

FARMACOLOGIA

INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS - SISTEMA IMUNOLÓGICO

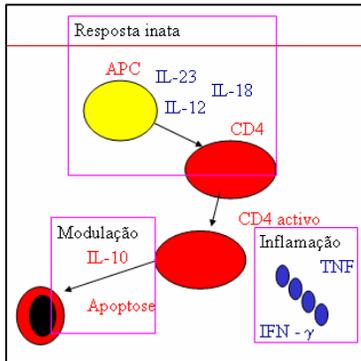
Professor Fernando Magro

2006/2007

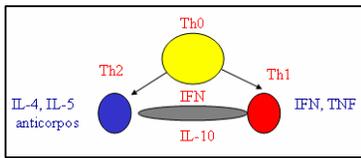
Aula desgravada por Filipa Costa e Joana Ferreira

NOTA: Dentro dos quadros a tracejado estão informações adicionais ou explicações do que o professor disse. A maioria dessa informação foi retirada do Goodman, que foi o livro que o professor aconselhou.

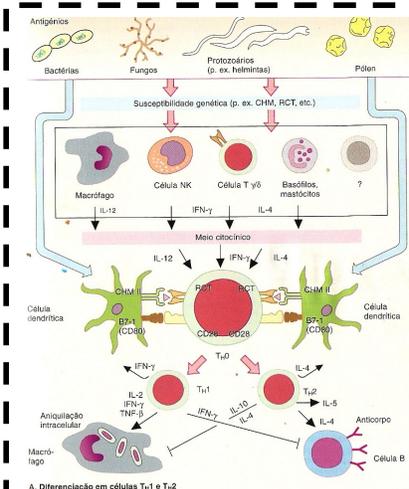
ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA



Na resposta inata há pelo menos duas células importantes: as APCs e as CD4. As células APC (células apresentadoras de antígenos) produzem duas interleucinas fundamentais para estimular as células CD4 (linfócitos T helper). As interleucinas produzidas pelas células APCs são a IL-12 e a IL-23. A célula CD4 fica então ativa, havendo produção de TNF e IFN γ , com resposta inflamatória. E nesta resposta, que corresponde a uma resposta a um estímulo antígeno ou a um determinado agente nocivo, há a modulação da resposta imunológica, havendo produção de IL-10 pelas células reguladoras. E há também mecanismos de apoptose nos próprios linfócitos, que entram em apoptose levando à diminuição da resposta inflamatória.

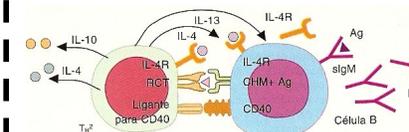


Conceito de imunologia clássica: resposta tipo Th1 e tipo Th2. As citocinas clássicas de Th1 são o IFN e TNF, e a IL2 por parte das APCs. Na resposta tipo Th2 há produção de IL4, IL5, TGF- β e anticorpos, particularmente IgE. Existe ainda modelação entre as duas subpopulações.

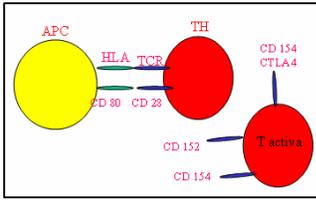


Devido ao meio predominantemente citocínico e às diferentes maneiras de apresentação de antígeno, a célula T helper nula (Th0), originalmente indeterminada, transforma-se em célula Th1 ou Th2. As células Th1 segregam principalmente IL-2, IFN- γ , TNF- β e GM-CSF, que levam, via activação macrofágica, a processos inflamatórios extensos que também permitem a eliminação de agentes patogénicos intracelulares. As células Th2 produzem principalmente IL-4 e IL-5 (entre muitas outras IL: 3, 6, 7, 8, 9, 10 e 14) e activam as células B para produção de anticorpos.

Ambos os grupos de células T helper são capazes de inibir a activação do outro grupo por meio das suas próprias citocinas. Assim, o IFN- γ inibe as células Th2, enquanto que a IL-10 impede a activação dos macrófagos e provoca uma marcada imunossupressão. Por outro lado, as citocinas características têm um efeito positivo, intensificador sobre a respectiva subpopulação. Por exemplo, a IL-2 actua sobre as células Th1 e a IL-4, sobre as células Th2.

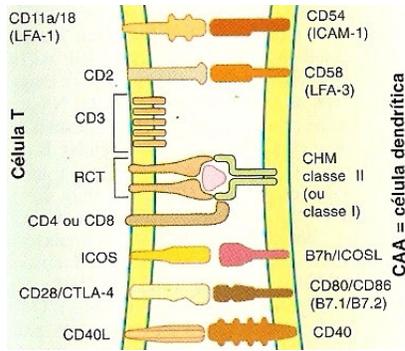


A célula Th2 desempenha um papel essencial na produção de IgE. A activação da célula B realiza-se através do sistema CD40/ligante do CD40. Ocorre aí libertação de IL-4, IL-13 e/ou de receptores solúveis de IL-4 que também contribuem para a produção IgE.



A modelação das APCs envolve obrigatoriamente dois estímulos: interacção entre TGF (por parte das células T) e o sistema HLA (APCs), e uma resposta conjunta entre CD28 e CD80. E é este fenómeno pós-estimulatório, que faz com que as células T *helper* sejam activadas. E depois da célula T estar activa há a produção de outros tipos de antígenios: o CD152 e CD154. Este CD154, também chamado CTLA4 é regulador das células T.

Moléculas implicadas na interacção célula T – APC



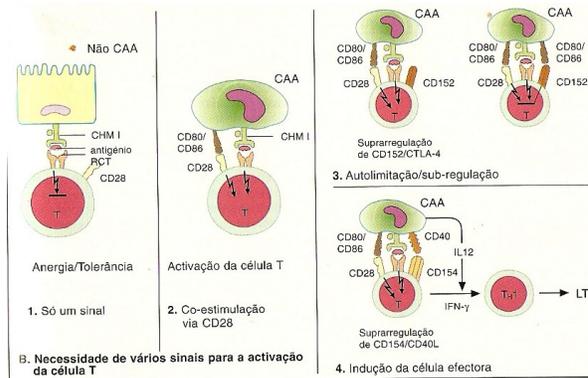
O antígeno 1 associado à função dos leucócitos (LFA-1), um antígeno ubiquitário, liga-se à molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1).

O CD2 liga-se à LFA-3, uma glicoproteína que é expressa principalmente em células endoteliais, células epiteliais e no tecido conjuntivo.

A interacção CD40-ligante do CD40 transmite um sinal de sobrevivência para as células B do centro germinativo e induz a maturação de CeID (células dendríticas) e a produção por estas de grandes quantidades de IL-12.

A interacção da molécula CD-28 de células T com CD80/CD86 em APCs tem um efeito estimulador, enquanto que a interacção de CD152, ou antígeno citotóxico-4 dos linfócitos (CTLA-4), com os mesmos antígenios tem um efeito inibidor.

CAA=APC



Sinais necessários para a activação das células T

O reconhecimento do antígeno pelo receptor das células T (RCT) fornece um primeiro sinal activador para a célula T, mas não é suficiente para induzir a sua completa activação. Na ausência dum segundo sinal, a célula T torna-se tolerante ou anérgica.

O segundo sinal é fornecido pela interacção do antígeno CD28, que é constitutivamente expresso nas células T em repouso, com as moléculas co-estimuladoras B7.1 (CD80) ou B7.2 (CD86) em APCs.

Com a activação por ambos os sinais, o antígeno CTLA-4 (CD152) é supra-regulado em células T num espaço de 24-48h. O CTLA-4 é um receptor de alta afinidade para CD80/CD86; compete com o CD28 e inibe a progressão do ciclo celular. Este sinal negativo é provavelmente emitido pelo CTLA-4 para terminar a activação das células T a fim de impedir uma resposta imunológica exagerada. Um outro receptor inibidor é conhecido como gene-1 da morte programada (MP-1 ou PD-1), que pode interagir com dois membros da família de B7: MP-L1 ou B7-H1 e MP-L2 ou CeID-B7. As CeID finalmente diferenciadas podem produzir grandes quantidades de IL-12 na interacção CD40-ligante do CD40, induzindo a libertação de IFN- γ e a diferenciação de células CD4⁺ em células T_H1. A IL-12 também é um estímulo directo e potente da função de linfócitos T citotóxicos (LTC) e das células *natural killer*. O IFN- γ estimula a actividade antimicrobiana e pró-inflamatória dos macrófagos e reforça a activação de LTC.

Existem, portanto, vários alvos imunológicos possíveis para quem faz farmacologia. Por exemplo, bloqueando o CD28 impedindo a activação das células T helper pelas APCs. Ou, por exemplo, um agonista de CTLA4, que está neste momento a ser estudado, que vai induzir uma frenagem da resposta imunológica das células T activas. Mas vamos falar do que já existe, dos fármacos actualmente ao nosso dispor.

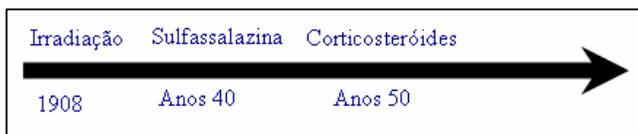
IMUNOSSUPRESSÃO

Os fármacos imunossupressores são usados para diminuir a resposta imune no transplante de órgãos e nas doenças auto-imunes. No transplante, as principais classes de fármacos imunossupressores usadas actualmente são: (1) glicocorticóides, (2) inibidores da calcineurina, (3) agentes antiproliferativos / antimetabolitos, e (4) biológicos (anticorpos). Estes fármacos proporcionaram um alto grau de sucesso clínico no tratamento de condições como rejeição imune aguda de órgãos transplantados e várias doenças auto-imunes. Contudo, estas terapias requerem uso a longo prazo e supressão não específica de todo o sistema imunitário, expondo os doentes a risco consideravelmente aumentado de infecção e cancro. Os inibidores da calcineurina e os glicocorticóides, em particular, são nefrotóxicos e diabetogénicos, respectivamente, restringindo assim a sua eficácia numa variedade de quadros clínicos.

As preparações de anticorpos monoclonais e policlonais dirigidas às células T reactivas são terapias adjuvantes importantes e providenciam uma oportunidade única para atingir especificamente as células imuno-reactivas. Finalmente, novas pequenas moléculas e anticorpos expandiram o arsenal de imunossupressores. Em particular, inibidores do mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (**Sirolimus**, **Everolimus**) e anticorpos anti-CD25 [receptor da IL-2] (**Basiliximab**, **Daclizumab**) que atingem as vias de factores de crescimento, limitando substancialmente a expansão clonal e promovendo potencialmente a tolerância.

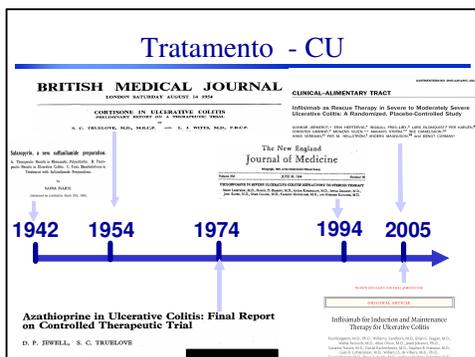
INTERVENÇÕES SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA

– Aspectos Históricos –



Surgiu a ideia de que tinha que se fazer intervenção sobre a resposta imunológica, particularmente quando está exacerbada, como no Lúpus, Artrite Reumatóide, Asma, doença de Crohn, Colite Ulcerosa, na rejeição de transplantes. A irradiação foi a primeira

intervenção que se fez. Os problemas da irradiação advêm do facto de não ser específica, actuando em vários órgãos e sistemas, além dos vários problemas relacionados com a sua toxicidade. E foi nos anos 40 que foram introduzidas duas moléculas no controlo da inflamação. Uma nos anos 40 já na prática clínica – **Sulfassalazina**, e outra que foi descoberta também nos anos 40, mas foi introduzida na prática clínica nos anos 50 – **Corticosteróides**.



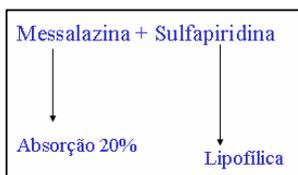
Para dar uma noção de como este tipo de intervenção evoluiu, eis um relato histórico da sucessão de eventos farmacológicos no tratamento da Colite Ulcerosa.

Nos anos 40 foi introduzida a **Sulfassalazina**. Nos anos 50 foram introduzidos os **Corticosteróides** como arma terapêutica. Nos anos 70, foi introduzida na prática clínica a **Azatioprina**, para resolver o problema dos doentes cortico-dependentes e dos cortico-resistentes. Dos anos 70 até aos anos 90 não surgiu nada de muito novo. E só nos anos 90, a **Ciclosporina**, que já era utilizada na transplantação hepática e renal medular, foi introduzida na terapêutica da Colite Ulcerosa grave ou fulminante. E só em 2005 é que foram introduzidos os **Anticorpos anti-TNF**, que nos finais dos anos 90 já eram usados

no tratamento de outras doenças como a doença de Crohn e a Artrite Reumatóide.

Este percurso histórico de terapêutica da Colite Ulcerosa resume um pouco o nosso percurso farmacológico e a lógica dos fármacos que vamos falar seguidamente.

SULFASSALAZINA

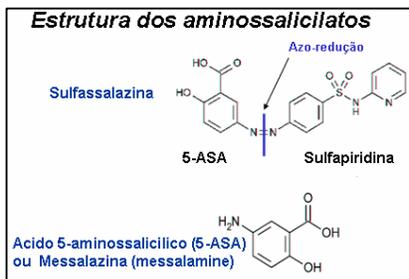


Primeira molécula: **Sulfassalazina**. Descobriu-se posteriormente à união de duas moléculas, a **Messalazina** (ou ácido 5-aminossalicílico) e a Sulfapiridina.

A Sulfapiridina é lipofílica, sendo a porção que é absorvida da molécula, atravessando facilmente as barreiras. A **Messalazina** é o princípio activo anti-inflamatório, é um anti-inflamatório local pois tem pouca absorção sistémica.

A Sulfapiridina como é bem absorvida, atravessa facilmente as barreiras, sendo a molécula fundamental no tratamento dos doentes com Artrite. Isto porque a

Messalazina não tem capacidade de atravessar as barreiras, pelo que as concentrações que atinge no líquido articular são baixíssimas, ao contrário da Sulfapiridina que atinge concentrações aceitáveis.



A molécula **Sulfassalazina** é a união da **5-ASA** com a Sulfapiridina. Por acção das bactérias do cólon, que fazem uma azo-redução, quebrando a ligação, há o aparecimento do **ácido 5-aminossalicílico (ASA)** ou **Messalazina**.

Diminuição de:

LTB4
PGE2

IFN- γ
IL-1
IL-2
IL-6
TNF

Radicais livres de oxigénio

E o que faz a **Sulfassalazina**?

- ✓ Diminui a produção de leucotrienos e prostaglandinas,
- ✓ Diminui de forma pouca específica a produção de IFN γ e várias interleucinas,
- ✓ Diminui a produção de TNF e radicais livres de oxigénio.

Terapêutica: Doença inflamatória do intestino, artrite

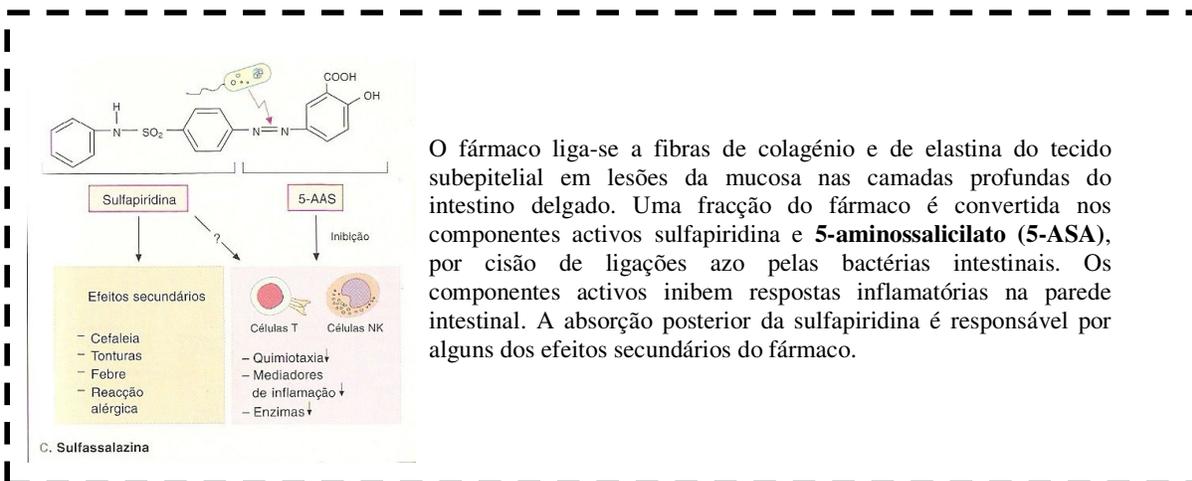
Toxicidade: Febre, diarreia, exantemas, anemia

Onde é que se utiliza?

- ✓ Doença inflamatória do intestino,
- ✓ Artrite.

Tem alguma toxicidade. Pode dar:

- ✓ Febre, exantemas, diarreia e anemia hemolítica,
- ✓ Cefaleias (que aparecem com alguma frequência),
- ✓ Problemas na espermatogénese.



Messalazina		
Messalazina	Preparação galénica	Libertação
Pentasa	microgranulos etilcelulose	contínua
Asacol	Eudragil S	pH>7
Claversal	Eudragil L/S	pH<7
Salofalk	Eudragil L	pH>6
Olsalazina	5-ASA-dímero	Cego, Cólon
Balsalazida	4-aminobenzil-b-alanina-ligação	Cego, Cólon

E porque a **Sulfassalazina** tem estes efeitos colaterais, e o princípio activo é sobretudo o **5-ASA**, as companhias farmacêuticas decidiram criar só ácido **5-ASA** ligado a uma molécula que o liberta só no local de acção. Por isso, a **Messalazina**, que existe comercialmente, está ligada a vários veículos:

(1) Eudragil S (nome comercial Asacol), que faz com que a **Messalazina** só se liberte a um pH superior a 7, que é atingido só na porção terminal do íleon;

(2) Eudragil L (nome comercial Salofalk), que faz com que a **Messalazina** se liberte a um pH superior a 6, que é atingido no íleo e no cólon;

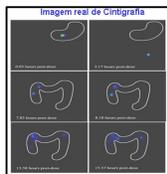
(3) Microgrânulos etilcelulose (nome comercial Pentasa), que faz com que a **Messalazina** se liberte desde o estômago até ao cólon. É importante, por exemplo, para os doentes com doença de Crohn com atingimento do duodeno e do estômago, pois é um anti-inflamatório local, actuando pouco em termos sistémicos, e portanto a molécula tem que ser libertada no estômago e duodeno;

(4) Duas moléculas de 5-ASA (nome comercial **Olsalazina**), que não está à venda em Portugal;

(5) 4-aminobenzil-b-alanina (nome comercial **Balsalazida**), que é uma outra forma de libertação de **Messalazina** no cólon.



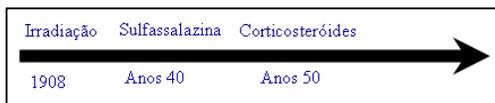
Este esquema (animado), permite observar como o comprimido liberta o princípio activo. Ele chega inteiro ao íleo terminal, onde se abre, e liberta ao longo do íleo terminal e do cólon a **Messalazina**.



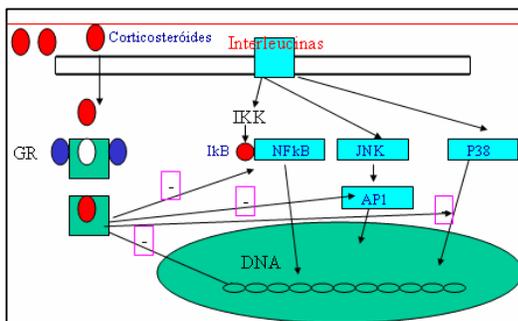
E isto é possível ver por imagens de Cintigrafia em humanos, em que o comprimido passa inteiro pelo intestino delgado e só se começa a libertar no cólon.

São tudo formulações galénicas que libertam o princípio activo no local da inflamação.

CORTICOSTERÓIDES¹



Depois apareceram os **Corticosteróides**.



São também fármacos que não têm um alvo farmacológico específico. Inibem o NFkB, potenciando o Ikb, que têm receptores intracitoplasmáticos, que inibem também a activação do P38. Portanto são fármacos muito importantes.

- Cataratas
- Osteoporose
- Diabetes
- Acne
- Miopatia
- Euforia e depressão
- Hipertensão arterial
- Osteonecrose
- Atraso de crescimento

O problema dos Corticosteróides é os efeitos colaterais, que a longo prazo podem ser extremamente agressivos. Pode provocar o aparecimento de cataratas, osteoporose, diabetes, acne, miopatia, situações psiquiátricas como euforia e depressão, hipertensão arterial, osteonecrose e atraso no crescimento. Temos que ter particular atenção em crianças que estão em crescimento, pois os Corticosteróides alteram, e muito, o crescimento.

¹ O professor avisou que ia falar pouco sobre corticosteróides porque foram dados em seminário. Decidimos também não acrescentar nada além do que o professor disse.

E portanto havia a necessidade de criar fármacos para os doentes que ficam dependentes dos **Corticosteróides** ou para os doentes que lhes ficam resistentes.

A dependência aos **Corticosteróides** é definida pelo facto de que um doente com uma Artrite que toma **corticosteróides** durante algum tempo em sub-doses (40-60mg), tendo depois de lentamente baixar a dose até 20mg-30mg, e quando se tenta baixar ainda mais a dose o doente volta a ter sintomas, pelo que se sobe a dose novamente, e o doente anda neste ciclo. Atinge-se normalmente um nível de cortico-dependência que anda à volta de 15-20mg. São doentes cortico-dependentes, pois dependem dos corticóides para não terem sintomas.

E há um outro grupo de doentes que são os cortico-resistentes, isto é, nunca respondem à terapêutica com corticóides em sub-doses. A sub-dose de corticóides depende de doença para doença, mas é habitualmente de 1mg/Kg, com o que se define como resistência aos **Corticosteróides**. Há vários mecanismos de cortico-resistência, que estão relacionados com alterações dos receptores ou então com mecanismos muito eficazes de extrusão dos **Corticosteróides** para fora das células através do *Multidrug Resistance Gene*.

FÁRMACOS CONTRA A CORTICO-RESISTÊNCIA E CORTICO-DEPENDÊNCIA

Azatioprina	Ciclosporina	Tacrolimus	MFM
→			
Anos 60	1983	1993	1997

Para resolver o problema dos cortico-dependentes e dos cortico-resistentes (que pode ser um grupo tão grande como cerca de 50% dos doentes que estamos a tratar) foram criados estes fármacos: anos 60, a **Azatioprina**; anos 80, a **Ciclosporina**; anos 90, o **Tacrolimus**; e final dos anos 90, o **Micofenolato de Mofetil (MFM)**.

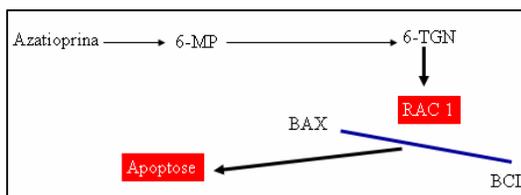
AZATIOPRINA

Antimetabolito da purina

Boa absorção oral

Inibe proliferação e migração dos linfócitos

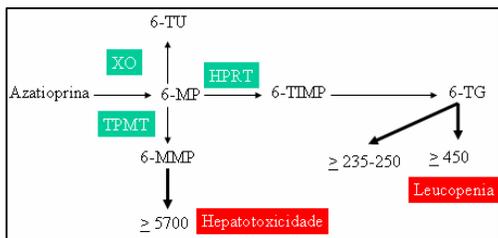
A **Azatioprina** é um antimetabolito da purina, que inibe a proliferação e migração de linfócitos. Tem uma boa absorção oral. Ao contrário da **Sulfassalazina** e dos **Corticosteróides** que actuam de forma indiferenciada, o grande alvo de acção da **Azatioprina** é a diminuição da produção de IL-2, inibindo depois a proliferação de linfócitos (pois a IL-2 é importante para a sua proliferação).



A **Azatioprina** é um pró-fármaco, é convertido, de forma não enzimática, em **6-mercaptopurina (6-MP)**, sendo este o seu princípio activo. É depois convertida em nucleótidos **6-tioguanina (6-TGN)**, e é esta que actua sobre a molécula de transdução do sinal Rac1, inibindo-a. Esta inibição induz a apoptose dos linfócitos. Em grande parte das doenças do foro imunológico, onde actuam estes fármacos, há alteração da apoptose dos linfócitos. Por exemplo, nos doentes com doença de Crohn, os

linfócitos vivem mais tempo e produzem mais tempo interleucinas, provocando portanto lesão tecidual imunomediada. E só há dois anos se descobriu que a **Azatioprina** é um fármaco pró-apoptótico, actuando na Rac e induzindo os linfócitos a uma morte programada.

Alguma atenção a este esquema da metabolização da **Azatioprina**.



A **Azatioprina**, que é um pró-fármaco, é rapidamente convertida a **6-MP**, que por sua vez sofre metabolização extensa por três vias competitivas:

(1) **Oxidase da Xantina (XO)**: Converte-a a ácido 6-tiourico (6-TU).
 (2) **Tiopurina Metiltransferase (TPMP)**: Converte-a a 6-metilmercaptopurina (6-MMP), ou outros produtos metilados. Se houver um polimorfismo desta enzima, associado a um aumento da sua actividade, haverá aumento da produção de produtos metilados e o aparecimento subsequente de hepatotoxicidade. Actualmente já

é possível quantificar os produtos metilados resultantes da **6-MP**, e habitualmente quando superiores a 5700 correlacionam-se com hepatotoxicidade.

(3) **Hipoxantina Guanina Fosforibosiltransferase (HPRT)**: converte-a a 6-tioinosina monofosfato (6-TIMP). Uma vez formada, a 6-TIMP pode ser transformada em nucleótidos de **6-tioguanina (6-TG)**. Quando se dá **Alopurinol** a um doente, bloqueando a via 6-MP→6-TU, a 6-MP é quase toda transformada em 6-TG (6-tioguanina), e esta molécula induz leucopenia. Isto significa que um doente que está a fazer **Azatioprina** ou 6-MP não deve fazer concomitantemente inibidores da Oxidase da Xantina, pois pode ter leucopenia.

Terapêutica: Transplante; Doença inflamatória do intestino

Toxicidade: Hepática
Leucopenia, trombocitopenia
Pancreatite

Onde se usa a **Azatioprina**? No transplante e doença inflamatória do intestino.

A toxicidade pode ser hepática, e normalmente é dependente da dose. Se diminuirmos a dose diminuimos o risco de hepatotoxicidade e também de leucopenia. E chamo particular atenção para a pancreatite, porque 2-3% dos doentes desenvolvem pancreatite, sendo esta independente da dose, e habitualmente aparece no primeiro mês em que se dá o fármaco.

6-Mercaptopurina

6-Tioguanina

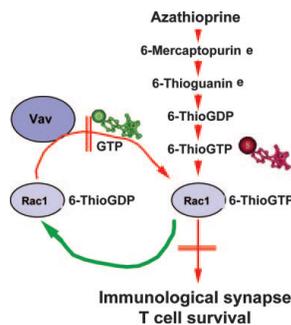
Adenomas hepáticos

Podemos dar também só **6-MP** ou **6-TG**, sendo também um dos princípios activos. Contudo a utilização da **6-TG** associou-se a adenomas hepáticos pelo que actualmente não se utiliza muito.

A Azatioprina resolveu alguns dos problemas da cortico-dependência e da cortico-resistência.

O problema da **Azatioprina** é que os doentes têm que a tomar durante algum tempo até atingirem concentrações intra-eritrocitárias elevadas da **6-TG** para que tenha eficácia. Quer dizer que se dermos agora **Azatioprina** a um doente habitualmente só no 4º/5º mês se atinge o *steady state* da droga. É um bom fármaco, mas que é lento a actuar. Ao contrário da **Ciclosporina**, que é um fármaco muito rápido a actuar, e inibe a produção de IL-2.

Mecanismo de acção: Actua inibindo a síntese da purina necessária para a proliferação das células, especialmente leucócitos e linfócitos. A **Azatioprina** é convertida no plasma a **6-Mercaptopurina** que é convertida em metabolitos adicionais que inibem a síntese de novo das purinas. A 6-TIMP, um nucleótido falso, é convertido em 6-tio-GMP e finalmente em 6-tio-GTP que é incorporado no DNA. Desta forma, a proliferação e diversas funções dos linfócitos são inibidas.



Modelo de Imunossupressão mediado pela **Azatioprina**.

A Azatioprina é metabolizada via **6-MP** e **6-TG** em 6-Tio-GTP. Esta última liga-se à pequena GTPase Rac1. Uma vez hidrolisada, a 6-Tio-GDP ligada à Rac1 inibe a actividade da troca guanosina/Vav levando à acumulação de moléculas Rac1 inactivas ligadas à 6-Tio-GDP, ao bloqueio da incorporação de GTP na Rac1 e, conseqüentemente, à supressão das funções da Rac1 na sobrevivência das células T e conjugação APC-CélulasT.

Farmacocinética: Administrada por via oral ou por via IV. A via IV só deve ser utilizada quando for impossível o recurso à via oral, uma vez que a solução injectável é alcalina e muito irritante. A semi-vida da **Azatioprina** é cerca de 10min e do metabolito 6-mercaptopurina de 1h. Ambos são rapidamente removidos do sangue por oxidação e metilação no fígado e/ou pelos eritrócitos.

OUTROS IMUNOMODULADORES - ASPECTOS GERAIS

Inibidores da calcineurina

Ciclosporina
Tacrolimus

Inibidores da desidrogenase da inosina

Micofenolato de mofetil

Inibidores da proteína cinase do ciclo celular

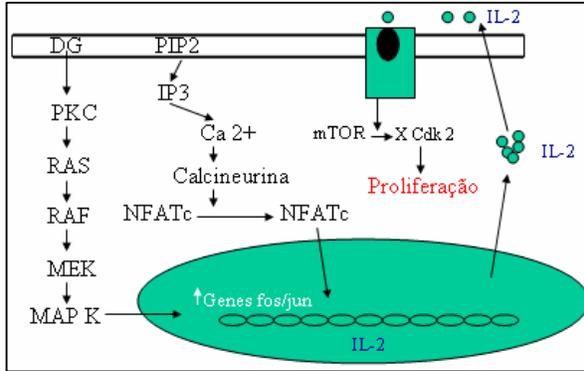
Sirolimus

Inibidores clássicos da calcineurina: a **Ciclosporina** e o **Tacrolimus**.

Inibidores da desidrogenase da inosina: **Micofenolato de Mofetil**.

Inibidores da proteína cinase do ciclo celular: **Sirolimus**.

São todos fármacos que existem na prática clínica.

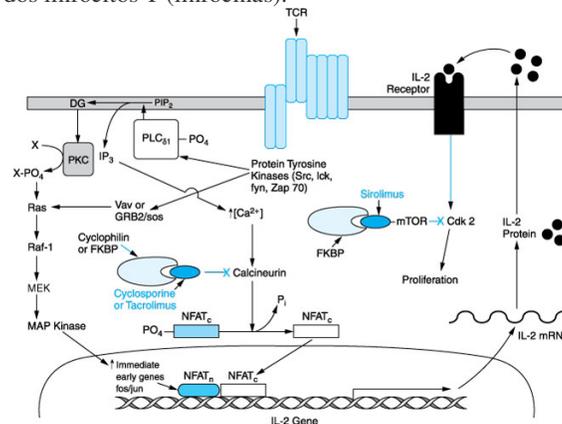


O factor nuclear de activação de células T (NFATc) está habitualmente fosforilado, e tem que ser desfosforilado para ir ao núcleo e aumentar a produção de alguns genes, que leva depois à produção de IL-2. A molécula citoplasmática de transdução TOR, está particularmente relacionada com a proliferação das células, sendo importante nos linfócitos pois para que estes passem do período G1 ao S, necessitam deste factor. E portanto este é um dos possíveis alvos farmacológicos sobre a resposta imunológica. E o outro é a calcineurina, uma molécula que precisa de cálcio, que é fundamental para que depois o factor de activação das células T seja activado e induza a produção de determinados genes.

INIBIDORES DA CALCINEURINA

Ciclosporina, Tacrolimus

Tanto a **Ciclosporina** como o **Tacrolimus** ligam-se a imunofilinas (ciclofilina e FK506-binding protein [FKBP], respectivamente), formando um complexo que se liga à fosfatase da calcineurina. Este complexo inibe a desfosforilação catalizada pela calcineurina essencial para permitir o movimento do factor nuclear das células T activadas (NFAT) para o núcleo. NFAT é necessário para a transcrição de IL-2 e outras citocinas associadas à diferenciação e crescimento dos linfócitos T (linfocinas).



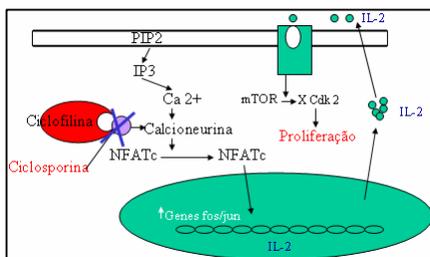
Copyright © 2006 by The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

NOTA: O **Sirolimus** (Rapamicina), que é um inibidor da proteína cínase do ciclo celular, funciona numa fase mais tardia da activação das células T, *downstream* do receptor da IL-2. O **Sirolimus** também se liga ao FKBP, mas o complexo FKBP-Sirolimus liga-se e inibe o alvo da rapamicina (mTOR), uma cínase envolvida na progressão do ciclo celular (proliferação).

Azatioprina	Ciclosporina	Tacrolimus	MFEM
Anos 60	1983	1993	1997

Vamos agora falar da **Ciclosporina**.

CICLOSPORINA



Um dos factores da calcineurina é a Ciclofilina. E o que faz a **Ciclosporina**? Inibe a ligação da Ciclofilina à calcineurina, impedindo a desfosforilação do NFATc, e, portanto inibindo a produção de IL 2.

Mecanismo de Acção

A **Ciclosporina** faz alguma supressão da imunidade humoral, mas é mais eficaz contra mecanismos imunes dependentes das células T, como aqueles subjacentes à rejeição de transplantes e algumas formas de auto-imunidade. Inibe preferencialmente a transdução de sinal nos Linfócitos T desencadeada por antigénios, bloqueando a expressão de muitas linfocinas, incluindo a IL-2, e a expressão de muitas proteínas anti-apoptóticas. A **Ciclosporina** forma um complexo com a ciclofilina, uma proteína do receptor citoplasmático presente nas células alvo. Este complexo liga-se à calcineurina, inibindo a desfosforilação estimulada por Ca^{2+} do componente citosólico do NFAT. Quando o NFAT é desfosforilado, sofre translocação para o núcleo e faz um complexo com componentes nucleares necessários para a activação completa das células T, incluindo transactivação da IL-2 e outros genes das linfocinas. A actividade da fosfatase da calcineurina é inibida após interacção física com o complexo **Ciclosporina** – Ciclofilina. Isto previne a desfosforilação do NFAT de tal forma que o NFAT não entra no núcleo, a transcrição génica não é activada, e os linfócitos T falham a resposta a estimulação antigénica específica. **Ciclosporina** também aumenta a expressão do TGF- β , um potente inibidor da proliferação de células T estimulada pela IL-2 e formação de Linfócitos T citotóxicos (CTL).

Lipofílica e muito hidrofóbica

Via oral ou endovenosa

Biodisponibilidade de 50% (nova formulação)

Necessidade de doseamento dos níveis séricos (C_0 e C_2)

Metabolização hepática CYP3A

A **Ciclosporina** é muito lipofílica e muito hidrofóbica, por isso existiram alguns problemas para criar soluções estáveis de **Ciclosporina**. Só recentemente foram criadas formulações via oral que dão maior biodisponibilidade. A biodisponibilidade das novas formulações é de 50%. Há necessidade de doseamento pré-dose, conceito de farmacocinética. Podemos ter níveis séricos de C_0 e C_2 (C_0 : concentração mais baixa ao longo do dia; C_2 : concentração duas horas após toma) ou podemos fazer a área abaixo da curva (AUC). Isto porque a **Ciclosporina** tem toxicidade

hepática e renal. É metabolizada no fígado pela CYP3A.

Farmacocinética

- ✓ **Absorção oral:** não é completa, variabilidade inter-pacientes e com a preparação usada, retardada e diminuída pela presença de alimentos.
- ✓ **Distribuição:** amplamente distribuída para fora do compartimento vascular.
- ✓ **Biotransformação:** extensamente metabolizada no fígado pela CYP3A, e em menor grau no aparelho gastrointestinal e rim.
- ✓ **Excreção:** principalmente na bile e nas fezes; apenas cerca de 6% nos rins.
- ✓ **Necessidade de doseamento dos níveis séricos (C_0 e C_2):** Devido á inexistência de equivalência entre preparações genéricas e comerciais, quando se substitui a primeira pela última há necessidade de monitorização dos pacientes para que não haja risco de imunossupressão ineficaz ou aumento da toxicidade. Deste modo, deve-se obter uma amostra de sangue antes da próxima dose (C_0 ou nível mínimo) e avaliar os níveis do fármaco 2h após administração de uma dose (C_2) pois o valor de C_2 tem uma correlação mais precisa com AUC. C_0 e C_2 ajudam a avaliar se a imunossupressão é inadequada ou se o fármaco está a provocar efeitos tóxicos.

Terapêutica: Transplante, colite ulcerosa, psoríase

Toxicidade: Renal, hepática,
Tremor, hiperplasia gengival, hipertensão arterial

Interações: Verapamil, nicardipina, fluconazole, eritromicina

Rifampicina, fenobarbital, ticlopidina

Onde se utiliza? No transplante, na colite ulcerosa e na psoríase. A **Ciclosporina** revolucionou o transplante. Actualmente, a mortalidade da maior parte dos transplantes é bastante baixa. A sobrevida aos 5 anos depende de transplante para transplante, por exemplo, no transplante hepático, que é o que está associado a uma maior mortalidade, é de cerca de 65%. E isto deve-se a uma molécula que se chama **Ciclosporina**, que impede as rejeições agudas e crónicas. Portanto, utiliza-se no transplante hepático, renal, medular, na colite ulcerosa grave e fulminante, etc., etc., etc....

O problema da **Ciclosporina** é a sua toxicidade renal e hepática. Outro efeito lateral é o aparecimento de tremor, que ocorre com bastante frequência. Pode também induzir hiperplasia gengival, hipertensão arterial que é sensível aos antagonistas do cálcio. Tende a aumentar os níveis de LDL.

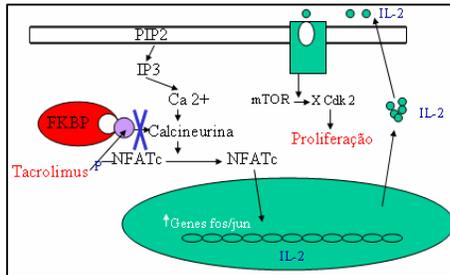
Tem interações com um número grupo de fármacos:

- ✓ Fármacos que inibem as enzimas microssomais, principalmente o sistema das CYP3A, podem reduzir o seu metabolismo e aumentar as suas concentrações plasmáticas: bloqueadores dos canais de cálcio (Verapamil, Nicardipina), agentes antifúngicos (Fluconazole), antibióticos (Eritromicina), etc., etc....
- ✓ Fármacos que induzem a actividade da CYP3A podem acelerar o seu metabolismo e reduzir as suas concentrações sanguíneas: antibióticos (Rifampicina), anticonvulsivantes (Fenobarbital) e outras drogas (Ticlopidina).

Interações Farmacológicas

- ✓ A interação entre a **Ciclosporina** e o **Sirolimus** levou à recomendação de que a administração destes dois fármacos seja separada no tempo. O **Sirolimus** agrava a disfunção renal induzida pela **Ciclosporina**, enquanto que a **Ciclosporina** aumenta a hiperlipidemia e mielosupressão induzida pelo **Sirolimus**.
- ✓ Outras interações de preocupação incluem aumento da nefrotoxicidade quando a **Ciclosporina** é co-administrada com fármacos anti-inflamatórios não esteróides e outros fármacos que causam disfunção renal; elevação dos níveis do **Metotrexato** quando são co-administrados; e diminuição do *clearance* de outras drogas como Prednisolona.

TACROLIMUS



Outro fármaco que também actua na calcineurina é o **Tacrolimus**. E actua na molécula FKBP, impedindo que a calcineurina através da fosfatase active o factor NFATc (factor activador de células T). Portanto, também bloqueia a produção de IL-2.

Mecanismo de Acção do Tacrolimus

Tal como a **Ciclosporina**, o **Tacrolimus** inibe a activação das células T inibindo a calcineurina. O **Tacrolimus** liga-se a uma proteína intracelular, FK506-binding protein – 12 (FKBP-12), uma imunofilina estruturalmente relacionada com a ciclofilina. Forma-se então um complexo de **Tacrolimus**-FKBP-12, Ca²⁺, calmodulina, e calcineurina, e a actividade da fosfatase da calcineurina é inibida. A inibição da actividade fosfatase previne a desfosforilação e a translocação nuclear do NFAT e inibe a activação das células T. Assim, ainda que os receptores intracelulares difiram, a **Ciclosporina** e o **Tacrolimus** têm como alvo a mesma via de imunossupressão.

Via oral ou endovenosa

Necessidade de doseamento dos níveis séricos (Co)

Metabolização hepática CYP3A4

O **Tacrolimus**, também conhecido como FK506, dá-se por via oral ou endovenosa. Há necessidade de doseamento dos níveis séricos porque também causa toxicidade hepática e renal.

Terapêutica: Transplante, colite ulcerosa, psoríase

Toxicidade: Renal, neurológica
Tremor, hipertensão arterial, diabetes

Não afecta as LDL e ácido urico

Utiliza-se no transplante, colite ulcerosa e psoríase. Tem toxicidade renal e neurológica. Causa tremor e hipertensão arterial. O aparecimento de Diabetes é mais frequente com o uso deste fármaco do que com o uso de **Ciclosporina**. Também não afecta as LDL e o ácido úrico, ao contrário da **Ciclosporina** que pode alterar ambos. Há quem diga que o **Tacrolimus** se acompanha com menor toxicidade renal, mas o professor duvida.

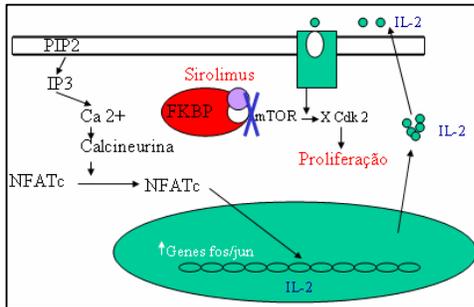
Interações Farmacológicas

A co-administração com a **Ciclosporina** resulta em nefrotoxicidade adicional ou sinergista, pelo que é necessária uma pausa de 24h quando se troca a terapêutica do paciente de **Ciclosporina** para **Tacrolimus**. Uma vez que o **Tacrolimus** é metabolizado principalmente pela CYP3A, as potenciais interações descritas para a **Ciclosporina** também se aplicam a este fármaco.

FARMACOS ANTIPROLIFERATIVOS E ANTIMETABÓLICOS

Azatioprina², Sirolimus, Everolimus, Micofenolato de Mofetil

SIROLIMUS



O **Sirolimus** também actua no FKBP, que é uma molécula importante que regula a proliferação das células T.

Mecanismo de Acção

O **Sirolimus** inibe a activação e proliferação dos linfócitos T, *downstream* o receptor da IL-2 e outros receptores de factores de crescimento das células T. Tal como a **Ciclosporina** e o **Tacrolimus**, a acção terapêutica do **Sirolimus** requer a formação dum complexo com uma imunofilina, neste caso a FKBP-12. Contudo, o complexo **Sirolimus**-FKBP-12 não afecta a actividade da calcineurina. Ele liga-se e inibe uma proteína cinase designada *mammalian target of rapamycin* (mTOR), que é uma enzima chave na progressão do ciclo celular. A inibição do mTOR bloqueia a progressão do ciclo celular na transição das fases $G_1 \rightarrow S$. Em modelos animais, o **Sirolimus** não inibe apenas a rejeição de transplantes e uma variedade de doenças autoimunes, mas o seu efeito também perdura por vários meses após a paragem da terapia, sugerindo um efeito toleragénico. O seu uso permite evitar os inibidores da calcineurina, mesmo em pacientes que estão estáveis, protegendo assim a função renal.

Via oral

Semi-vida 62h

Necessidade de doseamento dos níveis séricos

Metabolização hepática CYP3A4

O **Sirolimus**, ou Rapamicina, dá-se por via oral (rapidamente absorvido). Tem uma semi-vida relativamente longa (62h). Há necessidade de doseamento dos níveis séricos e tem metabolização hepática (CYP3A4).

Terapêutica: Transplante

Toxicidade: Dislipidemia, anemia, leucopenia, trombocitopenia

Utiliza-se no transplante e provoca trombocitopenia, leucopenia, anemia e dislipidemia.

Terapêutica: Profilaxia da rejeição do órgão transplantado em combinação com inibidores da calcineurina e glicocorticóides.

Toxicidade: A imunoterapia com **Sirolimus** *per se* não é nefrotóxica, contudo pacientes tratados com **Ciclosporina + Sirolimus** têm maior disfunção renal quando comparados com pacientes tratados apenas com Ciclosporina ou até Azatioprina ou placebo.

Interações Farmacológicas: Como é substrato da CYP3A e é transportado pela glicoproteína P interage com outros fármacos metabolizados ou transportados por estas proteínas.

EVEROLIMUS

Semelhante ao sirolimus

Semi-vida: curta

Toxicidade: Dislipidemia, anemia, leucopenia, trombocitopenia

O **Everolimus** é química e estruturalmente semelhante ao **Sirolimus**, mas tem uma vantagem que é a sua semi-vida curta. Acompanha-se também de alguma toxicidade, particularmente hematológica: anemia, leucopenia ou trombocitopenia.

² A Azatioprina é um antimetabolito, por isso inclui-se neste grupo, mas como optamos por manter a sequência do professor já falamos dela.

MICOFENOLATO DE MOFETIL

Transformado em ácido micofenólico

Inibidor reversível da desidrogenase da inosina monofosfato

Inibe proliferação, formação de anticorpos, adesão e migração dos linfócitos

O **Micofenolato de Mofetil** é um inibidor reversível da desidrogenase da inosina monofosfato, uma enzima fundamental para os linfócitos T e B, actuando no ciclo celular. E a inibição desta enzima afecta imenso a capacidade proliferativa dos linfócitos. Provoca, portanto, inibição da formação de anticorpos e alteração da adesão e migração dos linfócitos.

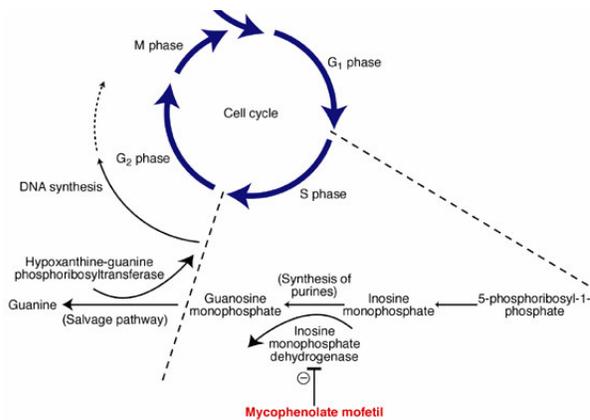
Terapêutica: Transplante; Doença inflamatória do intestino

Toxicidade: Diarreia, vômitos, leucopenia, ↑infecção por CMV

Utiliza-se no transplante e na doença inflamatória do intestino. Tem alguma toxicidade hematológica e aumenta o risco de infecções pelo Citomegalovírus.

Mecanismo de Acção do Micofenolato de Mofetil

É rapidamente hidrolisado a ácido micofenólico (MPA), a sua forma activa. O MPA é um inibidor selectivo, não competitivo e reversível da desidrogenase da inosina monofosfato (IMPDH) inibindo assim a formação de novos nucleótidos de guanina. Como os linfócitos T e B são extremamente dependentes da formação de novas purinas para a sua proliferação celular, enquanto outros tipos de células podem utilizar vias alternativas, o MPA inibe selectivamente a proliferação de linfócitos.



Nos linfócitos, a via de recuperação da síntese de purinas é menos activa de que a síntese de novo. A inosina monofosfato é convertida a guanosina monofosfato pela desidrogenase da inosina monofosfato. Durante a activação das células T, a actividade de ambos os tipos desta enzima (I e II) aumenta em cerca de 10 vezes. O **Micofenolato de Mofetil** é convertido no fígado a ácido micofenólico, que, por sua vez, inibe, reversível e não competitivamente, a actividade de ambos os tipos da enzima durante a síntese de DNA na fase S do ciclo celular. Na via de recuperação, a guanina é convertida a guanosina monofosfato pela enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase.

OUTROS FÁRMACOS ANTIPROLIFERATIVOS E CITOTÓXICOS

Metotrexato, FTY720

METOTREXATO

Inibe a Dihidrolato redutase

absorção oral – grande variabilidade

I.M, S.C

Altera a produção de interleucinas

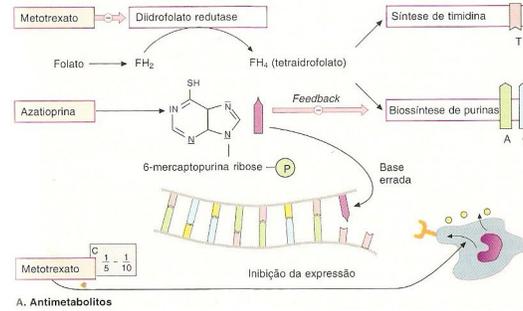
O **Metotrexato** é um fármaco antigo, é um inibidor da Dihidrolato redutase. Tem uma absorção oral muito variável, e a absorção subcutânea também não é previsível, por isso, na opinião do professor, o Metotrexato deve-se dar por via intramuscular. Altera a produção de várias interleucinas.

Terapêutica: Doença inflamatória do intestino,
Artrite reumatóide,
Psoríase

Toxicidade: Hepática
Leucopenia, trombocitopenia
Pneumonite

Utiliza-se muito na Artrite Reumatóide, menos na doença de Crohn e não é eficaz no tratamento da Colite Ulcerosa. Os problemas do **Metotrexato** são a sua toxicidade hepática e hematológica e o facto de poder provocar fibrose pulmonar, que pode ser irreversível.

Mecanismo de Acção



O **Metotrexato** actua como um antimetabolito que interfere com o metabolismo do ácido fólico. Ligando-se à enzima dihidrofolato redutase, ele inibe a redução intracelular de folato para tetraidrofolato, bloqueando assim o metabolismo de C1, necessário para a biossíntese de timidina e purina. A diminuição da síntese de precursores de nucleótidos (bases púricas) que integram DNA e RNA afecta a reparação e replicação de ácidos nucleicos, e consequentemente a proliferação de linfócitos. O **Metotrexato** tem propriedades imunossupressoras porque em doses baixas é capaz de inibir a proliferação de linfócitos B e T, o que leva à diminuição de IL-1, IFN- γ , TNF e outras citocinas. (NOTA: A Azatioprina é um antimetabolito que é convertido a 6-Mercaptopurina, uma adenina sulfurosa que inibe a biossíntese das purinas ao actuar como “produto final errado” que transmite feedback negativo. Além disso é incorporada como componente falso no DNA e RNA, lesando, com isso, as moléculas.)

Toxicidade

O ácido fólico não é eficaz como fármaco de resgate da toxicidade do **Metotrexato**, pois para a sua bioactivação necessita da enzima dihidrofolato redutase que é inibida pelo próprio **Metotrexato**. Por isso dá-se ácido fólnico.

FTY 720

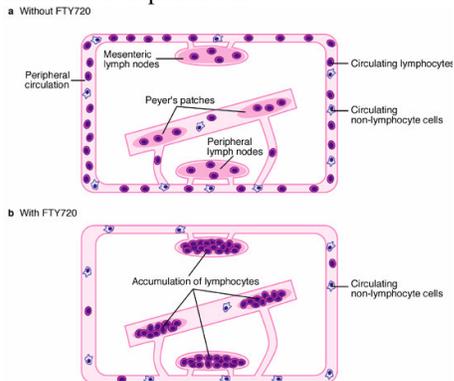
Agonista do receptor S1P (receptor esfingosina 1-fosfato)
 Agonismo S1P altera a recirculação dos linfócitos
 “Lymphocyte homing”

O **FTY720** é um agonista do receptor S1P, que é o receptor da esfingosina 1-fosfato. Este receptor é importante para a migração e adesão dos linfócitos, ou seja, para que os linfócitos deixem a circulação para os órgãos alvo. É um fármaco que está actualmente em desenvolvimento, já em humanos, e que impede que os linfócitos atinjam os órgãos.

Terapêutica: Transplante
 Toxicidade: Efeito cronotrópico negativo

Mecanismo de Acção do FTY720

FTY720 age via “lymphocyte homing”. Sequestra específica e reversivelmente os linfócitos nos gânglios linfáticos e nas placas de Peyer mantendo-os afastados da circulação. Assim protege o enxerto do ataque mediado por linfócitos. **FTY720** sequestra os linfócitos, mas não afecta as funções celulares dos linfócitos B e T. **FTY720** é um pró-fármaco, é fosforilado pela esfingosina-cinase 2, sendo o produto **FTY720**-fosfato resultante um potente agonista dos receptores S1P. A alteração do tráfico dos linfócitos induzida pelo **FTY720** resulta claramente do seu efeito nos receptores S1P.

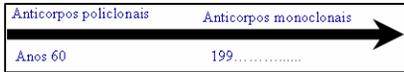


FTY720 altera o tráfico dos linfócitos (comparar os painéis a e b). Em particular, **FTY720** pode alterar a expressão ou função da integrina $\alpha 4\beta 7$, molécula de adesão molecular que é responsável pelo *homing* dos linfócitos em tecidos linfóides. Em contraste, não afecta o nº de leucócitos polimorfonucleares ou monócitos que estão em circulação no sangue. **FTY720** aumenta o nº de linfócitos (i.e. células B e T) que estão presentes nas placas de Peyer e gânglios linfáticos mesentéricos e periféricos. A sequestração dos linfócitos pode ser causada pela expressão *up-regulated* das integrinas $\alpha 4\beta 7$ nos linfócitos que se liga à molécula de adesão celular Gly (CAM-1) e Mad CAM-1, que são moléculas de adesão que são expressas na superfície celular de vênulas endoteliais altas (HEV) tanto nos gânglios linfáticos como nas placas de Peyer.

Terapêutica: tratamento imunossupressor combinado para a profilaxia da rejeição aguda

Toxicidade: linfopenia – efeito colateral mais comum, reversível com a interrupção do tratamento; efeito cronotrópico negativo – efeito mais preocupante detectado em 30% dos pacientes.

ANTICORPOS



Por fim, chegamos a uma nova era, no final dos anos 90. Foi o aparecimento da farmacologia dirigida para um alvo imunológico. Isto é, temos a produção de TNF e sabemos que ele é importante na doença Y, e então vamos produzir um anticorpo monoclonal que seja dirigido ao TNF. Ou então, sabemos que um determinante antigénico, por exemplo o CD20, é expresso em determinadas leucemias e produzimos um anticorpo monoclonal para este antígeno matando ou induzindo a apoptose das células que exprimem esse antígeno. Esta é portanto a nova era da terapêutica farmacológica dirigida.

Terapêutica de Indução Biológica

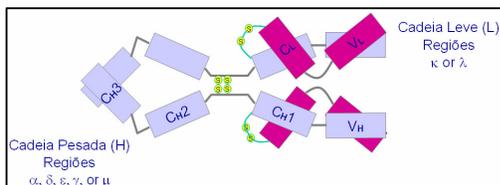
A terapia de indução biológica com anticorpos policlonais e monoclonais tem sido um importante componente de imunossupressão desde os anos 60, quando Starzl e seus colegas demonstraram o efeito benéfico da globulina anti-linfocitária (ALG) na profilaxia de rejeição de transplante renal. Nos últimos 40 anos, várias preparações policlonais anti-linfocitárias têm sido usadas no transplante renal; contudo apenas 2 preparações têm aprovação da FDA: globulina imune linfocitária (ATGAM) e globulina anti-timócito (*THYMOGLOBULIN*). Outro importante marco na terapia biológica foi o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais e a introdução do anticorpo anti-CD3 murino.

Em muitos centros de transplantes, a terapia de indução com agentes biológicos é usada para retardar o uso de inibidores da calcineurina nefrotóxicos ou para intensificar a terapia de imunossupressão inicial em pacientes com grande risco de rejeição (por exemplo, transplantes repetidos ou crianças). A maioria das limitações dos anticorpos monoclonais murinos foram, de uma forma geral, ultrapassadas com a introdução de anticorpos monoclonais quiméricos ou humanizados que não têm antigenicidade, têm semi-vidas séricas prolongadas e podem ser mutagenizados para alterar a sua afinidade aos receptores Fc.

Os agentes biológicos de indução podem ser divididos em 2 grupos: os agentes de depleção e os moduladores imunes. O anti-CD3, por exemplo, é um agente de depleção, a sua eficácia deriva da sua capacidade de depleção das células CD3+ do transplante e da apresentação antigénica, sendo também um agente imunomodulador. O anticorpo monoclonal anti-receptor da IL-2 (anti-CD25) não faz depleção dos linfócitos T, mas bloqueia a activação das células T mediada pela IL-2 ligando-se a cadeia α do receptor da IL-2, sendo portanto um agente imunomodulador.

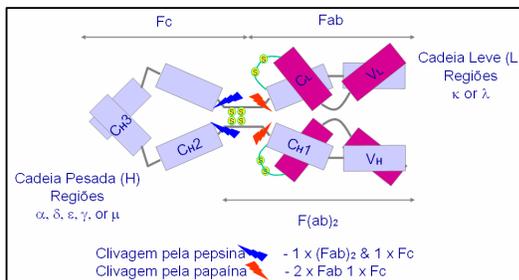
Para pacientes com altos níveis de anticorpos anti-HLA, a rejeição humoral mediada pelas células B pode ser modificada por plasmaferese, seguida de imunoglobulina intravenosa para suprimir a produção de anticorpos.

ANTICORPOS MONOCLONAIS

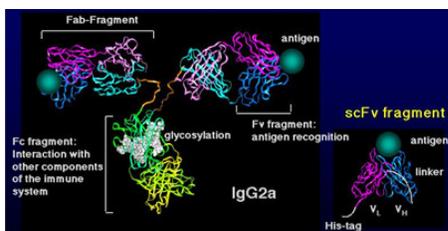


Só para recordar como se constrói um anticorpo (esquema animado).

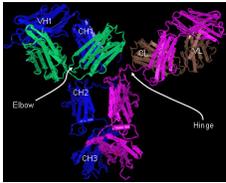
“Esta é a cadeia pesada duma imunoglobulina, que contém os segmentos C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} e V_H ... a cadeia pesada une-se à cadeia leve ... com dois segmentos da cadeia leve ... e há produção de outro segmento de cadeia pesada ... formando-se as ligações dissulfeto.”



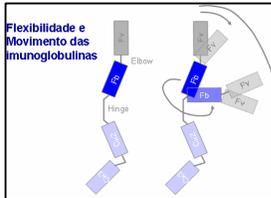
Existem então estes segmentos Fc e Fab. É no segmento Fab que há o reconhecimento do antígeno. As cadeias dissulfidadas do segmento Fc são importantes para a activação do complemento. Se queremos um anticorpo com a activação do complemento, ou se isso é importante para provocar a morte das células, temos de ter o segmento Fc e não podemos ter o anticorpo monoclonal só com o segmento Fab.



Outro esquema que explica a mesma coisa. Não esquecer que o segmento Fab é fundamental para a captura do antígeno.

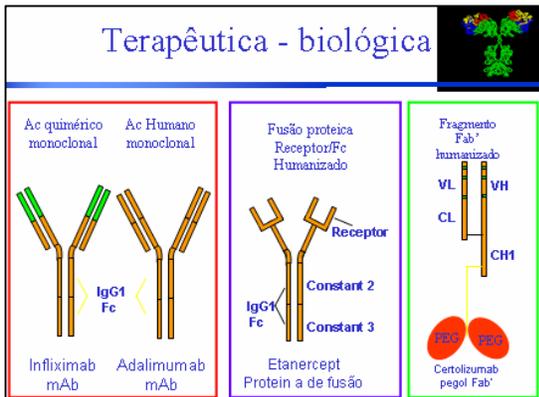


Esquema sobre como uma imunoglobulina é construída espacialmente (esquema animado).



O segmento Fab não é estático, tem a capacidade de ir à procura do antígeno (esquema animado).

Tem a capacidade de ir à procura do antígeno fazendo rotação para ambos os sentidos. Portanto, o anticorpo monoclonal é dinâmico.



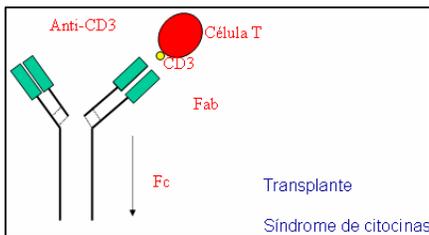
Vamos começar falando de três anticorpos.

O **Infliximab** é um anticorpo monoclonal IgG1 para o TNF (75% humano e 25% de proteínas de rato).

O **Adalimumab** é um anticorpo monoclonal anti-TNF, 100% humano.

Depois evolui-se para anticorpos que são proteínas de fusão. Sabe-se que o receptor do TNF é o P75 ou o P55. É possível construir um anticorpo monoclonal com o segmento Fc que tenha na sua extremidade o receptor P55 ou P75 do TNF, é o que se chama **Etanercept**. Ou então a utilização só de anticorpos do segmento Fab, que é a região do anticorpo que capta directamente o antígeno, é o caso do anticorpo Certolizumab, que também é um anticorpo anti-TNF.

ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD3



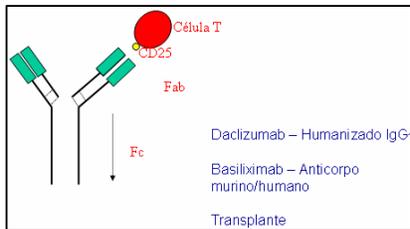
O anticorpo monoclonal **anti-CD3**, que é expresso nas células T, é importante nos transplantes. O problema deste anticorpo é que pode provocar o síndrome de citocinas³, isto é, o anticorpo pode ser tão eficaz que provoca a morte das células T não por apoptose, mas por necrose, o que faz com que libertem todo o seu conteúdo, induzindo a libertação maciça de interleucinas, podendo provocar o choque anafilático e a morte do doente.

Mecanismo de Acção: Anticorpos dirigidos contra a cadeia ϵ do CD3, que é uma molécula trimérica situada ao lado do receptor das células T na superfície dos linfócitos T humanos, envolvida no reconhecimento de antígenos, sinalização celular e proliferação. O tratamento com este anticorpo provoca interiorização do receptor das células T e impede assim o reconhecimento de antígenos. A administração deste anticorpo é rapidamente seguida por depleção e extravasão da maioria das células T da corrente sanguínea e órgãos linfóides periféricos. Esta ausência de células T nas regiões linfóides onde habitualmente se encontram é secundária à morte celular por activação do complemento, à morte celular induzida por activação e à marginação das células T nas paredes endoteliais vasculares e à sua consequente redistribuição por órgãos não linfóides. Também reduz a função das restantes células T, pois também provoca a ausência de produção de IL-2 e grande diminuição de produção de múltiplas citocinas, talvez com excepção da IL-4 e IL-10.

Toxicidade: Síndrome das citocinas manifesta-se clinicamente por febre alta, calafrio, cefaleia, tremores, náuseas, diarreia, dor abdominal, mialgias, e fraqueza generalizada.

³ Esta síndrome esteve na moda o ano passado pois provocou a morte de 4/5 doentes que o estavam a testar.

ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD25 (= Anti-receptor da IL-2)

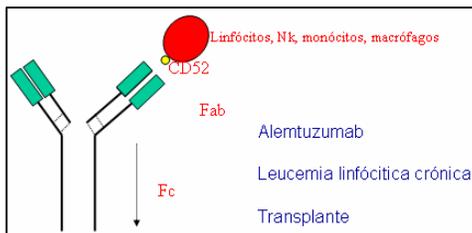


Anticorpo anti-CD-25 pode ser o **Daclizumab**, sendo uma IgG₁, ou pode ser **Basiliximab**, se for um anticorpo murino/humano. Utiliza-se no transplante, com bastante eficácia na rejeição aguda. O CD-25 é importante para a activação das células.

Mecanismo de Acção: Daclizumab tem uma afinidade mais baixa que o Basiliximab, mas tem uma semi-vida longa (20 dias). O mecanismo de acção exacto não está ainda totalmente percebido, mas resulta provavelmente da sua ligação aos receptores da IL-2 na superfície dos linfócitos T activados.

Toxicidade: Não se associa ao síndrome de libertação de citocinas, mas podem ocorrer reacções anafiláticas. Ainda que possam ocorrer distúrbios linfoproliferativos e infecções oportunistas, a sua incidência parece ser muito baixa.

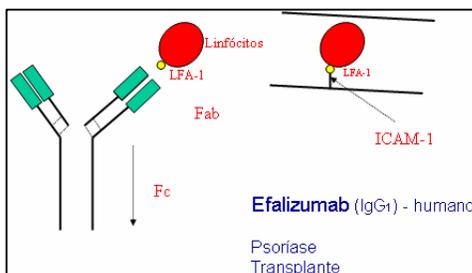
ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD52



O anticorpo Anti-CD52, chamado **Alemtuzumab**, utiliza-se na Leucemia Linfocítica Crónica e no Transplante.

O anticorpo atinge o CD52, uma glicoproteína expressa nos linfócitos, monócitos, macrófagos e células natural killer. O fármaco causa lise extensa dos linfócitos ao induzir a apoptose das células alvo. Alcançou alguma eficácia no transplante renal porque produz depleção prolongada das células B e T e permite a minimização de uso de fármacos.

ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-LFA-1



O **Efalizumab** é um anticorpo monoclonal IgG₁. Bloqueia o LFA-1 (determinante antigénico das células T), que é fundamental para que as células T se liguem ao ICAM-1 (molécula de adesão molecular).

Anticorpo monoclonal IgG₁ humanizado que tem como alvo a cadeia CD11a do LFA-1 (antigénio 1 associado à função dos linfócitos). Liga-se a LFA-1 e previne a interacção LFA-1-ICAM (molécula de adesão intercelular) para bloquear a adesão, tráfico e activação de células T.

ANTICORPOS MONOCLONAIS E PROTEÍNAS DE FUSÃO ANTI-TNF

Infliximab : anticorpo 75%

CDP 571: IgG4 anti-TNF (humanizado)

CDP 870: anti-TNF (Fab) peguilado

Adalimumab : IgG1 anti-TNF (humano)

Etanercept: Receptor P75 do TNF

Onercept: Receptor P55 do TNF

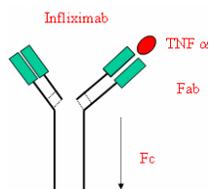
Infliximab, que é um anticorpo anti-TNF, 75% humano.

Há já a construção de anticorpos anti-TNF peguilados. A forma peguilada permite-nos dar o anticorpo por via subcutânea, fazendo com que o anticorpo se liberte ao longo do tempo.

O **Adalimumab** é um anticorpo anti-TNF humano.

O **Etanercept** é uma proteína de fusão, que tem o segmento Fc e na sua extremidade tem o receptor P75 do TNF. Não é eficaz na doença de Crohn porque não provoca a apoptose das células, acontecendo o mesmo com o **Onercept**, que tem só o P55 como princípio activo.

INFLIXIMAB



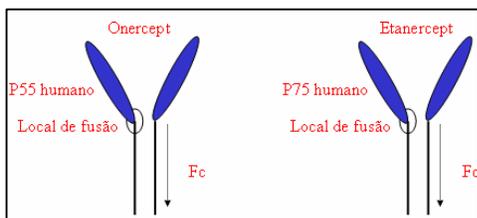
É anticorpo monoclonal quimérico anti-TNF- α , que contém uma região constante humana e uma região variável murina. Liga-se com grande afinidade ao TNF- α e previne que esta se ligue aos seus receptores.

Terapêutica: Os pacientes com Artrite Reumatóide têm níveis elevados de TNF- α nas articulações, enquanto que os pacientes com doença de Crohn têm níveis elevados de TNF- α nas suas excreções. Está aprovado para tratamento de sintomas da Artrite Reumatóide, e é usado em combinação com Metotrexato em pacientes que não respondem à terapia com apenas Metotrexato. Também está aprovado para o tratamento de sintomas da doença de Crohn moderada e severa em pacientes que não responderam à terapia convencional, e para tratamento de fístulas derivadas da mesma doença.

Toxicidade: Os pacientes podem ter uma reacção à infusão caracterizada por febre, urticária, hipotensão e dispneia após 1-2 horas da administração do anticorpo. Podem também ocorrer infecções graves, mais frequentemente nos aparelhos respiratório superior e urinário. Também está descrito o desenvolvimento de anticorpos anti-nucleares e uma síndrome *Lúpus-like*, embora seja raro.

ADALIMUMAB

Outro anticorpo monoclonal anti-TNF- α para uso intravenoso. É um anticorpo monoclonal IgG₁ humano recombinado aprovado para o uso na Artrite Reumatóide.



Estrutura das proteínas de fusão anti-TNF: Observa-se o local de fusão entre o receptor humano do TNF- α (P75 no **Etanercept** e P55 no **Onercept**) e o segmento Fc dum anticorpo.

ETANERCEPT

Embora não seja um anticorpo monoclonal, mas sim uma proteína de fusão, o **Etanercept** está, em termos de mecanismo de acção, relacionado com o **Infliximab**, pois também tem como alvo o TNF- α . O **Etanercept** contém a porção de ligação ao ligando do receptor TNF- α humano (P75) fundido como porção Fc da IgG₁ humana, e liga-se ao TNF- α prevenindo a sua interacção com os seus receptores.

Terapêutica: Está aprovado para o tratamento de sintomas da Artrite Reumatóide em pacientes que não responderam a outras terapias. Pode ser usado em combinação com o Metotrexato em pacientes que não responderam à terapia com apenas Metotrexato.

Toxicidade: Tal como o Infliximab, ocorreram infecções graves após tratamento com Etanercept. Reacções no local da injeção (eritema, dor, infecção) ocorreram em mais de 1/3 dos pacientes.

Certolizumab: fragmento Fab de anticorpo monoclonal anti-TNF- α humanizado, que se liga com grande afinidade ao TNF- α , neutralizando a sua actividade. A sua forma peguilada torna possível a administração subcutânea. (NOTA: este fármaco não está no glossário)

Terapêutica:	Doença inflamatória do intestino, Artrite reumatóide, Psoríase Sacroileíte
Toxicidade:	Reacções imediatas Reacções tardias Tuberculose

São os mais utilizados. Usam-se na doença inflamatória do intestino, na Artrite Reumatóide, na Psoríase, na Sacroileíte, na Pélvis Condilite. Podem dar reacções imediatas, como o choque anafilático, que são relativamente raras. Ou podem dar reacções tardias, que são reacções imunológicas do tipo 3, em que há a produção de anticorpos, habitualmente por volta do 5º/7º dia, que reagem com os determinantes antigénicos do anticorpo que se está a dar, e os doentes ficam com febre, artrite, anorexia (este síndrome trata-se com corticóides). Outro problema *de novo* é a Tuberculose. O TNF é uma molécula fundamental no combate à *Mycobacterium*, portanto sem ele não conseguimos combater a bactéria. Por isso, quando se começou a

utilizar anticorpos anti-TNF houve um aumento da incidência de Tuberculose. Isto levou a que as sociedades recomendassem que os doentes que vão fazer anticorpos anti-TNF façam radiografia pulmonar e uma prova da tuberculina. Habitualmente quando a prova tuberculínica é superior a 5mm, recomenda-se que haja quimioprevenção de *Mycobacterium Tuberculosis* com Isoniazida durante 9 meses. Se a prova tuberculínica for superior a 20mm recomenda-se que o doente seja tratado como se tivesse Tuberculose em actividade.

OUTROS ANTICORPOS

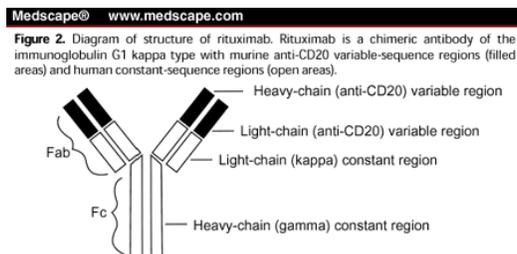
Anticorpos
Rituximab :IgG1 (Fc humano) CD20 – Linfócito B Linfoma B Activa o complemento + apoptose
Fontolizumab : Anticorpos anti-IFN Doença de Crohn
ABT – 874 : Anticorpos anti-IL12 Doença de Crohn

O **Rituximab** é muito utilizado em hematologia. É um anti-CD20 (Linfócitos B), utilizando-se no Linfoma das células B. Ele activa o complemento e a apoptose.

O **Fontolizumab** é um anticorpo anti – Interferão γ e utiliza-se na doença de Crohn.

O ABT-874 é um anticorpo anti-IL-12, e está em fase III no tratamento da doença de Crohn.

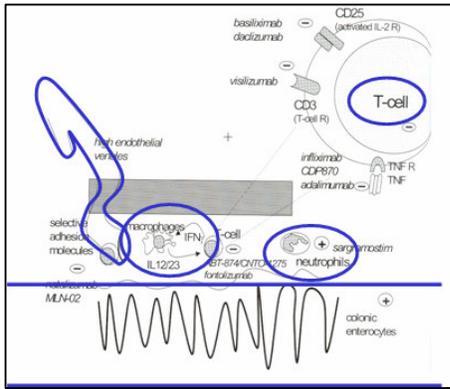
RITUXIMAB



A estrutura quimérica do **Rituximab** consiste em IgG₁ e regiões constantes da cadeia kappa humanas e regiões leves e pesadas variáveis do anticorpo murino para CD20. As regiões variáveis murinas ligam-se selectivamente ao antígeno CD20, expressa na superfície de linfócitos B normais e células B dos linfomas. A presença da região constante humana permite que o **Rituximab** se ligue aos receptores Fc nas células efectoras humanas (ex. células do linfoma, macrófagos e neutrófilos) para mediar a citotoxicidade dependente do complemento e anticorpos e diminuir a imunogenicidade.

FONTOLIZUMAB

Anticorpo monoclonal IgG₁ contra o IFN- γ . É usado na doença de Crohn, pois o IFN- γ tem um papel chave na inflamação derivada desta doença.

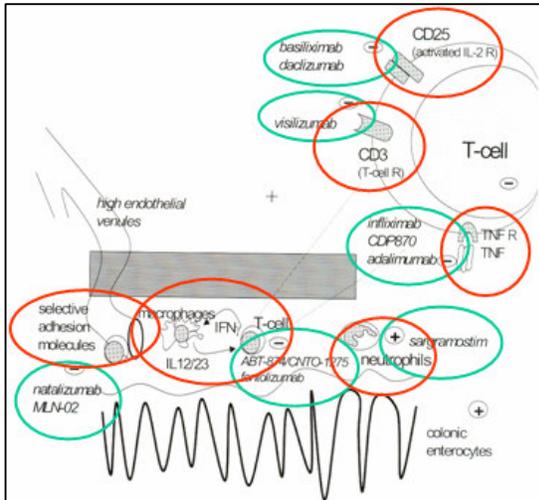


Resumindo tudo que foi dito.

Temos aqui representado todos os alvos farmacológicos possíveis:

- ✓ Vasos
- ✓ Célula T
- ✓ Macrófagos, APCs
- ✓ Neutrófilos

Por exemplo, os vasos. Para os linfócitos poderem actuar têm que deixar os vasos e ir para os tecidos, provocando depois uma lesão tecidual imunomediada. E podemos bloquear esta passagem dos vasos.



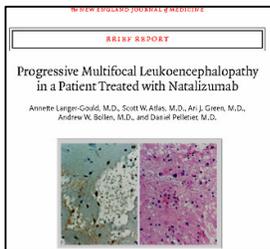
Actualmente podemos:

- ✓ Bloquear o CD25, com **Daclizumab** e **Basiliximab**;
- ✓ Bloquear o CD3 com o **Visilizumab**.
- ✓ Bloquear o TNF circulante ou os seus receptores com o **Infliximab** ou **Adalimumab**;
- ✓ Actuar nos neutrófilos com a **Sargramostima**, que não é mais que o GM-CSF (Factor Estimulante das Colónias de Macrófagos e Granulócitos);
- ✓ Actuar ao nível das células APC bloqueando a IL-12, com **Fontolizumab**;
- ✓ Bloquear as moléculas de adesão molecular, com **Natalizumab**.

Portanto estes são os nomes dos fármacos que já existem.

A terapia biológica revolucionou o tratamento das doenças imunológicas, porque alterou a história natural da maior parte destas. Isto é, diminuíram o número de recidivas e de internamentos e melhoraram a qualidade de vida dos doentes.

O maior problema é a razão risco/benefício. São fármacos muito caros e que se podem acompanhar de alguns efeitos laterais.



O anticorpo **Natalizumab** bloqueia a $\alpha 4\beta 7$ integrina, molécula de adesão que promove a migração dos linfócitos para vários órgãos, incluindo cérebro e rins. É muito eficaz no tratamento da doença de Crohn e da Esclerose Múltipla. Associou-se, em dois doentes, a uma Leucoencefalopatia multifocal progressiva (artigo publicado o ano passado). O anticorpo provocou a reactivação de um vírus, o JC, que habitualmente existe no SNC.⁴

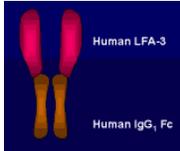
Unusual Presentation of Tuberculosis After Infliximab Therapy.
Magro, F. MD; Pereira, P. MD; Veloso, F. Távares PhD, MD;
Carneiro, F. PhD, MD
Inflammatory Bowel Diseases. 11(1):82-84, January 2005.

Há também o aparecimento de formas atípicas de Tuberculose após terapia. O professor, juntamente com outros colegas, publicaram, à dois anos, um caso do aparecimento de Tuberculose disseminada, num paciente que estava assintomático e o PCR para Mycobacterium foi sempre positivo.

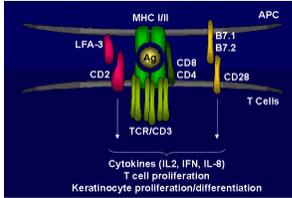
“Por onde é que estudam? Vou surpreendê-los! Eu vou-vos dar os slides, estudem pelos slides. E depois o capítulo 52 do Goodman e, por isso, eu trouxe o Goodman, tem quase tudo.”

⁴ Artigo disponível em: <http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/4/375>

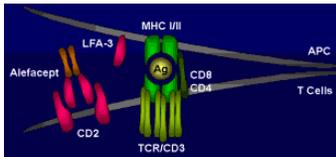
ALEFACEPT



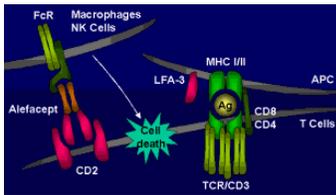
O **Alefacept** é uma proteína de fusão recombinada, que é composta pela porção terminal de LFA-3 e pela porção Fc da IgG₁ humana. Aprovada em 2003 pela FDA para o tratamento de placas de Psoríase moderadas a severas.



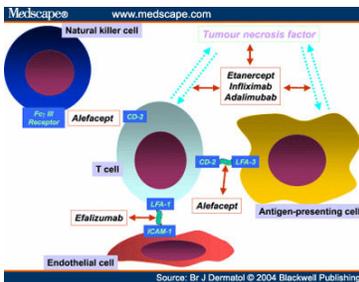
LFA-3 é expressa nas APCs e é o ligando para CD2, que é expresso nos linfócitos T maduros e células natural killer (NK). A ligação de CD2 ao LFA-3 age como um sinal co-estimulador e é importante na proliferação e activação dos linfócitos T. As lesões da psoríase exibem uma predominância de linfócitos que são células T efectoras de memória, nos quais o CD2 está *up-regulated*.



O **Alefacept** bloqueia a interacção entre LFA-3 nas APCs e CD2 nos linfócitos T através de inibição competitiva. O LFA-3 do **Alefacept** liga-se ao CD2 e previne a transdução de sinais co-estimuladores entre APCs e linfócitos T.

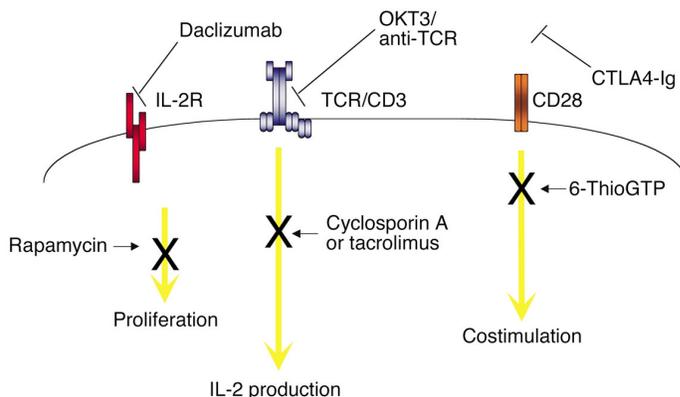


Além disso, parece haver outro mecanismo pelo qual o **Alefacept** exerce o seu efeito imunossupressor. O Alefacept age como uma molécula que faz ponte entre CD2, que está *up-regulated* nas células T de memória, e o receptor FcγIII (CD16) nas células NK. Tal interacção induz apoptose dos linfócitos T através da libertação de granzima pelas células NK.



Assim, o **Alefacept** inibe a proliferação e activação dos linfócitos T de memória através do bloqueio da interacção LFA-3-CD2 e induz a apoptose dos linfócitos T através da mediação entre linfócitos T e células NK.

Esquema das vias de sinalização extra- e intracelular das células T que são alvo de fármacos imunossupressores.



Daclizumab bloqueia a interacção do receptor da IL2 com os seus ligandos.

CTLA4-Ig bloqueia a interacção do receptor CD28 com os seus ligandos.

OLT3 interage com o complexo CD3 associado ao TCR.

Rapamicina inibe a progressão do ciclo celular através da sua interacção com mTOR.

Ciclosporina A e o **Tacrolimus** inibem a calcineurina, inibindo assim NFAT e a síntese de IL2.

Azatioprina, através do seu metabolito 6-ThioGTP, inibe os sinais de CD28.

GLOSSÁRIO: MODIFICADORES DA RESPOSTA IMUNE

Aminossalicilatos

Doença Inflamatória do Intestino e Artrite:

Sulfassalazina: anti-inflamatório; união da Messalazina com Sulfapiridina; usa-se na Doença Inflamatória de Intestino e Artrite (sendo a Sulfapiridina é fundamental nesta última).

Messalazina: principio activo anti-inflamatório; pode resultar da azo-redução sobre a Sulfassalazina ou usada ligada a veículos que a libertam no local da inflamação.

Balsalazida: pró-fármaco constituído por Messalazina ligada ao veículo 4-aminobenzil-b-alanina, que a liberta no cego e cólon.

Olsalazina: pró-fármaco constituído por 2 moléculas de 5-ASA, e que liberta a Messalazina no cego e cólon.

Inibidores da Calcineurina

Inibem a produção de IL-2; Usados no Transplante, Colite Ulcerosa e Psoríase; Via oral ou endovenosa; Necessidade de doseamentos séricos porque causam toxicidade hepática e renal; causam tremor e hipertensão arterial; Metabolização hepática pela CYP3A:

Ciclosporina: inibidor da calcineurina por ligação à ciclofilina; afecta a LDL e ácido úrico; associado ao aparecimento de hiperplasia gengival

Tacrolimus (FK506): inibidor da calcineurina por ligação ao FKBP; mais associado ao aparecimento de Diabetes, não afecta a LDL e ácido úrico; toxicidade neurológica

Antimetabolitos e Antiproliferativos

Transplante e Doença Inflamatória do Intestino:

Azatioprina: antimetabolito da purina, que inibe a proliferação e migração dos linfócitos, por falsa incorporação nucleotídica; boa absorção oral; toxicidade: hepática, leucopenia, trombocitopenia, pancreatite.

Mercaptopurina (6-MP): antimetabolito da purina; existe como resultado da metabolização da Azatioprina ou como fármaco isolado.

Tioguanina (6-TG): antimetabolito da purina; existe como metabolito activo da Azatioprina ou como fármaco isolado; como se associou a adenomas hepáticos não se usa muito.

Micofenolato de Mofetil: pró-fármaco que é transformado em ácido micofenólico, um inibidor reversível da desidrogenase da inosina monofosfato que actua no ciclo celular, inibindo selectivamente a proliferação dos linfócitos; toxicidade: diarreia, vómitos, leucopenia, ↑infecções por CMV.

Transplante:

Sirolimus (Rapamicina): inibidor do mTOR por ligação ao FKBP; inibe a proliferação dos linfócitos; semi-vida longa; necessidade de doseamentos séricos; metabolização pela CYP3A4; toxicidade: dislipidemia, anemia, leucopenia e trombocitopenia.

Everolimus: inibidor do mTOR; em tudo semelhante ao Sirolimus, mas com uma semi-vida menor.

Antiproliferativos e Citotóxicos

Doença Inflamatória do Intestino, Artrite Reumatóide e Psoríase:

Metotrexato: antimetabolito inibidor da dihidrofolato redutase; altera a produção de ILs; via IM, toxidade: hepática, hematológica e fibrose pulmonar.

Transplante:

FTY720: agonista do receptor S1P, age via “*lymphocyte homig*” mantendo os linfócitos afastados da circulação; toxicidade: efeito cronotrópico negativo.

Terapêutica Biológica

Anticorpos Monoclonais (terminam em “mab”)

Anti-CD3: dirigido contra a cadeia ϵ do CD3, que provoca interiorização do receptor das células T impedindo o reconhecimento de antígenos; usa-se no transplante; pode provocar síndrome das citocinas.

Anti-TNF- α _ Doença Inflamatória do Intestino, Artrite Reumatóide, Psoríase, Sacroileíte; Toxicidade: Reacções imediatas ou tardias, Tuberculose:

Adalimumab: 100% humano

Infliximab: 75% humano

Anti-CD25 (anti-receptor da IL-2) _ Transplante (muito eficaz na rejeição aguda):

Daclizumab: humanizado IgG₁.

Basiliximab: murino/humano.

Anti-CD52 _ Leucemia Linfocítica Crónica e Transplante:

Alemtuzumab: induz a lise de linfócitos por apoptose.

Anti-IFN γ _ Doença de Crohn:

Fontolizumab: usa-se na doença de Crohn

Anti-LFA-1 _ Psoríase e Transplante:

Efalizumab: IgG₁ humanizado que bloqueia o LFA-1, que é fundamental para que as células T se liguem ao ICAM-1.

Anti-CD20 _ Linfoma das Células B

Rituximab: activa o complemento e a apoptose.

Anti-integrina $\alpha 4\beta 7$ _ Doença de Crohn e Esclerose Múltipla

Natalizumab: bloqueia a $\alpha 4\beta 7$ integrina, impedindo a migração dos Linfócitos para os órgãos alvo.

Proteínas de Fusão (terminam em “cept”)

Anti-TNF- α (terapêutica e toxicidade = ao anticorpo monoclonal anti-TNF)

Etanercept: contém a porção de ligação ao ligando do receptor TNF- α humano (P75) fundido com a porção Fc da IgG₁ humana

Onercept: contém o receptor P55 do TNF- α

Anti-CD2 _ Psoríase

Alefacept: composta pela porção terminal de LFA-3 e pela porção Fc da IgG₁ humana, que bloqueia a interacção LFA-3-CD2; inibe a proliferação e activação dos linfócitos T e induz a sua apoptose.

Finalmente acabamos!

Pedimos desculpa por qualquer erro que possa aparecer ou se, por ventura, nos tornamos demasiado repetitivas. Mas como o professor disse, o Goodman tem quase tudo, mas não tem tudo! O que não facilitou nada o nosso trabalho. De qualquer maneira esperamos que esta desgravação vos seja útil.

Agradecemos ao Nuno por nos ter disponibilizado e editado a gravação e ao Leonel por ter pedido os slides ao professor! Obrigado meninos! É caso para dizer que sem vocês, o que seria de nós.... ou melhor, desta desgravação !!!!!

Queremos também dar os PARABÉNS à nossa comissão de curso pelo excelente e GRANDE trabalho que têm feito!

Paula, prometido é devido, por isso aqui vai:

Um grande beijo para TODA a nossa Turma (Nilza, Mary, Marta, Nuno, Patrícia Fernandes, Patrícia Amaral, Paula, Pedro Benji, Baião e João)! Gostamos muito de vocês! Obrigado por TUDO! E agora sim, é caso para dizer: sem vocês o que seria de nós!!!!!!

Filipa Costa
Joana Ferreira
Turma 16