absorção, a mucosa oral é altamente vascularizada, e a drenagem venosa do plexo sublingual é deslocada diretamente até veia cava superior, evitando desta forma efeito de primeira passagem hepático (que serão discutidos posteriormente) e atingindo a circulação sistêmica de forma excepcionalmente rápida. Os exemplos mais clássicos de sua utilização como via de escolha estão relacionados a urgências hipertensivas e crises de angina, nas quais fármacos vasodilatadores agem de forma mais rápida no controle do aumento agudo de pressão e alívio dos sintomas. Esta via também pode ser usada para fármacos que sofrem extenso efeito de primeira passagem hepático.

A via retal é escolhida quando o objetivo é ação local do fármaco (anti-inflamatórios na colite ulcerativa) ou quando a administração oral não é possível (paciente desacordado ou no pós-cirúrgico). Apresenta efeito de primeira passagem menor que na via oral, já que parte do fármaco é drenada pelo plexo hemorroidal à veia cava, evitando o efeito de pré-eliminação sistêmica hepática.

A via tópica é amplamente utilizada, por exemplo, para controle de alterações locais na pele. Todavia, dependendo das características químicas da molécula (lipossolubilidade) e da condição da superfície epitelial (íntegra, queimada, lesionada por cortes) pode haver algum grau de absorção sistêmica. Este evento deve ter especial atenção, sobretudo para fármacos que apresentam efeitos adversos significativos, sendo evitada a aplicação destes em mucosas e pele não-íntegras.

Entretanto, em alguns casos, a absorção do fármaco através da pele (via transdérmica) é desejável e utilizada clinicamente pela capacidade de gerar resposta sistêmica, tais como contraceptivos hormonais, analgésicos e dispositivos de controle de dependência à nicotina.

A administração de fármacos pela via parenteral evita o metabolismo de primeira passagem hepático, resultando em biodisponibilidade maior ou total, como no caso da via intravenosa (apesar de ainda haver a possibilidade do efeito de primeira passagem pulmonar). As principais vias de administração parenterais são a intravenosa, intramuscular e subcutânea. Outras vias menos comuns que utilizam medicamentos injetáveis são a intra-arterial (utilizado em alguns casos de tumores, especialmente hepáticos, sendo a única forma de administração que evita primeira passagem pulmonar), intra-articular e intratecal.

A via intravenosa representa uma excelente via de administração, especialmente quando a rápida ação do fármaco é requerida. Esta via isenta o fármaco de metabolismo de primeira passagem, apresentando biodisponibilidade total já que o fármaco é diretamente administrado na circulação sistêmica. Apesar disso, após sua administração, ao contrário de outras vias (especialmente via oral) não há como efetuar remoção do fármaco (como ocorre, por exemplo, na lavagem gástrica após administração pela via oral) e ainda é necessário manter acesso venoso de forma correta no paciente, uma vez que os acessos são grandes fontes de infecção, sobretudo em ambientes hospitalares. Esta via ainda apresenta a restrição da necessidade do medicamento administrado ser apirogênico. Esta via não admite ainda a possibilidade de administração de suspensões oleosas e fármacos e excipientes que precipitem constituintes sanguíneos ou promovam lise de eritrócitos.

A via inalatória pode ser utilizada para fármacos que não causem irritação da mucosa ou das vias aéreas. Gases e fármacos voláteis (exemplo: anestésicos inalatórios) administrados desta forma são absorvidos pelo epitélio pulmonar, sendo a condução até a circulação sistêmica rápida devido à elevada superfície pulmonar. Esta via não sofre metabolismo de primeira passagem hepática. A via inalatória pode ainda ser usada visando efeito pulmonar, como broncodilatadores e glicocorticoides. Esta via, pelas características acima descritas quanto ao grau e rapidez de absorção, pode também pode ser utilizada para administração de algumas drogas de abuso.

A administração nasal de fármacos é de grande interesse clínico para alguns tipos específicos de fármacos. Alguns destes, não são passíveis de administração por via oral

por serem rapidamente destruídos no trato gastrintestinal. A administração nasal pode visar somente ação local (exemplo: descongestionantes nasais) ou exercer efeito sistêmico devido à extensão da absorção pela mucosa, como ocorre para os hormônios antidiurético (ADH), a ocitocina e a calcitonina.

A via ocular é utilizada para tratamento de distúrbios locais (como processos inflamatórios oculares), apesar de haver a possibilidade de absorção sistêmica (exemplo: broncoespasmo em pacientes suscetíveis induzido pelo fármaco timolol oftálmico utilizado no tratamento do glaucoma).

Toda a descrição acima mostra que a escolha correta da via de administração do fármaco é, muitas vezes, o fator determinante no sucesso da conduta terapêutica e minimização de possíveis efeitos adversos ao paciente.

6.4. Tipos de Receptores

A ocorrência de resposta biológica em decorrência da administração de um fármaco depende de alterações químicas promovidas pela complexa interação da molécula com seu receptor. Os receptores genericamente podem ser ligados a canais iônicos (ionotrópicos), acoplados a proteína G (metabotrópicos), acoplados à atividade enzimática ou intracelulares. Estes receptores são acoplados a sistemas de transdução de sinais intracelulares citoplasmáticos e/ou nucleares (acoplados à proteína G, tirosino-quinases, fosfatases, vias de ativação de fatores nucleares, dentre outros), e podem também alterar o padrão de fluxo iônico determinando processos de exocitose, ativação neuronal, movimentação de estruturas intracelulares, dentre outros. O estudo de receptores neste contexto é extremamente vasto e novas vias de sinalização são descritas com frequência, fazendo com que esta breve descrição tenha tão somente o caráter de reforçar a importância dessas moléculas como atores principais na intermediação entre o fármaco e sua ação biológica.

6.5. Introdução à Farmacocinética

Diversos fatores influenciam o sucesso de uma conduta terapêutica além do conceito dose-efeito estabelecido pela farmacodinâmica. Tão logo um fármaco entra em contato com o organismo, uma sequência de eventos ocorre de forma controlada, envolvendo mecanismos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação.

Conforme já discutido anteriormente, a absorção de fármacos depende de uma série de fatores físico-químicos, destacando-se entre eles, o tamanho da partícula administrada, grau de lipossolubilidade, via de administração escolhida, grau de ionização da molécula, superfície de absorção e passagem através de membranas biológicas, além de outros fatores como vascularização tecidual, motilidade gastrintestinal e efeito de primeira passagem.

Os mecanismos de absorção e distribuição de fármacos pelo corpo dependem, na sua grande maioria, da capacidade destes de atravessar membranas biológicas. Assim, um dos fatores com grande importância é o perfil de lipossolubilidade, que define, juntamente com grau de ionização, tamanho e formato (polimorfismo) da molécula, a capacidade de interagir com bicamadas lipídicas a atravessá-las por transporte passivo. Moléculas muito hidrofílicas dependem do transporte facilitado para alcançarem seus sítios de ação.

Além das características de lipofilicidade, o grau de ionização é fator determinante para a passagem de fármacos através de membranas biológicas. Enquanto moléculas não-ionizadas apresentam maior caráter de solubilização em lipídeos e, portanto, maior capacidade de transpor membranas biológicas, moléculas ionizadas não são aptas ao transporte passivo através de membranas celulares. O grau de ionização dos fármacos depende do pH do meio e da constante de ionização, característica de cada molécula. Segundo a equação de Henderson-Hasselbalch, que determina o equilíbrio de ionização de uma molécula em dado pH, temos para um ácido fraco:

pKa - pH = log ([não-ionizada]/[ionizada]) (equação 1)

Reorganizando a equação 1 para um fármaco cuja estrutura química seja de um ácido fraco (pKa = 4,4) obtemos a seguinte relação (equação 2):

$$([\text{ionizada}]/[\text{não-ionizada}]) = 10^{(pH - pKa)} \qquad \text{(equação 2)}$$

Em pH 1,4 (suco gástrico):

Temos 1000 moléculas não-ionizadas para cada molécula ionizada

Em pH 7,4 (plasma):

Temos 1000 moléculas ionizadas para cada molécula não-ionizada

Assim, fica claro que a extensão de absorção de um determinado fármaco é modificada, entre outros fatores, pela variação de pH do meio (Tabela 1).

Relação entre as formas ionizadas / não-ionizadas (fármacos com características ácido-base diferentes)			
Fármaco	Suco Gástrico pH = 3	Plasma pH = 7,4	Urina pH = 8
Ácido Acetilsalicílico Ácido fraco pKa = 3,5	≈ 0,3 : 1	≈ 10.000 : 1	≈ 31.600 : 1
Meperidina Base fraca pKa = 8,6	≈ 2.500.000 : 1	≈ 100 : 1	≈ 400 : 1

Tabela 6.2 Relação entre formas ionizada/não-ionizada de fármacos com características ácido-base diferentes.

6.6. Distribuição de fármacos

Após atingir circulação sistêmica, o fármaco começa sua etapa de distribuição pelo fluido intracelular e espaço intersticial. Esta distribuição depende de uma série de fatores, como débito cardíaco, fluxo sanguíneo local, permeabilidade capilar e volume tecidual. A distribuição depende também de características químicas do fármaco, como sua permeabilidade através das membranas, intensidade das interações do fármaco em constituintes destes compartimentos, da partição determinada pelas diferenças de pH, dentre outros.

Muitos fármacos circulam nos vasos ligados às proteínas plasmáticas. Entre elas estão a albumina (principal carreador, especialmente para moléculas de caráter ácido) e a glicoproteína α_1 ácida (que se liga principalmente a moléculas de caráter alcalino). Estas ligações ocorrem de maneira não-linear, saturável e não-específica. O efeito das ligações a proteínas plasmáticas é a geração de um "reservatório de

fármaco" que estabelece um equilíbrio dinâmico entre fração ligada e fração livre no plasma, promovendo redução da concentração de fármaco livre para exercer ação biológica e, eventualmente, aumento do tempo de meia-vida do fármaco (uma vez que ocorre redução da taxa de metabolização deste). Desta forma, vários fármacos diferentes podem competir pelos sítios de ligação da albumina, alterando padrões normais de ligação quando os fármacos são administrados isoladamente, necessitando inclusive de ajuste de doses de fármaco quando administrado com outro que também se liga a proteínas plasmáticas.

Alguns fármacos apresentam características de acúmulo em determinados tecidos, como ocorre, por exemplo, com a quinacrina (antimalárico) no fígado e gentamicina (antibiótico) nos rins e sistema vestibular (inclusive levando à toxicidade local). Um tecido com grande importância no acúmulo diferenciado de fármacos é o tecido adiposo. O tiopental (anestésico), por exemplo, apresenta elevada partição pelo tecido adiposo, criando um depósito de fármaco, aumentando o tempo de ação. A afinidade de fármacos pelo tecido adiposo deve ser levada em conta na escolha da dose, sobretudo em pacientes idosos ou obesos em que o percentual de gordura corporal atinge níveis significativamente mais elevados, podendo desencadear ~~bio~~acúmulo do fármaco no organismo.

6.7. Metabolização de fármacos

A biotransformação de fármacos é, em geral, o ponto limitante que determina o término da ação do fármaco no organismo, já que altera a estrutura química da molécula em metabolitos inativos. De fato, algumas moléculas, mesmo após a etapa de metabolização ainda exercem efeitos farmacológicos e/ou tóxicos. Por outro lado, alguns fármacos precisam passar por metabolização para se tornarem ativos e exercerem efeito, já que a substância com ação terapêutica é exatamente o produto do metabolismo enzimático sobre a molécula administrada (estas substâncias são classicamente denominadas pro-fármacos).

As reações de metabolização ocorrem principalmente no fígado, apesar de vários outros tecidos e órgãos participarem de etapas de alterações químicas em uma vasta coleção de substâncias. As enzimas responsáveis pelas transformações químicas estão majoritariamente localizadas nas membranas do retículo endoplasmático liso e envolvem, de fato, uma superfamília de enzimas denominadas coletivamente citocromo P450

(devido ao seu espectro de absorção em 450 nm) que conjuntamente e com níveis diferenciados de seletividade e especificidade atuam sobre os mais diferentes fármacos.

Conforme discutido anteriormente, uma das características que confere acesso dos fármacos até seus locais de ação é a lipofilicidade, característica importante para o transporte através de membranas biológicas. Entretanto, a principal via de eliminação de substâncias do organismo é a via renal através da urina. Assim, para muitos fármacos há a necessidade de biotransformá-los em substâncias de maior caráter hidrofílico.

Essas reações são em geral divididas em reações de fase I e de fase II. Esta divisão é por vezes, muito mais didática que fisiológica já que várias moléculas passam por somente uma das etapas, ou ainda pela fase II antes da fase I.

Em linhas gerais, as reações de fase I determinam o fim da ação farmacológica das substâncias (com exceções, já citadas). São vários os tipos de reações químicas que podem ocorrer, dentre elas: oxidação, hidroxilação, dealquilação, deaminação e hidrólise. Em geral, esta fase torna as moléculas mais reativas quimicamente (em alguns casos, mais tóxicas também), além de mais polares. Esta etapa de biotranformação é passível de sofrer indução ou inibição em função de interações medicamentosas que alterem a função e/ou expressão enzimática, com redução ou aumento, respectivamente, do tempo de meia-vida do fármaco que está sendo metabolizado.

As reações de fase II envolvem conjugação (processo passível de saturação) com a molécula produzida pelas reações de fase I com resíduos de ácido glicurônico, sulfato, glutationa, aminoácidos ou ainda acetato. Os conjugados produzidos são altamente polares e capacitados para os mecanismos de excreção, sejam eles via urina ou nas fezes.

A Fig. 6.3 a seguir exemplifica a via de metabolização do ácido acetilsalicílico (AAS) que gera o principal metabólito eliminado pela urina (ácido saliúrico) através de reação de conjugação com glicina:

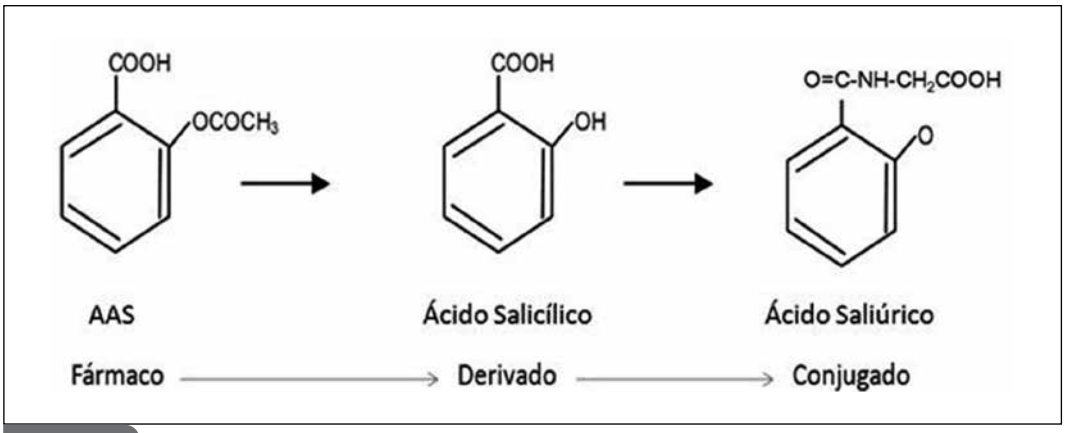


Fig. 6.3 Metabolização do ácido acetilsalicílico.

(Fonte: Informações Técnicas - Bula medicamento Aspirina® - Bayer HealthCare)

6.8. Eliminação de Fármacos

Após as etapas de distribuição e metabolização de fármacos, tem lugar o processo de eliminação. O principal órgão responsável por esta função é o rim, apesar da eliminação biliar ter papel importante para excreção de algumas moléculas, além de pulmões, eliminação pelo leite materno, dentre outros.

A excreção renal depende de três processos que agem coordenadamente e determinam a extensão da remoção de um fármaco da circulação sistêmica. São eles: filtração glomerular, secreção tubular ativa e reabsorção tubular passiva. A função renal, além de sofrer alterações de uma série de eventos, inclusive patológicos, apresenta grande variabilidade interindividual e mesmo intra-individual ao longo do curso da vida. Em neonatos, a função renal é bastante reduzida em relação ao peso corporal, fenômeno esse modificado já no final do primeiro mês de vida. Na idade adulta, a perda de função renal é de aproximadamente 1% ao ano. Assim idosos necessitam, muitas vezes de ajustes na dose de fármacos devido a sua função renal reduzida.

A filtração glomerular depende, basicamente, do fluxo sanguíneo renal, da taxa de filtração glomerular e da extensão da ligação a proteínas plasmáticas ao fármaco, já que somente moléculas não ligadas são passíveis de filtração glomerular. O fenômeno da reabsorção tubular é em sua grande parte devido a transporte passivo por difusão de moléculas não-ionizadas, além de uma parcela exercida por transporte ativo por carreadores localizados na superfície do túbulo renal.

O fato da reabsorção tubular ocorrer através de transporte passivo de moléculas não-ionizadas abre a possibilidade de intervenção farmacológica no sentido de minimizar reabsorção de alguns fármacos em condições especiais. A alcalinização da urina faz com que fármacos que são ácidos fracos (ex: fenobarbital) aumentem sua fração ionizada, reduzindo assim sua reabsorção e aumentando sua eliminação renal. Esta conduta é ainda utilizada no manejo de intoxicações medicamentosas (por exemplo, a alcalinização da urina com bicarbonato de sódio na superdosagem de metotrexato em protocolos de quimioterapia previne a precipitação renal do fármaco).

Outra via importante na excreção de fármacos envolve processos secretórios por transportadores presentes na membrana dos hepatócitos, que lançam seus produtos diretamente na bile. O conteúdo biliar é lançado no duodeno durante o processo digestivo. A superfície dos enterócitos possui transportadores que podem reabsorver parte dos fármacos lançados na bile, processo chamado de circulação entero-hepática, o que pode prolongar significativamente a presença do fármaco (ou toxina) no organismo (e neste caso seria um processo de distribuição do fármaco). Para fármacos que sofrem excreção biliar na forma conjugada é necessária ação de enzimas hidrolíticas da microbiota intestinal antes que ocorra o processo de reabsorção. No caso de fármacos que são lançados na bile, e não são reabsorvidos, eles sofrerão eliminação nas fezes.

6.9. Tipos de interações estabelecidas entre o fármaco e seu alvo

O evento da interação do fármaco com o receptor, independente da sua natureza química (exemplo: covalente, hidrofóbica ou eletrostática) não necessariamente desencadeia reposta biológica. O tipo de alteração biológica em um determinado sistema promovida pela ligação dos fármacos aos seus respectivos receptores permite inferir a estas moléculas classificações, como descrito abaixo, e que constituem a base da farmacodinâmica.

- **Agonista**: definido como determinada molécula que ao entrar em contato químico com o receptor promove alterações especificas de forma a induzir a sinalização celular relacionada àquele receptor. Alguns fatores relacionados à interação fármaco-receptor são de grande importância no tipo de grau de alteração promovido. O

conceito de afinidade, de forma simplificada, está relacionado à probabilidade da molécula em se ligar ao seu receptor. Contudo, alguns fármacos, apesar de apresentarem alta afinidade por determinado receptor, não mostram igual capacidade de ativação e resposta biológica, sendo incapazes de induzir resposta máxima mesmo quando todos os receptores estão ocupados pelos ligantes, logo não são agonistas plenos ou totais. Experimentalmente, podemos realizar ensaios *in vitro* onde a cada concentração do fármaco tem-se uma amplitude de resposta do agonista, e após análise dos dados, construir um gráfico efeito (eixo Y) em função do logaritmo da concentração do fármaco (eixo X). A análise quantitativa deste gráfico concentração-resposta permite calcular dois parâmetros: a concentração do fármaco que produz 50% do efeito máximo (CE_{50}) e o efeito máximo (E_{max}). O conceito de potência engloba o parâmetro CE_{50}. Quanto menor o valor de CE_{50} maior é a potência (e indiretamente a afinidade) do fármaco, ou seja, a concentração necessária para promover 50% do efeito é menor. Por outro lado, a parâmetro E_{max} é importante para definir e comparar experimentalmente a eficácia de agonistas. Um agonista pleno é aquele capaz de induzir resposta máxima no sistema biológico em questão.

Além do conceito de agonista pleno, há outras classificações, como agonista parcial e agonista inverso. Um agonista parcial desencadeia resposta biológica qualitativamente similar àquela dada pelo agonista pleno, todavia com menor eficácia. Assim, mesmo em elevadas concentrações, o efeito produzido será apenas submáximo. Já a denominação de agonista inverso está intimamente relacionada à descoberta que uma fração dos receptores pode existir em estado constitutivamente ativado, *i.e.*, o receptor é ativado na ausência do agonista, como por exemplo, em casos de mutações genéticas, ou mesmo em alguns sistemas fisiológicos. Nestes casos, os agonistas inversos promovem alterações nos níveis de ativação desses receptores para padrões inferiores, ou seja, minimizam o padrão de resposta fisiológica basal.

- **Antagonista**: definido como molécula sem eficácia, mas capaz de minimizar ou mesmo abolir o efeito promovido por outro fármaco. Em geral, o antagonismo é estudado de forma bastante restrita ao antagonismo farmacológico por bloqueio de receptor ou uma via de sinalização, impedindo sua ativação pelo agonista endógeno ou exógeno. Na verdade há uma série de mecanismos de antagonismos possíveis entre fármacos ou drogas. Entre eles temos:

- **Químico**: uso de quelantes para ligação a metais pesados reduzindo sua toxicidade, anticorpos neutralizantes para citocinas; cátions divalentes que quelam o antibiótico tetraciclina;

- **Farmacocinético**: fármacos que minimizam a absorção ou que aceleram a eliminação de outra substância (ex: fenobarbital acelera metabolização hepática da varfarina);

Por bloqueio de receptor (farmacodinâmico): forma mais classicamente estudada. Denota a ocupação do sitio de ligação do fármaco agonista ao seu receptor por outra molécula sem eficácia intrinseca, ou seja, um antagonista. O antagonismo pode ser por competição reversível (que pode ser limitado ou abolido frente ao aumento de concentração do agonista), ou irreversível (na qual a velocidade de dissociação do antagonista é muito lenta). O antagonista competitivo reversível desloca a curva concentração-resposta do agonista para a direita reduzindo sua potência (aumenta o valor de CE_{50}). O antagonista competitivo irreversível em geral reduz a eficácia (redução do E_{max}).

Antagonismo não-competitivo: o antagonista impede uma via de sinalização relevante para o efeito do agonista, mas não há bloqueio do receptor em si (exemplo: a vasoconstricção depende do aumento do cálcio intracelular. A nifedipina, antagonista dos canais de cálcio do tipo L, bloqueia a entrada de cálcio na célula muscular lisa reduzindo o efeito vasoconstrictor da noradrenalina e de outros vasoconstrictores);

Fisiológico: fármacos que exercem efeitos biológicos opostos, apesar de não interagirem diretamente um com o outro e não compartilharem o mesmo receptor (exemplo: histamina estimula secreção ácida estomacal pela ativação de receptores histaminérgicos H_2 na célula parietal enquanto o omeprazol bloqueia este efeito por inibir a bomba próton-potássio ATPase responsável pela secreção ácida.

Todos esses tipos de interação fármaco-alvo demonstram o grau de complexidade que vai desde a chegada da molécula ao seu sitio de ação até o efetivo desencadeamento da resposta biológica final.

Por fim, esta breve discussão a respeito de parâmetros de ordem farmacocinética e farmacodinâmica que regem a ação de fármacos no organismo tem por objetivo mostrar quão complexa é a rede de interações que são estabelecidas desde a administração de um determinado fármaco até sua eliminação do corpo e da necessidade de profissionais extremamente capacitados para lidar com situações clínicas e experimentais visando à utilização da farmacologia na mais nobre das causas, prover e restaurar saúde e bem-estar e salvar vidas.

7. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

BIANCA T. CIAMBARELLA

Mediadores inflamatórios são substâncias químicas produzidas pelo organismo em resposta a estímulos exógenos (por exemplo: traumas físicos, produtos bacterianos, virais, etc) ou endógenos (por exemplo: respostas auto-imunes). Os mediadores inflamatórios são originados de proteínas plasmáticas ou de células e podem atuar na microcirculação (causando vaso-dilatação; aumento de permeabilidade capilar, extravasamento de proteínas) e em células, atraindo leucócitos para o local da lesão, ativando células, induzindo a produção de outros mediadores. Didaticamente podem ser divididos em mediadores de origem celular e mediadores de origem plasmática.

7.1. Mediadores de origem celular

7.1.1. Aminas vaso-ativas

7.1.1.1. Histamina

Os principais estudos sobre a ação da histamina se deram por Dale e Laidlaw quando eles observaram que após a estimulação do músculo liso com histamina ocorria uma intensa vasodilatação. A histamina é uma molécula hidrofílica formada por um anel imidazólico e um grupamento amina ligada a uma cadeia etílica.

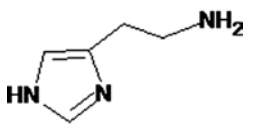


Fig. 7.1 Estrutura química da histamina.

A histamina é sintetizada a partir da histidina, que é um aminoácido, pela ação da α-histidina descarboxilase (Fig. 7.1). Após a sua síntese ela é armazenada em grânulos de mastócitos e basófilos. Está amplamente distribuída no organismo, atuando como neurotransmissor controlando funções neuroendócrinas, regulação cardiovascular, termoregulação e vigília; é secretada pelas células endocromafins estimulando a secreção gástrica nas células parietais e atua como mediador inflamatório a partir do momento da ligação do antígeno à IgE que está ligada nas membranas celulares de basófilos e mastócitos. Esta ligação leva à desgranulação dessas células, com liberação da histamina (Fig. 7.2).

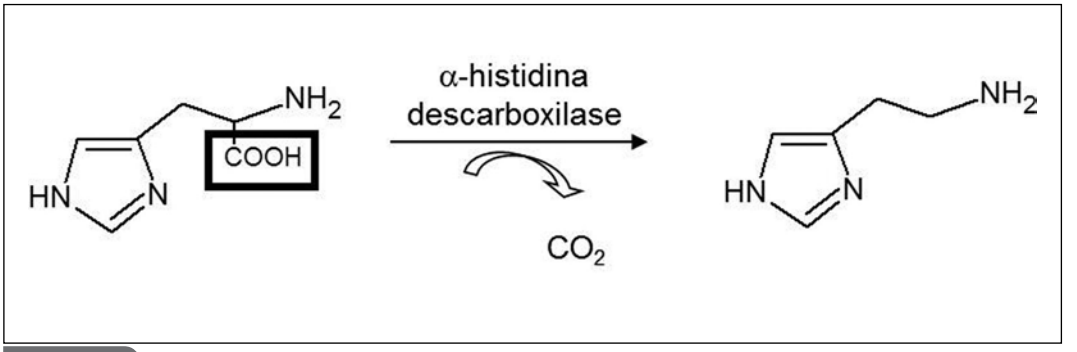


Fig. 7.2 Ação da α-histidina descarboxilase sobre a histidina. Ela retira o grupamento carboxila da histidina dando histamina e gás carbônico (CO_2).

A ação da histamina é observada após a ligação aos seus receptores metabotrópicos que estão acoplados à proteína G, denominados H_1, H_2, H_3 e H_4. O H_4 é encontrado em células hematopoiéticas, neutrófilos e eosinófilos ativos e no trato gastrintestinal. A ligação da histamina ao receptor H_4 em eosinófilos induz a mudança de forma, quimiotaxia com aumento na expressão de moléculas de adesão como CD11b/CD18 e ICAM-1. Já o H_3 está distribuído no sistema nervoso central, principalmente no glânglio basal, hipocampo e no córtex, sua ativação é responsável pela indução do sono. Ambos são ligados a proteína $G_{i/o}$ e inibem a atividade da adenilato ciclase. Enquanto H_2 está acoplado a proteína G_s, distribuído em células gástricas parietais, células cardíacas, mastócitos e no sistema nervoso central. É responsável pelo aumento da atividade da adenilato ciclase e consequentemente nos níveis de cAMP. Dessa forma, na musculatura dos vasos leva a vasodilatação e aumento na se-

creção de ácido gástrico. Já H_1 que além de estar presente no sistema nervoso central, também está presente nas células do músculo liso e células endoteliais. Este leva a produção de IP_3 e DAG pela ativação da fosfolipase C, aumentando o influxo de Ca^{+2}, fosfolipase A_2 e vias de sinalização como MAPKs, ERKs, JNKs e p38MAPK. Sua atividade é percebida pela broncoconstrição das vias aéreas, porém ele possui características vasodilatadoras devido a liberação de óxido nítrico endotelial.

Como observamos, o papel da histamina irá depender do local e do tipo de receptor a ser ativado. Em pacientes asmáticos a ligação da histamina ao receptor H_1 pode ser muito perigosa, pois leva a uma broncoconstrição deixando o paciente muitas vezes dependente de uma terapia com medicamentos como broncodilatadores e glicocorticóides. Já no endotélio vascular, o aumento da permeabilidade vascular confere ao local inflamado características dos sinais cardinais da inflamação: edema, calor e rubor. O processo de desgranulação de mastócito/basófilo decorrente da ligação do antígeno ao anticorpo IgE está representado na Fig. 7.3.

7.1.1.2. Serotonina

Isolada em 1948 por Maurice M. Rapport, Arda Green e Irvine Page, a serotonina também é chamada de 5-Hidroxitriptamina (5-HT) e é formada através da transformação do aminoácido triptofano em 5-hidroxitriptofano pela triptofano hidroxilase e desse em 5-HT pela L-aromático aminoácido descarboxilase (Fig. 7.4).

É formada pelo sistema nervoso central e pelas células enterocromafins, mas também pode ser encontrada no sangue armazenada em grânulos nas plaquetas. Possui 14 tipos de receptores classificados em: $5\text{-}HT_1$ ($5\text{-}HT_{1A}$, $5\text{-}HT_{1B}$, $5\text{-}HT_{1D}$, $5\text{-}HT_{1E}$ e $5\text{-}HT_{1F}$), $5\text{-}HT_2$ ($5\text{-}HT_{2A}$, $5\text{-}HT_{2B}$ e $5\text{-}HT_{2C}$), $5\text{-}HT_3$, $5\text{-}HT_4$, $5\text{-}HT_{5A}$, $5\text{-}HT_{5B}$, $5\text{-}HT_6$ e $5\text{-}HT_7$. Sendo estes receptores metabotrópicos acoplados à proteína G com exceção de $5\text{-}HT_3$ que é inotrópico. O receptor $5\text{-}HT_1$ inibe a adenilato ciclase e pelo menos a $5\text{-}HT_{1A}$ também ativa canais de K^+ e inibe canais de Ca^+2. ele é encontrado no núcleo da Rafe. Ela também está amplamente distribuída pelo o organismo, principalmente nos receptores somatodendríticos no corpo de neurônios

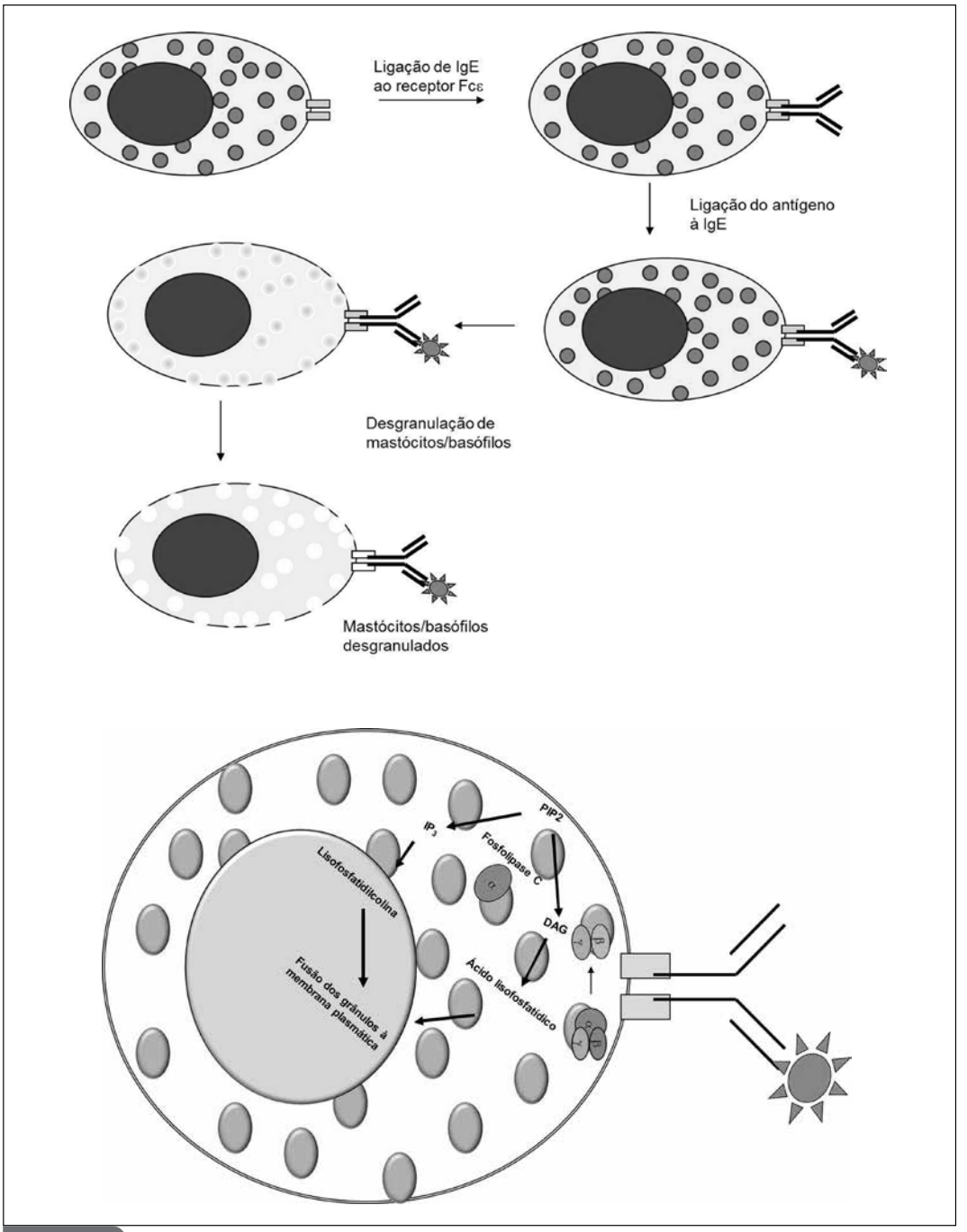


Fig. 7.3 A ligação do antígeno a IgE, leva à ativação da proteína G, que ativa fosfolipase C, esta transforma PI-4,5-b fosfato (PIP2) da membrana em diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP3) que são responsáveis pelo aumento de ácido lisofosfatídico e lisofosfatidil colina, respectivamente, os quais levam à fusão dos grânulos com a membrana dos mastócitos e basófilos.

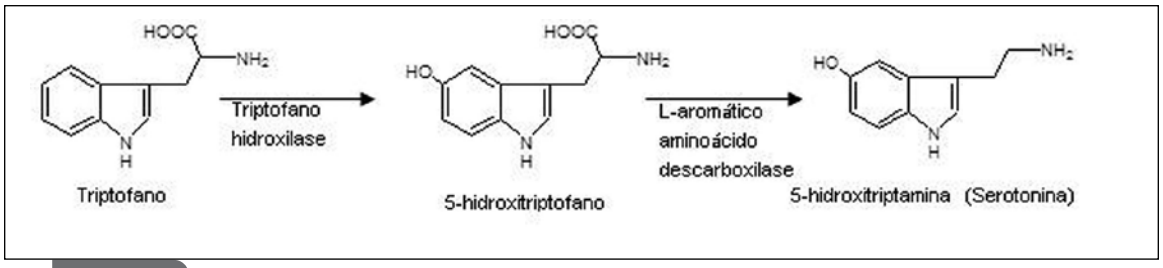


Fig. 7.4 Síntese da serotonina no organismo.

serotoninérgicos. Os 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} estão localizados na substância nigra e são responsáveis pela concentração de dopamina intra e extracelular. Os receptores 5-HT_2 ativam fosfolipase C levando à síntese de IP_3 e DAG com consequente aumento de Ca^{+2} intracelular e ativação de proteínas quinases. Estão localizados nas plaquetas, músculo liso e córtex cerebral sendo responsável pela agregação plaquetária, contração e excitação neuronal. O receptor 5-HT3 localiza-se nos nervos periféricos e área póstrema e participa tanto no gastrintestinal quanto no Sistema Nervoso Central (SNC) podendo levar ao aumento do peristaltismo, vômito, centro da fome, agressividade, humor, dentre outros. Nas terminações nervosas, estimula as terminações nociceptivas causando dor. O receptor 5-HT4 está distribuído em todo o corpo e é responsável por induzir a produção de secreções no trato gastrintestinal, e ativar o reflexo peristáltico. Seus efeitos são derivados da ativação intracelular de adenilato ciclase e aumentando AMPc. Sua degradação é realizada pela monoaminooxidase (MAO) que a transforma em ácido 5-hidroxiindolacétaldeído, este sofre ação de NAD ou NADH gerando 5-hidroxiindolacético e 5-hidroxitriptol, respectivamente. Entretanto, em uma via menos comum a 5-HT pode sofrer ação da 5-HT N-acetilase, transformando-se em N-acetil-5-HT e esta é transformada em melatonina pela hidroxindol O-metiltransferase. Seus metabólitos são eliminados através da urina.

7.1.2. Metabólitos do ácido aracdônico

7.1.2.1. Eicosanóides

Os eicosanóides são formados a partir de um ácido carboxílico poliinsaturado essencial chamado ácido aracdônico (Fig. 7.5). Sua estrutura inclui 20 carbonos e 4 ligações duplas cis iniciando em ômega-6 nas posições 5, 8, 11 e 14, recebendo assim a denominação química de ácido eicosatetraenóico ou ácido 20;4 (5, 8, 11, 14). No organismo, a reserva de ácido araquidônico é mantida nas membranas celulares estocadas na forma de fosfolipídeos. Sendo assim, o ácido araquidônico é liberado dos seus fosfolipídeos de origem através de reação direta catalisada pela fosfolipase A_2 ou por reações seqüenciais catalisadas pela fosfolipase C e a seguir pela diacilglicerol-lipase. A partir daí ele pode sofrer ação da ciclooxigenase, que levará à formação da prostaglandina G_2 (PGG_2), esta sofrerá ação de uma peroxidase e será convertida em PGH_2 que por sua vez poderá ser convertida em PGE_2, PGF_2, PGD_2. A PGH_2 também poderá sofrer ação da prostaciclina sintase levando à formação de PGI_2 e $PGF_{1\alpha}$. Por outro lado, a PGH_2 poderá sofrer ação da tromboxano sintase levando à formação de tromboxano A_2 (TXA_2). O ácido aracdônico pode ser metabolizado pela 5-lipoxigenase associada à FLAP que levará à síntese de 5-HEPET. Esta por sua vez poderá formar o ácido hidroxieicosatetraeinóico (5-HETE) ou os leucotrienos, começando pela formação de LTA_4 que pode sofrer ação de duas enzimas: LTA_4 hidrolase que o transformará em LTB_4 ou LTC_4 sintase que o transformará em LTC_4; este perderá uma molécula de glutamina, formando o LTD_4 que por sua vez perderá uma molécula de glutamina e formará LTE_4. LTC_4, LTD_4 e LTE_4 são chamados de Cisleucotrienos, devido aos resíduos de cisteína.

As prostaglandinas atuam em diferentes sistemas, dentre eles o sistema cardiovascular, onde a PGE_2, PGD_2 e PGI_2 causam vasodilatação, entretanto, o $PGF_{2\alpha}$, assim como o TXA_2, são vasoconstritores. Este também é um potente agregante plaquetário; na musculatura lisa, dependendo do órgão, um mesmo eicosanóide pode levar a diferentes processos. Por exemplo, nos brônquios a PGE_2 atua como broncocons-

tritor enquanto no músculo uterino não-grávido é relaxado pela mesma. No processo inflamatório, as PGs são responsáveis pela diminuição do limiar nociceptivo.

Os leucotrienos são sintetizados e secretados por polimorfonucleares e possuem ação de vaso e broncoconstritores e são responsáveis pelo aumento da secreção de muco e aumento da permeabilidade vascular.

As lipoxinas (LX), por sua vez, foram descritas por Serham e colaboradores em 1984, ao incubarem o derivado do ácido aracdônico, 15-HPETE, com leucócitos humanos. Essas moléculas são sintetizadas a partir da interação entre células. No caso da interação dos leucócitos com as plaquetas, as LXs são formadas através da ação da 12-lipoxigenase sobre o LTA_4. As LXs possuem propriedades anti-inflamatórias e próresolução através da inibição da quimiotaxia e ativação de polimorfonucleares, como neutrófilos e eosinófilos e aumentando a fagocitose de polimorfonucleares apoptóticos pelos macrófagos no tecido inflamado.

7.1.3. Fator de Ativação de Plaquetária (PAF)

Em 1971, Henson observou a agregação plaquetária devido a um fator solúvel, que mais tarde, Jacques Benveniste, um imunologista francês e colaboradores, denominaram de Fator Ativador de Plaquetas. O PAF, também chamado de 1-O-alquil-2-acil-sn-glicero-3-fosfocolina é um derivado lipídico proveniente de reações enzimáticas mediada pela Liso-PAF acetiltransferase, cujo ponto de partida é o liso-PAF. Este é produzido pela remoção enzimática catalisada, pela fosfolipase A_2, de um glicerofosfolipídeo com substituições 2-acil (removida pela PLA_2) e 1-alquil, liberando, em geral ácido araquidônico. A sua metabolização é realizada através da transformação do PAF em Liso-PAF pela PAF acetilhidrolase e em 1-alquil-2-acil-glicerofosfocolina pela ação da acil transferase, como observado nas Fig. 7.6 e 7.7.

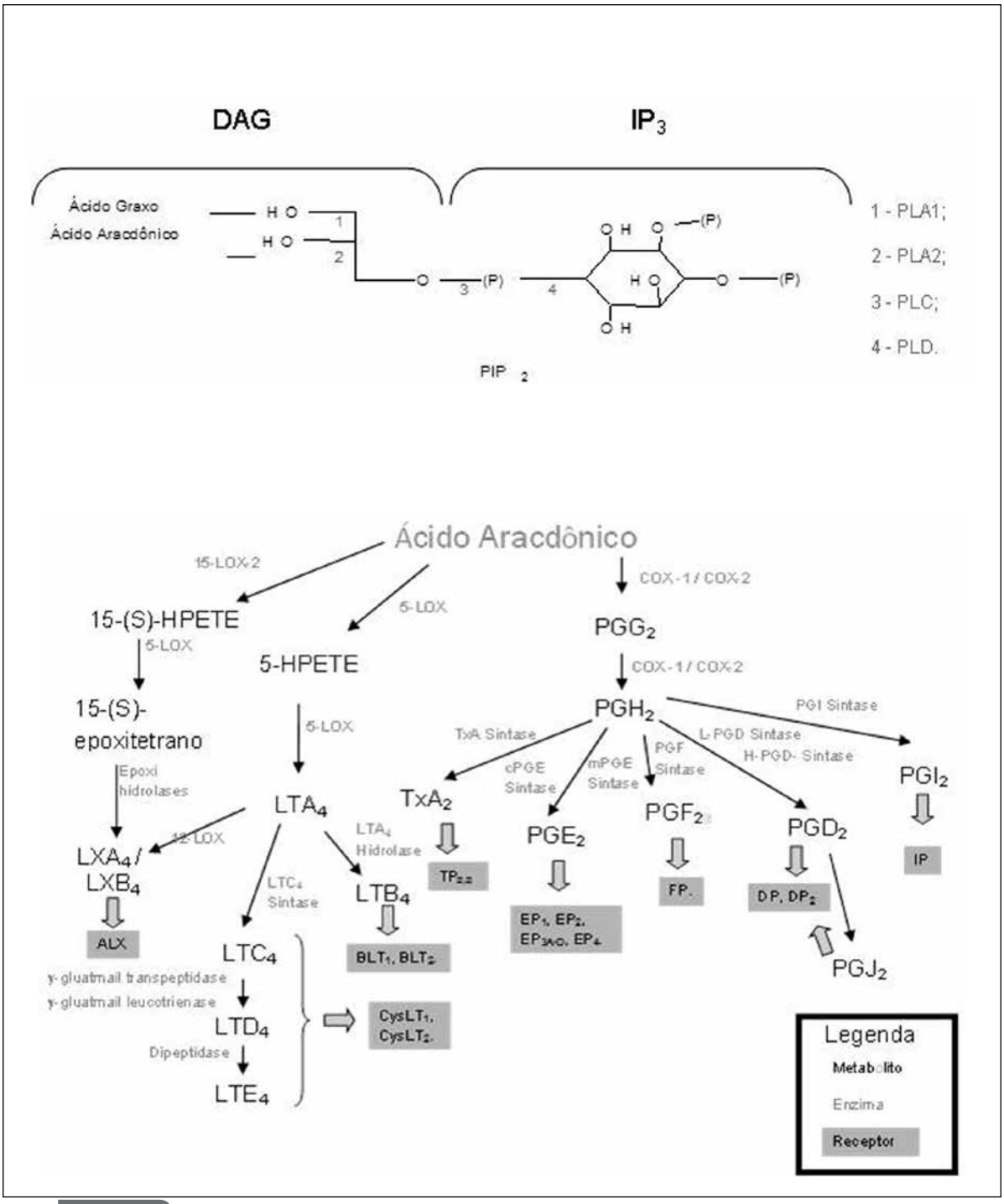


Fig. 7.5 Esquema das vias de síntese de prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos e lipoxinas. O ácido aracdônico pode sofrer ação de diversas enzimas e gerar diferentes estruturas que atuarão durante o processo inflamatório.

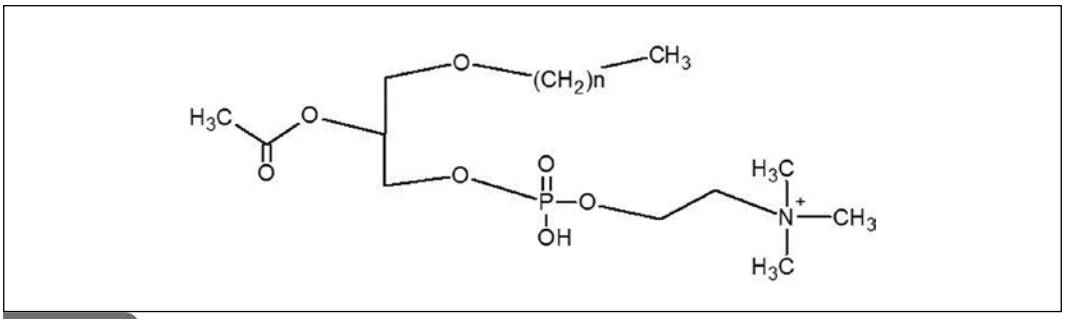


Fig. 7.6 Estrutura molecular do PAF.

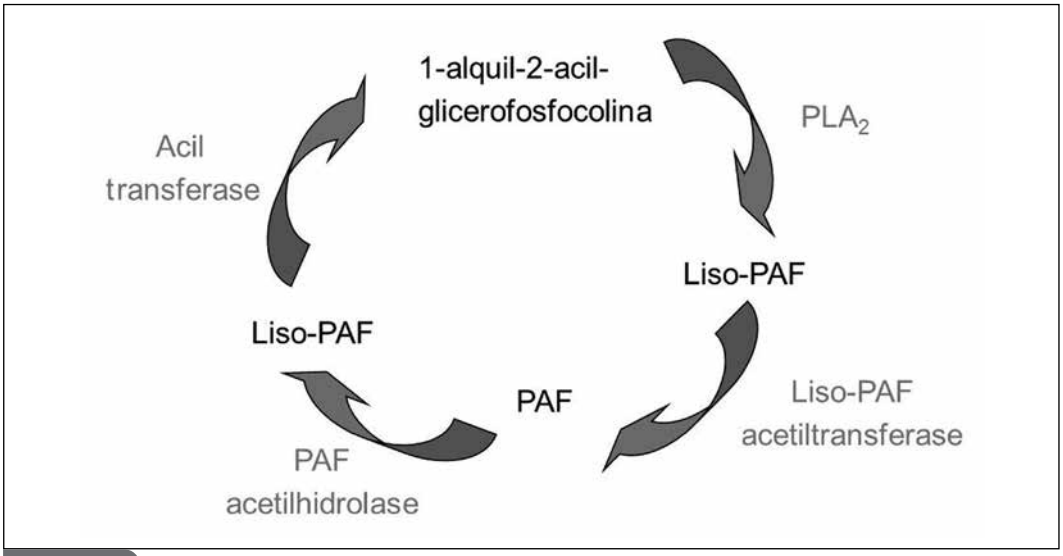


Fig. 7.7 Via de metabolização do PAF.

O PAF é produzido por diferentes tipos celulares, como neutrófilos, monócitos, mastócitos, eosinófilos, plaquetas, células endoteliais, dentre outras. Moléculas semelhantes ao PAF podem ser produzidas através de fragmentos de lipídeos oxidados da membrana celular, estas também são capazes de se ligar aos receptores do PAF e produzir ações semelhantes, como: vasodilatação, diminuição do fluxo sanguíneo, broncoconstrição, quimiotaxia, dentre outras.

O receptor de PAF está acoplado a uma proteína G. A ligação do PAF ao seu receptor leva à ativação de uma cascata de sinalização mediada pela fosfolipase C, IP_3 e Ca^{+2}, assim como, pela fosfolipase A_2, fosfolipase D e ácido aracdônico levando à formação de PGs, TXA_2 e LTs. O PAF possui ação no sistema cardiovascular, promovendo redução da resistência vascular periférica, vasodilatação e queda da pressão arterial. No rim, promove diminuição do fluxo sanguíneo, redução da filtração glomerular e excreção de água

e sódio. No estômago, causa contração de fundo e úlcera. No músculo liso, leva à contração, seja gastrointestinal, uterina ou brônquica; nos leucócitos, leva à agregação de polimorfonucleares, monócitos, estimula degranulação de eosinófilos e liberação de leucotrienos e enzimas lisossomais. Apresenta ainda função quimiotática para eosinófilos, monócitos e neutrófilos e adesão deste último ao endotélio vascular, facilitando eventos de diapedese. Estimula a liberação LTs e geração de superóxidos. Ainda promove edema, sendo mil vezes mais potente que histamina ou bradicinina em induzir extravasamento vascular pela contração das células endoteliais venulares. Nas plaquetas, o PAF estimula agregação plaquetária.

7.1.4. Citocinas e quimiocinas

7.1.4.1. Citocinas

As citocinas são polipeptídeos com peso molecular de aproximadamente 8 a 80 kDa sendo produzidas e secretadas por diversos tipos celulares em resposta a antígenos que geram uma resposta inflamatória. Essas podem atuar de forma autócrina, ou seja, agindo sobre a célula que a produziu ou parácrina, agindo sobre outras células próximas à célula produtora.

Dentre as citocinas podemos incluir:

- **Interleucinas (IL) –** são assim denominadas, pois se pensava que essas citocinas eram produzidas por leucócitos e agiam sobre outros leucócitos. Possuem como principais funções mediar e regular a resposta imunológica e inflamatória, como, por exemplo, a IL-1α que é capaz de iniciar uma cascata de mediadores inflamatórios. IL-1β é também uma citocina pró-inflamatória e é derivada predominantemente de macrófagos ativados, apesar de ser produzida também por células B e células vasculares endoteliais. Esta induz uma resposta inflamatória caracterizada por um infiltrado polimorfo e mononuclear. Já a IL-10 é uma citocina essencialmente anti-inflamatória produzida primariamente por células T e por macrófagos ativados. Essa citocina foi caracterizada inicialmente pela sua habilidade em inibir a ativação e função efetora de células T, monócitos e macrófagos. A IL-10 regula crescimento,

diferenciação e função de células B, NK, células T_h e citotóxicas, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais. IL-10 tem papel fundamental na diferenciação e função das células T regulatórias, as quais participam do controle da resposta imunológica e da tolerância. As próprias células T regulatórias produzem IL-10 em abundância.

- **Interferons (INF)** – são citocinas produzidas por linfócitos, particularmente células NK, linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ e possuem três subtipos: INF-α, INF-β e INF-γ. Os INF-α e INF-β são produzidos principalmente frente a um estímulo viral, enquanto o INF-γ medeia uma resposta Th1. Atualmente, estão sendo usados como fármacos no tratamento de diferentes doenças como o câncer, hepatite C, esclerose múltipla e doenças autoimunes pois, não só regulam o crescimento e divisão de células somáticas, mas também influenciam a sobrevida das células através da modulação da apoptose. Paradoxalmente, essas citocinas podem ser de natureza pró e anti-apoptótica. Ex.: Rebil – INF-b1a.

- **Fatores Estimulante de Colônia (CSF)** – são glicoproteínas secretadas que se ligam aos receptores de superfície em células tronco hematopoiéticas e são capazes de ativar uma cascata de sinalização levando à proliferação e à diferenciação celular de leucócitos. Estes podem ser classificados como: Fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF), fator estimulante de colônia de granulócitos (eosinófilo, neutrófilo e basófilo) e macrófago (GM-CSF) e fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF).

- **Fator de Necrose Tumoral (TNF)** – é citocina próinflamatória produzida por monócitos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, linfócitos T e B, granulócitos, células musculares lisas, eosinófilos, condrócitos, osteoblastos, mastócitos, células glia e queratinócitos, após estímulo. O TNF humano é uma proteína homotrimérica codificada dentro do *locus* do MHC. É inicialmente expresso como uma proteína transmembranar de 26 kDa (TNFmem) que após clivagem proteolítica é liberada, principalmente pela

Enzima Conversora de TNF (TACE), como uma proteína solúvel (TNFsol) de 17KDa. Ambas as formas transmembranar e secretada são biologicamente ativas, e acredita-se que a forma associada à membrana seja responsável pela sinalização justácrina secundária ao contato célula-célula.

- A LTα, formalmente conhecida como TNFβ, e o TNF foram uma vez considerados formas redundantes. No entanto, junto a um complexo com a LTβ, a LTα emergiu com funções no sistema imune distintas daquelas do TNF, o que também se manifesta a nível molecular e celular.

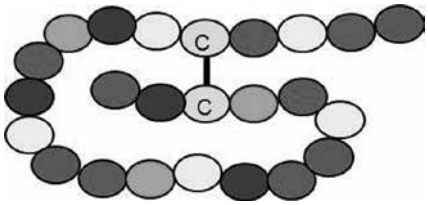
A ligação do TNF ao seus receptores leva a ativação de três cascatas principais que são: a ativação do fator de transcrição NF-kB, ativação da cascata de MAPK e indução da apoptose pela ativação da cascata das caspases.

O aumento nos níveis de TNF está associado a diversas doenças inflamatórias, como artrite reumatóide, doença de Crohn, psoríase, asma, silicose. Algumas dessas doenças podem ser tratadas utilizando anticorpos anti-TNF como o infliximab ou um receptor circulante como o etanercept.

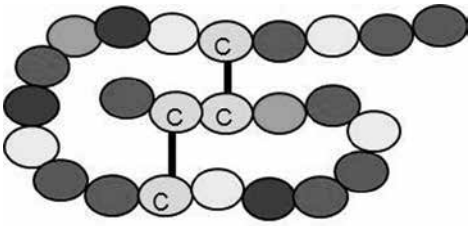
7.1.4.2. Quimiocinas

São citocinas de menor peso molecular (aproximadamente 8 a 10 kDa) e possuem como característica principal a presença de resíduos de cisteína em sítios conservados. Elas possuem como principal função a indução de recrutamento de leucócitos sendo classificadas em quatro tipos (Fig. 7.8):

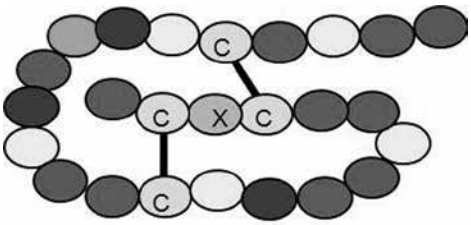
- C – Também denominada linfotaxina. Possui apenas 2 resíduos de cisteína;



CC – Possuem quatro resíduos de cisteína, sendo dois resíduos adjacentes;



CXC – Possuem também quatro resíduos de cisteína, sendo que dois resíduos são separados por um aminoácido. Ex.: IL-8, que é quimiotático para neutrófilo;



CXXXC – Possuem quatro resíduos de cisteína, entretanto, os dois resíduos mais próximos são separados por três aminoácidos (fractalquina).

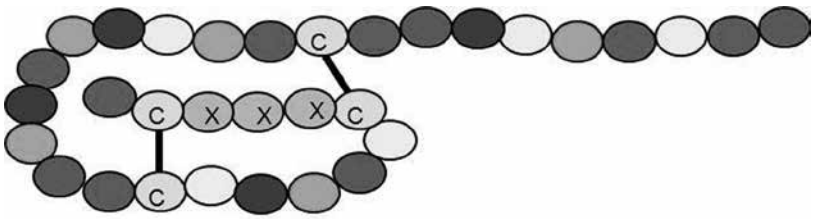


Fig. 7.8 Estrutura das quimiocinas.

A CXC é também classificada como α-quimiocina e possui ação quimiotática para neutrófilo e linfócitos, devido a presença ou não da seqüência de ácido glutâmico, leucina e arginina próximo a cadeia N terminal. Enquanto a CC é classificada como β-quimiocinas e age geralmente sobre monócitos eosinófilos, basófilos e linfócitos. E assim como α-quimiocina, a seqüência de aminoácido próximo a cadeia N terminal vai determinar o tipo celular que será atraído. A C e a CX_3C não são classificadas como α ou β-quimiocina, pois possuem apenas dois resíduos de cisteína paralelo e é separada por três aminoácidos, respectivamente.

Essa ativação e quimiotaxia ocorrem devido à ligação das quimiocinas com seus respectivos receptores de superfície. Estes receptores são metabotrópicos, ou seja, possuem sete domínios transmembranares e estão acoplados à proteína G. Sua denominação é dependente do ligante e dessa forma, os receptores para quimiocinas CC, são os CCRs; para as quimiocinas CXC, os receptores CXCRs; para a quimiocina CX_3C, o receptor CX_3CR1 e o receptor de C ainda não foi identificado.

7.1.5. Óxido nítrico (NO)

As primeiras observações da existência do óxido nítrico resultaram da observação do acúmulo de nitrito e nitrato (produtos de oxidação do óxido nítrico) na urina em camundongos que sofreram administração de endotoxina, além do acúmulo desses metabólitos em macrófagos e neutrófilos *in vitro* em resposta ao LPS (lipopolissacarídeo). Outra significativa descoberta foi o mecanismo de relaxamento da musculatura lisa vascular promovida pela acetilcolina. Mais tarde foi comprovado que esta função exercida indiretamente pela acetilcolina é mediada pela geração de NO.

O NO é um radical livre gasoso formado como produto secundário da reação de transformação da L-arginina em L-citrulina e é mediada por um grupo de enzimas chamado de NO sintase (NOS) (Fig. 7.9). Existem três tipos de NOS. A NOS induzida (iNOS) que está presente em macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular; a NOS endotelial (eNOS), presente constitutivamente em células endoteliais, miócitos cardíacos, osteoblastos, osteoclastos e em pequenas quantidades em plaquetas; e a NOS neuronal (nNOS) presente constitutivamente nos neurônios. A iNOS, por ser induzida devido a uma resposta imunológica e encontra-se em concentrações de até mil vezes maior que as NOS induzidas.

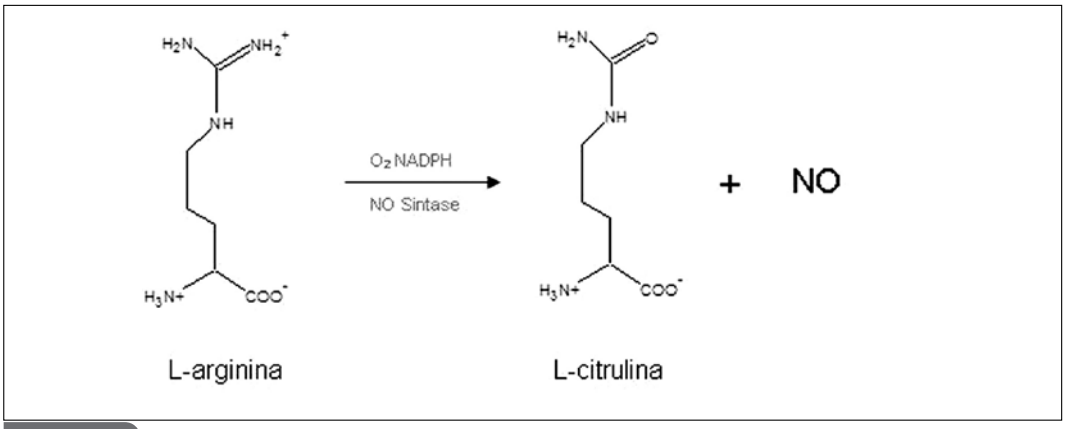


Fig. 7.9 Formação de NO a partir da transformação de L-arginina em L-citrulina mediada por NO sintase.

O NO é capaz de se ligar ao heme presente na molécula de guanilato ciclase e ativá-la. Esta, por sua vez, transforma GTP (guanidina trifosfato) em GMP cíclico, que atua sobre os canais iônicos impedindo a entrada de Ca^{+2} nas células; ativando canais de potássio, o que leva à hiperpolarização e relaxamento. E estimula a proteína quinase dependente de cGMP a ativar a cadeia leve de miosina fosfatase, levando a desfosforilação da cadeia leve de miosina e consequente relaxamento do músculo liso. O NO é o agente efetor do relaxamento da musculatura lisa vascular promovida pela acetilcolina e bradicinina (através do aumento da concentração intracelular de cálcio). Este mediador ainda apresenta efeito protetor contra trombose e aterosclerose através da inibição da migração e proliferação do músculo liso vascular. Nos vasos é capaz de diminuir a resistência vascular devido a sua ação relaxante, promovendo assim a redução da pressão arterial; também é capaz de inibir a adesão plaquetária promovendo fibrinólise.

Diversas citocinas, como TGF-β e IL-1, são capazes de induzir a expressão de $_i$NOS. O aumento da produção de NO tem importantes implicações na erradicação do foco de infecção e na alteração do microambiente inflamatório, já que possui um citotóxico e/ou citostático. O NO se associa ao ânion superóxido, formando espécies de nitrogênio altamente reativas que promovem alterações em proteínas, lipídeos e nucleotídeos, favorecendo combate a patógenos. Todavia, quando a via de síntese de NO é desreprimida patologicamente, o excesso de NO pode gerar uma série de eventos indesejáveis. Algumas patologias como artrite, psoríase e síndromes inflamatórias intestinais mostram elevados níveis de NO.

Na região pós-sináptica neuronal, a ativação de receptores NMDA glutamatérgicos resulta em aumento da concentração de cálcio intracelular e ativação da $_{n}$NOS. O NO, por sua vez poderia agir como neurotransmissor pré-sináptico. No sistema nervoso periférico, NO é associado às ações de alguns receptores NANC (não-adrenérgico e não-colinérgico). NO é ainda relacionado ao processo de ereção peniana, pelo relaxamento da musculatura lisa vascular, sendo um dos alvos dos medicamentos para tratamento da impotência de última geração. Estes inibem a fosfodiesterase 5, inibindo a redução dos níveis de AMPc.

7.2. Mediadores de origem plasmática

7.2.1. Bradicinina

Resultante da clivagem do cininogênio pela calicreína, a bradicinina (BK) foi descoberta em 1949 por Maurício Rocha e Silva, Wilson Teixeira Beraldo e Gastão Rosenfeld, pesquisadores brasileiros do Instituto Biológico da USP quando descreveram sua ação hipotensora. Ela também é capaz de provocar vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, recrutamento leucocitário e dor. Sua ação é consequência de sua ligação aos seus receptores B_1 e B_2, ambos receptores metabotrópicos acoplados à proteína G.

O receptor B_2 é expresso constitutivamente e quando ligado a BK ativa fosfolipase A_2 que leva à produção de mediadores derivados do ácido aracdônico como as prostaciclinas. Ativa fosfolipase C, ativando a via de IP_3 e Ca^{+2} com conseqüente ativação de PKC e aumento de síntese e liberação de NO. Também é capaz de ativar MAPK e o fator de transcrição NF-κB aumentando a transcrição de mediadores inflamatórios. O receptor B1 não está expresso na membrana celular e é induzido após uma resposta inflamatória por citocinas, endotoxinas e fatores de crescimento. Ao contrário de B2, ele não se liga a BK e sim aos metabólitos da mesma, gerados pela ação da carboxipeptidase N ou M.

A resposta celular gerada por esses mediadores tem como objetivo a resolução do processo inflamatório, entretanto, em alguns casos onde há persistência do patógeno, esses mediadores podem levar a uma exacerbação da resposta imunológica e consequente perda da função do tecido lesado.

7.2.2. Sistema complemento (C3 – C9)

O sistema complemento é composto de aproximadamente 30 moléculas e possuem como principal função o controle de reações inflamatórias e quimio-

taxia, ativação celular, opsonização e lise da célula-alvo. Acredita-se que esse sistema tenha se desenvolvido antes do sistema imune adaptativo. O sistema complemento pode ser ativado por 3 vias: a via clássica, que é ativada quando há ligação do anticorpo ao antígeno; a via alternativa, que é ativada principalmente na presença de antígenos microbianos e a via da lecitina, que é ativada por carboidratos de bactérias. Essas vias de ativação levarão a clivagem de C3 em dois fragmentos: C3a, responsável pela ativação celular (fagócitos e mastócitos), indução da agregação neutrofílica e liberação de espécies reativas de oxigênio, além da desgranulação de mastócitos; e C3b, que se liga a membrana da célula e facilita a ligação dos fagócitos, agindo como uma opsonina.

Outra molécula do sistema complemento importante para a defesa do organismo é a C5, que por sua vez, também é clivada em dois fragmentos: C5a, que possui um papel importante na ativação de granulócitos e fagócitos mononucleares. Sendo capaz de ativar a desgranulação de neutrófilos, mastócitos e basófilos, levando a liberação de espécies reativas de oxigênio e aminas vaso-ativas. Além de aumentar a quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e macrófagos para o sítio de inflamação. E C5b, que se liga a outras moléculas do sistema complemento (C6, C7, C8 e C9) formando o complexo de ataque à membrana (CAM), que promoverá a ruptura e lise da membrana celular do patógeno.

7.2.3. Sistema de coagulação

Ainda no contexto de mediadores inflamatórios, podemos salientar a cascata de coagulação, onde duas de suas proteínas possuem um papel importante no desenvolvimento da inflamação. São elas:

- A trombina, uma proteína resultante da ativação da cascata de coagulação, é responsável por clivar o fibrinogênio em fibrina que por sua vez participa na formação do coágulo. Também promove o aumento da aderência leucocitária e proliferação de fibroblastos. Em paralelo a esse processo, ocorre a formação de fibrinopeptídeos que aumentam a permeabilidade vascular e induzem o recrutamento de células do sistema imune;

- O Fator Xa, induz aumento da permeabilidade vascular, contribuindo para a transmigração de leucócitos para o tecido, através da sua ligação ao receptor-1 da protease na célula efetora.

O aumento da permeabilidade vascular e o aumento da aderência de células do sistema imune, causado pela ação dessas proteínas, facilitará a migração de leucócitos para o local do processo inflamatório.

8. ANTI-INFLAMATÓRIOS ESTEROIDAIS

FÁBIO P. M. DOS SANTOS

Os corticosteróides são substâncias endógenas (hormônios) que estão quimicamente classificadas como esteróides, e são sintetizados e liberados pelo córtex da glândula adrenal (córtex supra-renal).

Anatomicamente, as glândulas adrenais são duas pequenas glândulas com a forma de uma pirâmide, com cerca de 3 cm de largura, 5 cm de altura e 3 cm de espessura. Estruturalmente, encontram-se envolvidas numa cápsula de tecido conjuntivo, rodeada de tecido adiposo, membranas e ligamentos que são responsáveis pela fixação do órgão na parte superior dos rins.

Na sua porção inferior, é possível distinguir duas partes completamente distintas: o *córtex adrenal*, que corresponde a porção mais externa; e a *medula adrenal*, que ocupa a região mais interna da glândula. O córtex adrenal é a região da glândula responsável pela produção de vários hormônios. Histologicamente, a região da córtex supra-renal é constituida por regiões específicas: (i) a ***zona glomerulosa***, que está situada mais externamente e é responsável pela produção de mineralocorticóides; (ii) a ***zona fasciculada***, que é mais central, e mais importante por ser responsável pela produção de cortisol; e (iii) a ***zona reticularis***, que é a região responsável pela síntese dos hormônios sexuais.

Todos esses hormônios da córtex são esteróides derivados do colesterol que possuem o núcleo ciclopentanoperidrofenantreno característico, podendo ser agrupados como:

a) *Glicocorticóides* – Atuam primariamente no metabolismo das proteínas, carboidratos e lipídeos. Seu principal representante é o cortisol (hidrocortisona) em humanos e corticosterona em roedores;

b) *Mineralocorticóides* – Atuam primariamente no transporte de eletrólitos a nível renal e na distribuição de água nos tecidos. Seu principal representante é aldosterona.

c) *Androgênios* ou *estrogênios* – Atuam primariamente sobre as características sexuais secundárias, em seus órgãos alvos específicos. Nas mulheres são produzidas pelas glândulas supra-renais e, nos homens, esse hormônios são produzidos pelos testículos.

De todos os cerca de 50 esteróides cristalinos que foram isolados da adrenal, apenas 8, até o presente momento, possuem atividade fisiológica conhecida. Os mais importantes são: cortisona, hidrocortisona (cortisol, 17-hidroxicorticosterona), aldosterona, e os dois androgênios: androstenediona (androst-4-ene-3,17-diona) e desidroepiandrosterona. Tanto os corticosteróides naturais quanto os sintéticos são utilizados no diagnóstico e no tratamento de distúrbios da função supra-renal e, com freqüência cada vez mais elevada, no tratamento de uma grande variedade de distúrbios inflamatórios e imunológicos.

8.1. Glicocorticóides

Os glicocorticóides são sintetizados na zona fasciculada, da região da córtex adrenal, por conta da ação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Nas demais regiões da glândula – as zonas glomerulosa e reticular – não há produção de glicocorticóides por conta da ausência das enzimas CYP17 e CYP11B1, respectivamente.

Esse grupo tem como principal representante o cortisol, que é sintetizado a partir do colesterol, que pode ter origem endógena ou exógena. No entanto, alterações na fórmula estrutural desse corticóide levam a alteração na sua potência biológica, pois resulta em mudanças na sua absorção, na sua capacidade de ligação proteica, na taxa de biotransformação, na taxa de excreção, na permeabilidade a membranas e no próprio poder de ação no local desejado. Em suma, esses hormônios apresentam semelhanças na sua estrutura química, mas as diferenças estão na presença de grupos polares, hidroxilas ou cetonas conjugadas a molécula do cortisol, o que irá caracterizar um novo glicocorticóide. Para exemplificar essa característica dos glicocorticóides, a Fig. 8.1 compara as estruturas químicas do cortisol e da dexametasona. As setas apontam os sítios que apresentam grupamentos diferentes, entre o cortisol e dexametasona.

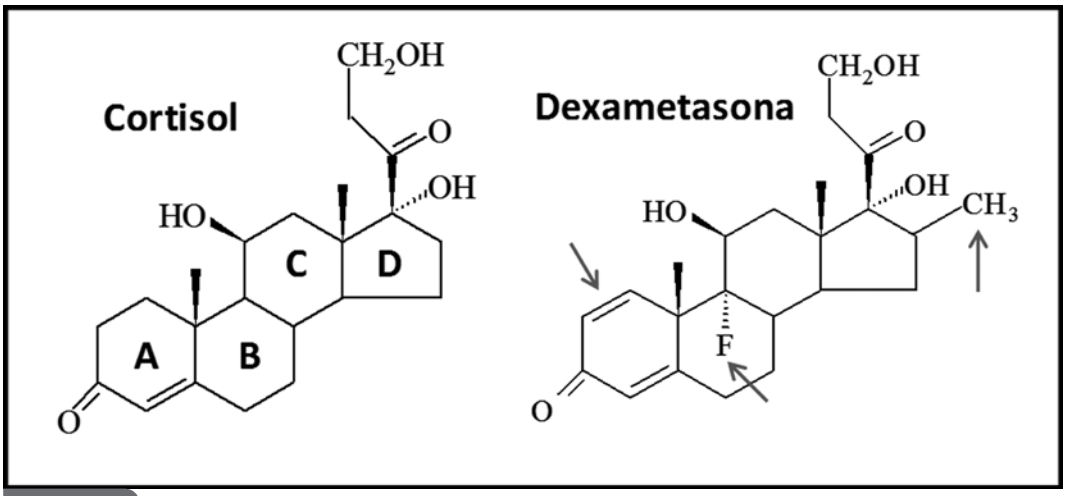


Fig. 8.1 Esquema ilustrativo comparativo entre as estruturas químicas do cortisol e da dexametasona. As setas apontam as modificações estruturais existentes na moléculas da dexametasona, que resultam nas diferenças farmacológica observada pelo uso dessa molécula.

Outras alterações promovidas na molécula do cortisol, resultam em alterações estruturais significativas, que formam moléculas com características biológicas e farmacológicas distintas. Por exemplo, ainda com referência a Fig. 8.1, (i) a introdução de uma dupla ligação no anel A do cortisol promove aumento da atividade sobre o metabolismo dos carboidratos e diminuição do poder retentor de sal (ação mineralocorticóide), como o observado na prednisolona e prednisona; (ii) a introdução do flúor na posição 9 alfa do anel B, como o observado nas moléculas de Triamcinolona e Fludrocortisona, é capaz de aumentar as atividades biológicas dos glicocorticóides; (iii) a presença do oxigênio na posição 11, anel C do cortisol, é responsável pela ação anti-inflamatória dos corticosteróides, caso da cortisona, enquanto (iv) a metilação ou hidroxilação da posição 16, anel D do cortisol, elimina o poder retentor de sal (ação mineralocorticóide), caso da betametasona e da dexametasona.

A sua síntese e secreção estão estreitamente reguladas pelo sistema nervoso central, através de um mecanismo de retroalimentação negativa (*feedback* negativo) do próprio cortisol e de glicocorticóides exógenos (sintéticos). O principal hormônio que regula esse fenômeno é o ACTH. Esse hormônio tem um importante sítio de regulação da sua secreção que está localizado nos neurônios hipotalâmicos do núcleo paraventricular. Nesse sítio são produzidos o hormônio liberador da corticotrofina (CRH) e a arginina vasopressina (AVP), que atuam em seus receptores específicos (CRH-R1 e o receptor tipo 3 da AVP) resultando na regulação da secreção do ACTH.

Dessa forma, a velocidade de secreção desse hormônio segue um ritmo circadiano endógeno, que modula a secreção de CRH. Esse ritmo resulta numa concentração de cortisol que atinge um valor máximo nas primeiras horas da manhã, declinando nas restantes 24 horas do dia. Na ausência de estresse, a secreção de cortisol é de cerca de 10-20 mg por dia em um organismo adulto.

Enzimaticamente, a biossíntese dos glicocorticóides inicia-se com a conversão do colesterol em pregnenolona a partir da ativação da desmolase. A pregnenolona, uma vez formada, servirá de substrato para a enzima esteróide-desidrogenase, resultando na formação de progesterona. Esse metabólito sofre reações de hidroxilação sucessivas, sendo convertido no cortisol.

Uma vez formado e liberado no plasma, o cortisol se liga às proteínas circulantes, como a globulina de ligação dos corticosteróides (CBG), que é uma α_2-globulina sintetizada pelo fígado, e se liga a 90% do hormônio circulante em circunstâncias normais. Devido ao seu caráter lipofílico, essa ligação favorece o seu transporte sanguíneo e facilita a sua distribuição aos tecidos-alvo. O restante encontra-se na forma livre (cerca de 5-10%) ou frouxamente ligado à albumina (cerca de 5%), estando disponível para exercer seus efeitos sobre as células-alvo.

Atualmente, achados sugerem que os glicocorticóides possam afetar a secreção de diversos hormônios, através da alteração dos níveis intracelulares de AMPc e de alterações na dinâmica de polimerização de actina.

8.2. Mecanismo de ação e efeitos fisiológicos

Em sua maioria, os efeitos conhecidos dos glicocorticóides são mediados por receptores específicos, chamados de "Receptores de Glicocorticóides" (GR), os quais apresentam uma ampla distribuição, tendo predomínio no citoplasma das células. Esses receptores proteicos são membros da superfamília de receptores nucleares, na qual estão incluídos os receptores de esteróides, esterol (vitamina D), hormônio tireoidiano, ácido retinóico e muitos outros receptores que interagem com os promotores de genes-alvo.

Uma vez no ambiente intracelular, o glicocorticóide liga-se às proteínas de choque térmico (Hsp), dentre as quais tem papel de destaque a Hsp90, embora outras proteínas possam estar envolvidas. Essas proteínas encontram-se ligadas aos receptores de glicocorticóides. Uma vez ligado ao seu receptor intracelular, por ação de alterações conformacionais, as proteínas de choque térmico se dissociam, permitindo que o complexo glicocorticóide-receptor seja translocado para o núcleo, onde poderá interagir com o DNA e com proteínas nucleares.

No núcleo, o complexo glicocorticóide-receptor liga-se a elementos de resposta dos glicocorticóides (GRE) presentes nos promotores dos genes responsivos. Foram identificados dois genes responsáveis pela codificação dos receptores de glicocorticóides. Esses receptores são: o hGR alfa, que é o receptor clássico de glicocorticóides e é ativado por ligante, sendo responsável pela modulação da expressão de genes sensíveis aos glicocorticóides; e o hGR beta, que é inativo a nível transcricional, mas que é capaz de inibir os efeitos do hGR alfa.

Ao se ligarem ao seu receptor nuclear, os glicocorticóides podem promover a transcrição de genes anti-inflamatórios, como por exemplo, ao promover um aumento na síntese de lipocortina-1, que é uma proteína que tem efeito inibitório sobre a fosfolipase A_2 (PLA_2). Dessa forma, a síntese de mediadores inflamatórios de natureza lipídica estaria inibida.

Um outro mecanismo de ação seria através da inibição da transcrição de genes próinflamatórios, como os genes responsáveis pela expressão das enzimas COX-2 e a PLA_2, através da ativação da proteína ativadora-1 (AP-1). Essa proteína é um fator de transcrição composto de dímeros da família de proteínas *Jun* e *Fos*, que uma vez ativados, promovem a inibição da transcrição de vários genes envolvidos nas respostas inflamatória. Além disso, os glicocorticóides podem promover um aumento na expressão de IκB que, por sua vez, irá manter o NFκB sob a forma inativa, impedindo assim a transcrição de genes pró-inflamatórios.

Além disso, os glicocorticóides podem aumentar a expressão de receptores β_2. Esses receptores quando ativados têm conhecida ação broncodilatadora. Dessa forma, a utilização de glicocorticóides tem relevante papel no tratamento da asma, pois preveniria a regulação negativa da expressão desse receptor em virtude do tratamento prolongado com β_2 agonistas. A tabela 1 lista os principais efeitos dos glicocorticóides na transcrição gênica ocorrida durante a resposta inflamatória.

Tabela 8.1: Efeitos dos glicocorticóides na transcrição gênica

Transcrição Aumentada
Lipocortina-1 Receptor β_2 adrenérgico IκB
Transcrição Diminuída
Citocinas (IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -8, -11, -12, -13, TNFα, GM-CSF, RANTES, MIP-1α, SCF) Óxido nítrico sintase induzida (iNOS) Ciclooxigenase induzida (COX-2) Fosfolipase induzida ($cPLA_2$) Endotelina-1 Moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1)

Em linhas gerais, os glicocorticóides podem influenciar a função da maior parte das células do organismo, visto que possuem efeitos abrangentes. Embora muitas das ações dos glicocorticóides estejam relacionadas com a dose, e sejam intensificados quando são administradas grandes quantidades para fins terapêuticos, existem também outros efeitos, denominados efeitos "permissivos", cuja ausência pode estar associada a uma deficiência de muitas funções normais.

8.2.1. Efeitos metabólicos

Conforme fora abordado anteriormente, o cortisol é um hormônio produzido regularmente ao longo do dia, tendo papel importante na regulação do metabolismo dos carboidratos, das proteínas e dos lipídios. No entanto, o uso dos hormônios glicocorticóides em doses terapêuticas pode ser responsável por alguns dos efeitos adversos graves.

Com relação ao metabolismo de carboidratos, a ação desses hormônios é capaz de contra regular a insulina, regulando dessa forma a glicemia sanguínea, evitando que se desenvolva o quadro de hipoglicemia. Os glicocorticóides estimulam a gliconeogênese hepática pelo aumento da atividade das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glicose-6-fosfatase, o que irá resultar na formação de glicose. Perifericamente, ainda inibem a captação da glicose pelo tecido muscular, através da inibição dos transportadores de glicose. Dessa forma, esses hormônios têm ação hiperglicemiante.

No tecido adiposo, os glicocorticóides promovem a diferenciação dos adipócitos, promovendo a adipogênese. Esse fenômeno é resultante da ativação da transcrição de alguns genes, como leptina, glicerol-3-fosfato desidrogenase e da lipase lipoproteíca, o que contribui para um aumento no acúmulo de gordura visceral. Esse fato parece ser resultante de uma maior distribuição de receptores de glicocorticóide nessa região. Já no tecdio muscular, os glicocorticóides causam alterações catabólicas, como inibição da síntese proteíca e liberação de aminoácidos durante o catabolismo muscular, o que pode levar à atrofia muscular.

Em linhas gerais, os glicococorticóides além de estimularem a síntese de proteínas e de RNA no fígado, também exercem efeitos catabólicos no tecido linfóide e conjuntivo e na pele, além do tecidos muscular e adiposo, mencionados anteriormente. Sobre o tecido ósseo, os glicorticóides podem causar

osteoporose (associada a Síndrome de Cushing), principal limitação no uso terapêutico a longo prazo desses hormônios. Nas crianças, os glicocorticóides reduzem o crescimento, que poderia ser parcialmente evitado pela administração do hormônio do crescimento em altas doses.

8.2.2. Efeitos anti-inflamatório e imunossupressor

A resposta inflamatória pode ser suprimida radicalmente por ação dos glicocorticóides, visto que podem alterar a concentração, a distribuição e a função dos leucócitos periféricos, além de poderem exercer efeitos supressores sobre a geração de citocinas e quimocinas inflamatórias e outros mediadores lipídicos e glicolipídicos da inflamação.

Esses hormônios também inibem a função dos macrófagos teciduais e de outras células apresentadoras de antígenos, sendo observada uma redução na capacidade dessas células de responder a antígenos e a mitógenos. De fato, os glicocorticóides são capazes de limitar a capacidade de células em fagocitar e destruir microrganismos, bem como de produzir o TNF, a IL-1, metaloproteinases e ativador do plasminogênio. Essas células são acentuadamente afetadas por esse tratamento. As citocinas IL-12 e IFN-γ têm sua produção diminuidas.

Mais ainda, além de seus efeitos sobre a função leucocitária, os glicocorticóides apresentam efeitos anti-inflamatórios ao alterar a produção de mediadores lipídicos, por induzir a redução na síntese de prostaglandinas, leucotrienos e fator de ativação plaquetária (PAF), que têm síntese dependente da ativação da PLA_2, principalmente por indução da expressão da proteína lipocortina. Vale ressaltar que os glicocorticóides são capazes de reduzir a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), que é a forma induzível dessa enzima nas células inflamatórias, com consequente diminuição da quantidade de enzima disponível para a formação de prostanóides.

A utilização desses hormônios é importante no caso de pacientes que receberam transplantes, pois é capaz de evitar as reações inflamatórias nos casos de rejeição em função da sua ação imunossupressora. Além disso, a ativação do complemento não é alterada, porém seus efeitos são inibidos e a produção de anticorpos pode ser reduzida por grandes doses de esteróides, embora não seja afetada por doses moderadas.

8.2.3. Outros efeitos

Os glicocorticóides em quantidades aumentadas frequentemente produzem distúrbios do comportamento em seres humanos, promovendo a princípio insônia e euforia e, posteriormente, depressão. Além disso, quando administrados em grandes doses, podem aumentar a pressão intracraniana (pseudotumor cerebral), se administrados de forma crônica suprimem a liberação hipofisária de ACTH, GH, TSH e LH.

Além dos efeitos sobre os leucócitos, os glicocorticóides aumentam o número de plaquetas e eritrócitos. É também observado que na ausência de quantidades fisiológicas de cortisol, ocorre comprometimento da função renal (particularmente da filtração glomerular), a secreção de vasopressina aumenta, e verifica-se a incapacidade em excretar normalmente uma sobrecarga hídrica.

Um ponto importante a ser mencionado está relacionado ao uso prolongado de glicocorticóides, que pode levar à condição atrofia das glândulas supra-renais, fazendo com que a interrupção do tratamento deva ser feita com a retirada progressiva da administração da droga.

8.3. Glicocorticóides sintéticos

Em face da importância dos glicocorticóides no tratamento de distúrbios inflamatórios, alérgicos, hematológicos e entre outros, foram desenvolvidos muitos esteróides sintéticos com atividade anti-inflamatória e imunossupressora. Esses compostos (esteróides farmacêuticos) são habitualmente sintetizados a partir do ácido fólico (obtido do gado bovino) ou de sapogeninas esteróides, em particular a diosgenina e a hecopenina, encontradas em plantas das famílias *Liliaceae* e *Dioscoreaceae*.

Quando administrados por via oral, os corticosteróides sintéticos têm a absorção e o metabolismo semelhante aos esteróides endógenos. No entanto, as alterações na molécula influenciam na sua afinidade pelos receptores de glicocorticóides e mineralocorticóides. Dessa forma, em alguns casos, o agente é administrado na forma de pró-droga. Por exemplo, a prednisona é rapidamente convertida no produto ativo, prednisolona, no organismo. Esses fármacos têm as mesmas ações do cortisol, porém podem exibir relações diferentes de potência glicocorticóide e mineralocorticóide. O organismo tem mais dificuldade de metabolizar e eliminar os corticosteróides sintéticos, por isso, estes possuem efeito mais prolongado e potência elevada.

8.4. Aplicação dos glicocorticóides

8.4.1. Uso para fins de diagnóstico

A dexametasona pode ser utilizada para auxiliar no diagnóstico da Síndrome de Cushing. O teste empregado, chamado de teste de supressão da dexametasona, é utilizado quando há suspeita da hiperfunção glandular. Nesse teste a dexametasona é administrada ao paciente e o material biológico para quantificação do cortisol é coletado posteriormente para avaliar a produção do cortisol, pois a dexametasona inibe a liberação de ACTH o que ocasinoa diminuição na produção de cortisol. Em pacientes com disfunção glandular, essa produção encontra-se aumentada.

8.4.2. Distúrbios não-supra renais

Os análogos sintéticos do cortisol têm se mostrado úteis no tratamento de um grupo diversificado de doenças. Dentre esses quadros, esses fármacos vêm sendo utilizados para o tratamento de doenças não-relacionadas a qualquer distúrbio da função supra-renal, e esse uso tem como objetivo suprimir as respostas inflamatórias e imunes.

No entanto, a utilização dessa terapia pode ser não benéfica ao organismo. Além de promover as alterações metabólicas já expostas anteriormente, a utilização dos glicocorticóides suprime a resposta inflamatória, visto que em quadros onde a resposta do hospedeiro constitui-se na principal causa do quadro observado, como por exemplo nas doenças autoimunes. Mas, em quadro infecciosos crônicos, o tratamento pode permitir que processo patológico (infeccioso) possa progredir, apesar da supressão das manifestações clínicas.

8.4.3. Efeitos adversos e toxicidade

O uso de glicocorticóides possibilita resultados satisfatórios, que podem variar de modo considerável, visto que podem causar efeitos disseminados em todas as partes do organismo. Os principais efeitos indesejáveis dos glicocorticóides resultam de suas ações hormonais produzindo o quadro clínico da "Síndrome de Cushing". Quando os glicocorticóides são utilizados por um curto período de tempo (menos de 2 semanas), observa-se ocasionalmente a ocorrência de insônia, alterações do comportamento e úlceras pépticas agudas. Não são observados efeitos adversos graves.

A taxa de desenvolvimento dessa síndrome é em função da dose do glicocorticóide e da constituição genética do paciente. Nesse caso, ocorre maior crescimento de pêlos finos nas coxas, troncos e na face, além de ocorrer aparecimento de acne. São característicos também o contorno arredondado do rosto, a ocorrência de tumefação e a distribuição alterada de gordura no corpo.

A degradação contínua de proteínas e o desvio de aminoácidos para a produção de glicose aumentam as necessidades de insulina e, com o decorrer do tempo, resultam em aumento de peso corporal, deposição visceral de gordura, consunção muscular, adelgaçamento da pele com estrias e equimoses, hiperglicemia e, por fim, desenvolvimento de osteoporose, diabetes e necrose asséptica do quadril. Quando presente, o diabetes é tratado através de dieta e insulina.

Outras complicações estão associadas ao tratamento com glicocorticóides, como o desenvolvimento de úlceras pépticas. Além disso, caso sejam administrados por mais de duas semanas, os glicocorticóides podem promover atrofia das glândulas supra-renais, o que implica na necessidade de um processo de interrupção progressiva do tratamento . Visto que se a dose for reduzida com demasiada rapidez nesses pacientes, os sintomas do distúrbio podem reaparecer, ou sua intensidade pode aumentar. Essas rápidas reduções podem ser prejudiciais a pacientes sem distúrbios subjacentes, como os pacientes cirurgicamente curados da Síndrome de Cushing.

Essa síndrome pode ser causada também por tumores ou por hiperplasia nodular da glândula supra-renal, assim como pela produção ectópica de ACTH. No entanto, na maioria dos casos, a Síndrome de Cushing resulta de hiperplasia supra-renal bilateral secundária a um adenoma hipofisário secretor de ACTH.

Dessa forma, a (hipersecreção) de glicocorticóides, promove muitas alterações no paciente, como obesidade do tronco, perda proteica, adelgaçamento da pele, estrias de cor púrpura, alem de cicatrização deficiente de feridas e osteoporose, dentre outras características. Em casos mais graves esses distúrbios podem chegar a alterações mentais, hipertensão e diabetes. O tratamento consiste em remoção cirúrgica do tumor acompanhado de diminuição das quantidades de corticosteróides aos níveis normais de maneira lenta e gradual.

8.4.4. Contra-indicações

Deve ser feito o monitoramento dos pacientes que receberem tratamento com esses fármacos devido ao risco de desenvolvimento de hiperglicemia, glicosúria, hipertensão, úlcera péptica, osteoporose e infecções ocultas. Além disso, esses agentes terapêuticos devem ser utilizados com cautela em pacientes com úlcera péptica, cardiopatia ou hipertensão, dentre outras patologias.

8.4.5. Inibidores de síntese/antagonistas

Algumas drogas vêm sendo usadas como inibidores de síntese de glicocorticóides e também como antagonistas dos mesmos. Cada uma dessas drogas tem um mecanismo de ação distinto. Dentre elas destacam-se a *metirapona*, por seu efeito inibidor seletivo da síntese de esteróides; a *aminoglutetimida*, por bloquear a conversão do colesterol em pregnenolona e por ser utilizada em associação com dexametasona (ou hidrocortisona) no tratamento do câncer de mama; e o *cetoconazol*, pela sua ação inibidora potente e não-seletiva sobre a síntese de esteróides supra-renais e gonadais. Além desses, existem outras drogas que também são utilizadas com a mesma finalidade como *mifepristona* (RU 486) que é um antagonista de receptor, *mitotano* e *trilostano*.

9. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIS

RAFAEL M. CARDOSO

9.1. Introdução

O processo inflamatório é uma resposta natural de defesa do sistema imune inato que estabelece elo com a resposta adaptativa. Como visto nos capítulos anteriores, vários mediadores são responsáveis por significativas alterações nos parâmetros fisiopatológicos nos mais variados sistemas orgânicos. Dentre as modificações, estão a elevação da temperatura corporal (promove inibição de crescimento de patógenos agressores), estimulação para multiplicação e maturação de precursores relacionados às linhagens mieloide e linfoide, aumento da permeabilidade vascular (gerando edema local pela transudação de material da circulação e viabilizando chegada ao foco inflamatório de células polimorfonucleares, monócitos e linfócitos), além de alterações hemodinâmicas globais (afetam pressão arterial e perfusão renal) e pronunciada redução do limiar nociceptivo, com consequente potencialização do estímulo álgico. Os mediadores são capazes de modular a ativação de células do sistema imune, conduzindo-as à realização de suas funções efetoras cujo objetivo é eliminar o agente desencadeador do processo lesivo permitindo retorno à condição homeostática.

Todavia, em alguns casos, a resposta inflamatória torna-se prejudicial ao organismo, comprometendo o funcionamento fisiológico de vários tecidos e órgãos.

Várias classes de fármacos foram desenvolvidas e são clinicamente utilizadas pelo seu potencial de interferência na formação ou ação de vários mediadores do processo inflamatório. Neste capítulo, focaremos naqueles que são diretamente relacionados com os produtos da cascata do ácido araquidônico, ou seja, fármacos que atuam sobre os eicosanoides.

Os agentes anti-inflamatórios são classicamente divididos em:

- Anti-inflamatórios Esteroidais
- Anti-inflamatórios Não-Esteroidais:
  - Inibidores Não-Seletivos de Ciclooxigenase
  - Inibidores Seletivos de Ciclooxigenase-2
- Inibidores da ação de Leucotrienos:
  - Inibidor da Lipoxigenase
  - Antagonistas dos Receptores de Leucotrienos
- Outros fármacos e terapêuticas utilizados em distúrbios inflamatórios

A seguir, algumas características básicas de cada classe serão descritas, incluindo mecanismos de ação, usos clínicos e efeitos adversos decorrentes de seu uso e principais fármacos de cada classe, exceto para os anti-inflamatórios esteroidais que foram discutidos no capítulo anterior.

9.2. Anti-inflamatórios Não-Esteroidais (Inibidores de Ciclooxigenase)

A demonstração da existência de duas isoformas da enzima ciclooxigenase conduziu ao conceito que cada uma delas teria papéis absolutamente distintos, sendo a COX-1 responsável pela manutenção homeostática e produção de prostaglandinas benéficas (proteção da mucosa gástrica, dilatação vascular, prevenção de geração de eventos tromboembólicos, melhora da capacidade da função renal, entre outros) ao passo que a COX-2 seria responsável por todos os eventos inflamatórios deletérios produzidos pelas prostaglandinas. Desta forma, houve forte interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de fármacos inibidores seletivos de COX-2 que seriam, em tese, capazes de conter a reação inflamatória e seus efeitos deletérios sem, entretanto, interferir nos mecanismos benéficos das prostaglandinas produzidas pela COX-1. A utilização clínica destes fármacos mostrou ser falha a visão dicotomizada para os inibidores de ciclooxigenase, uma vez que os inibidores seletivos também mostraram ter efeitos adversos importantes.

Todos os anti-inflamatórios compartilham funções relacionadas, agindo na inibição da síntese de mediadores lipídicos, reduzindo focos inflamatórios, álgicos e de elevação de temperatura. Apresentam estrutura química diversificada, sendo na grande maioria dos casos ácidos fracos (exceção representada pela nabumetona), propriedade que in-

fluencia padrões de absorção destes fármacos quando administrados via oral. Quase a totalidade dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) age por mecanismos de competição reversível do sítio catalítico das ciclooxigenases, impedindo a metabolização do ácido araquidônico. Como exceção, temos o ácido acetilsalicílico, que modifica covalentemente o sítio de catálise das COXs, sendo essa alteração irreversível.

Apesar de pertencerem a uma mesma classe farmacológica, apresentam diferenças significativas em suas estruturas, levando a parâmetros farmacocinéticos muito variados. São, em geral, bem absorvidos pela via oral e metabolizados no tecido hepático através de reações de fase I (sobretudo pelas CYPs 3A e 2C) e fase II, enquanto alguns sofrem conjugação (reação de fase II) com ácido glicurônico diretamente. A via de eliminação majoritária é a excreção renal, com graus de importância variados para a excreção biliar (dependendo da estrutura molecular do fármaco). Outro parâmetro farmacocinético importante é o fato de se conjugarem, também em graus variados com proteínas plasmáticas, sobretudo albumina, o que pode formar reservatórios do fármaco, alterando cinética de ação e meia-vida destes.

Os principais AINEs estão organizados de acordo com a classificação química:

Ácidos Carboxílicos	Ácido Propiônico		Ibuprofeno
			Cetoprofeno
			Naproxifeno
	Ácido Salicílico		Ácido acetilsalicílico
			Diflunisal
			Flufenisal
			Salicilamida
	Ácido Fenâmico		Ácido Mefenâmico
			Ácido Tolfenâmico
			Ácido Flufenâmico
	Ácido Acético	Ácido Indol Acético	Indometacina
			Sulindac
		Ácido Fenilacético	Dicoflenaco
Ácidos Fenólicos	Pirazolônicos		Butasona
			Fenilbutasona
			Dipirona
	Oxicans		Piroxican
			Meloxicam
			Tenoxicam
	Sulfamídico		Nimesulida
			Coxibes
Compostos Não-Ácidos	Butanona		Nabumetona

Cada derivado foi sintetizado conferindo características especiais e individuais, como diferença no grau de irritação gastrintestinal (meloxicam é bem tolerado pelo trato gastrintestinal), capacidade de ser excretado no leite materno ou atravessar a placenta (naproxeno, em ambos), maior tempo de ação, graus de seletividades para COX-1 e COX-2 (AAS versus tenoxicam), administração como pró-fármaco (sulindac), administração em dose única diária (piroxicam).

Os efeitos gerais clínicos obtidos com uso dos AINEs estão abaixo listados:

9.2.1. Efeito Antipirético

A febre é desencadeada como mecanismo de defesa primário que ocorre por alterações nos centros termorreguladores hipotalâmicos, fazendo que a temperatura regular basal seja elevada. Estas alterações da regulação térmica são controladas principalmente pela interleucina-1 (IL-1), que induz a síntese de PGE_2 no hipotálamo. Os anti-inflamatórios não-esteroidais auxiliam no retorno para a temperatura regular basal, sendo o excesso de energia térmica dissipada através da sudorese e dilatação de vasos sanguíneos periféricos.

9.2.2. Efeito Analgésico

Como descrito nos capítulos anteriores, as prostaglandinas são agentes capazes de promover sensibilização de terminais nociceptivos, não sendo capazes por si só de gerarem dor significativa, mas potencializam eventos álgicos desencadeados por outros mediadores gerados na resposta inflamatória, como a bradicinina e substância P. Quando associados aos analgésicos narcóticos, há possibilidade de redução da dosagem destes, evitando efeitos adversos no uso de derivados opioides, como constipação, depressão respiratória, dentre outros. Na cefaleia, o efeito destes fármacos está relacionado a uma redução do efeito vasodilatador de algumas prostaglandinas sobre o leito vascular cerebral.

9.2.3. Efeito Anti-inflamatório

Os efeitos anti-inflamatórios dos AINEs são extremamente amplos e decorrem da inibição da síntese de todos os derivados da reação catalisada pelas ciclooxigenases. De fato, todos os efeitos inflamatórios descritos para os derivados prostanoides nos capítulos anteriores são afetados. É importante res-

saltar que a inibição não seletiva de ambas isoformas da enzima COX também abole efeitos protetores fisiológicos das prostaglandinas, como manutenção da perfusão renal, vasodilatação e proteção da mucosa gástrica.

Os principais e mais prevalentes efeitos adversos estão sumarizados abaixo e separados pela seletividade pela isoforma de ciclooxigenase:

9.3. Principais Efeitos Adversos dos AINEs

9.3.1. Efeitos Adversos Decorrentes do Uso de AINEs: (não seletivos)

A) Distúrbios Gastrintestinais:

Os AINEs, particularmente os que atuam preferencialmente sobre a COX-1, reduzem o efeito protetor fisiológico das prostaglandinas no trato gastrintestinal, especialmente PGE_2 e PGI_2. Os efeitos adversos incluem desde vômitos, náusea, anorexia, diarreia, até formação de úlceras e perfurações estomacais. Este efeito é proporcionalmente reduzido quão mais seletivo para COX-2 for o fármaco, como será discutido adiante.

B) Efeitos Vasculares Renais:

De forma similar, a inibição das prostaglandinas PGE_2 e PGI_2 altera a manutenção do fluxo sanguíneo renal, com constrição da arteríola aferente nos glomérulos renais e redução da perfusão renal. PGE_2 ainda apresenta mecanismo de vasodilatação compensatória em resposta à ação de noradrenalina e angiotensina II. Desta forma, a redução na síntese destas prostaglandinas pode conduzir à nefrotoxicidade, com redução da filtração glomerular, nefrite crônica e até necrose de papilas renais.

C) Efeitos Respiratórios:

A inibição das ciclooxigenases faz com que todo o "pool" de ácido araquidônico disponibilizado da membrana celular possa ser utilizado na síntese de leucotrienos. Como descrito nos capítulos anteriores, essas substâncias são os principais responsáveis por broncoconstrição e aumento na produção de muco, causando aumento da resistência de vias aéreas e comprometendo a capacidade respiratória.

D) Função Plaquetária:

A cascata do ácido araquidônico tem como um de seus produtos o tromboxano A_2 (TXA_2), que atua como agregante plaquetário e potencializa os efeitos de outros pró-coagulantes, como a trombina. Como a isoforma do ciclooxigenase presente nas plaquetas é a COX-1, os inibidores não-seletivos de COX podem promover redução na capacidade de agregação plaquetária, propiciando aumento no risco de hemorragias.

E) Outros Efeitos:

Apesar de menos comum, alguns AINEs são capazes de promover distúrbios de medula óssea (anemia e neutropenia) e hepatotoxicidade (principalmente aumento de transaminases), além de reações de hipersensibilidade aos mais variados componentes desta classe de fármacos.

9.3.2. Efeitos Adversos Decorrentes do Uso de AINEs: (COX-2 seletivos)

A) Eventos Cardiovasculares:

Inibidores seletivos de COX-2 suprimem a produção de PGI_2 (vasodilatador e anti-agregante plaquetário) pelo endotélio vascular sem, no entanto, reprimir a produção de TXA_2 (vasoconstritor, agregante plaquetário) pelas plaquetas (já que essa é produzida pela COX-1). Desta forma, há aumento no risco de incidência de eventos tromboembólicos, aumentando a chance de isquemia coronariana, além de elevação na pressão arterial.

B) Gravidez e Lactação:

Momentos antes do parto, há indução de COX-2 e produção de PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$. Essas prostaglandinas exercem função de estímulo da contração da musculatura lisa uterina e indução de trabalho de parto. Há trabalhos demonstrando prolongamento da gestação pelo uso de AINEs. A indometacina, por esta razão, foi aprovada para uso clínico quando da necessidade de se evitar trabalho de partos pré-termo. Todavia, o uso de AINEs pode promover estenose do *ductus arteriosus* (causa de hipertensão arterial pulmonar congênita), além de aumentar a possibilidade de hemorragia pós-parto, motivo pelo qual o uso destes fármacos é contraindicado em mulheres em períodos gestacionais avançados.

9.4. Os inibidores seletivos de COX-2

O objetivo principal do desenvolvimento de inibidores seletivos de COX-2 foi prevenir os eventos gástricos decorrentes do uso de inibidores não-seletivos. Todavia, sabidamente esses inibidores seletivos apresentam alguns efeitos adversos significativos relacionados, principalmente ao seu uso por períodos prolongados, sendo o de maior destaque a possibilidade de aumento na geração de edemas e hipertensão e eventos cardiovasculares. Este fato conduziu à retirada do mercado do Vioxx® (rofecoxib) pela constatação em estudo ("prevenção de pólipos adenomatosos com Vioxx®") do aumento na incidência de eventos cardiovasculares (infarto agudo do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais) nos pacientes que receberam rofecoxib por períodos prolongados (semanas a meses). Os efeitos adversos de inibidores seletivos e não-seletivos de COX-2, já descritos, embasam os motivos pelos quais esses eventos têm sua incidência significativamente elevada. Outro fármaco, o valdecoxib, foi também retirado do mercado devido aos efeitos adversos decorrentes de seu uso. Outros fármacos ainda foram posteriormente desenvolvidos ou voltaram ao mercado. Todavia, estudos randomizados amplos estão sendo conduzidos para melhor esclarecer o risco de cada inibidor seletivo de COX-2. Os fármacos inibidores seletivos variam entre si, além do grau de seletividade, em uma série de parâmetros farmacocinéticos, como absorção oral, picos de concentração séricos, variações no mecanismo de excreção, interações medicamentosas, entre outros.

Abaixo estão relacionadas as relações de seletividade aproximadas para alguns inibidores seletivos de COX-2:

Fármaco	Formação de TXB2 (Inibição de COX-1)	Formação de PGE2 (Inibição de COX-2)	Relação de Seletividade COX-2/COX-1
Lumiracoxib ≈ Etoricoxib	120	1,2	100
Valdecoxib ≈ Rofecoxib	22	0,7	31,4
Celecoxib	7	0,9	7,8

A seletividade para cada isoforma da ciclooxigenase é avaliada pela razão da síntese de tromboxano A_2 de plaquetas durante a formação do coágulo (índice de atividade da

COX-1) e a síntese de PGE_2 por monócitos em sangue total exposto ao lipopolissacarídeo (índice de atividade de COX-2).

9.5. Outros fármacos utilizados no controle da dor e hipertermia (não-AINEs)

9.5.1. Ácido Acetilsalicílico (AAS)

Sintetizado quimicamente a partir do ácido salicílico, o AAS teve impacto fulminante no seu lançamento por se tratar da primeira alternativa farmacológica eficaz para controle de reações inflamatórias. Atualmente, seu emprego como anti-inflamatório está em declínio em decorrência de efeitos adversos e sua principal utilização na profilaxia de tromboembolismo em pacientes que apresentem risco para eventos cardiovasculares. É absorvido no estômago e início do intestino delgado e degradado por esterases plasmáticas que o convertem em ácido acético e salicilato. Em altas doses, pode provocar salicilismo, um tipo de intoxicação grave que pode ser contornado pela alcalinização da urina (leva ao aumento na excreção renal de salicilato e seus conjugados).

Apresenta efeitos anti-inflamatórios pela inibição não-seletiva das COXs, (através da modificação covalente por acetilação da serina 530 da COX), analgésico (por inibição do estímulo nociceptivo na região subcortical) e antipirético (pela inibição da síntese de prostaglandinas e secreção de IL-1 por macrófagos na inflamação).

O mais importante mecanismo de ação do AAS é a inibição irreversível da COX-1 plaquetária. Como plaquetas são estruturas não nucleadas derivadas de megacariócitos, elas são incapazes de sintetizar novas moléculas de COX. Desta forma, o efeito antiplaquetário é mantido por todo o tempo de vida da plaqueta (aproximadamente 10 dias). Neste contexto, AAS é usado visando reduzir a incidência de isquemias, obstrução da artéria coronária e infarto de miocárdio e angina instável. Para este fim, a dose indicada é de aproximadamente 75 a 325 mg/dia, ao contrário da posologia anti-inflamatória e antipirética de 2000 mg/dia (divididos em administrações em períodos de 6 horas).

Além de seus efeitos sobre as ciclooxigenases, foi demonstrada capacidade anti-inflamatória do AAS em animais deficientes geneticamente de ciclooxigenase, mostrando que o AAS participa de outras vias para inibição do processo

inflamatórios (como sua capacidade de inibir a expressão de NF-κB, um importante fator de transcrição de genes de mediadores inflamatórios).

Os efeitos adversos do uso de AAS incluem todos aqueles compartilhados para os anti-inflamatórios não-seletivos para COX-2, mas existem dois paraefeitos específicos: o salicilismo (náuseas, diarreia, cefaleia, tonteiras, confusão mental, dificuldade auditiva, sonolência e sudorese) e a *síndrome de Reye* (hepatite fulminante rara e grave em crianças, motivo pelo qual seu uso é evitado em crianças).

O AAS não deve ser usado em pacientes em tratamento com o anticoagulante varfarina, uma vez que compete pelo sítio de ligação a proteínas plasmáticas, aumentando o efeito anticoagulante da varfarina e predispondo o paciente a eventos hemorrágicos graves. Outra contraindicação é na gota (inflamação por hiperuricemia), já que reduz a excreção de ácido úrico.

9.5.2. Paracetamol (acetaminofeno)

Esta molécula apresenta atividade anti-inflamatória apenas se administrada em altas doses. Todavia é um dos mais usados como analgésico não narcótico e antitérmico. Sua ação antitérmica é exercida pela inibição da COX-3 na região hipotalâmica, apresentando IC_{50} de 460 μM contra IC_{50} de mais de 1000 μM para as demais COXs (1 e 2). É dado oralmente em doses que variam de 500 a 750 mg a cada 6 a 8 horas. É importante ressaltar que não se deve ultrapassar a dose máxima de 4g/dia (para pacientes com função renal normal) devido à possibilidade de desenvolvimento de hepatotoxicidade grave, além de toxicidade renal. O mecanismo deste efeito adverso é explicado pela ausência de glutationa suficiente para conjugar toda a quantidade de N-acetil-p-benzoxiquinonimina (metabólito proveniente das reações de eliminação). Este, uma vez livre, fica apto a realizar uma série de reações nucleofílicas com constituintes celulares, promovendo necrose do fígado e dos túbulos renais. O tratamento inclui lavagem gástrica e reconstituição do pool de glutationa pelo uso de N-acetilcisteína intravenosa ou metionina via oral.

9.6. Inibidores da Ação de Leucotrienos

O principal uso dos fármacos que atuam sobre as ações dos leucotrienos é evitar atividade destes sobre o sistema respiratório, incluindo broncoconstrição, aumento da reatividade brônquica, geração de edema mucoso e hipersecreção mucosa.

Os leucotrienos, produtos derivados da cascata do ácido araquidônico pela ação da 5-lipoxigenase e outras enzimas da via, exercem função de quimiotaxia para eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, sendo os principais responsáveis por broncoconstrição e outros eventos de restrição da capacidade respiratória e resposta anafilática (principalmente cisteinil-leucotrienos).

Existem dois pontos de interferência farmacológica na ação dos leucotrienos, que serão discutidos a seguir:

9.6.1. Inibição da 5-Lipoxigenase

A zileutina é um inibidor seletivo da 5-lipoxigenase, resultando na inibição de todos os derivados metabólicos gerados a partir do leucotrieno A_4 (LTA_4). Apesar do mecanismo de ação abrangente, a zileutina é menos frequentemente usada que os antagonistas de receptores de leucotrienos pela necessidade de número maior de administrações diárias e pela sua toxicidade hepática.

9.6.2. Antagonistas dos Receptores de Leucotrienos

O montelucaste e zafirlucaste são fármacos antagonistas seletivos para o receptor cys-LT_1, que tem como ligante primário o LTD_4 (apesar de passível de ligação também dos leucotrienos C_4 e E_4). LTD_4 apresenta potência 1000 vezes maior que a histamina na promoção de broncoconstrição. Assim, os fármacos desta classe são capazes de bloquear os efeitos patológicos nas vias aéreas promovido pelos cisteinil-leucotrienos.

A vantagem desta abordagem farmacológica sobre a inibição da 5-lipoxigenase é a ausência relativa de efeitos adversos e de toxicidade. Os fármacos desta classe incluem o montelucaste (aprovado para uso em crianças a partir de 6 anos e administrado em 4mg (10mg para adultos) uma vez ao dia) e zafirlucaste (administrado em duas doses diárias de 20mg).

9.7. Outros Fármacos e Abordagens Terapêuticas

9.7.1. Manipulação Dietética na Inflamação

O ácido araquidônico (eicosatetraenoico) é metabolizado nas vias das ciclooxigenases e lipoxigenase gerando uma série de mediadores químicos com amplo espectro de ações em vários sistemas, incluindo o sistema imune. Es-

tudos com manipulação da dieta e substituição da ingestão de ácidos graxos poliinsaturados como, por exemplo, o ácido eicosapentaenoico (encontrado em animais marinhos) são também alvos pra as enzimas que atuam na cascata do ácido araquidônico, mas tendo como produto final prostaglandinas e leucotrienos de série diferente das obtidas pelo metabolismo do ácido araquidônico (por exemplo, com ácido pentaenoico, obtemos eicosanoides da série 3, como PGE_3, PGI_3). A geração destes autacoides alternativos mostra grande potencial de inibição de processos inflamatórios tendo, em alguns estudos, demonstrada eficácia comparável ao uso de AINEs, motivo pelo qual em alguns protocolos a substituição terapêutica da dieta é aconselhada, como na artrite reumatóide, por exemplo.

9.7.2. Nedocromil sódico e Cromocalina

São derivados sintéticos de moléculas obtidas a partir de extratos vegetais de *Ammi visnaga* que demonstraram capacidade de inibir broncoespasmo induzido por antígeno e liberação de mediadores, como por exemplo, histamina e autacoides de mastócitos sensibilizados. Estes fármacos são administrados por via inalatória e são aprovados no controle dos eventos desencadeantes do processo asmático.

O mecanismo de ação, ainda não totalmente esclarecido, parece estar relacionado com a alteração de canais de cloreto na membrana celular, minimizando a capacidade de ativação celular por despolarização. Incluem-se inibição da liberação de mediadores, reversão do aumento de capacidade funcional de leucócitos obtidos de pacientes asmáticos, minimização de efeitos ativadores de peptídeos quimiotáticos e inibição do tráfego leucocitário nas vias aéreas de pacientes asmáticos.

9.7.3. Ouro

A utilização terapêutica de ouro já foi considerada para uma série de patologias, sobretudo na artrite reumatóide, não sendo mais frequentemente usados na atualidade.

O mecanismo de ação, ainda não esclarecido, parece estar relacionado com as alterações morfofisiológicas dos macrófagos, neutralização de fatores de transcrição (com consequente minimização da síntese de citocinas,

metaloproteases, moléculas de adesão e síntese de imunoglobulinas), redução da capacidade fagocítica de células polimorfonucleares, dentre outros. São apresentados em formulações para administração intramuscular (aurotiomalato e aurotioglicose) e oral (auranofina). Sua excreção ocorre pelas vias urinárias (66%) e nas fezes (33%).

9.7.4. Uso de Anticorpos Monoclonais (mABs)

Uma nova classe de imunofármacos apresentou grande avanço nas últimas décadas. A capacidade de síntese de imunoglobulinas específicas possibilitou a interferência direta em uma série de moléculas envolvidas na imunomodulação da resposta inflamatória em geral. São utilizados nas mais variadas patologias, seja como terapia pela própria ação do anticorpo, seja na utilização da ligação específica para direcionar outras moléculas para sítios específicos, possibilitando diagnósticos mais precisos e tratamentos que minimizam efeitos graves sistêmicos, sendo muito utilizados no câncer. Ao lado são relacionados os principais mABs com descrição de seus principais usos clínicos.

Todas as possibilidades terapêuticas aqui descritas, de forma bastante resumida e simplificada, mostram o desenvolvimento e produção da indústria farmacêutica apoiada na evolução da pesquisa básica e aplicada dos processos inflamatórios. Certamente, muitos outros mediadores, mecanismos de ação e fármacos ainda virão, aumentando a compreensão e a capacidade de intervenção clínica visando melhor controle dos efeitos deletérios da inflamação e minimizando os efeitos adversos decorrentes do uso de terapias anti-inflamatórias.

Anticorpo Monoclonal	Ligante Alvo	Ação / Uso Clínico
Alemtuzumab	CD52	Ligante localizado em linfócitos T e B, células NK, monócitos, macrófagos e algumas subpopulações de granulócitos. É usado na leucemia linfoblástica crônica de células B por induzir morte celular através de lise mediada por anticorpo.
Bevacizumab	VEGF (fator de crescimento de endotélio	Usado por suas propriedades antiangiogênicas em tumores e aprovado no tratamento de câncer coloretal metastático.
Cetuximab	EGFR (receptor de fator de crescimento	Inibe crescimento de células tumorais pela redução de atividade de quinases, atividade de metaloproteases de matrix, produção de fatores de crescimento e indução de apoptose.
Gemtuzumab	CD33	Ligante é uma proteína de adesão ao ácido siálico da matrix extracelular encontrado em blastos leucêmicos em quase todos os pacientes com leucemia mielóide aguda. Apresenta atividade anti-blástica e é usado para conjugar outros
Rituximab	CD20	Ligante presente em células B normais e tumorais. Aprovado para uso em linfoma de células B não-hodgkin por seus efeitos líticos (dependente de complemento) e indução de citotoxicidade mediada por anticorpo e apoptose.
Trastuzumab	HER-2 (receptor de fator de crescimento	Usado no tratamento de câncer de mama metastático em que as células expressem altos níveis de HER-2
Arcitumomab	CEA (Antígeno carcinoembriogênico)	É conjugado com isótopo radioativo para exames de imagem em pacientes com carcinoma coloretal metastático (imunocintilografia)
Ibritumomab	CD20	Conjugado com Ítrio radioativo. A radiação pelo isótopo aumenta a atividade antitumoral. Aprovado para uso em linfoma de células B não-hodgkin.
Nofetumomab	Liga-se a antígeno (40 KDa) de vários tipos celulares tumorais	Conjugado com isótopo radioativo para exames indicativos de extensão de lesão em pacientes com câncer de pulmão
Adalimumab	TNF-α	O bloqueio da ligação do TNF-α ao seu receptor na superfície de células inflamatórias minimiza a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 e IL-6 e moléculas de adesão que ativam e promovem migração de leucócitos. São usados na terapia para artrite reumatóide, doença de Crohn e colite ulcerativa.
Etanercept		
Infliximab		
Abatacept	Anticorpo monoclonal fusionado com o domínio extracelular de CTLA-4	Bloqueia ação de CD80 e CD86 na liberação de citocinas pelas células T (promovida pela ligação de CD28 a esses receptores). É aprovado para uso em pacientes com artrite reumatóide severa não-responsiva aos demais tratamentos.
Alefacept	Anticorpo monoclonal fusionado com o ligante CD2 para LFA-3	Liga-se ao CD2, impedindo a interação normal CD2 / LFA-3, conduzindo à redução do número de células T circulantes que predominam nas placas de psoríase
Basiliximab	CD25	Tem como ligante e receptor de IL-2 em linfócitos ativados. Reduz os efeitos proliferativos e estimulatórios decorrentes da ação de IL-2. É usado na profilaxia de rejeição de transplantes renais em associação a outros agentes imunossupressores.
Daclizumab		
Efalizumab	CD11a	Inibe a interação de LFA-1 com a molécula de adesão ICAM-1, minimizando, ativação e migração leucocitária. Usado no tratamento de psoríase severa.
Omalizumab	IgE	Inibe os efeitos da IgE sobre seu receptor Fcε em basófilos e mastócitos, minimizando a liberação de histamina e leucotrienos por estas células. Usado no tratamento da asma alérgica não-responsiva a corticosteróides inalatórios.

10. TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA O ESTUDO DA IMUNOFARMACOLOGIA

ANA CAROLINE COSTA SILVA

As interações entre antígeno-anticorpo perfazem a base de muitas técnicas de imunodetecção, onde se utiliza a alta especificidade e a estabilidade da ligação entre eles como ferramenta para pesquisa e diagnósticos, através da identificação, isolamento, quantificação e classificação de diversos antígenos e anticorpos.

As características mais importantes da reação antígeno-anticorpo são: (1) a **especificidade**, que é a capacidade do anticorpo de reagir somente contra seu imunógeno, distinguindo-o de outros antígenos; (2) a **quantidade de anticorpo** produzida, determinada pela quantidade de células B envolvidas na resposta, taxa de síntese e persistência desses anticorpos no plasma e fluido extracelular. Este último está relacionado com outra característica importante da reação que é (3) o tipo de **isotipo** envolvido. Cada isotipo tem função e meia-vida *in vivo* distinta; (4) a **afinidade** que é a força de ligação entre um sítio de combinação de anticorpo e um determinante antigênico.

As técnicas de imunodetecção podem utilizar anticorpos policlonais ou monoclonais, que são obtidos, respectivamente, por imunização de um animal e purificação de anticorpos de especificidades distintas, ou imunização e seleção de anticorpos idênticos com uma única especificidade através do uso de hibridomas.

Alguns ensaios podem medir a ligação direta entre antígeno e anticorpo, ou avaliar fenômenos secundários a essa interação resultantes da multivalência de anticorpos e antígenos, como a precipitação (quando o antígeno é solúvel), a aglutinação (quando o antígeno é particulado) ou a ativação do complemento.

As reações de precipitação (imunodifusão dupla, imunodifusão radial e imunoeletroforese) podem ser usadas em diagnóstico de doenças como cisticercose, na dosagem e caracterização de proteínas séricas, dentre outros. Já as reações de aglutinação (hemaglutinação direta e indireta, inibição da aglutinação e teste de Coombs) podem ser utilizadas na tipagem sangüínea, diagnóstico de doenças como tripanossomose, teste de gravidez pela detecção de hCG na urina, detecção de incompatibilidade de Rh que pode levar ao desenvolvimento da eritroblastose fetal, dentre outros. As reações de ativação de complemento podem ser utilizadas, por exemplo, na tipagem de antígeno leucocitário humano – HLA em situações de transplante, onde células do doador são incubadas com soro do receptor. Após adicionar moléculas do complemento observa-se a lise ou não das células através de ensaios de viabilidade.

Nesta seção serão descritas técnicas de imunoensaio clássicas de reação antígeno-anticorpo cujos sistemas de detecção envolvem o uso de enzimas, fluorocromos ou isótopos.

10.2. Citometria de fluxo e FACS (separador de células ativado por fluorescência)

10.2.1. Conceito

A citometria de fluxo consiste em um método multiparamétrico de análise fenotípica de células ou outras partículas biológicas em suspensão, previamente marcadas com fluorocromos.

Diversas partículas podem estar sujeitas à análise por citometria de fluxo como célula eucariótica, organelas citoplasmáticas, cromossomos, células agregadas (ex: células tumorais), bactérias, fungos, protozoários, complexos imunes, dentre outros.

A técnica é baseada na passagem forçada de partículas, envoltas e centralizadas em um fluxo contínuo de líquido condutor (*sheath fluid*) por uma câmara de células (*flow cell*), de forma que as mesmas permaneçam enfileiradas, sendo interceptadas por um laser, uma de cada vez. A interceptação pelo laser fornece informações acerca dessas partículas, baseada em dois tipos de fenômenos físicos. O primeiro consiste no espalhamento de luz (*scatter*) de acordo com as características morfológicas e estruturais da célula. Inicialmente, o desvio

frontal (*Foward Scatter* – FS) da luz, através do fenômeno de difração e refração, é detectado por um sensor de fotodiodo que proporciona a informação sobre o tamanho (volume) celular. Em seguida, um fotomultiplicador (PMT) fornece, através do desvio lateral (*Side Scatter* – SS) da luz, por um fenômeno de dispersão, a informação de granulosidade celular.

O segundo fenômeno explorado pela citometria é o da emissão de fluorescência quando um fluorocromo é excitado em um determinado comprimento de onda. Esta fluorescência emitida pelas partículas previamente marcadas é captada também por PMTs, e tanto os sinais de luz dispersa quanto fluorescentes, serão convertidos em pulsos elétricos que serão amplificados, digitalizados e enviados para o computador. A análise quantitativa e interpretação dos dados podem ser então realizadas através de *softwares* específicos.

A seleção e captação dos sinais luminosos são feitas através do uso de filtros ópticos, que bloqueiam ou refletem determinados comprimentos de onda incidentes, deixando passar somente o comprimento de onda desejado.

A maioria dos citômetros de fluxo, aparelhos responsáveis pela leitura das amostras, e equipado com lasers de luz estável monocromática e de alta potência. O laser mais utilizado é o de íon argônio, por possuir uma potência de 488 nm, que é o comprimento de onda muito utilizado para a excitação de vários fluorocromos usualmente empregados. Os citômetros equipados com mais de um laser, como os de UV ou Hélio-neônio (He-Ne), aumentam sua capacidade de análise de múltiplas possibilidades de características celulares e/ou componentes celulares de um elevado número de células de forma individual (análise multiparamétrica).

Em geral, os parâmetros considerados básicos e que podem ser medidos simultaneamente são: o tamanho celular (FSC), a granulosidade interna das células (SSC) e os parâmetros de fluorescência, onde todo citômetro possui no mínimo os canais de fluorescência verde (FL1), de fluorescência amarela (FL2), de fluorescência laranja (FL3) e, na maioria também é encontrado o de fluorescência vermelha (FL4).

O esquema básico de um citômetro de fluxo está ilustrado na Fig. 10.1.

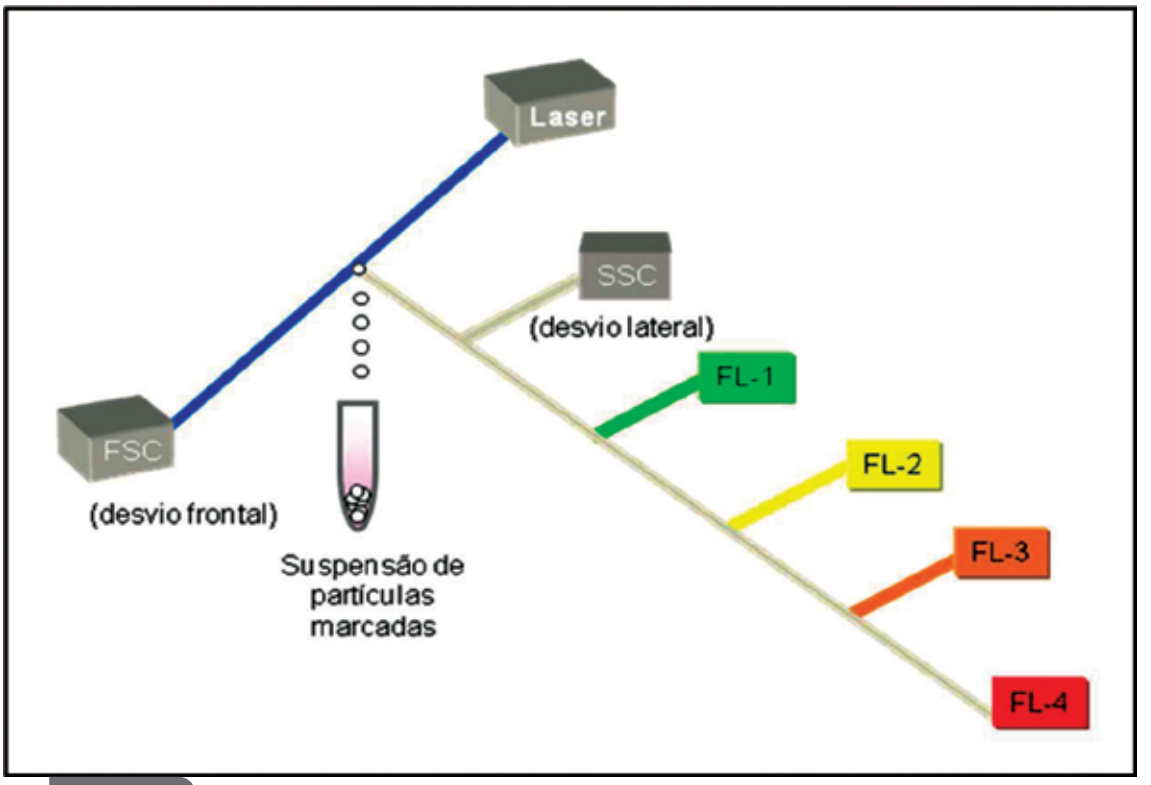


Fig. 10.1 Representação esquemática do princípio da técnica de citometria de fluxo.

10.2.2. Preparo das amostras

Para análise mono ou multiparamétrica, acerca da estrutura, função e viabilidade das células, é necessário que essas amostras estejam marcadas com corantes fluorescentes, de espectros de excitação e de emissão conhecidos. Esses fluorocromos podem estar acoplados a anticorpos com especificidade conhecida para uma determinada molécula, inseridos não covalentemente a determinadas estruturas, ou ainda podem ser empregados para estimar propriedades do ambiente que se encontram através da variação de seu espectro de excitação ou emissão em função das características do meio.

Abaixo estão exemplificados alguns fluorocromos que são utilizados frequentemente na citometria, com seus respectivos espectros de excitação e de emissão (Tabela 1), ou ainda os traçadores fluorescentes que

estudam a fisiologia de células vivas e são excitados especialmente a 488 nm (laser de argônio) (Tabela 2).

Fluorocromo	Comprimento de onda de excitação (nm)	Comprimento de onda de emissão (nm)
FITC	495	519
Texas Red	589	615
PerCP	490	675
Rodamina	540	625
PE	480;565	578
PE-Cy5	480;565	670
Corantes de núcleo		
Hoescht 33342	340	450
DAPI	350	470
Iodeto de Propídeo (PI)	536	623
TOTO – 1	514	533
7 – aminoactinomicina D	595	655

Tabela 10.1 Comprimento de onda de excitação e emissão dos fluorocromos que são usualmente empregados.

Propriedade biológica analisada	Corante
Influxo de cálcio após estímulo (a intensidade da fluorescência está relacionada com a concentração de cálcio intracelular)	Indo-1, Fura-2, Fluo-3
Medida de pH intracelular	SNARF-1
Influxo de sódio	Sodium green
Detecção de fosfolipase A após estímulo	Fosfolipídeo sintético bis-BODIPY
Potencial de membrana celular	$DiBaC_4$ (bis-oxonol)

Tabela 10.2 Alguns traçadores fluorescentes para análise da fisiologia de células vivas.

As marcações das amostras onde se utilizam anticorpos podem ser feitas de forma direta com o uso de apenas um anticorpo já acoplado a um fluorocromo, ou indireta. Nessa última, as amostras são primeiramente marcadas com um anticorpo primário não acoplado ao fluorocromo, específico para o antígeno, e em seguida adiciona-se um anticorpo secundário marcado com fluorocromo, que será responsável pelo reconhecimento da porção Fc do anticorpo primário (Fig. 10.2).

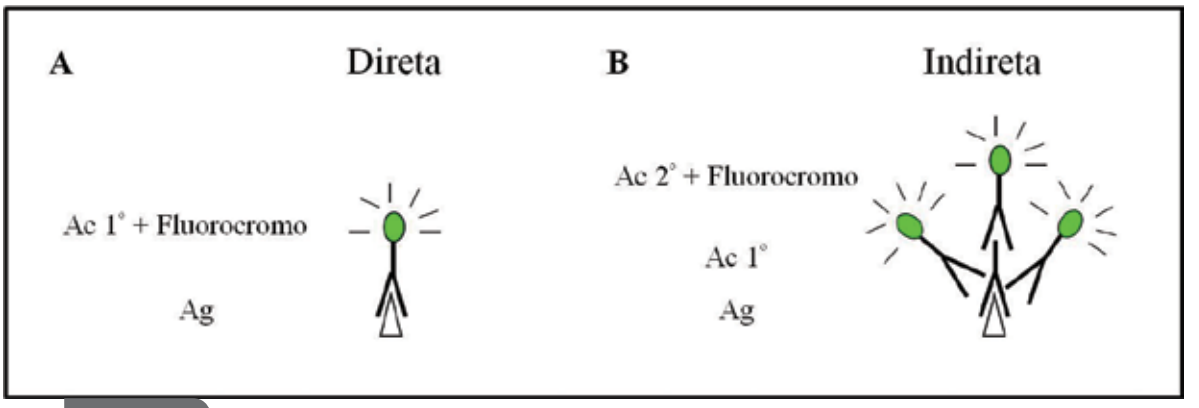


Fig. 10.2 Tipos de marcação. (A) Marcação direta; (B) Marcação indireta. Ac 1º- anticorpo primário; Ac 2º - anticorpo secundário; Ag – antígeno.

A marcação pode ainda ser simples, com o uso de apenas um fluorocromo, ou múltipla, onde as partículas são marcadas com dois ou mais tipos de fluorocromo para análise de mais de uma característica (Fig. 10.3).

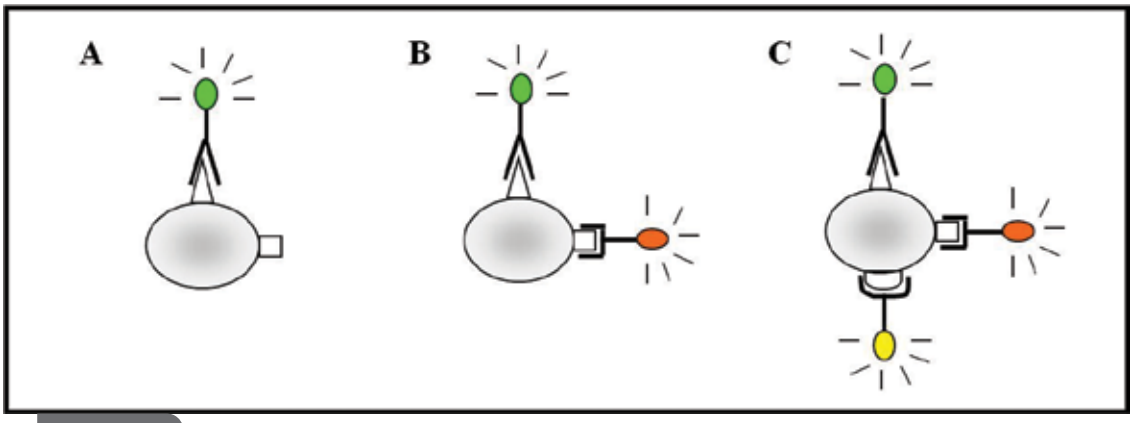


Fig. 10.3 Tipos de marcação. (A) marcação simples; (B) marcação dupla; (C) marcação múltipla.

As diferenças nos espectros de fluorocromos distintos é que permite o uso de diferentes fluorocromos, de acordo com o que se quer observar, na mesma aplicação.

10.2.3. Análise dos dados

Após a aquisição, a análise dos dados pode ser feita através do uso de *softwares* específicos. Os dados podem então ser expressos das seguintes formas:

a) Citogramas de pontos (*dot plot*) e contorno (*countour plot*), em duas ou três dimensões, para a análise de dados bivariantes (histogramas biparamétricos),

sejam eles de tamanho (FSC) x granularidade (SSC), para análise morfológica da população a ser estudada ou duas fluorescências para as combinações possíveis das características que se desejem analisar.

b) Histogramas simples de cada parâmetro - dados univariantes (histogramas monoparamétricos);

A Fig. 10.4 mostra algumas representações sobre esses tipos de análise:

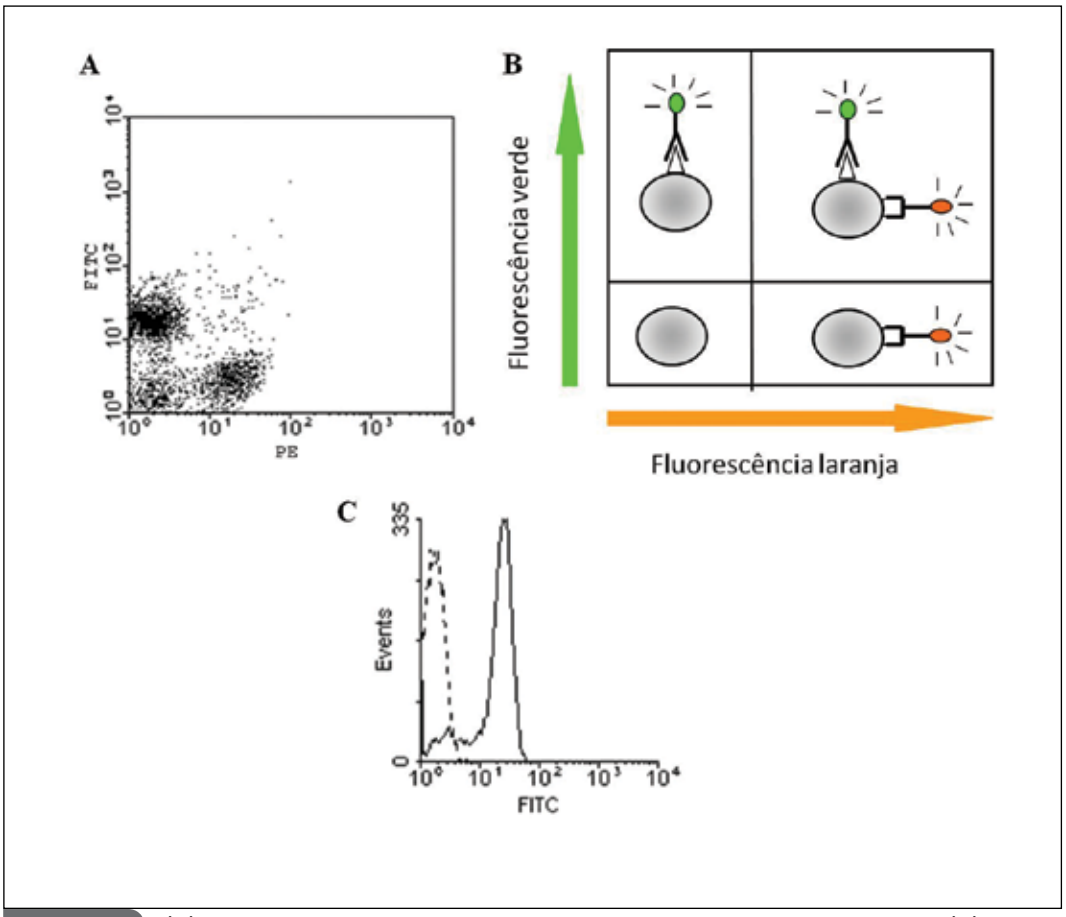


Fig. 10.4 (A) Representação de um *dot plot* para análise morfológica de células; (B) Representação de um histograma biparamétrico, tendo como base a Fig. 10.4A; (C) representação de um histograma monoparamétrico para análise de fluorescência.

10.2.4. Aplicações

Os avanços na ciência e tecnologia têm contribuído muito para o uso da citometria de fluxo em muitas áreas como na hematologia, farmacologia, microbiologia, genética, oncologia, e principalmente, na imunologia.

Uma lista extensa e crescente de características fenotípicas podem ser medidas através da técnica de citometria de fluxo como o tamanho e complexidade morfológica das células, conteúdo de DNA e RNA, receptores de superfície celular, apoptose (quantificação, medidas de degradação do DNA e RNA, potencial de membrana mitocondrial, atividade de caspase), viabilidade celular, produção intracelular de citocinas, dentre outros.

As aplicações são diversas, podendo ser realizados experimentos de imunofenotipagem e caracterização de subpopulações celulares, análise de graus de maturação e ativação celular, análise de quimiotaxia, degranulação e catabolismo em resposta a estímulos, medida de conteúdo de DNA para estudo de ploidia, ciclo celular; caracterização de cromossomos e detecção de morte celular; diagnóstico de doenças como leucemias e linfomas, monitoração laboratorial da infecção por HIV, testes de citotoxicidade analisando-se o efeito de drogas sobre células, dentre outras aplicações.

10.2.5. *Sorting*

Além da análise multiparamétrica, alguns citômetros também são capazes de separar (*sorting*) uma determinada população celular ou outras partículas biológicas de acordo com parâmetros pré-estabelecidos. Esta separação pode ser baseada em propriedades morfológicas, bioquímicas ou funcionais dessas partículas.

A técnica de *sorting* baseia-se no uso da eletrostática para carregar e defletir uma gota contendo a partícula a ser analisada após sua passagem através de um campo elétrico. Esta gota forma-se, no filete único que passa pela *flow cell*, através de vibrações ultrassônicas que ocasionam perturbações no fluxo, de forma que uma única célula se encontre em seu interior. Através de critérios pré-estabelecidos essas gotas receberão ou não, cargas positivas ou negativas, que serão defletidas para a direita ou para a esquerda, caindo em tubos coletores (Fig. 10.5).

Como essas células não sofrem nenhum dano durante o processo, elas podem ser reutilizadas para cultura, ou até mesmo para clonagem, onde uma única partícula é dispensada em um poço de uma placa de microtitulação (autoclone). Com isso, essa técnica pode ser utilizada para diversos fins: produção de anticorpos monoclonais através do clone de uma única célula de hibridoma; seleção de células progenitoras na busca de células totipotentes; purificação de diferentes linhagens de amostras de medula óssea; *sorting* de células transfectadas com um marcador de expressão, tipo proteína fluorescente verde (GFP); isolamento multiparamétrico de células de uma população mista; dentre outras.

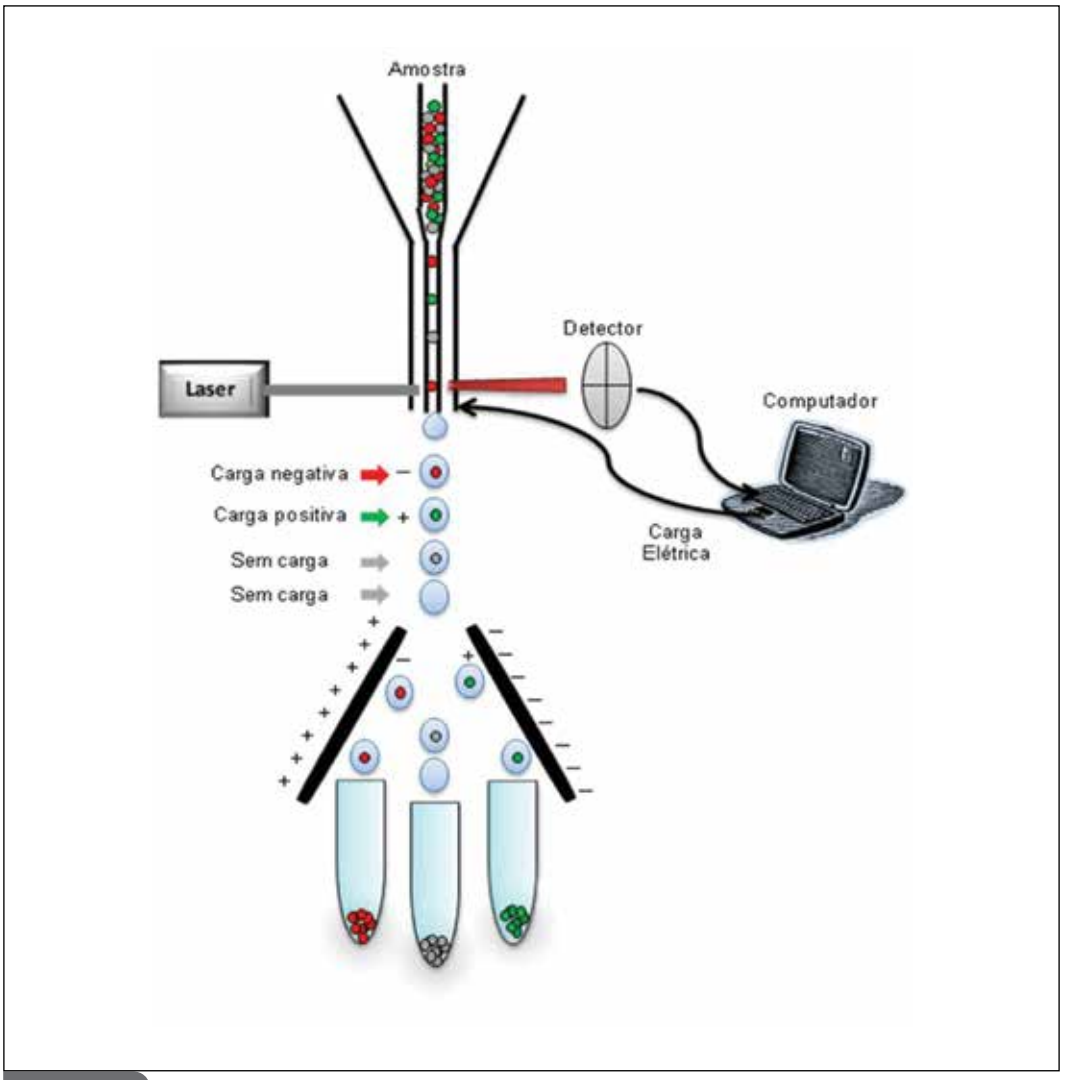


Fig. 10.5 Representação esquemática do princípio da técnica de *cell sorting*. As células foram marcadas com anticorpos específicos de interesse conjugados a fluorocromos

verde e vermelho. As células após passarem por um fluxo contínuo são interceptadas por um laser e este é detectado por PMTs que levam a informação da fluorescência para o computador e este emite então uma carga elétrica correspondente a cada cor, positiva ou negativa. As gotas eletricamente carregadas são então defletidas de acordo com sua carga, sendo dispensadas em tubos coletores específicos. As gotas não carregadas eletricamente ou com partículas não marcadas passam diretamente pelos defletores.

10.3. Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência possui muitas características em comum com a técnica de citometria de fluxo, excetuando-se principalmente o fato de que a primeira pode ser usada para detectar estruturas, moléculas ou proteínas em uma célula fixada em um substrato (lamínulas), assim como tipos específicos de célula em um tecido, entre outras possibilidades que não o uso de células em suspensão. Uma das grandes vantagens da imunofluorescência é que esta permite detectar a localização e distribuição relativamente precisa do antígeno.

A imunofluorescência, assim como a citometria de fluxo, pode ser tanto direta como indireta. A primeira é usada na detecção de antígenos em preparos de amostras clínicas como urina, fezes, sangue ou mesmo em cortes de tecidos, como no caso de doenças dermatológicas. A imunofluorescência direta também é utilizada na fenotipagem de células e tecidos, através da análise de marcadores específicos. Já a imunofluorescência indireta é empregada no diagnóstico sorológico de várias doenças infecciosas como a doença de Chagas, a SIDA/AIDS, as hepatites e complexos em doenças autoimunes.

A técnica de imunofluorescência, assim como a de citometria, também pode ser baseada no uso de anticorpos marcados com fluorocromos, uso de moléculas fluorescentes que por si próprias já atuam como marcadores diretos ou sondas para estruturas específicas, ou ainda pode haver o uso de proteínas de fusão, na qual a proteína de interesse é ligada geneticamente a uma proteína fluorescente. A primeira proteína fluorescente a ser descrita foi a GFP, mas recentemente, outras proteínas fluorescentes já foram identificadas, tendo como exemplos a proteína fluorescente amarela (abreviatura do inglês: YFP), a vermelha (RFP), entre outras. A observação das amostras marcadas é feita através do uso de um microscópio de fluorescência, que pode ser tanto de luz transmitida (microscó-

pio de transiluminação) quanto de luz refletida (microscópio de epiluminação), equipado com a fonte de luz necessária para a excitação do fluorocromo (normalmente lâmpadas de tungstênio e arco de mercúrio), e um sistema de filtros e espelhos dicróicos que permitirão a efetiva separação dos comprimentos de onda de excitação e emissão desse fluorocromo (Fig. 10.6).

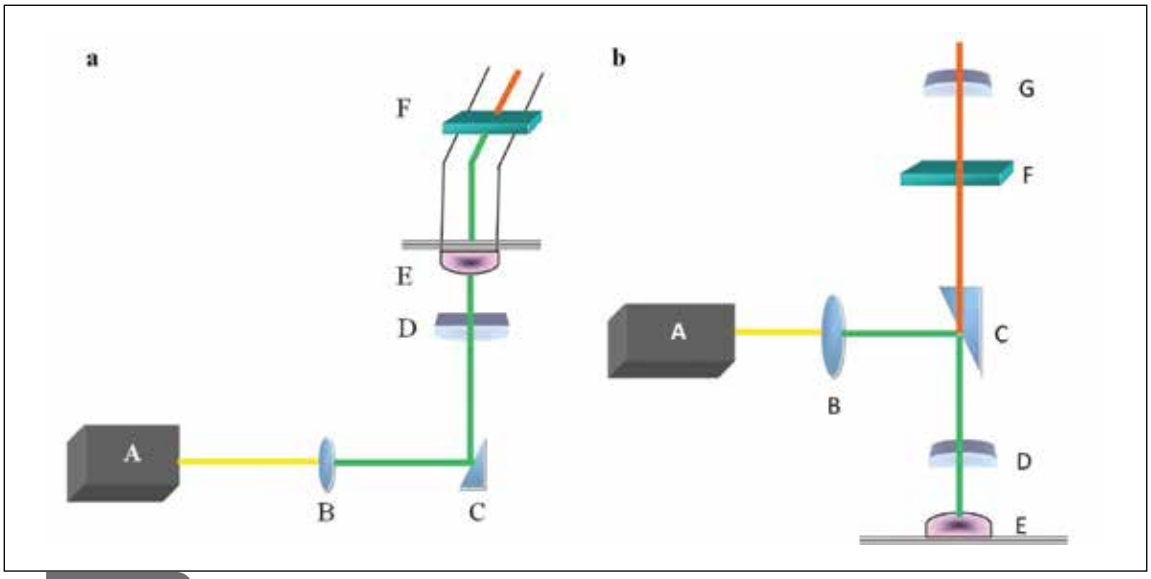


Fig. 10.6 Tipos de microscópios de fluorescência. Em (a) Microscópio de transiluminação (luz transmitida). (b) Microscópio de epiluminação (luz refletida). A – fonte de luz (lâmpadas ou laser UV); B – filtro de excitação; C - Espelho dicróico; D - condensadores e objetiva; E - Amostra; F - Filtro de barreira (de emissão); G – Ocular.

O desenvolvimento do microscópio confocal permitiu a obtenção de imagens com uma melhor resolução já que este é capaz de eliminar a luz fora de foco e claridade proveniente de amostras cuja espessura excede o plano imediato do foco. Com isso a microscopia confocal oferece vantagens em relação à microscopia de fluorescência convencional: possui a capacidade de controlar a profundidade do campo, com eliminação ou redução das informações fora do plano focal; e permite a coleta de secções óticas seriadas de amostras espessas, podendo obter uma reconstrução tridimensional das mesmas.

10.4. Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima (ELISA)

10.4.1. Conceito

O ELISA é um ensaio imunoenzimático que visa a análise qualitativa ou quantitativa da ligação antígeno-anticorpo. Dependendo do seu uso, pode detectar antígenos (hormônios, citocinas, enzimas, antígenos microbianos, drogas ilícitas) ou anticorpos (anti-HIV, por exemplo) em fluidos corporais ou sobrenadantes de culturas. É um método simples, específico, altamente reproduzível e que é baseado no uso de anticorpos acoplados a enzimas que serão responsáveis pela conversão colorimétrica do substrato enzimático incolor em um produto colorido que será lido por um espectrofotômetro. As enzimas marcadoras mais utilizadas são a catalase, a glucose-oxidase, α-galactosidase, a fosfatase alcalina e a peroxidase. A reação de ELISA ocorre em placas de 96 poços cobertas com antígeno purificado (se for para detecção ou quantificação de anticorpo) ou anticorpo purificado (se for para detecção ou quantificação de antígeno).

Há dois tipos principais de ELISA: o indireto e o direto (ou de captura, ou sanduíche).

a) ELISA indireto

É o método mais simples usado para a detecção de um anticorpo específico em um anti-soro desconhecido. Como mostrado na Fig. 10.7, as placas são cobertas com antígeno purificado (que se ligam não-covalentemente) seguido de lavagem para retirada dos antígenos em excesso. A realização da etapa de bloqueio com proteínas inertes para impedir que ocorram ligações inespecíficas na placa é essencial. O anti-soro a ser testado é então adicionado sendo feita uma nova lavagem para retirada do excesso. Em seguida, há a adição de anticorpos anti-imunoglobulinas, que se ligarão ao anticorpo específico para o antígeno. Nova lavagem é realizada, com posterior adição do substrato. Esse, pela ação da enzima acoplada ao anticorpo secundário, será convertido em um produto colorido, cuja absorbância será lida em um espectrofotômetro.

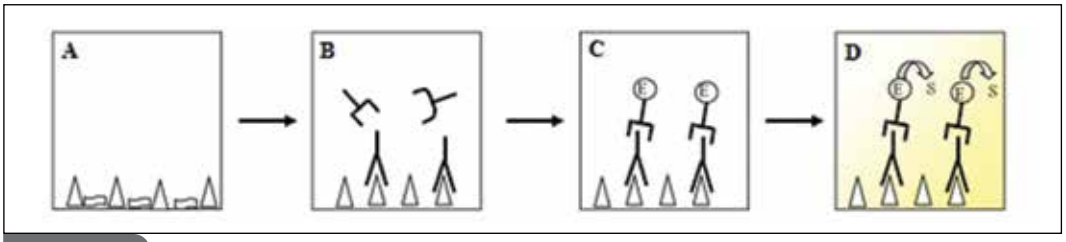


Fig. 10.7 ELISA indireto. (A) placa coberta com antígenos e bloqueada; (B) adição da amostra a ser testada; (C) adição de anticorpo acoplado a enzima; (D) adição do substrato (S) e mensuração da cor.

b) ELISA direto (captura ou sanduíche)

Esse método é muito similar ao do ELISA indireto, porém a placa é coberta com um anticorpo específico para captura de determinado antígeno. Após a adição do mesmo, outro anticorpo acoplado a uma enzima é então adicionado. Este se ligará a um determinante antigênico distinto do primeiro anticorpo. A absorbância produzida está em função da concentração do antígeno na amostra teste. A especificidade do método dependerá das especificidades dos anticorpos utilizados para cobrirem a placa e detectarem o antígeno e a sensibilidade do teste dependerá das afinidades e quantidades do primeiro anticorpo preso à placa. A Fig. 10.8 representa um esquema desse tipo de ELISA.

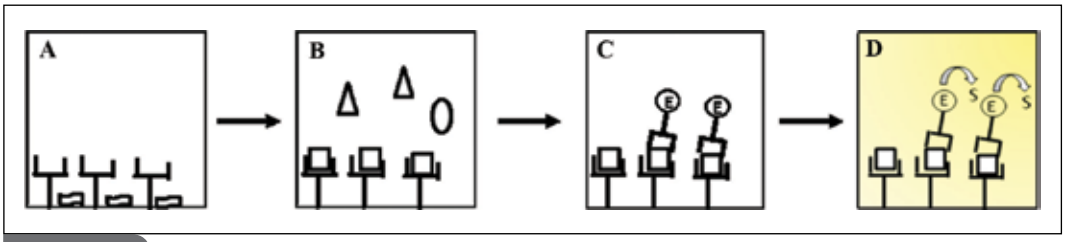


Fig. 10.8 ELISA direto. (A) placa coberta com anticorpos específicos e bloqueada; (B) adição da amostra a ser testada; (C) adição de anticorpo acoplado a enzima; (D) adição do substrato (S) e mensuração da cor.

10.4.2. Análise dos dados

A leitura no espectrofotômetro fornece os dados em função da absorbância das amostras, que é convertida em concentração através da comparação com uma curva padrão, estabelecida a partir de amostras cujas concentrações são conhecidas (Fig. 10.9).

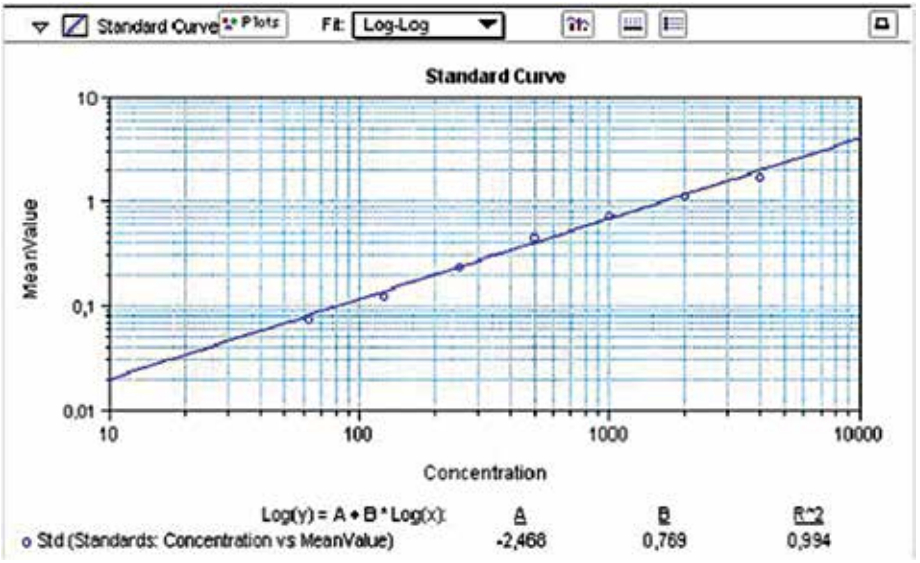


Fig. 10.9 Curva padrão obtida de um do programa "SOFTmax Pro" . No eixo Y encontram-se os valores da absorbância das amostras e no X os valores da concentração

10.5. *Immunoblotting* (*Western blotting*)

O *Western blotting* é um método utilizado para detecção de proteínas em um lisado celular ou em um extrato de tecido biológico.

A técnica consiste de uma etapa inicial onde as proteínas do lisado são submetidas a um tratamento com dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente aniônico que rompe ligações não-covalentes penetrando na proteína e abrindo-a, conferindo à mesma carga negativa. Em seguida, essas proteínas são submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e, uma vez que essas proteínas possuem a mesma carga, sua separação ocorre em função do seu peso molecular. Assim, quanto menor a molécula, maior a distância percorrida, já que estas terão maior facilidade de passar por entre os poros formados no gel.

Após a eletroforese, as proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde serão identificadas através do uso de anticorpos específicos, que irão se ligar às bandas correspondentes a cada antígeno. Em seguida, é usado um anticorpo secundário marcado com radioisótopos ou com enzimas. A revelação então é feita através da focalização de uma reação colorimétrica ocasionada pela enzima, ou através da exposição da membrana de nitrocelulose a um filme fotográfico, que revelará o anticorpo marcado com radioisótopo.

A Fig. 10.10 apresenta um desenho esquemático da técnica de *Western blotting*, tendo como exemplo a detecção de proteínas do núcleo de um extrato celular.

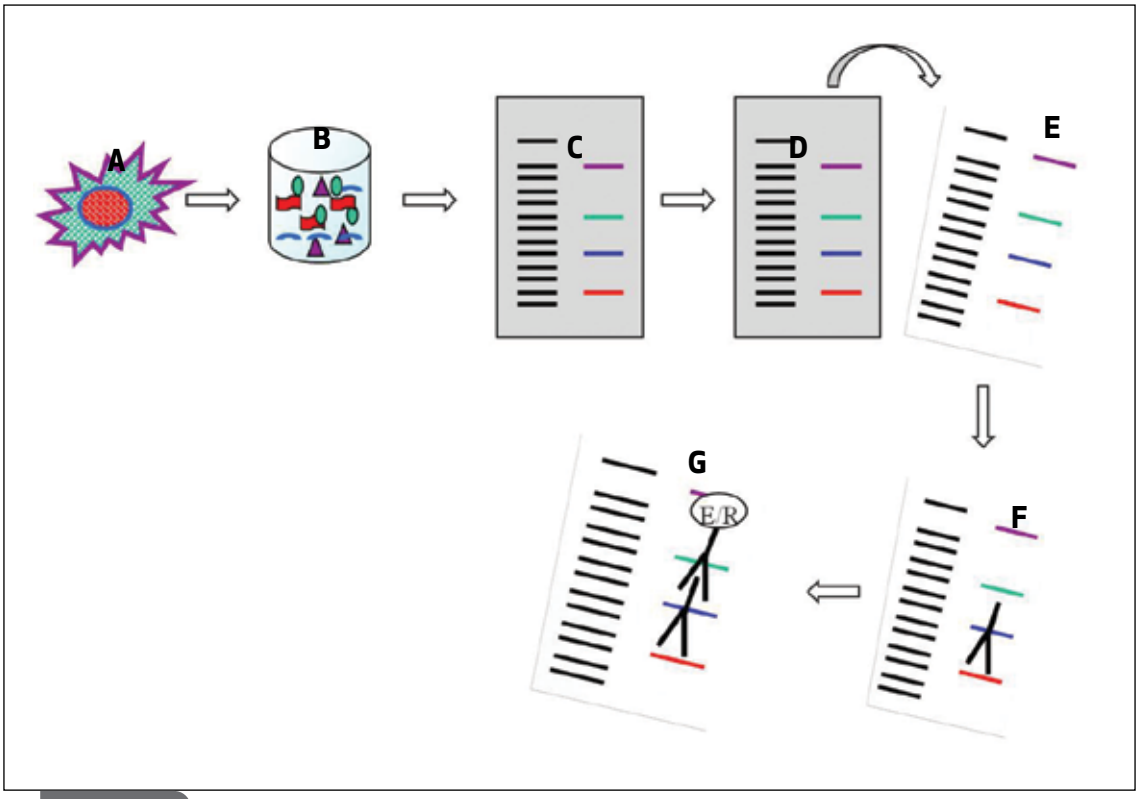


Fig. 10.10 Representação esquemática do princípio da técnica de *Western blotting*. (A) Uma célula representativa de uma amostra de cultura celular com as respectivas proteínas da membrana celular (▲), do citoplasma ( ), da membrana nuclear ( ) e do núcleo (▬); (B) Extrato celular; (C) Separação protéica por eletroforese em gel de poliacril amida; (D) Transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose; (E) Marcação com anticorpo específico para uma proteína do núcleo; (F) Marcação com anticorpo secundário acoplado à uma enzima ou radioisótopo (E/R); (G) Revelação da proteína de interesse.

É indicado que o experimento seja realizado também para uma proteína estrutural, como actina ou tubulina, que não devem ser moduladas entre as amostras. Dessa forma, é possível a normalização dos dados em sua função.

O *western blotting* tem diversas aplicações em diagnóstico clínico e pesquisa básica, exemplificando-se a confirmação do diagnóstico de HIV através da detecção do anticorpo anti-HIV em amostra de soro humano e fenotipagem celular e tecidual, através da identificação de vários marcadores.

Referências bibliográficas

Abbas, A. K & Lichtman A.H. 2005. *Imunologia Celular e Molecular*. 5ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro, RJ.

Bailey, M., Christoforidou, Z., & Lewis, M. 2013. Evolution of immune systems: specificity and autoreactivity. *Autoimmun. Rev*.12(6):643-647.

Barnes, P.J., Blasi, F., Ward, B., Reeves, E., Rabe, K.F. 2014. Respiratory diseases in the world: one voice 'united for lung health'. *Eur Respir J*. 43: 3–5.

Bozzano, F., Marras, F., & De Maria, A. 2014. Immunology of tuberculosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. doi: 10.4084/MJHID.2014.027.

Buxton, I.L. 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics: the dynamics of drug absorption, distribution, action and elimination. In: *Goodman & Guilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11ª ed. J.L. Brunton, J.S. Lazo e K.L. Parker, McGraw-Hill, Nova York, EUA. p.1-39.

Colley D.G. Bustinduy A.L., Secor, W.E., King, C.H. 2014.Human schistosomiasis. *Lancet*. 383(9936): 2253–2264.

Davis, G.S., Holmes, C.E., Pfeiffer, L.M., Hemenway, D.R. 2001. Lymphocytes, lymphokines and silicosis. *JEPTO*. 20(1):53 – 65.

Davis J.M. & Ramakrishnan L. 2009.The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* 136(1):37-49.

Desmoulière, A., Chaponnier, C., Gabbiani, G. 2005. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*. 13(1):7-12. Review.

El Ridi, R., Tallima, H., Dalton, J.P., Donnelly, S. 2014. Induction of protective immune responses against schistosomiasis using functionally active cysteine peptidases. *Front Genet*. 5:119. doi: 10.3389/fgene.2014.00119. eCollection 2014.

Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R.K., Kitani, A. 2006. IL-13 signaling thougth the IL-13a2 receptor is involved in induction of TGF-b1 production and fibrosis. *Nature Medicine*. 12(1):99 – 106.

Flajnik, M.F. & Kasahara, M. 2010. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature Genetics*. 11:47-59.

Flajnik, M.F., Miller, K., Pasquier L.D. 2003. Evolution of the Immune System. In: *Fundamental Immunology*. 5ª ed. Paul, W.E. Lippincott Williams & Wilkins, Filadélfia, EUA. p. 519-570.

Giacomini, K.M. & Sugiama, Y.A. 2006. Membrane transporters and drug response. In: *Goodman & Guilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11ª ed. J.L. Brunton, J.S. Lazo e K.L. Parker, McGraw-Hill, Nova York, EUA. p.41-70.

Gonzalez, F.J. & Tukey, R.H. 2006. Drug metabolism In: *Goodman & Guilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11ª ed. J.L. Brunton, J.S. Lazo e K.L. Parker, McGraw-Hill, Nova York, EUA. p. 71-91.

Hamilton Jr, R.F., Thakur, S.A., & Holian, A. 2008. Sílica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med*. 44(7):1246-1258.

Henao-Tamayo, M., Ordway, D.J., & Orme, I.M. 2014. Memory T cell subsets in tuberculosis: What should we be targeting? *Tuberculosis* (Edinb). doi: 10.1016/j.tube.2014.05.001.

Holgate, S.T. 2008. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. 38: 872-897.

Joshi, S.K., Lang, M.L. 2013. Fine tuning a well-oiled machine: Influence of NK1.1 and NKG2D on NKT cell development and function. *Int. Immunopharmacol*. 17: 260-266.

Kolaczkowska, E., & Kubes, P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 13:159-175.

Litman, G.W., Rast, J.P., & Fugmann, S.D. 2010. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 10(8): 543–553.

Mannaioni, P.F., Di Bello, M.G., & Masini, E. 1997. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res*. 46(1):4-18.

Manoury, B., Nénam, S., Guénon, I., Lagente, V., Broichot, E. 2007. Influence of early neutrophil depletion on MMPs/TIMP-1 balance in bleomicin-induced lung fibrosis. *Int Immunopharmacol*. 7:900 – 911.

Margulies, D.H. & McCluskey J. 2003. The major histocompatibility complex and its encoded proteins. In: *Fundamental Immunology*. 5ª ed. Paul, W.E. Lippincott Williams & Wilkins, Filadélfia, EUA. p. 571-612.

Martins, M.A., Silva, P.M.R. & Carvalho, V.F. 2013. Bases da resposta inflamatória. In: *Dinâmica das Doenças Infecciosas e parasitárias*. 2ª ed. J. R. Coura, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. p. 7-22.

Maurer, M., Bader, M., Bas, M., Bossi, F., Cicardi, M., et al. 2011. New topics in bradykinin research. *Allergy*. 66(11):1397-406.

McHeyzer-Williams, M. 2003. B-cell signaling mechanisms and activation. In: *Fundamental Immunology*. 5ª ed. Paul, W.E. Lippincott Williams & Wilkins, Filadélfia, EUA. p.195-226.

Millan, M.J., Marin, P., Bockaert, J. et al. 2008. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends in Pharmacological Sciences*. 29(9):454–464.

Miyada, R., & van Eeden, S.F. 2011. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particle matter. *Toxicol Appl pharmacol*. 257:209-226.

Mossman, B.T., & Churg, A. 1998. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Resp Crit Care Med*. 157:1666 – 1680.

Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. 2008. *Janeway's Immunobiology*. 7ª ed. Garland Science, Taylor & Francis Group, Nova York, EUA.

O'Sullivan, S., Medina, C., Ledwidge, M., Radomski, M.W., Gilmer, J.F. 2014. Nitric oxide-matrix metalloproteinase-9 interactions: biological and pharmacological significance--NO and MMP-9 interactions. *Biochim Biophys Acta*. 1843(3):603-617.

Phan, S.H. 2008. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc*. 5(3):334 – 337.

Raymonda, J.R., Mukhinb, Y.V., & Gelasco, A. 2001. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacology & Therapeutics* 92:179 – 212.

Ritz, T., & Trueba, A.F. 2014. Airway nitric oxide and psychological processes in asthma and health: a review. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 112(4):302-308.

Scabilloni, J.F., Wang, L., Antonini, J.M., Roberts, J.R., Castranova, V., et al. 2005. Matrix metalloproteinase induction in fibrosis and fibrotic nodule formation due to silica inhalation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 288:L709 – L717.

Shapiro, H.M. Pratical Flow Cytometry. 2003. 4ª ed. John Wiley & Sons.Nova Jersey, EUA.

Skidgel, R.A. & Erdös, E.G. 2006. Histamine, bradykinin and their antagonists. In: *Goodman & Guilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11ª ed. J.L. Brunton, J.S. Lazo e K.L. Parker, McGraw-Hill, Nova York, EUA. p.629-651.

Smyth, E.M., Burke, A. & FitzGerald, G.A. 2006. Lipid-derived autacoids; eicosanoids and platelet-activating factor. In: *Goodman & Guilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11ª ed. J.L. Brunton, J.S. Lazo e K.L. Parker, McGraw-Hill, Nova York, EUA. p.653-670.

Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., Flavell R. 2012. Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 18;481(7381):278-86.

Terra Filho, M., & Santos, U.P. 2006. Silicose. *J Bras Pneumol*. 32(1): S41-S47.

Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., et al. 2011. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. Science. 331(6013):44-49

Weiss, A. & Samelson, L.E. 2003. T-lymphocyte activation. In: *Fundamental Immunology*. 5ª ed. Paul, W.E. Lippincott Williams & Wilkins, Filadélfia, EUA. p. 321-364.

Wilson, M.S., & Wynn, T.A. 2009. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol*. 2(2):103-121.

Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*. 80(5):617-653.