

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU
MESTRADO EM NEUROLOGIA

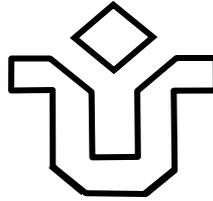
**A ANTITROMBINA PLASMÁTICA EM PACIENTES
COM ESCLEROSE MÚLTIPLA NAS FORMAS
CLÍNICAS SURTO-REMISSÃO E
SECUNDÁRIA PROGRESSIVA**

MARILZA CAMPOS DE MAGALHÃES

Profa. Dra. Soniza Vieira Alves Leon
ORIENTADORA

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU
MESTRADO EM NEUROLOGIA

Dissertação apresentada ao término do Curso de Pós-Graduação Stricto-Sensu em Neurologia, Área de Concentração Neurociências, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

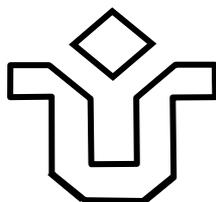
2006

C16.8 MAGALHÃES, Marilza Campos de
M188n A Antitrombina plasmática em pacientes portadores de Esclerose
Múltipla nas formas clínicas surto-remissão e secundária progressiva./
Marilza Campos de Magalhães – Rio de Janeiro, 2006.
103 p.

Orientador: Soniza Vieira Alves Leon

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Mestrado em
Neurologia / Neurociências, 2006.

1. antitrombina. 2. esclerose múltipla. 3. hemostasia. 4. coagulação.
5. inflamação. I – Leon, Soniza Vieira Alves. II – Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU
MESTRADO EM NEUROLOGIA

**A ANTITROMBINA PLASMÁTICA EM PACIENTES
COM ESCLEROSE MÚLTIPLA NAS FORMAS
CLÍNICAS SURTO-REMISSÃO E
SECUNDÁRIA PROGRESSIVA**

Por

MARILZA CAMPOS DE MAGALHÃES

Dissertação de Mestrado

BANCA EXAMINADORA

Professora Dra. Soniza Vieira Alves Leon (Presidente)

Professor Dr. Carlos Alberto Morais de Sá

Professora Dra. Telma Barbosa Gadelha

Conceito:.....

Rio de Janeiro, RJ – Brasil, 2006

HOMENAGEM

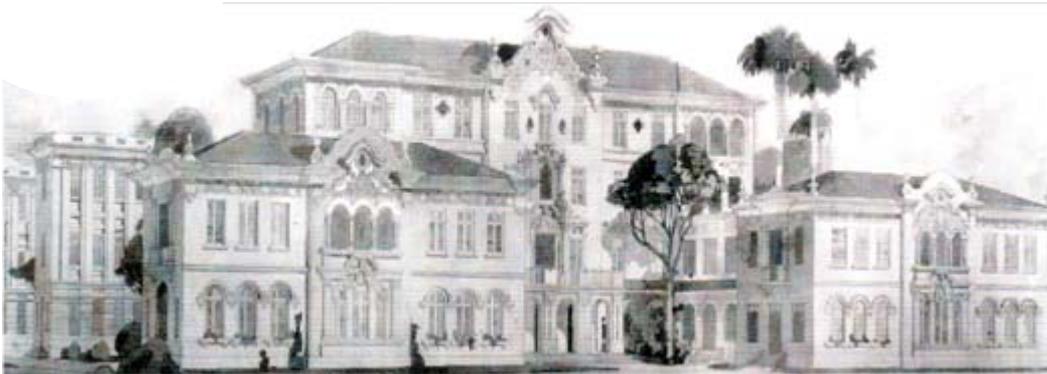
Esta dissertação foi apresentada quando:



A UNIRIO – *Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro*
completou 26 anos de criação;



A Escola de Medicina e Cirurgia
alcançou 94 anos de existência;



e o Hospital Universitário Gaffrée e Guinle
comemorou o seu 76º aniversário de construção.

DEDICATÓRIA

Aos que me inspiraram

- Orlando Campos, meu pai (1918 – 1983)
- Luiz Carlos de Britto Lyra, Mestre e o melhor dos amigos (1932 – 1995)

À que é o meu melhor exemplo

- Brígida Célia Couto Campos, minha mãe

Às que acreditemos

- Soniza Vieira Alves Leon
- Regina Maria Papais Alvarenga

Aos que foram a força

- Minha família
- Meus amigos

Àquela que é o motivo

- Isabela, minha filha

EPÍGRAFE

*“Quando as coisas estão dentro de uma realidade irrestrita, elas são sempre difíceis. Apesar disso, não fuja da luta, pois a vitória só aparece se ela houver e houver persistência em relação a ela. Imagine também que se ela não houvesse onde estaríamos, e também se não houvesse pessoas para enfrentá-la. Nada cai do céu. Tudo está ligado e em constante desenvolvimento. Não pares, e, em todos os momentos de sua vida, principalmente os difíceis, lembre-se desta palavra – lutar. De quem não tem pretensões **em ser um esquisitão (como Monteiro Lobato classificou um certo tipo de pessoa) porquanto é muito difícil, mas que deseja ardentemente ajudar a quem o for, pois sem eles estaríamos ainda atrás de mamutes**MGCB, RJ, 1966 ”*

O trecho acima é uma dedicatória feita por um amigo querido, em 1966, ao me presentear com o livro “Perspectivas do Homem”, de Roger Garaudy.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho só foi possível ser realizado porque contei com a participação de pessoas, colocadas no momento certo em minha vida pelas mãos de **Deus**. Agradeço a **Ele** a convivência com pessoas tão interessantes, incomuns, privilegiadas em seus conhecimentos, que se encaixam de alguma forma na Epígrafe desta dissertação.

Ao Professor Luiz Carlos de Brito Lyra, responsável pela Hematologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, mestre por excelência, tanto nos ensinamentos da Clínica Médica quanto da Hematologia, inspirador, formador de inúmeros hematologistas a quem semeou o gosto pelo estudo das doenças do sangue, falecido prematuramente no vigor de sua atuação como médico e tutor e de quem tive o privilégio de absorver conhecimentos durante mais de 30 anos. Foi junto com meus pais referência de vida e firme apoio em horas decisivas de minha vida. Divido com ele este momento da minha vida.

A Professora Dr^a. Soniza Vieira Alves Leon, pela paciência, dedicação, competência profissional na sua orientação. Junto com a Professora Dr^a. Regina Maria Papais Alvarenga, formaram a dupla que acreditaram em mim e na possibilidade de realização deste trabalho. Corajosas! Foi uma honra compartilhar com vocês estes dois anos de trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Moraes de Sá, por tornar menos árduo o meu trabalho, solícito quando precisei de ajuda, companheiro de horas difíceis, polêmico, certamente sem pretensões em correr atrás de mamutes. Absteve sua família de momentos preciosos de sua presença para a correção do primeiro texto, com importante contribuição conceitual.

Ao Professor Adilson José de Almeida, amigo, companheiro com quem divido a árdua e prazerosa tarefa do ensino de Hematologia, imprescindível, competente, incansável na tarefa da análise estatística e correção do texto. Suas intervenções foram vitais.

Ao Dr. Fábio Cristiane de Oliveira Cachem, pela ajuda na confecção de figuras do texto, pela efetiva realização da técnica de dosagem da antitrombina, pela força jovem e de futuro brilhante.

À Dras. Claudia Vasconcelos e Claudia Miranda pelo entusiasmo com que acompanharam o desenvolvimento desta pesquisa, selecionando e encaminhando seus pacientes.

A Dra. Olívia Pereira de Mello Marçal, ao Dr. Dalton Luiz Dreyer Ferreira, com quem divido as atividades assistenciais, pela amizade e apoio, sempre. Compartilharam comigo as dificuldades destes dias.

A Professora Dr^a. Telma Barbosa Gadelha, por permitir o uso do Laboratório de Hemostasia e Coagulação, da Hematologia Clínica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ, para a realização da dosagem da antitrombina, por ceder a técnica da dosagem adaptada, por permitir a ajuda e o socorro de sua experiente técnica Gisele de Castro Souza na condução dos testes. Foram de capital ajuda.

À Sra. Maria Marta da Costa, nossa auxiliar de laboratório, pela presteza, companheirismo, auxílio e os muitos anos de amizade.

Aos meus colegas da Clínica Médica, pelo incentivo, pela força.

Aos meus colegas de Mestrado, pelo prazer de compartilhar com vocês, novamente, depois de tantos anos os bancos escolares, alguns meus ex-alunos recentes e outros, “velhos companheiros” de Universidade.

Aos meus professores, sem distinção, pelos ensinamentos, pela excelência das aulas, pelo exemplo.

À Coordenação do Mestrado em Neurologia da UNIRIO, área de concentração de Neurociências, pelo privilégio e honra de pertencer a sua primeira turma.

RESUMO

A inflamação da Esclerose Múltipla (EM) depende de mecanismos associados à função endotelial, migração linfocitária e barreira hematoencefálica. A coagulação, uma das etapas da inflamação, e seus fatores ativados estão alterados no plasma de animais com Encefalite Alérgica Experimental. A trombina é fator chave e seus inibidores são a antitrombina (AT) no plasma e a protease Nexina 1 no sistema nervoso central. O **objetivo** deste estudo foi investigar se níveis plasmáticos de AT de pacientes com EM em formas clínicas surto-remissão (EMSR) e secundária progressiva (EMSP) têm relação com a doença quando comparados aos controles. O **método** de digestão amidolítica em substrato sintético cromogênico e adaptado para determinação em leitor de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) foi utilizado para dosagem de AT. A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes qui-quadrado (χ^2), *t* de Student e *one-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni para comparação entre os grupos. Foram incluídos 69 pacientes com EM, dos quais 37 (53,6%) com EMSR, 32 (46,3%) com EMSP e 34 indivíduos saudáveis como grupo controle. Nossos **resultados** mostraram que no grupo com EMSR, 7/37 (18,9%) eram homens e 30/37 (81,0%) mulheres, no grupo com EMSP, 10/32 (31,2%) eram homens e 22/32 (68,7%) mulheres e no grupo controle, 12/34 (32,2%) eram homens e 22/34 (64,7%) mulheres. Os valores de AT dos pacientes com EM ($n=69$) foi de $109,68 \pm 18,39$ (25,00 a 147,00) %, sem diferença significativa com o grupo controle ($109,44 \pm 22,08\%$) ($t = 0,0574$; $p = 0,9543$). A AT apresentou média de $107,16 \pm 16,19$ (72,00 a 147,00) % nos pacientes EMSR, de $112,59 \pm 20,53$ (25,00 a 140,00) % nos pacientes EMSP e de $109,44 \pm 22,80$ (62,00 a 152,00) % nos controles. Os grupos não apresentaram diferença em relação às médias dos níveis de AT (ANOVA $p = 0,1481$). Em relação à atividade da doença, os níveis plasmáticos de AT nos pacientes com EM não foram diferentes entre si ($t = 0,1154$; $p = 0,9085$) e dos controles (ANOVA = 0,9943). As médias de AT dos grupos EMSR em surto ($109,88 \pm 17,26\%$) e controle ($109,44 \pm 22,80\%$) não apresentaram diferenças ($t = 0,4776$; $p = 0,6355$), assim como o grupo EMSR em remissão ($107,38 \pm 16,19\%$) vs controle ($t = 0,4776$; $p = 0,6927$), e entre si (EMSR em surto vs EMSR em remissão) ($t = 0,3088$; $p = 0,7593$), EMSR em surto vs EMSP ($112,59 \pm 20,53\%$) ($t = 0,9594$; $p = 0,3433$), e quando comparados EMSR em remissão e EMSP ($t = 0,9053$; $p = 0,3690$). As médias de AT do grupo com mais de 10 anos de doença ($n = 29$; $113,14 \pm 21,04\%$), do grupo com menos de 10 anos ($n = 40$; $107,20 \pm 16,01\%$) e dos controles quando comparados entre si (ANOVA $p = 0,4789$) não foram diferentes. Não foi observada associação entre os valores de EDSS e os níveis de AT. **Concluimos** que os níveis plasmáticos de AT não têm relação com EM nas formas clínicas estudadas, seja com o tempo de doença, o tratamento, a morbidade determinada pela escala de EDSS ou com períodos de atividade da doença.

ABSTRACT

The inflammation of Multiple Sclerosis (MS) depends of mechanisms associated with endothelial function, lymphocyte migration and blood-brain-barrier (BBB). The coagulation as a step of inflammation and its activated factors were altered in plasma of animals with Experimental Allergic Encephalomyelitis. Thrombin is the key factor and its inhibitors are the Antithrombin (AT) in plasma and the protease Nexin 1 (NP1) in central nervous system (CNS). **The objective** of this study was to investigate if AT plasma levels are related with clinical forms relapsing-remitting (RRMS) and secondary progressive (SPMS) of MS and compared with control group. **The method** of synthetic chromogenic substrate amidolytic action adapted to reading in ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay*) was used in AT assays. Statistical analysis was performed by using chi-square of Pearson (χ^2), Student t test, one-way ANOVA with Bonferroni post-test. to compare means. **Our results** showed a total of 69 patients with MS included: 37 (53,6%) with RRMS, 32 (46,3%) with SPMS e 34 healthy subjects as control group. In the RRMS group, 7/37 (18,9%) were male and 30/37 (81,0%) female; in SPMS group, 10/32 (31,2%) were male and 22/32 (68,7%) female, and in the control group, 12/34 (32,2%) were male and 22/34 (64,7%) female. Mean AT values of patients with MS ($n= 69$) were $109,68 \pm 18,39$ (range 25,00 to 147,00)% was not statistically different from mean of the control group ($109,44 \pm 22,08\%$) ($t = 0,0574$; $p = 0,9543$). Mean AT levels were $107,16 \pm 16,19$ (72,00 to 147,00) % in patients RRMS; $112,59 \pm 20,53$ (25,00 to 140,00) % in patients SPMS and $109,44 \pm 22,80$ (62,00 to 152,00) % in controls. No significant difference was found among means of those groups (ANOVA $p = 0,1481$). Plasma levels were not different in relation to disease activities ($t = 0,1154$; $p = 0,9085$) and control (ANOVA $p = 0,9943$). AT means in RRMS relapsed group ($109,88 \pm 17,26\%$) and control ($109,44 \pm 22,80\%$) were not different ($t = 0,4776$; $p = 0,6355$), as well in RRMS remission ($107,38 \pm 16,19\%$) vs control ($t = 0,4776$; $p = 0,6927$), in RRMS relapsing vs RRMS remitting ($t = 0,3088$; $p = 0,7593$), in RRMS relapsing vs SPMS ($112,59 \pm 20,53\%$) ($t = 0,9594$; $p = 0,3433$) and when comparing RRMS remitting and SPMS ($t = 0,9053$; $p = 0,3690$). Mean AT values of the group with more 10 years of disease ($n = 29$; $113,14 \pm 21,04\%$) were not different from means of patients with less 10 years of disease ($n = 40$; $107,20 \pm 16,01\%$) and control group (ANOVA $p = 0,4789$). No association was shown between values of EDSS and AT levels. We **concluded** that plasma levels of AT appears to demonstrate no relationship with MS, with the disease duration, morbidity estimated by EDSS, treatment or with remitting and relapsed forms of disease.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estruturas das antitrombinas nativa e latente obtidas por cristalografia por Raios-X	6
Figura 2. Diagrama da Mudança Conformacional da molécula da AT nativa ao se ligar ao pentassacáride glicosaminoglicano.....	7
Figura 3. Complexo antitrombina-heparina.....	8
Figura 4. Organização estrutural do gene da antitrombina humana.....	15
Figura 5. Modelo tridimensional do complexo trimolecular.....	23
Figura 6. Fisiopatologia da esclerose múltipla.....	38
Figura 7. Representação esquemática da microplaca de ELISA.....	56
Figura 8. Diagrama em caixas da idade em uma coorte de 69 pacientes com EM	60
Figura 9. Diagrama em caixas da antitrombina em uma coorte de 69 pacientes com EM.....	61
Figura 10. Dosagem de antitrombina de acordo com o tempo de doença.....	64
Figura 11. Dosagem de AT de acordo com EDSS.....	65

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Tabela 1 – Critérios Diagnósticos de EM (McDonald e cols.,2001).....	43
Tabela 2 - Características demográficas dos pacientes com Esclerose Múltipla e Controles.....	60
Tabela 3 - Análise de variância de fator único com pós-teste de Bonferroni para variável idade	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARG	Arginina
AT	Antitrombina
BHE	barreira hemato-encefálica
BOC	bandas oligoclonais
C ₅ b-9	complemento 5b-9
CD	<i>cluster of diferenciation</i>
DO	densidade óptica
EAE	encefalomielite alérgica experimental
ECAM	<i>endothelial celular adhesion molecula</i>
EDSS	<i>expandid disability score system</i>
ELISA	<i>enzymatic inked-immunoabsorbent assay</i>
EM	esclerose múltipla
EPR	<i>endothelial protein receptor</i>
E-selectina	selectina endotelial
FcγR	receptor citoplasmático do fragmento F da imunoglobulina
FT	fator tecidual
GAG	glicosaminoglicanos
GLI	glicina
HLA	<i>human histocompatibility leucocyte</i>
HS	sulfatos de heparina
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IL	interleucina
INF	interferon
LCR	liquido cefalorraqueano
MCP1	<i>macrofage cytoplasmic protein 1</i>
MHC	<i>major histocompatibilty complex</i>
MOG	mielina oligodendrocito
mRNA	RNA mensageiro
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>

NK	<i>natural killer</i>
NO	<i>nitrous oxide</i>
PAF	<i>platelet activator factor</i>
PAR	protein activated receptor
PBM	proteína básica da mielina
PCa	proteína C ativada
PECAM	<i>platelet endothelial cellular adhesion molécula</i>
PGI ₂	prostaglandina prostaciclina
PLP	proteína proteolípida
PN1	proteína nexina 1
P-selectina	selectina plaquetária
PTQ	proteína tirosinoquinase
RM	ressonância magnética
Rpm	rotação por minuto
S-4	sindecán 4
SER	serina
SNC	sistema nervoso central
TCR	<i>T cell receptor</i>
TIR	tirosina
TNF	fator de necrose tumoral
t-PA	<i>tissular - activator of plasminogen</i>
t-PAI –	<i>inhibitor of activator plasminogen tissular</i>

LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES DE MEDIDA

U –	unidade
ml –	mililitros
nm -	nanômetro
n –	número
µl –	microlitro
γ –	gama
κ –	kappa
α –	alfa
≤ -	menor ou igual
± -	mais ou menos
µ –	micra
β –	beta
> -	maior
< -	menor
C –	carbono
kD –	kilodáltons
<i>p</i> –	probabilidade
<i>t</i> –	teste t de Student
χ^2 -	qui-quadrado
Ca ⁺⁺ -	íon cálcio
® -	marca registrada
°C –	grau centígrado
log -	logarítimo

Sumário

DEDICATÓRIA	iii
EPÍGRAFE	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS E TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES E MEDIDAS	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. A Antitrombina.....	4
2.1.1. Histórico.....	4
2.1.2. As características moleculares	5
2.1.3. As ligações moleculares	6
2.1.4. As proteínas glicosaminoglicanas.....	9
2.1.5. O receptor sindecan 4 da antitrombina.....	12
2.1.6. As características clínicas da deficiência.....	13
2.1.7. O gene da antitrombina.....	14
2.1.8. As ações da antitrombina.....	15
2.1.9. Inflamação, Endotélio Vascular e Esclerose Múltipla.....	16
2.1.10. A coagulação e inflamação.....	19
2.1.11. Os fatores da coagulação com atividade inflamatória.....	19
2.1.11.1. A trombina.....	20
2.1.11.2. O fator Xa	26
2.1.11.3. O fibrinogênio.....	26
2.1.12. As ações antiinflamatórias da antitrombina.....	27
2.2. O Sistema Nervoso Central e a Inflamação.....	29
2.2.1. A barreira hemato-encefálica.....	30
2.2.2. As células do tecido nervoso central e a inflamação.....	31

2.2.2. A inflamação e coagulação e sistema nervoso central.....	32
2.3. A Esclerose Múltipla.....	34
2.3.1. Apresentação da doença.....	34
2.3.2. Características genéticas.....	35
2.3.3. Características populacionais.....	36
2.3.4. A fisiopatogenia da Esclerose Múltipla.....	37
2.3.5. O diagnóstico.....	40
2.3.6. Os critérios diagnósticos.....	40
2.3.7. A evolução clínica.....	44
2.3.8. Os marcadores biológicos.....	45
2.3.9. A Esclerose Múltipla e a Hemostasia e Coagulação.....	46
3. OBJETIVO.....	49
3.1. Geral.....	49
3.2. Específicos.....	49
4. PACIENTES E MÉTODO.....	50
4.1. Desenho da pesquisa.....	50
4.2. Ética.....	50
4.3. Seleção dos pacientes.....	50
4.3.1. Critérios de inclusão.....	50
4.3.2. Critérios de exclusão.....	51
4.3.3. Origem dos pacientes.....	52
4.4. Revisão da Literatura.....	52
4.5. Amostras Biológicas.....	52
4.6. Dosagem da antitrombina.....	53
4.6.1. Material utilizado para execução da técnica.....	53
4.6.1.1. Permanebtes e descartáveis.....	53
4.6.1.2. Reagentes para realização do teste	53
4.6.2. Procedimentos da coleta de amostras de sangue total e separação de plasma.....	53
4.6.3. Determinação da AT.....	54
4.6.4. Fundamentos do teste.....	54
4.6.5. Procedimento técnico.....	55
4.6.6. Etapas da realização do teste.....	56
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58

6. RESULTADOS.....	59
6.1. Características da população estudada.....	59
6.6. Níveis plasmáticos da atividade da antitrombina	61
7. DISCUSSÃO.....	65
8 .CONCLUSÃO.....	71
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
11. ANEXO 1 - Escala Expandida de Incapacidade (EDSS).....	93
12. ANEXO 2 - Características demográficas, clínicas e os níveis de antitrombina dos portadores de Esclerose Múltipla surto-remissiva, secundária progressiva e controle	95
13. ANEXO 3 - Classificação de Gell-Coombs.....	98
14. ANEXO 4 - Termo de consentimento livre e esclarecido	99
15. ANEXO 5 -Folha de coleta de dados	100
16. ANEXO 6 - Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, UNIRIO.....	101
17. ANEXO 7 - Permissão para utilização e adaptação de figura de artigo.....	102

1. INTRODUÇÃO

Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória e desmielinizante que acomete principalmente a mielina do sistema nervoso central (SNC). A EM está associada à susceptibilidade conferida por múltiplos genes e fatores ambientais (Dyment et al, 2004). A característica inflamatória da EM é expressa pelo perfil de citocinas pró-inflamatórias, tais como interferon-gama (IFN γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α), que atuam como gatilhos dos eventos que resultam na lesão da mielina imuno-mediada, dos oligodendrócitos e neurônios, levando a dano axonal irreversível e progressiva perda das funções neurológicas (Alves-Leon et al., 2001). A migração transendotelial de monócitos e linfócitos ativados atravessando a barreira hemato encefálica (BHE) e alcançando o sistema nervoso (SN) é um evento fundamental nos estágios iniciais da inflamação da EM, envolvendo uma cascata complexa de interações mediadas por uma série de moléculas de adesão (Kuenz et al, 2005). Moléculas de adesão são proteínas da superfície celular que se expressam em níveis muito baixos nas células do endotélio vascular do encéfalo normal e classificadas em três famílias, de acordo com sua estrutura e função: selectinas (P-selectina [PECAM], E-selectina [ECAM]), integrinas e super família de imunoglobulina) (Lassmann et al, 1991). Formas solúveis de moléculas de adesão são liberadas das células endoteliais ativadas, leucócitos e plaquetas (Lee et al 1999). As citocinas, estimuladas pela lesão inflamatória da EM, mantém uma regulação positiva de moléculas de adesão necessárias para a adesão leucocitária e migração pela superfície do endotélio vascular (Cannella & Raine, 1995). A inflamação da EM e a perpetuação do processo imuno-mediado dependem de mecanismos associados à função endotelial e da barreira hemato-encefálica (BHE)

(Poser, 2006). Estudar esses mecanismos pode contribuir para melhor compreensão da fisiopatogenia da EM.

Os fatores de coagulação ativados estão associados à inflamação e elevados no plasma de animais com Encefalite Alérgica Experimental (EAE), o modelo animal da EM. A trombina é o fator de coagulação chave e seus principais inibidores são a antitrombina (AT) no plasma e a protease nexina 1 (PN1) no sistema nervoso. O receptor Sindecan-4 (S-4) da AT na célula endotelial é expresso em várias células componentes do processo inflamatório, aparecendo na linhagem linfocitária B, células mono-macrofágicas, neutrófilos e plaquetas (Kaneider et al, 2001). O PN1, com atividade mais potente e rápida antitrombínica que a AT, é expresso na glia (Beilin et al., 2005). Na EAE há aumento da atividade desses inibidores da trombina, encontrados em níveis mais altos durante a fase aguda da doença (provavelmente refletindo o aumento do fluxo de proteínas plasmáticas para o liquor), e do PN1 que se encontra mais elevado nos estágios pré-clínicos da EAE (Beilin et al, 2005). O TNF- α , que apresenta importante função na atividade inflamatória da EM, induz a expressão do S4 nas células endoteliais, por via dependente de um fator da PN1. A AT ligada ao S4 pela porção citoplasmática induz, por meio da ativação das proteínocinasas C- α da célula endotelial, a liberação de prostaciclina, um inibidor da adesão leucocitária (Uchiba et al, 1996) e plaquetária (Yamauchi et al, 1989). A prostaciclina, inibindo a adesão leucocitária e plaquetária, atua na inflamação diminuindo a liberação de interleucinas (IL), como IL-6, IL-8 e TNF pela célula endotelial promovendo vasodilatação (Hoffmann et al, 2000). O S-4 da AT, atuando na maior liberação de prostaciclina, que por sua vez é um inibidor da adesão leucocitária, passa a apresentar ação antiinflamatória na membrana celular. A ação antiinflamatória da ligação AT- S-4 é observada ainda nos neutrófilos, linfócitos, e

monócitos, com redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF, inibição da ativação do fator transcricional nuclear kappa-B (NFkB), IL-8 (Opal et al, 2003; Hoffmann et al, 2000) e inibição da proliferação celular linfocitária T e B (Zuo et al, 2000). Estas ações podem ser inibidas pela heparina ou substâncias similares que competem com os receptores S-4 da AT (Kaneider et al, 2002). Considerando que na EM, doença inflamatória crônica do SNC, as ações de citocinas pró-inflamatórias mediadas por células T e B estão associadas à lesão da mielina, os níveis de AT na ligação AT- S-4 poderiam influenciar a evolução da doença e estarem alterados quando comparados com indivíduos saudáveis.

Motivados por esses dados, passamos a estudar os níveis de AT no plasma de pacientes com EM nas formas clínicas surto-remissão e secundária-progressiva comparando com grupo de indivíduos saudáveis. A hipótese aqui testada é se estes níveis estariam variando nestas duas formas de EM e relacionados à gravidade da doença, quando considerados os diferentes graus de incapacidades pelas escalas padronizadas associadas ao tempo da doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A ANTITROMBINA

2.1.1. Histórico

Em 1939, Brinkhous e cols. denominaram de “antitrombina” (AT) uma glicoproteína plasmática necessária para a atividade anticoagulante da heparina (Brinkhous et al,1939). A observação de que a AT era uma glicoproteína plasmática necessária para a atividade anticoagulante da heparina teve origem no final do século 19 e início do século 20 (Contejean, Mc Lean, Howell, *apud* Rosenberg & Damus, 1973) com a demonstração que a trombina perdia gradualmente sua atividade quando adicionada ao plasma desfibrinado ou soro. A suspeita de um inativador da enzima, presente no plasma normal, motivou a procura da entidade molecular verdadeira, por mais de três décadas. Atribuía-se a heparina atividades inibitórias da antitrombina. Coube a Brinkhous e cols. distinguirem as funções da antitrombina e da heparina (Brinkhous et al,1939). Desde então, foram observadas cerca de seis atividades diferentes antitrombínicas. Destas, três foram consideradas as mais importantes: a antitrombina I (AT I), referida como a atividade de absorção da trombina pela fibrina; a antitrombina II (AT II), como co-fator heparínico; e, a antitrombina III (AT III), que possuía atividade antitrombínica progressiva no plasma ou no soro.

Abilgaard (Abilgaard et al, 1967) mostrou que, na verdade, a antitrombina era uma única molécula com diferentes atividades no processo da anticoagulação. A nomenclatura para a antitrombina, proposta em 1954, e que contemplava com

números romanos cada uma das suas três funções (AT I, AT II, AT III), foi substituída em 1993, por Antitrombina (AT), durante a realização do *International Congress of Hemostasis and Thrombosis*.

2.1.2. Características moleculares da AT

A AT é produzida pelas células parenquimatosas hepáticas, e é encontrada no plasma na concentração de cerca de 150 µg / ml (110 a 150 µg / ml) , correspondendo a 1U / ml. Proteína globular de cadeia única, pertencente à família das serpinas, com aproximadamente 58 kD, composta de 432 aminoácidos e 6 resíduos de cisteína que formam pontes dissulfetos intramoleculares (cisteínas nas posições 8 com 128, 21 com 95, e 247 com 430). Existem ainda 4 resíduos de asparaginase (nas posições 95, 135, 155 e 192) que são glicosilados com oligossacarídeos em 90% da antitrombina plasmática (isoforma antitrombina α). A isoforma β não possui as quatro cadeias laterais de carboidratos presentes na forma α . A isoforma β tem papel mais importante, pois está relacionada às atividades da AT ligada a moléculas de heparina e heparina-símile, sendo responsável pela atividade na coagulação contra a trombina e outros fatores da coagulação, e na ligação à parede vascular (Pratt & Church, 1991; Villanueva et al,1979; Roeminsh et al, 2002; Quinsey et al, 2004) (Figura 1).

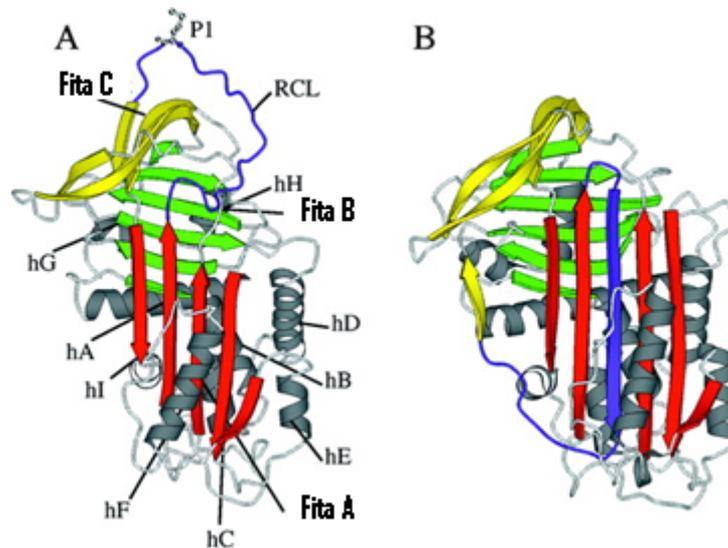


Figura 1. Estruturas da AT nativa (A) e latente (B) obtidas por cristalografia por Raios-X. Fita A, vermelho; Fita B, verde; Fita C, amarelo. Hélices (h) na AT nativa, cinza. (Silverman et al. J Biol Chem. 2001 Sep 7;276(36):33293-6).

A AT foi isolada do plasma pela técnica cromatográfica em agarose-heparina, o que permitiu a sua purificação e industrialização em larga escala para fins terapêuticos (Miller-Anderssem et al, 1973; Rosenberg & Damus,1987). Muitos investigadores clonaram cDNAs da AT (Procovinick et al,1983; Wasley et al, 1987). Os produtos obtidos da tecnologia recombinante são utilizados com a segurança que o produto plasmático não continha. Os preparados industrializados de AT, não podendo sofrer inativação viral pelo calor, tornavam o produto de alto risco, semelhantes aos componentes sanguíneos.

2.1.3. As ligações da molécula da Antitrombina

A molécula complexa da AT tem múltiplas atividades biologicamente importantes. A sua ativação fisiológica parece ocorrer na superfície luminal das células endoteliais, através da ligação com moléculas sulfatadas heparinóides (ativação alostérica), levando-a a um dramático rearranjo conformacional, com

exposição do seu sítio ativo (Villanueva & Danishefsky, 1979; Huntington et al, 2000). As reações da antitrombina dependem de sua exposição a estas moléculas, sendo que a heparina aumenta em 1.000 vezes a capacidade e velocidade de reação da AT diante de seu alvo proteinase (Olson et al,1981). O papel da heparina e moléculas similares é a promoção da exteriorização do sítio ativo da AT que, em sua forma nativa, encontra-se contraído para dentro da molécula. Vários trabalhos identificaram o sítio de ligação da AT com a heparina. O envolvimento de interações iônicas na ligação AT-heparina ou moléculas-símiles é demonstrado em trabalhos onde sítios com resíduos de lisina na AT e os carregados negativamente dos polissacárides influenciam a reação. A ligação ARG-SER (resíduo P1) no sítio reativo da AT é reconhecido como um substrato pela maioria das proteinases coagulantes (Smith & Knayer, 1987; Liu & Cahng,1987).(Figura 2)

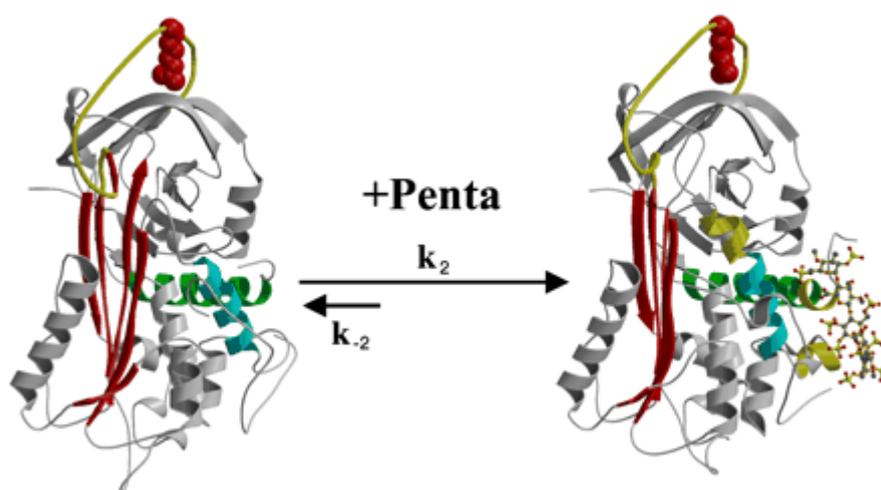
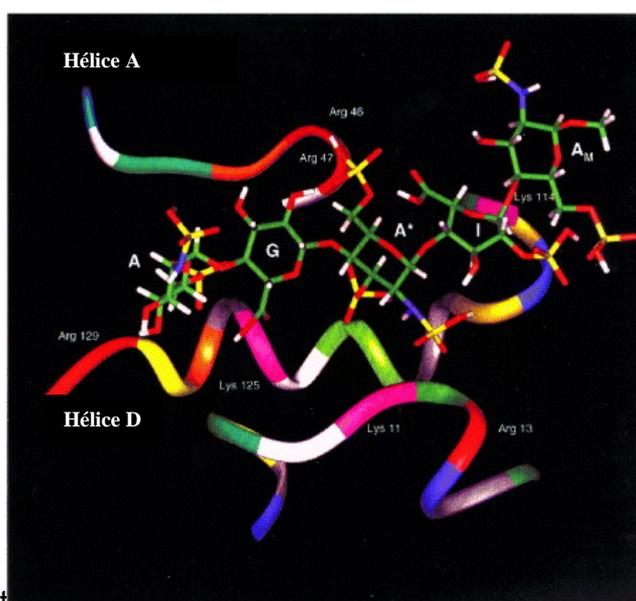


Figura 2- Diagrama da Mudança Conformacional da molécula da AT nativa ao se ligar ao pentassacáride glicosaminoglicano. As velocidades das etapas de reação dependem da concentração (k_2 =maior concentração; k_{-2} = menor concentração) do pentassacáride. Em k_{-2} há reversão do processo. Centro reativo=vermelho; fita A=vermelho; hélice D=cinza; hélice A= verde; P1-arginina=espaço cheio vermelho; mudança estrutural secundária=amarelo. (Huntington et al. The Conformational Activation of Antithrombin. J Biol Chem 2000 May 19;275(20):15377-15383)

A AT pertence à superfamília das serpinas. Estas proteínas exibem hipervariabilidade na região do sítio reativo, como proteínas estruturalmente semelhantes, porém com funções bem diferentes, incluindo muitos inibidores de proteinases que contem 30% de homologia na seqüência de aminoácidos. Elas são identificadas pela estrutura terciária conservada e mecanismo inibitório tipo “substrato suicida” (Silverman et al, 2001). A AT, diferente das outras serpinas, não expõe a alça do centro reativo, que contem a cadeia lateral P1 (posição do encaixe da proteinase). A estrutura da AT complexada ao pentassacáride ativador foi demonstrada por Raios-X - cristalografia, e espectrofotometria, que revelaram a expulsão da região flexível e a secundária mudança estrutural na região de ligação à heparina ou moléculas-símiles, consistindo no alongamento da hélice A e D e formação da hélice P1 (Carrel et al, 1994) (Figura 3).



Esse sítio at... da molécula da AT tornando as ligaç... específicas como as pentossacarídeas... (Carrel et al, 1994) (Figura 3).

solúvel, a reação é irreversível e equimolecular, causando inibição da atividade da proteinase. O complexo formado é rapidamente clareado da circulação (meia vida de 2 minutos) por mecanismo mediado por um receptor, que não reconhecendo o inibidor não reativo é inicialmente fagocitado pelas células do sistema macrofágico. Na ausência da heparina, a AT se liga a moléculas receptoras similares da heparina na membrana endotelial, desempenhando aí uma função diferente da realizada no processo da coagulação (Dickneite,1998).

2.1.4. As proteínas glicosaminoglicanas

A partir dos anos 90, importantes funções foram mostradas como associadas a um grupo de proteínas de membrana já conhecidas como ligadas à atividade anticoagulante do endotélio vascular. São as proteínas transmembranas glicosaminoglicadas (GAG), do grupo proteoglicanas heparina-sulfatadas (HS). Elas atuam como mediadoras e substratos para muitas reações associadas à ativação celular, controlando o seu comportamento. Estas reações levam ao desencadeamento de sinalizações complexas inter e intracelulares que terminam em vários efeitos: modulação das interações de receptores específicos, aceleração da formação do complexo inibidor de proteinase-proteinase e mediação de interações da superfície da célula com muitas enzimas e proteínas estruturais (Rapraeger,1993). No endotélio vascular e nos leucócitos interagem com a P-selectina e E-selectinas, moléculas que regulam a adesão e migração leucocitária (Koenig et al, 2001), importantes funções no mecanismo da inflamação. As moléculas de adesão, em especial as P-selectinas e E-selectinas estão significativamente elevadas na EM surto-remissiva, principalmente durante a

exacerbação da doença, e vêm sendo indicadas como potenciais marcadores paraclínicas de atividade da EM (Kuenz et al, 2005).

Em condições fisiológicas, as GAGs HS endoteliais se ligam às proteínas alvo, e estas modificam a função de muitas moléculas envolvidas no processo de inflamação (Götte, 2000) Na superfície celular, os proteoglicans da família Syndecan (S) são as maiores fontes de HS. Elas constituem proteínas transmembranas expressas em todas as células aderentes (Bernfield et al,1999). A família Syndecan é composta de quatro moléculas, com diversas funções, afetando propriedades funcionais de quimiocinas, leucócitos e células endoteliais de múltiplos modos. Em sua estrutura, a seqüência amino-terminal sinalizadora do corpo protéico é seguida por um ectodomínio contendo seqüências consensuais de SER-GLI de fixação glicosaminoglicana, um domínio simples bastante conservado transmembrânico e um domínio também bem conservado citoplasmático. Todos os sindecans carregam cadeias HS, e, alguns núcleos protéicos podem ser adicionalmente substituídos por sulfato de condroitina (Bernfield et al,1999). A estrutura básica extremamente aniônica destas moléculas consiste de resíduos alternantes de ácido glucurônico e glucosamina. Este processamento efetuado no interior do aparelho de Golgi decorre da reposição de grupos acetilados com grupos sulfatados e epimerização do ácido glucurônico a ácido idurônico, sulfatação dos grupos hidroxilas C-3 e C-6 da glucosamina e grupos hidroxilas C-2 dos resíduos de ácido urônico. Estas reações de modificação não se completam totalmente, ficando a cadeia final HS com estrutura de múltiplos domínios (Lyon & Gallanger, 1998). Essa finalização incompleta determina uma seqüência funcional para ligações específicas a vários ligantes, com domínios carregados positivamente, como por exemplo, as citocinas e seus receptores. Uma pletera de dados *in vitro* sobre o papel dos sindecans como

co-receptores e receptores de sinalização, participantes da ligação de quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento, integrinas e outras moléculas de adesão, mantêm seu papel como parte integrante dos eventos inflamatórios (Carey, 1997). Quatro membros da família Sindecan são conhecidos e foram clonados em animais e todos têm ligações com atividades inflamatórias. Destes, o Sindecan 4 (S-4) é referido como o receptor celular da antitrombina (Kaneider, 2001). Na sua seqüência estrutural ectodomínica HS, os O-sulfatados podem ser encontrados no C-3 dos resíduos CLCNSO₃, o pentassacarídeo reconhecido pelo sítio de ligação da heparina na antitrombina (Horie, 1992). As porções transmembrana e de endodomínio estão ligadas as proteínas tirosino-quinases (PTQ) Src, enzimas intracitoplasmáticas que têm papel básico na iniciação de numerosos caminhos de sinalização intracelulares e também envolvidas na regulação da migração celular, adesão, fagocitose, ciclo e sobrevivência celular. Recrutadas e ativadas por este receptor, as PTQs têm capacidade de ampliar e diversificar vários sinais (Horowitz & Simon, 1998). A atividade das tirosinoquinases Src é regulada pela fosforilação da tirosina em dois sítios com efeitos opostos. A fosforilação da TIR 416 na alça do domínio de ativação da quinase regula a atividade enzimática. A fosforilação da TIR 527 na ponta carboxi-terminal da enzima torna-a menos ativa. Harmônico com a importância destes eventos fosforilativos das PTQs, as atividades no processo inflamatório de células que expressam o S-4, como os leucócitos, plaquetas (Kaneider et al, 2005) e outras células aderentes (macrófagos ou células neoplásicas), tornam a antitrombina um participante retrógrado da atividade inflamatória.

As proteínas ligadas as GAGS / HS estão envolvidas em várias etapas inflamatórias como:

- Interação leucocitária e endotelial (as moléculas de adesão celular e as citocinas e quimiocinas);
- no extravasamento, migração e reparo (fatores de remodelamento celular, fatores de crescimento, moléculas celular endoteliais, proteinases, proteínas de ligação aos fatores de crescimento, proteinases, mediadores de formação de edema);
- processos relacionados a inflamação (coagulação e inibidores da angiogênese).

A trombina, o inibidor da via do fator tecidual, o fator plaquetário 4, fator Xa e a antitrombina são exemplos de moléculas que atuam nesse último processo (Götte, 2003).

2.1.5. O receptor Sindecan 4 (S-4) da AT

O receptor S-4 da AT na célula endotelial é expresso em várias células componentes do processo inflamatório, aparecendo na linhagem linfocitária B, células mono-macrofágicas, neutrófilos e plaquetas. O TNF- α induz a expressão do S-4 nas células endoteliais, pela via dependente do fator NF- κ B. A AT ligada ao S-4 pela porção citoplasmática induz através ativação das proteínquinases C- α da célula endotelial a liberação de prostaciclina, um inibidor da adesão leucocitária (Horie et al, 1992; Uchiba et al,1996) e plaquetária (Yamauchi et al, 1989). A prostaciclina atua na inflamação diminuindo a liberação de interleucinas IL-6, IL-8 e TNF pela célula endotelial e promovendo vasodilatação. A ação antiinflamatória da ligação AT - S-4 pode ser observada também nos neutrófilos, linfócitos, e monócitos – redução da expressão da IL-6, TNF, inibição da ativação do fator transcripcional NF κ B, IL-8 (Hofmann et al, 2000; Opal & Esmon, 2003) e inibição da proliferação celular linfocitária T e B (Zuo et al, 2001). Estas ações podem ser inibidas pelo

efeito da heparina ou substâncias similares que competem com os receptores S-4 da AT (Kaneider et al, 2002).

Assim, a fina regulação da atividade da AT envolve etapas sucessivas e dependentes, como: 1) manutenção de uma concentração não ativa no plasma; 2) localização no endotélio vascular e nas células ativas através ligação com glicosaminoglicanos; 3) ativação conformacional; 4) capacidade de desenvolver rearranjo conformacional maciço ao reagir com a proteinase e 5) liberação do glicosaminglicano na formação do complexo com a proteinase (Yamachita et al, 1999; Huntingthon et al, 2000)

2.1.6. As características clínicas da deficiência de AT

A deficiência da AT pode ser hereditária ou adquirida. A característica clínica nestes casos é a ocorrência de múltiplas trombozes venosas profundas e incidência elevada de embolia pulmonar. O primeiro caso de condição genética hereditária foi descrito por Egberg em 1965 (*apud* Kotke-Marchand & Duncan, 2002) O modo de herança é autossômico dominante, com expressões variáveis. Desde então, várias anormalidades da molécula da AT foram descritas, com mutações específicas, conferindo condições de disproteinemia, antes que de deficiência quantitativa da AT. A biologia molecular e o estudo genético permitiram a localização do defeito mutacional deste estado explicando em parte as diferenças clínicas. O estado homozigótico é raro, com manifestações clínicas aparecendo na infância (Kottke-Marchant & Duncan, 2002). Nos indivíduos saudáveis a frequência da deficiência é de cerca de 0,07% (1:1400) e nos estados de trombofilia é de 1 a 8% (Tait et al, 1994). A ocorrência trombótica no SNC é menor que as de outras deficiências

trombofílicas, estando em torno de 0-3,1% (Bombeli et al, 2002; Sanches-Martin et al, 2002).

Os diversos estados patológicos, onde alterações de sua concentração foram observadas, indicaram que a AT não é proteína de fase reacional aguda, pois sua síntese não é afetada como, por exemplo, a inflamação. No entanto, em outras circunstâncias a sua síntese pode estar impedida (doenças hepática, má nutrição, pré-maturidade, doenças inflamatórias intestinais, grandes queimados) ou haver perda ou consumo (coagulação intravascular disseminada, síndrome nefrótica, sepsis, choque, doenças malignas, terapia antineoplásica [asparaginase], episódios trombóticos agudos, vasculites, hemodiálise, rejeição em transplante de órgãos, doenças hemolíticas hereditárias [anemia falciforme, talassemia], plasmaféreses); ou diminuída (gravidez, menopausa, reposição hormonal ginecológica, uso de pílulas anticoncepcionais) (Kottke-Marchant & Duncan, 2002).

2.1.7. O gene da AT

O gene da AT está alocado no cromossomo 1(q23-25), e consiste de aproximadamente 16 kD de DNA agrupados em sete exons e seis introns (Figura 4).

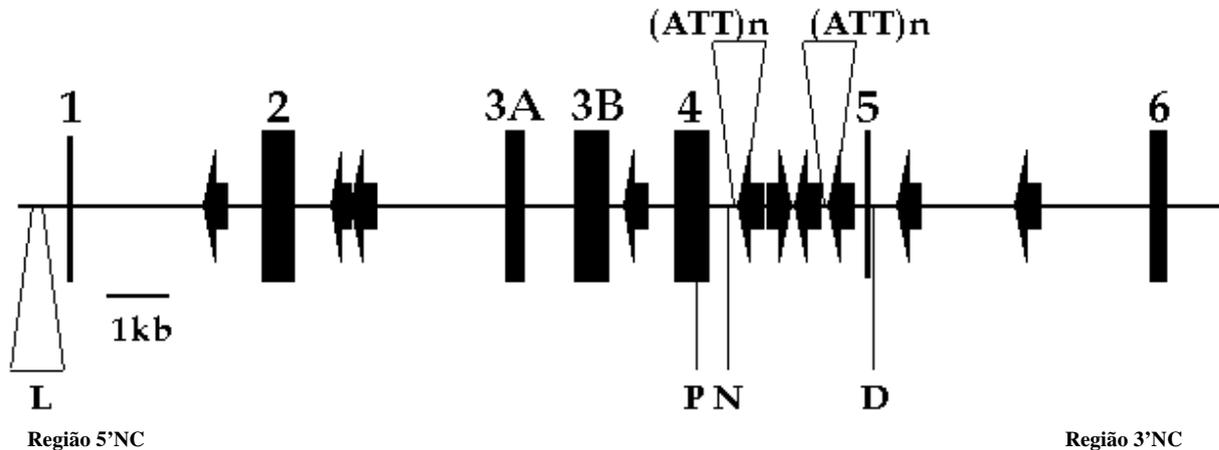


Figura 4. Organização estrutural do gene da AT humana. As regiões codificantes (5'NC e 3'NC) ou exons são numeradas de 1- 6 e os sítios de polimorfismos estão representados por L, P, N e D. Disponível em : <URL: www1.imperial.ac.uk/.../structure.html>. [Acesso em: 18 mar 2006].

O local do início da transcrição está situado a 72 pares de bases do códon de iniciação ATG próximo à região 5' não-codificante. Existem muitos polimorfismos seqüenciais do gene da AT a partir deste sítio, sendo pouco conhecidas suas seqüências gênicas (Prochownick et al, 1983; Prochownick et al, 1985). O fígado constitui o local de síntese primária e da glicosilação pós-translacional.

2.1.8. As Ações da Antitrombina

As ações pleiotrópicas da AT estão respaldadas em literatura extensa. Elas se concentraram, no passado, na atividade da coagulação do sangue atuando como anticoagulante natural.

Nos últimos 20 anos, devido ao melhor conhecimento da interligação das proteínas da coagulação com o mecanismo da inflamação, emergiu outra função aparentemente de igual importância: a de proteína antiinflamatória (Risber, 1998). Os modelos clínicos e laboratoriais onde foram verificadas deficiências da AT correspondiam a processos inflamatórios e infecciosos principalmente agudos

(Amaral et al, 2004; Warren et al, 2001). Estados sépticos, de consumo, agressões a órgãos isolados ou múltiplos, são modelos respaldados pela literatura em estudos experimentais laboratoriais (Wiederman, 2004; Hofmann et al, 2004). A focalização na atividade antiinflamatória da AT tem propiciado interessantes observações clínicas (Makson et al, 1998; Grip et al, 1997; Okagima et al, 1998; Opal, 2000).

2.1.9. INFLAMAÇÃO , ENDOTÉLIO VASCULAR E ESCLEROSE MÚLTIPLA

Na literatura encontramos bem sedimentadas as ligações entre sistema de coagulação, mecanismo da inflamação, e propriedades da célula endotelial (Cirino et al, 2000; Levi et al, 2002; Webster, 2002; Vincent, 2003; Levi et al, 2003; Esmon, 2004; Levi et al, 2004, Fernandez et al, 2004; Winn & Harlan, 2005).

Várias moléculas atuam como mediadoras na reação inflamatória, representadas principalmente pelas citocinas, moléculas de adesão, e proteases solúveis atraídas para o sítio de injúria durante o extravasamento plasmático. As citocinas são polipeptídeos de baixo peso molecular que atuam como mediadoras pleiotrópicas da inflamação e imunidade. Suas fontes são os leucócitos e as células endoteliais, sendo também alvo da atuação destes. As citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, e TNF- α) têm papel fundamental na expressão dos monócitos e células endoteliais contribuindo significativamente para a regulação do equilíbrio hemostático em condições fisiológicas e patológicas (Grinan & Maiolo, 2000). Na EM, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias são encontrados ao longo da doença, independente da exacerbação da EM, e mais elevados ainda durante os surtos (Alves-Leon et al, 2001). As citocinas derivadas do endotélio recrutam e ativam os leucócitos e plaquetas (pela expressão das integrinas β , P e E-selectinas),

contactando os receptores Fc γ R (*factor cytoplasmatic R*) da membrana leucocitária com as integrinas β endoteliais, liberando óxido nítrico (produzido pela própria célula endotelial ou pelos macrófagos ativados) e endotelinas (ET-1,ET-2,ET-3), peptídeos vasoconstrictores que ativam a secreção e adesão dos polimorfonucleares, modulando a atividade dos macrófagos e o metabolismo da matrix extra-celular (Fernandez et al, 2004).

Após a injúria o organismo recruta um mecanismo limitador e reparador do dano tecidual chamado inflamação. É uma resposta que demanda atração de leucócitos e moléculas plasmáticas para o local. Há em conseqüência aumento do suprimento sanguíneo, da permeabilidade vascular para grandes moléculas séricas e favorecimento da migração dos leucócitos pelo endotélio vascular local e para a área de inflamação. No primeiro momento as células migratórias se fixam no endotélio vascular e em seguida se movimentam entre e através desta. No segundo momento as células no interior do tecido lesado migram para a área de inflamação sob orientação de estímulos quimiotáxicos. Moléculas da superfície endotelial e as das células migratórias controlam o fluxo e emitem sinalizações célula-célula, e são expressas por mecanismos ativadores complexos, que envolvem moléculas solúveis e intracelulares. Vários tipos celulares participam desse processo, conseqüentes ao aumento da permeabilidade vascular local (mastócitos, plaquetas, granulócitos, linfócitos, monócitos) ocorrendo também transudação de proteínas (anticorpos, complemento, cininogênios, proteínas da coagulação) (Roit,1999). As células endoteliais têm papel fundamental nesse processo, pois através de ativações elaboram um conjunto de mecanismos que visam o recrutamento de células, secreção de substâncias quimioatrativas, exposição de moléculas superficiais de adesão celular vascular (VCAMs) e seus receptores. A produção de moléculas de

adesão intercelular (ICAM) estabelece correlação direta com os períodos de exacerbação da EM, o que é comprovado pelos índices significativamente elevados de ICAM e imagens com captação de contraste gadolínico na substância branca vistas na RM durante o surto da doença. (Acar et al, 2005).

O endotélio vascular e as células que participam do cortejo inflamatório têm papel fundamental nessas ações, reivindicando para si, o palco para a realização dos eventos coagulação e inflamação (Cicala, 1988; Levi et al, 2002; Aird, 2004), respostas universais à injúria tecidual. O processo reacional inflamatório que se segue, é qualificado pelo tipo e intensidade do agente agressor – vírus, bactéria, autoanticorpo, agressor químico ou físico, etc), operando com maior ou menor intensidade as etapas do fenômeno inflamatório. A interação desses mecanismos pode ser observada principalmente nas reações de hipersensibilidade inflamatória do tipo III e IV da Classificação de Gell-Coombs (Gell & Coombs, 1963). Nas doenças autoimunes este fenômeno é mediado por receptores FC de imunoglobulinas G (FcγR), reconhecido recentemente como necessário para que os autoanticorpos alcancem os alvos teciduais (Wipke et al, 2004). Assim como os níveis de ICAM estão elevados durante a exacerbação da EM, os níveis de Imunoglobulina G (IgG) encontram-se significativamente aumentados durante o surto da doença, e estabelecem correlação com os altos índices de moléculas de adesão (Acar et al, 2005).

O depósito de complexo antígeno-anticorpo nas áreas intravascular e perivascular pode danificar os tecidos propiciando aumento inicial da permeabilidade vascular, influxo de polimorfonucleares para a área perivascular e necrose hemorrágica (Gell & Coombs, 1963). Na ausência de anticorpos, o antígeno sofre

difusão lentamente pelas vênulas pós-capilares. Entretanto, na presença de anticorpos IgG existe rápido aumento da permeabilidade vascular, mediado pela biossíntese do fator ativador plaquetário (PAF), produzido na região peri-endotelial. Na área de edema há geração de substâncias lipídicas atuando por meio de receptores prostanóides EP3, criando importante rede de mediadores lipídicos dentro do tecido perivascular. Esses mediadores são gerados pelos leucócitos, plaquetas e lipoproteínas plasmáticas, regulando a barreira funcional das células endoteliais de maneira dependente da proteína G e óxido nítrico (NO) (Anliker & Chung, 2004).

2.1.10. A COAGULAÇÃO E A INFLAMAÇÃO

No sistema reacional inflamatório são observadas várias interações de diferentes células que ativam o mecanismo da coagulação e fibrinólise. O gatilho para isto é indução da expressão celular do fator tissular (FT) nas células ativadas. Quando os fatores estimulantes são suficientemente fortes, o fator VII (FVII) circulante é transudado na área de injúria, liga-se ao FT na célula ativada (Edgington et al, 1997) formando junto com os íons Ca^{++} (fase inicial da coagulação) um complexo com atividade de proteinase (FVIIa-FT) capaz de ativar os fatores X (FX), fator IX (FIX). O FXa age sobre a protrombina (FII), ocorrendo a primeira geração de trombina (FIIa) Esse primeiro traço de trombina *in loco* ao agir sobre as plaquetas promove a sua agregação e adesão. Nesse agregado estão adsorvidos fatores e co-fatores diversos da coagulação, como o FVIII e FV que são então ativados. O FIXa ao se complexar com o FVIII (FIXa-FVIIIa) gera mais trombina (amplificação da coagulação). As proteases ativas se combinam com seus co-fatores

na superfície plaquetária, onde ocorre considerável formação de mais trombina (propagação da coagulação). A trombina formada ativa mais fatores que transudam e se fixam. O fibrinogênio local extravasado é então degradado, formando fibrina. (Furie & Furie,1988; Hoffman et al,1996; Monroe & Roberts,1996; Rauch & Nemerson, 2000; Hoffman & Monroe, 2001; Robert et al, 2004; Schenone et al, 2004).

O FT tem similaridades estruturais com membros da superfamília de receptores de citocinas (Villanueva & Danishefsky, 1979), constituindo a membrana celular dos fibroblastos, dos pericitos em e ao redor da parede dos vasos sanguíneos e de outras células. Pouco ou nada é observado no espaço intravascular. Em condições de ativação celular, como nos monócitos/ macrófagos, células endoteliais e plaquetas, ele pode ser expresso, contribuindo significativamente para a ativação da coagulação. A expressão de FT em células circulantes, como micropartículas derivadas dos leucócitos ativados pode interagir com seu ligante, a glicoproteína P1-selectina das plaquetas ativadas. O estímulo inflamatório pode aumentar esta resposta. Fibrinogênio, trombina, com o colágeno e o complemento C5b-9, podem potencializar em até 100 vezes a amplificação da coagulação por esta via. A ativação da via do complemento na inflamação leva à formação de superfícies de membranas plasmáticas carregadas de fosfolipídios negativos, que ampliam as reações de coagulação (Sims et al, 1989).

Estímulos diferentes podem induzir os monócitos-macrófagos a expressar o FT, como na resposta inflamatória durante sua exposição a um agente estranho. IL-1, o TNF, IL-6, IL-8 e INF- γ são alguns dos indutores. A presença de plaquetas e granulócitos estimulam o FT-macrófago, numa reação dependente de P-selectina (resultado da ativação do fator NF κ B), induzindo a produção de IL-1b, IL-8, MCP1 e

TNF α . A ligação entre inflamação e coagulação forma base biológica de forte relação entre os dois sistemas, fundamentando o estudo da participação dos mecanismos de coagulação (ten Cate et al, 1997) em doenças inflamatórias crônicas como a EM.

As células endoteliais podem ser ativadas da mesma forma que os monócitos para a expressão do FT. Citocinas, complexos imunes, agentes bacterianos e virais, influenciam a função das células endoteliais. IL-1 e TNF induzem a atividade pró-coagulante da célula, inibem a via anticoagulante da Proteína C ativada (PCa) e afetam a fibrinólise pela estimulação da produção do inibidor do ativador do plasminogênio tecidual (t-PAI), criando um estado pró-trombótico pró-inflamatório (Mantovani et al, 1997). A inibição do sistema fibrinolítico é elemento chave na deposição da fibrina durante inflamação intensa e no mecanismo de regeneração e reparo. Os maiores inibidores e ativadores deste sistema são sintetizados e armazenados nas células endoteliais. O TNF- α e a IL-1 aumentam a síntese do inibidor do ativador do plasminogênio tecidual (t-PAI) reduzindo a liberação do ativador pela célula, ações necessárias para manutenção da fibrina no local da injúria. O efeito fibrinolítico-antifibrinolítico parece estar relacionado a ação do TNF- α sobre a IL-6, citocina com influência na coagulação (Levi et al, 1997).

Na inflamação, as proteases da coagulação interagem com receptores de membrana da célula vascular para deflagrar um amplo painel de eventos sinalizados, que culminam com mecanismos iniciais de ativação celular, modulação de expressão gênica, comunicação intracelular, aderência celular, e proliferação de fenótipos celulares malignos ou normais.

2.1.11 . OS FATORES DA COAGULAÇÃO COM ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

Os fatores da coagulação que mais estão implicados com o mecanismo inflamatório são a trombina, fator Xa e fibrinogênio.

2.1.11.1. A trombina

No mecanismo da coagulação, o produto mais importante das reações é a trombina. Trata-se de uma serina-protease da família tripsina com papel central na hemostasia após a injúria tecidual: promove agregação plaquetária, converte por proteólise o fibrinogênio solúvel do plasma em fibrina, induz a ativação dos fatores V,VIII,XI,XIII.

A molécula da trombina possui 3 domínios distintos de ligação: um ativo ou catalítico, e dois outros externos – exosítios, positivamente carregados localizados em polos opostos da enzima. O externo, exosítio 1, é o local de ligação da fibrina onde há orientação das pontes peptídicas para o sítio ativo. O exosítio 2 é para a ligação da heparina. A trombina se liga ao fibrinogênio pelo exosite 1 (Sttubs & Bode, 1993). A heparina ou moléculas similares exercem sua atividade anticoagulante por catalizar a inibição da trombina pela AT. Há formação de um complexo trimolecular trombina-heparina-antitrombina (Figura 5). A heparina também forma um complexo trombina-heparina-fibrina, quando promove a ligação com os exosítios 1 e 2 da trombina. A trombina ligada neste último complexo não sofre mais a ação da antitrombina-heparina, pois o exosítio 2 não está exposto, tornando o coágulo resistente a inativação por este complexo (Liaw et al, 2001).

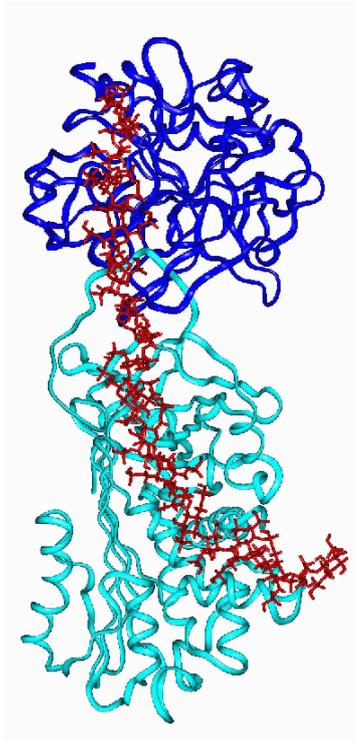


Figura 5. Modelo tridimensional do complexo trimolecular formado por antitrombina (azul claro), heparina (vermelho) e trombina (azul escuro). Disponível em : <URL: http://www.bioweb.uwlax.edu/.../Chime_Page/chime_page.htm>. [Acesso em: 18 mar 2006].

Outras atividades, além da coagulação, são atribuídas a esta proteína e seu papel na inflamação e reparo tecidual (Strukova, 2001). Essas atividades incluem extravasamento do plasma e edema, aumento da expressão de moléculas endoteliais que causam adesão leucocitária e infiltração, e liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células endoteliais, linfócitos T, fibroblastos, células da musculatura lisa, mastócitos, células nervosas, monócitos (Tadamich et al, 2004). Entre as conseqüências dessas atividades estão a indução quimiotóxica dos monócitos e neutrófilos, estimulação da célula endotelial para a produção de prostaglandina PGI_2 , indução de expressão de citocinas em diferentes tipos celulares, e promoção da migração transendotelial pelos neutrófilos (Strukova, 2001). As funções conhecidas da trombina vêm de sua estrutura molecular que,

além do clássico sítio ativo, contem outros, chamados exosítios ou subsítios como centros de reconhecimento adicionais para substratos e receptores. Os dois tipos de receptores celulares da trombina bem conhecidos são os receptores de proteínas ativadas (PARs) e a trombomodulina. Receptores celulares da trombina da família PAR pertencem à superfamília das integrinas - receptores ligados aos sete domínios da proteína G – que também tem em seu grupo receptores de catecolaminas, acetilcolina, serotonina, histamina, angiotensina, taquicinas, endotelinas, PAF e outros. Eles estão relacionados aos processos de crescimento, desenvolvimento, mitogênese, aterogênese e inflamação. Os receptores da trombina são PAR-1, -3 e -4 (Couglin, 2000). Proteases clivam a ponte peptídica no domínio extracelular do PAR, e um novo sítio N-terminal interage com o mesmo domínio do receptor clivado, ativando-o, diferentemente das outras proteases, que regulam funções celulares sem quebra de seus receptores (como por exemplo, os receptores para o fator Xa). A trombina faz essa regulação conforme a característica da família PAR. As funções da trombina na inflamação, reparo tecidual, e cicatrização envolvem a ativação do receptor PAR-1, acoplado a uma variedade de proteínas G. Assim ativado gera sistemas de sinais de transdução intracelular, aumentando a fosforilação das tirosinoquinasas intracelulares, como as Src (p60), Syk (p72), e FAK (p125), induzindo a expressão de diversas proteínas pela célula (Couglin, 2000).

Outros efeitos incluem também geração de atividades antiinflamatórias, como a produção de óxido nítrico (NO), que diminui a expressão de moléculas de adesão (inibição da expressão do ICAM-1 e outras) nas células endoteliais. Este fenômeno acontece fisiologicamente como mecanismo protetor vascular, e é abortado quando a célula é ativada pela inflamação (Libby et al, 1997).

Outro receptor celular importante da trombina é a trombomodulina. O endotélio vascular íntegro normalmente inibe a trombose e é composto por camada de células dinâmicas envolvidas em muitas funções fisiológicas, como tônus vasomotor, manutenção da fluidez do sangue, e crescimento vascular (Aird, 2004). A trombomodulina é o receptor de superfície endotelial da trombina que se liga formando o complexo trombina-trombomodulina, que não é atacado pela AT. Este complexo por sua vez ativa a proteína C (PCa) e seu co-fator proteína S, fixados no local, catalizando a inativação dos fatores Va e VIIIa, cofatores para o fator Xa na formação da protrombinase (Weitz, 2003) com impedimento conseqüente na formação da trombina. Em modelos animais a PCa atua de forma semelhante a AT ao bloquear a produção de TNF e NF-kB nos monócitos, inibindo a expressão de moléculas de adesão e de citocinas inflamatórias nas células endoteliais.

A protrombina (fator II) é o precursor enzimático inativo da trombina. Seu sítio primário de produção é o fígado, sendo um dos fatores influenciados pela vitamina K. O mRNA para o Fator II é também expressado no cérebro (Dihanick et al, 1991). Foram observados efeitos mediados por receptores da trombina no SNC como o mitogênico e regulador da estelação dos astrócitos e crescimento neural (Beilin, 2005). Dois inibidores da trombina foram detectados no cérebro sob inflamação - a AT sérica e a Nexina 1 (PN-1) (Festoff et al, 1966; Gloor et al, 1986), sendo esta última a mais potente.

Assim, funções homeostáticas importantes imputadas à molécula da trombina são controladas pela AT, pela célula endotelial (PARs e trombomodulina) e pela proteína C ativada (PCa).

2.1.11.2. O Fator X

O FX é outra proteína importante das reações da coagulação. Sua forma ativada (FXa) é responsável pela ativação da protrombina em trombina. Tem como seus ativadores os complexos FT-VIIa, FVa-FVIIIa, FIXa-FVIIIa da coagulação. Como a trombina, tem como inibidores a AT e a PCa (via inativação dos FVa e FVIIIa). O FXa se liga aos leucócitos, endotélio, células musculares lisas, ativando caminhos complexos de transdução de sinalizações intracelulares. Estas vias participam direta e indiretamente na regulação do crescimento celular. Em consequência, a ativação da protrombina em trombina é apenas uma das atividades biológicas da fixação do FXa nas células ativadas.

O receptor para o FXa nos leucócitos, o EPR-1 (receptor de protease-1) é um dos sítios de ligação celular do coagulante e tem como consequência a indução da sinalização mitogênica, co-estimulando a proliferação linfocitária através a liberação de mensageiros secundários intracelulares e sua expressão celular regulada pelo enrolamento do mRNA. O EPR-1 pode influenciar o crescimento celular vascular e contribuir para o aparecimento inicial da doença vascular. O FX junto com a trombina é um dos influenciadores destas ocorrências (Altieri, 1995). O FXa tem um número de efeitos pró-inflamatórios, induzindo produção de IL-6, IL-8. MCP-1, E-Selectina, expressão de moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e de adesão celulares VCAM-1 pelas células endoteliais e leucócitos (Sendem, 1998; Busch et al, 2005).

2.1.11.3. O Fibrinogênio

Além do seu papel fundamental na coagulação, o fibrinogênio (FI) é reconhecido como proteína de reação de fase aguda inflamatória, aumentando em

condições patológicas. Na reação inflamatória, durante o extravasamento plasmático, entra no parênquima, altera a composição da matriz celular, promove formação e deposição de fibrina e induz outros mediadores inflamatórios (Esmon, 2000).

A fibrina é matriz provisional posteriormente degradada pela plasmina do sistema fibrinolítico. O fibrinogênio e seus derivados, através de ligações com receptores celulares (Integrinas β expressas em leucócitos, macrófagos, monócitos) tem a propriedade de transduzir sinais com efeitos sobre a agregação plaquetária, induzir angiogênese, estimular a NF κ B induzindo aumento da expressão gênica de citocinas nos monócitos, induzir a adesão por ICAM-1 e caderina endotelial, estando, portanto, envolvidos na homeostase vascular e no tráfico leucocitário (Languino et al, 1993; Adams et al, 2004).

Estas três proteínas da coagulação por suas funções importantes na inflamação incentivaram o desenvolvimento de estudos clínicos e experimentais que ampliaram esta área do conhecimento.

2.1.12. A AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA DA ANTITROMBINA

Os mecanismos inibidores da coagulação são representados por proteínas solúveis no plasma e pela célula endotelial íntegra, que é naturalmente antitrombogênica em estados não-patológicos. A Antitrombina, a Proteína C e S pertencem ao primeiro grupo, sendo a AT o mais importante inativador de diversas proteases da coagulação.

As atividades antiinflamatórias da AT são observadas pela via humoral da anticoagulação, ao inibir as proteases trombina e FXa, pela via celular através da

ligação aos GAGs / HS da membrana da célula endotelial, ou influenciando a migração leucocitária e aderência. Estas ações foram estudadas em vários ensaios clínicos e experimentais (Risberg, 1998; Okagima et al, 1989; Roemish, 2002;; Widermann et al, 2002). A AT ao inativar a trombina e o FXa, proteases da coagulação também com atividades pró-inflamatórias, promove conseqüentemente inibição de IL-6, TNF, IL-8, MCP-1, E-selectin, ICAM-1 e V-CAM-1, entre outros, induzidos por estes. Ao se ligar ao S-4 na célula endotelial, a AT, na ausência de heparina, exerce sua atividade antiinflamatória promovendo a liberação de Prostaciclina (derivado endoperóxido da via ciclooxigenase) pela célula, um inibidor da liberação de moléculas de oxigênio reativas e de proteases inflamatórias pelos leucócitos (Hofmann et al, 2000). Por ação direta sobre estas células promove desativação e diminuição da interação com o endotélio vascular, reduzindo a transmigração e subseqüentemente a injúria tecidual. Este último mecanismo, via diminuição da expressão P-Selectina endotelial, impede o rolamento dos leucócitos e a sua transmigração (Souter et al, 2001; Yamashiro et al, 2001). Nos monócitos e células endoteliais a AT bloqueia o aumento de IL-6, IL-8, TNF e expressão do mRNA do FT (Oelschläger et al, 2001).

O efeito benéfico antiinflamatório da AT foi observado em tecidos e órgãos , como na perfusão vascular nos pulmões (Uchiba et al, 1996) rins (Mizutani et al, 2003), sistema nervoso (Arai et al, 2004), fígado (Maksan et al, 1998), sepsis (Hoffman et al, 2004; Levi et al, 2004), coração (Grip et al, 1997) e em doenças obstétricas (Paternoster et al, 2004). A ação antiinflamatória da AT constitui uma promissora forma de tratamento, preservando a insuficiência de um órgão ou de um sistema (Imberti,2003).

2.2. O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E A INFLAMAÇÃO

O conceito de que o Sistema Nervoso Central (SNC) é estrutura diferente dos outros tecidos em relação aos processos inflamatórios e imunológicos foi seqüencialmente desmontado nos últimos anos. Devido à falta de estruturas celulares e características dos tecidos que respondem à injúria, era considerado como exemplo de sítio imunoprevilegiado. A presença da BHE, a falta de vias de drenagem características linfáticas, a falta de uma célula profissional apresentadora de antígeno e a infrequente expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) fortaleciam este conceito (Bradl & Hohlfeld, 2003). Nos últimos anos, evidências clínicas e experimentais mudaram esta visão: o parênquima intacto do SNC contém regularmente pequeno número de células T, e ocorre drenagem do líquido cefalorraqueano (LCR) e de proteínas para o sangue durante a inflamação e degeneração (Bradl & Flügel, 1991; Cserr et al, 1992)

O SNC está em constante vigilância imunológica e interage com as células do sistema imune na saúde e na doença (Bradl & Hohlfeld, 2003). O SNC responde aos estímulos inflamatórios periféricos (por meio de sinais humorais e neurais), integra e regula aspectos da resposta de fase aguda e exibe respostas inflamatórias locais que parecem contribuir nas doenças agudas e crônicas do SNC (Allan & Rothwell, 2003). A expressão de mediadores inflamatórios, incluindo complemento, moléculas de adesão, enzimas ciclooxigenases e seus produtos, e citocinas estão aumentadas em doenças neurodegenerativas e inflamatórias clínicas e experimentais. A EAE e a EM são exemplos desse processo, que envolve a apresentação de autoantígenos como a proteína básica de mielina (PBM), oligodendrócito da mielina (MOG) e proteolipídeo da mielina (PLP) as moléculas MHC, perpetuando a atividade

inflamatória e mantendo o repertório de citocinas, complemento, moléculas de adesão, e outros marcadores inflamatórios continuamente elevados (Carvalho et al, 2003)

2.2.1. A Barreira Hemato – Encefálica (BHE)

As células que compõem o sistema nervoso, como os neurônios e as da glia, são protegidas do meio externo por uma barreira de difusão constituída de células vasculares endoteliais unidas entre si por junções finas. Três tipos celulares compõem esta barreira: as células endoteliais, os astrócitos e os pericitos (Ballabh et al, 2004). O metabolismo dessas células regula a entrada de proteínas e células do sangue para dentro do parênquima cerebral. A glia e os neurônios estão em íntimo contato com essas células e regulam juntas a homeostasia vascular e a microcirculação cerebral. O rompimento deste balanço contribui para a patologia de muitas doenças do SNC, como as doenças neuroinflamatórias e degenerativas (Esclerose Múltipla, doença de Alzheimer). Além disso, as ações contributivas da vascularização cerebral vão além de sua conhecida função no suprimento nutricional e remoção de produtos tóxicos. Semelhante a célula endotelial, suas funções estão ampliadas para um papel dos mais importantes na fisiopatologia neurológica (interfere na neurogênese, sinaliza os astrócitos na interface gliovascular para a circulação do sangue, tráfico metabólico, balanço hídrico, controle do metabolismo neurovascular do oxigênio, imprime a imagem do sistema visual, e através integrinas de membrana, mantem a integridade vascular). Associadas às células do sistema nervoso, tais como neurônios perivasculares, elas se entrecruzam, formando a

unidade funcional definida como unidade neurovascular (Abbott, 2002; Lo et al, 2002; Kim et al, 2005).

2.2.2. As células do tecido nervoso central e a inflamação

O maior volume do encéfalo é representado pelas células da glia. Uma delas, a micróglia, está implicada na inflamação. Como célula da linhagem monócito-macrófago, são ativadas durante a injúria (Streit, 2002), respondendo como macrófago, fagocitando células e liberando numerosas moléculas inflamatórias, particularmente citocinas. Os astrócitos (que controlam a BHE) e os oligodendrócitos (fundamentais na mielinização) também respondem ao estímulo inflamatório liberando citocinas e neurotrofinas protetoras. Estas células sustentam e mantem a viabilidade neuronal.

Quase a totalidade dos mediadores primários da inflamação identificados nos tecidos periféricos também existe no SNC lesado. Estão implicados direta ou indiretamente na inflamação ou doença: a cascata do complemento, cinicas, eicosanóides, óxido nítrico, fator ativador plaquetário (PAF) são alguns representantes (Allan & Rothwell, 2003). As citocinas produzidas pelas células gliais ativadas são também alvos destas, podendo liberar muitas substâncias neuroativas em resposta a citocina-estimulação: as neuroprotetoras (neurotrofinas, fatores de crescimento) ou neurotóxicas (óxido nítrico, radicais livres, proteases, e aminoácidos excitatórios). As citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF α causam quebra da BHE levando à expressão de moléculas de adesão e edema, com extravasamento plasmático, e consequente invasão de leucócitos para o parênquima cerebral (Quan & Herkenham, 2002). Os mecanismos celulares intrínsecos cerebrais inflamatórios

não são independentes do sistema imunológico local (como vimos acima representados por um pequeno número de células T) e sistêmico. Dependendo do modelo inflamatório (Gell & Coombs, 1996), células periféricas (leucócitos, plaquetas) migram para o interior do parênquima cerebral junto com os mediadores (citocinas e proteases) e concorrem para a quebra da BHE. O modelo clássico experimental animal da Encefalomielite Alérgica Experimental (EAE) (Quan & Herkenham, 1978), serve até o presente momento (Flugel et al, 2001) para mostrar as importantes interações do sistema nervoso com o processo imune e inflamatório. As células T têm papel relevante na neuroinflamação, e seus subtipos estão implicados em ações neuroprotetoras (liberam neurotrofinas que promovem sobrevivência neuronal), degenerativas (estimulam as células NK [*natural killer*]), imunossupressoras (estimulam células T produtoras de IL-4 e IL-10). Sabe-se que células T específicas para antígenos do SNC são componentes normais do sistema imune nos organismos saudáveis (Pete et al, 1990), e que mecanismos que levam a quebra da BHE, como por exemplo, infecções virais, permitem o ingresso destas células ativadas no SNC e conseqüente injúria tecidual. Linfócitos B e anticorpos também participam nesse processo (Willenborg & Prowse, 1983), como mostrado pela presença de imunoglobulinas reativas líquóricas como ocorre, por exemplo, na EM e infecções virais.

2.2.3. A inflamação e coagulação no SNC

A inflamação no SNC, em decorrência da quebra da BHE, propicia o extravasamento para dentro do parênquima de proteínas pró-coagulantes. Na fase aguda o fibrinogênio extravasado ao se ligar aos receptores integrinas β (leucócitos, macrófagos e monócitos, plaquetas) e ICAM-1 e VE-caderina (célula endotelial)

altera a composição da matriz celular da unidade neurovascular. A resposta à injúria induz atividade procoagulante local (expressão do fator tissular) e junto com as proteínas extravasadas necessárias à coagulação determinam o aparecimento de fibrina local. Além da atividade coagulante, as atividades pró-inflamatórias destas proteínas induzem a liberação celular de mediadores inflamatórios, tais como o TNF α e a IL-1 que ampliam o mecanismo da coagulação (Lee et al, 1999). A deposição de fibrina na Esclerose Múltipla se correlaciona com a demielinização, infiltração macrofágica, dano axonal, anormalidades juncionais endoteliais e edema astrocitário (Adams et al, 2004). As duas células mais afetadas pelo extravasamento do fibrinogênio são as células de Schwann do Sistema Nervoso Periférico (SNP) e os macrófagos no SNC. A fibrina depositada é lisada pelo sistema fibrinolítico (plasmina derivada do plasminogênio ativado pelo t-PA liberada pela célula endotelial ativada local) para que haja regeneração celular. No dano neuronal sua presença impede a transcrição do gene da mielina, impedindo a mielinização e crescimento axonal, um processo de multi-etapas para a regeneração funcional neural (Akassoglou et al, 2002).

A micróglia em repouso é informada da ocorrência da quebra da BHE ou da injúria tecidual pelos componentes do sangue extravasados. *In vitro*, estas células expressam PARs – receptores de proteases ativadas, como para a trombina. Há resposta inflamatória como vimos anteriormente, com produção de mediadores que é ampliada pela deposição do fibrinogênio-fibrina *in loco* (Coughlin, 2000; Gingrich & Traynelis, 2000).

A trombina, formada pela coagulação, tem entre uma de suas funções a de indução da mitogênese dos fibroblastos e astrócitos, proliferação glial, contribuindo na regulação da estelação astrocitária e neurite produtiva (Nelson & Siman, 1990;

Wang & Reiser, 2003). O mRNA da protrombina, foi demonstrado por hibridização *in situ* e reação da polimerase em cadeia (PCR) em várias regiões do tecido nervoso e em linhagens celulares neurais (Dinanich et al, 1991). Mais interessante, em culturas de tecido cerebral e de astróglio primária foram observadas expressão de mRNA protrombínico, produção de trombina e AT (Deschepper et al, 1991). Ou seja, uma das proteínas mais importantes da coagulação e inflamação já está dentro do parênquima cerebral, acompanhada de suas inibidoras serpinas (AT e Nexin-1). A Nexin-1 (PN-1) é a mais abundante e potente inibidora cerebral da trombina, nas células da glia e neurônios (Gloor et al, 1986; Reinhard et al, 1994). A associação da T-AT, formando um complexo no plasma, está aumentada ao início dos sintomas da EAE, e é um dos indicadores clínicos da gravidade das doenças auto-imunes demielinizantes humanas (Inaba et al, 2001). Foram observadas etapas na seqüência de eventos inflamatórios neuroimunológicos, sendo a 5ª e 6ª relacionadas à coagulação: ativação da célula efetora com secreção de pró-coagulante, iniciação da coagulação com deposição de fibrina sobre a célula endotelial; ativação desta célula, com liberação de t-PA desencadeando fibrinólise e liberação de peptídeos da quebra da fibrina, com mediação seqüencial do aumento da permeabilidade da BHE e quimiotaxia (Inaba et al, 2001).

O SNC, portanto, reage à injúria quando há quebra da BHE, ocorrendo simultaneamente inflamação, reação imunológica e coagulação. Muitas proteases da coagulação extravasam e causam atividade inflamatória (Gingrich & Traynelis, 2000). As presenças dos anticoagulantes naturais, como antitrombina, Proteína C ativada, Inibidor da Via do Fator Tecidual, e as enzimas fibrinolíticas contribuem na homeostase limitando a coagulação local e atuando também como substâncias anti-inflamatórias, do mesmo modo que atuam fora do SNC.

2.3. A ESCLEROSE MÚLTIPLA

2.3.1. Apresentação da Doença

A EM é doença inflamatória do Sistema Nervoso Central (SNC), poligênica e multifatorial. A etiologia da EM é desconhecida, mas acredita-se que a presença de lesões inflamatórias desmielinizantes no SNC seja resultante do processo inflamatório ativado diretamente da mielina. A inflamação é caracterizada por infiltração focal de células T CD4+, células B e ativação de macrófagos, e pela perda da mielina (Yentuer et al, 2002). Na EM, o acometimento da oligodendróglia, células formadoras da bainha de mielina, pode causar efeito progressivo e acumulativa desmielinização com perda axonal e neurodegeneração (Minagar et al, 2004). Essa resposta inflamatória é atribuída a processo auto-imune mediado pelas células T, envolvendo células T autoreativas específicas para proteínas da mielina tais como a PBM, PLP e MOG (Carvalho et al, 2003). Desde a descrição dos aspectos clínicos e da patologia feita por Charcot, Carswell e Cruveilhier há mais de cem anos, a EM vem servindo como o protótipo da doença enigmática onde ainda são discutidos aspectos etiopatogênicos, genéticos, raciais, organização de critérios evolutivos, diagnóstico clínico e tratamento (Weinshenker, 1995; Noseworthy et al, 2000; Poser & Brinar, 2004; Lutton et al, 2004).

2.3.2. Características genéticas

Semelhante ao que ocorre em outras doenças autoimunes, a EM está associada a certos alelos HLA classe II, principalmente com o haplótipo DR2 (HLA

DQA1*0102, DQA1*0602, DRB1*1501), comum no norte da Europa, Canadá, Estados Unidos, e DR4 na Sardenha e Turquia (YentüÈr et al, 2002). No Brasil, heterogeneidade genética foi observada na associação dos alelos HLA Classe II. Em pacientes brancos é encontrada a associação com HLA-DR2 (Papais-Alvarenga et al, 2002) mas em afro-descendentes ocorre associação alélica com DQB1*0602 na ausência de DRB1*1501 (Alves-Leon SV, 1999, Caballero et al, 1999). Os fatores genéticos podem ser influenciados por estímulos ambientais ou externos levando ao desenvolvimento da EM. A susceptibilidade genética é considerada um estado pré-mórbido, que em algum momento (provavelmente uma reação antigênica viral importante), permite a entrada no SNC de células ativadas do sistema imune e anticorpos, com quebra da BHE. Esta “tendência” foi denominada de traço da EM, de forma semelhante aos portadores do gene para a anemia falciforme (traço falcêmico) (Poser, 2006).

2.3.3. Características Populacionais

A origem étnica e racial parece ter importância relativa na susceptibilidade à doença. Há alta prevalência da EM em determinadas regiões do mundo, como a Escandinávia, ocorrência menos freqüente nos Orientais e, baixa na África, entre esquimós, polinesianos e outros (Compston, 1990). Estima-se em torno de 250.000 a 350.000, o número de pacientes nos Estados Unidos.. A freqüência da doença é mal estimada em diversas regiões do mundo, excetuando-se países do norte da Europa, alguns países africanos, Japão, e algumas cidades do Mediterrâneo (Noseworthy et al, 2000)..

2.3.4. A fisiopatogenia da EM

O diagnóstico pontual da doença é o encontro em exame histológico da biópsia da lesão, de placas escleróticas acometendo áreas diferentes e em diferentes tempos a substância branca do SNC, um recurso diagnóstico de difícil execução. Há o encontro de diferentes padrões lesionais histológicos que justificam diferentes repercussões clínicas, mas, infiltrado celular inflamatório perivascular, atrofia axonal pela perda da bainha de mielina e deposição de imunoglobulinas compoem o cortejo maior dos achados anatomopatológicos (Stadelman & Brück, 2003). A autoimunidade na EM caracterizada pela presença de anticorpos e as células TCD4+ específicas para mielina também são identificados sangue de pessoas normais. É necessária ativação para se introduzirem no SNC. Estímulos (virais, bacterianos, e outros) em indivíduos geneticamente susceptíveis ao quebrar a BHE, permitem o acesso ao parênquima cerebral destas células e anticorpos, que ativados, lesionam alvos e substratos do sistema imune desencadeando reação inflamatória (Theil et al, 2001). A permissividade da BHE para proteínas do contingente plasmático, introduz no parênquima cerebral células, mediadores, moléculas de adesão e citocinas. Dados recentes sugerem “mimetização molecular” com reação cruzada entre o peptídeo polimerase do vírus Epstein-Barr e moléculas do antígeno linfocitário humano EM-susceptível (HLA-DR2 DRB*1501, DBQ*0602) que ativam os linfócitos TCD4+ específicos (Lang et al, 2002). A mimetização molecular é o processo pelo qual a infecção viral ativa células T que têm reatividade cruzada com antígenos próprios. Há codificação de um epitopo mimetizado de mielina que pode iniciar via célula T órgão-específica reação de auto-imunidade (Olson et al, 2001). O conceito da EM como doença da célula Th1,

A exclusividade da participação Th1 na fisiopatogenia da EM tem sido discutida e novos enfoques, direcionados sobre o dano axonal mostram a ação de células B e complemento. As células T CD8⁺ têm potencial de reconhecer e atacar células cerebrais que expressem moléculas da classe MCH I. Neurônios ativados pelo INF- γ expressam estas moléculas. Células TCD8⁺ reconhecem e interagem com as neurites, trans-seccionando-as. A presença de mediadores inflamatórios dentro do SNC associados a trans-seção axonal e degeneração provocam a morte neuronal. Células linfocitárias B clonais também participam com aumento de imunoglobulinas no LCR e presença de bandas oligoclonais (BOC) (produção intratecal de anticorpos) além da presença destas células clonotípicas nas lesões de EM (Hemmer et al, 2002). Mecanismos de reparo e regeneração foram observados clinicamente, mas a remielinização espontânea na EM é limitada e parcial: apenas 40% das lesões se estendendo por mais de 10% da área lesionada. Há relação com a presença de grande número de oligodendrócitos expressando proteínas mielínicas ou mRNA para proteína mielina em seus citoplasmas. Esse processo parece ser dependente de células B e T, e de fibrina, que eventualmente pode falhar provocando a perda tecidual e permanente incapacidade dos pacientes (Ozawa et al, 1994; Bieber et al, 2003). O conceito de “oligodendrinopatia primária” foi sustentado pelo padrão heterogêneo patológico, a extensão da demielinização e perda axonal, interpretados como finalização de mecanismos variáveis imunopatogenéticos em diferentes pacientes com EM (Lassman, 1988; Wingerchuk et al, 2001).

2.3.5. O diagnóstico da Esclerose Múltipla

A EM é diagnosticada por critérios de apresentação clínica e caracterizada pelo acometimento de sistemas funcionais neurológicos centrais em diferentes momentos e distribuídos ao longo do neuro-eixo, o que motivou a clássica definição de doença distribuída no tempo e no espaço. A EM pode evoluir com surtos e remissões, parciais ou não, ou de forma progressiva desde o início. Esses critérios incluem a exclusão de outras condições neurológicas, como infecções bacterianas ou virais, doenças auto-imunes do colágeno, tumores, leucodistrofias, ataxias hereditárias, vasculites, acidentes vasculares cerebrais, carências vitamínicas, intoxicações, ou qualquer condição que justifique os sinais e sintomas neurológicos apresentados pelo paciente (Noseworthy et al, 2000). Seu curso clínico é variado apresentando formas de evolução menos grave ou curso grave e progressivo (Weinshenker,1995). Esse comportamento suscita o interesse pela procura por fatores intrínsecos etiológicos e fisiopatológicos (genéticos, raciais, virais endógenos) e extrínsecos (*stress*, agressões metabólicas, agressões auto-imunes, vacinações, viroses) (Lutton et al, 2004; Barcellos et al; 2002; Levin et al, 2003; Poser et al, 1981; Noseworthy, 1991).

2.3.6. Os critérios para diagnóstico de Esclerose Múltipla

Vários autores tentaram sistematizar os critérios diagnósticos para a EM (Schumacher et al, 1965; Poser et al, 1983; Poser & Brinnar, 2001; Tintoré & Rovira, 2003; McDonald et al, 2001). O critério mais usado nos últimos 20 anos foi o de

Poser e colaboradores (1983), o primeiro a incluir um exame laboratorial, o do LCR, como suporte para o diagnóstico de EM. O uso crescente da RM, o diagnóstico de SCI, e o surgimento de drogas imunomoduladoras indicadas no tratamento da EM com base em critérios cada vez mais precoces, motivou encontro internacional de especialistas, realizado em 2001, quando foi proposto novo critério, utilizado universalmente até o presente momento (McDonald et al, 2001). Estes critérios estão sob revisão crítica, devendo em breve sofrer atualização (Poser & Brinar, 2004; Polman et al, 2005).

Alguns termos e definições são apresentados para construir o diagnóstico de EM:

- Surto: é a ocorrência de um ataque (sintomas ou sinais de disfunção neurológica) com ou sem confirmação objetiva, com duração de mais de 24 horas, com remissão total, parcial ou não.
- Lesões separadas na ressonância magnética cerebral: apenas lesões que envolvem partes distintas do SNC, que levam a síndromes neurológicas que não podem ser explicadas por topografia única.
- Bandas oligoclonais no LCR: evidência de aumento da produção de bandas oligoclonais de IgG diferentes das bandas do soro ou index elevado de imunoglobulinas IgG .
- Curso temporal da doença define as formas clínicas: surto-remissão (EMSR), primária progressiva (EMPP), progressiva secundária (EMPS) e surto-progressiva (EMSP).
- Forma benigna da EM (EMB): pouca incapacidade físico-motora (EDSS<3,0) após 10 ou mais anos de doença.

- Forma clinicamente isolada (CI): a ocorrência de um surto isolado, que não permite o fechamento do diagnóstico, mas sugere EM.
- Forma clinicamente definida (CD) é a ocorrência de dois surtos definidos e separados no tempo e espaço. Define EM.
- Curso espacial da doença: detectado por exames de imagem, de lesões diferentes em sítios diversos do SNC que ocorrem após intervalo de 1 mês da última lesão evidenciada.
- Distribuição no tempo evidenciado pela RM: aparecimento de nova lesão de substância branca evidenciada pelo contraste gadolínico ou uma nova lesão T2, em exame feito no mínimo 3 meses seguidos do último surto.
- EDSS (*expanded disability score system*): escala de valores numéricos de 1 a 10, usada para avaliação da incapacidade neurológica do paciente com EM (ANEXO 1)

As definições dos cursos clínicos e de gravidade são apresentadas como:

- EMSR: doença com presença de surtos claramente definidos, com recuperação total ou parcial; períodos entre surtos da doença caracterizada por ausência de progressão.
- EMPS: doença com curso inicial de EMSR seguido de progressão com ou sem surtos ocasionais, recuperações mínimas e platô.
- EMPP: doença progressiva desde o início com ocasional platô e melhora mínima temporária, sem ocorrência de surtos definidos.
- EMPS: doença progressiva desde o início, com claros surtos agudos, com ou sem recuperação total, períodos entre os surtos caracterizados.

Lublin e Reingold (1996), definiram o curso clínico da doença, dividindo-o de acordo com a apresentação clínica em 5 categorias: surto-remissiva, secundária-

progressiva, primária-progressiva, surto-progressiva, e progressiva-surto. Uma outra divisão foi feita baseada na gravidade do curso da doença: benigna e maligna. Estas divisões foram aceitas e adotadas pelos neurologistas desde então.

Em artigo recente, Poser e Brinar (2004) sustentam com outras observações, considerações sobre a relação entre os sinais e sintomas clínicos da EM e o avanço da doença em relação ao padrão de lesão – inflamação vs demielinização. Mostram que os efeitos repetidos dos surtos levam progressivamente à inversão dos padrões, de modo que os sintomas definitivos aparecem quando o acúmulo residual de demielinização supera os fenômenos inflamatórios. Esta observação é importante na procura de intervenções terapêuticas que visem bloquear ou minimizar os surtos repetidos inflamatórios e aqueles que possam evitar a degeneração axonal. O último processo está fortemente implicado na atrofia e morte neuronal, e conseqüente incapacitação progressiva e irreversível do paciente.

Tabela 1 - Critérios Diagnósticos de EM, segundo McDonald e colaboradores (2001):

EM clinicamente definida	Dados adicionais ao diagnóstico
2 ou mais surtos e evidências clínicas para duas ou mais lesões _____ 2 ou mais surtos e evidencia clínica objetiva para uma lesão _____	Nenhum Disseminação espacial na RM: ou 2 lesões características de EM e LCR positivo ou surto clínico que indique um lugar diferente.
1 surto e evidência clínica objetiva para 2 ou mais lesões _____	Disseminação no espaço na RM ou segundo surto clínico
1 surto e evidencia clínica objetiva de 1 lesão _____	a) disseminação no espaço na RM, ou LCR positivo, 2 ou mais lesões na Rm característica para EM b) disseminação no tempo na RM; ou segundo surto clínico
progressão neurológica insidiosa _____	a) LCR positivo e, b) Disseminação no espaço na RM com 9 ou mais lesões em T2 ou 2 ou mais lesões na medula ou 4-8 lesões cerebrais = 1 lesão medular ou PEV com 4-8 lesões cerebrais ou < lesões cerebrais+ 1lesão medular com PEV normal e c) Disseminação no tempo ou RM progressivo por mais de 1 ano

Em todos os critérios diagnósticos, inclusive este último, a recomendação é de que seja executado por especialistas experimentados. Os sintomas parecem ter menos importância que os sinais, que, segundo Poser (1983) são essenciais ao diagnóstico inicial.

2.3.7. A evolução clínica da Esclerose Múltipla:

A EM acomete indivíduos jovens levando-os, progressivamente, em tempo não determinado, à incapacidade física e motora. O tempo pode ser longo e a sobrevida estimada em décadas (Weinshenker, 1995; Poser & Brinar, 2004). A progressão da doença vem sendo retardada com a utilização de imunomoduladores e imunossupressores (Noseworthy et al, 2000). auxiliada pelo diagnóstico precoce e melhor classificação dos grupos clínicos. Uma vez feito o diagnóstico, a evolução do paciente é imprevisível e os exames são elementos formais para padronização e validação da história evolutiva. Mas nenhum deles, quando isolados, pode diagnosticar ou prever, quando o doente vai recair, de que forma vai evoluir e em quanto tempo. Em 85% dos adultos jovens que desenvolvem EM, o início é com uma síndrome clinicamente isolada (Miller et al, 2005). A forma clínica de EM mais comum é a surto-remissiva (70%, segundo Noseworthy e cols, 2000; 80%, segundo Wheinshenker e cols., 1989), que assim se apresentará inicialmente. 70 % destes evoluirá para a forma secundária –progressiva em um período de tempo não previsível e 10% terá evolução benigna (Noseworthy et al, 2000).

2.3.8. Marcadores Biológicos de EM

Marcadores e indicadores biológicos da EM falham em sua especificidade ou reproduzibilidade, principalmente pela natureza intrínseca da doença de acesso difícil para coleta de amostra para exames rotineiros. Os marcadores no sangue periférico são de pouca reproduzibilidade e os do LCR inacessíveis a exames repetidos (Uccelli et al, 2003). O nível de N-acetilaspártato determinado por espectroscopia e ressonância magnética parece ser a medida mais confiável de dano axonal, porém, é exame que ainda carece de estudos mais amplos, e é dispendioso (Zaffaroni, 2003). O entendimento da EM em seus vários mecanismos e expressões tem motivado a ampliação do uso de medicamentos, mas, a estratégia terapêutica não pode ser avaliada pela falta de marcadores biológicos preditivos de sua eficácia. A procura por estes marcadores é extremamente importante, pois definiria pontos de início e de término de tais programas. Bielekova e Martin (2004) propuseram uma classificação contemplando sete categorias de bio-marcadores baseada em estudos dos mecanismos fisiopatológicos da EM: 1) biomarcadores que refletem alterações do sistema imune; 2) rompimento da BHE; 3) demielinização; 4) excitotoxicidade e *stress* oxidativo; 5) dano neuronal / axonal; 6) gliose e 7) remielinização e reparo. Não existe no momento nenhum biomarcador avaliável que preencha um substituto de ponto final na EM. A natureza flutuante da reação auto-imune, um dos mais ricos mananciais de biomarcadores na EM, é útil para definição de alguns grupos especiais, estratificando pacientes. Porém, os outros mecanismos fisiopatológicos, fora desta área, precisam ser desenvolvidos pelas características evolutivas da doença (Miller et al, 2004).

2.3.9. A Esclerose Múltipla e a Hemostasia e Coagulação

Hemostasia e coagulação acompanham a história de EM desde o início, no século 19. Eduard Rindfleisch (Rindfleisch apud Adams et al, 2004) patologista alemão, em 1863, já descrevia em seus estudos que um “vaso sanguíneo estava presente no centro de cada lesão esclerótica” da EM, e lhe imputou a patogenia da doença, chamando a atenção para o infiltrado perivascular inflamatório de padrão crônico dos vasos que circundavam a lesão. O distúrbio da quebra da BHE é o evento inicial para o desenvolvimento da EM e, acredita-se preceder os sintomas e a formação de novas lesões. As evidências de anormalidades na BHE, incluindo danos vasculares e presença de proteínas séricas dentro das placas demielinizadas foram examinadas em colorações histopatológicas (Adams et al, 2004). O acúmulo de fibrina pela ligação das proteínas de coagulação nos vasos endoteliais e nos espaços perivasculares inflamados, se associam ao aumento de células inflamatórias e aos axônios danificados. Fibrinogênio e trombina geradas no local induzem a liberação e expressão de citocinas, moléculas de adesão, alterando ainda mais a fina junção endotelial, ampliando o efeito migratório de células para o parênquima cerebral. Na EM, a fibrina depositada pode desempenhar papel de indução de apoptose do oligodendrócito e impedir a regeneração do axônio lesado (Akassoglou et al, 2004). Esses depósitos são importantes pré-requisitos para ocorrência dos sinais neurológicos clínicos da doença, pois estão ligados ao aumento da permeabilidade da BHE, e desta maneira importantes na etiopatogênese da EM e da EAE (Paterson et al, 1987).

Nos anos 50, alguns ensaios tentaram encontrar correlação entre EM e testes de hemostasia e coagulação (Simon, 1942; Feldman et al, 1957; Nathanson &

Savitsky, 1952). Houve um intervalo de desinteresse nesta área nos anos seguintes. Por volta dos anos 80, com o aprimoramento dos testes de hemostasia, alguns estudos interessantes foram realizados, como a demonstração de que as plaquetas dos pacientes com EM apresentam aumento de adesividade e agregação espontâneas quando induzidas por agonistas em relação às pessoas normais (Ney, 1982; Khan et al, 1985; Karlov et al, 1985; Prosielgel et al, 1986; Cananzi et al, 1987; Kirichuk et al, 2003), estudos sustentados pelo encontro de plaquetas no perimeio da fibrina na placa da EM.

Àquela época acreditava-se na patogenia trombótica da EM, de modo que usava-se o ácido acetil-salicílico (um inibidor da ciclooxigenase plaquetária) e anticoagulação com cumarínicos, como formas de tratamento.

Nos anos 90, a hemostasia e a coagulação no SNC ganharam novo enfoque. Isto se deu por conta dos trabalhos relacionando a inflamação, célula endotelial vascular e atividades pró e antiinflamatórias das principais proteases da coagulação. A trombina, uma protease primordial da coagulação foi documentada no parênquima cerebral influenciando, junto com o fibrinogênio e a fibrina, a cascata inflamatória, o processo de regeneração e reparo (Didanish 1991; Libby 1991, Festoff 1996)

O modelo da EM experimental, a EAE, tem servido para os estudos ligados à área da coagulação. A dosagem de fatores da coagulação, seus inibidores e da atividade fibrinolítica têm demonstrado alguns resultados interessantes. Observou-se correlação significativa entre os valores do complexo T-AT e a gravidade da doença e do dano cerebral (Inaba et al, 2001). O aumento deste complexo é consequência de um estado hipercoagulável. O SNC tem alta concentração de tromboplastina tecidual e o dano cerebral facilmente predispõe às alterações na coagulação. Contrariando a força dos estudos experimentais laboratoriais e em animais, pouco

foi realizado na área clínica. Um estudo com 59 pacientes portadores de EM, 42 com a forma EMSR e 17 com EMSP, o plasminogênio e a AT normais foram relacionados à forma benigna da EM. A atividade aumentada da AT foi observada na forma branda da doença, sugerindo neuroproteção não relacionada ao seu efeito anticoagulante (Kirichuk & Streknev, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar a associação da Antitrombina com a Esclerose Múltipla.

3.2. Específicos

- Investigar a associação da atividade de AT com as formas clínicas surto remissão e secundária-progressiva de pacientes com EM.
- Investigar a existência de deficiência de AT em pacientes com EM e controles.
- Investigar a relação da atividade de AT com o tempo de evolução e a morbidade da EM de acordo com a escala de EDSS.
- Comparar a atividade de AT em pacientes tratados com imunomoduladores e não tratados.
- Comparar a atividade da AT em pacientes com surto da EM e aqueles fora do período de exacerbação da doença.

4. PACIENTES E MÉTODO

4.1. Desenho da Pesquisa: Estudo observacional, controlado, com delineamento transversal.

4.2. Ética:

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, em 14 de março de 2005 (Memorando do Comitê de Ética em Pesquisa nº15/2005), conforme a resolução nº01, de 13 de junho de 1988 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde.

4.3. Seleção dos Pacientes

4.3.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes com diagnóstico de EM, segundo McDonald e cols. (2001), classificados em dois grupos de acordo com a clínica da doença: 37 pacientes com a forma Surto-Remissão (EMSR) e 32 pacientes com forma Secundária Progressiva (EMSP). A forma clínica da EM foi definida de acordo com os critérios de Lublin e cols.(1996). O diagnóstico e a forma clínica foram estabelecidos por neurologistas, com reconhecida atuação nesta área. Os pacientes foram avaliados nos Serviços de Neurologia do Hospital da Lagoa (Ministério da Saúde) e Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (Universidade do Brasil). Como grupo controle foram selecionados 34 indivíduos requisitados de uma

população saudável convidada a participar da pesquisa pelo pesquisador, após avaliação clínica-laboratorial. Os pacientes e controles saudáveis tinham idade acima de 18 anos, e eram de ambos os sexos. Os dados obtidos foram coletados por meio de entrevista com os pacientes e dos prontuários. Só foram incluídos pacientes e controles que consentiram em participar da pesquisa, após assinar termo de consentimento livre e esclarecido. Uma entrevista foi relacionada à observação dos critérios de exclusão e em seguida realizada a coleta de amostras de sangue periférico para a pesquisa dos níveis de AT.

4.3.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos da pesquisa os pacientes e os indivíduos do grupo controle que apresentassem 1 ou mais das seguintes condições:

- a) doença hepática de curso agudo ou crônico
- b) doenças inflamatórias agudas ou crônicas de qualquer órgão
- c) doenças renais com perdas protéicas ou em diálise
- d) doenças infecciosas graves
- e) trombofilia hereditária (deficiência de Antitrombina III)
- f) distúrbios hemorrágicos agudos e adquiridos da coagulação
- g) uso de medicamentos anticoagulantes
- h) outras doenças autoimunes (no caso dos controles)
- i) gravidez
- j) história de cirurgia recente (menos de dois meses)
- k) uso de pílula anticoncepcional

4.3.3. Origem dos Pacientes

Os pacientes foram encaminhados por neurologistas com reconhecida atuação na área de EM dos Serviços de Neurologia do Hospital da Lagoa, Ministério da Saúde, e Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade do Brasil.

4.4. Revisão da Literatura

A ferramenta de busca foi a *Internet*, utilizando as bases de dados do MEDLINE/PubMed com as seguintes palavras-chaves isoladas e cruzadas entre si: *antithrombin, multiple sclerosis, inflammation, hemostasis, coagulation, anticoagulation, blood-brain barrier, bio-markers, nervous central system, thrombin.*

4.5. Amostras biológicas.

A coleta do sangue foi realizada nos hospitais de origem dos pacientes e os procedimentos técnicos para a separação de plasmas foram realizados no Laboratório do Setor de Hematologia da Clínica Médica B, Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO) e a realização dos testes para dosagem de AT no Laboratório de Hemostasia e Coagulação, do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (Universidade do Brasil - UFRJ).

4.6. Dosagem da Antitrombina

4.6.1. Material utilizado para execução da técnica:

4.6.1.1. Permanentes e descartáveis: Tubos *vacutainer* para coleta de sangue de 4 ml contendo citrato de trissódico 0,09 M; seringas descartáveis de 5 ml; agulhas descartáveis; tubos eppendorf; tubos de ensaio; pipetas automáticas de 1ml, 200 µl; pipeta automática multicanal; centrífuga; *freezer* à -20°C; banho maria à 37°C; aparelho para leitura de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) calibrado para comprimento de onda 405 nm; placas de fundo chato para leitura de ELISA; bandejas de condicionamento para placas de fundo chato; cronômetro; papel milimetrado.

4.6.1.2. Reagentes para a realização dos testes: plasma citratado; ácido acético puro ou diluído à 0,5%; Substrato Cromógeno CSB 34,47: 1,8 µmol de H-D-CHO-But-Arg pNA AcOH por ampola, Trombina, solução tampão 10X (pH 8.7, heparina UI/mL (Kit Stachrom® ATIII, Diagnóstica Stago); calibrador Unicalibrator® (Diagnóstica Stago) ; ATIII Control® (Diagnóstica Stago); plasma controle Control N e P® Stago ; água bidestilada; solução salina a 0,9%.

4.6.2. Procedimentos da coleta de amostras de sangue total e separação de plasma

Foi coletado de cada paciente e do grupo controle 4 ml de sangue em citrato de sódio 3,2% em tubo à vácuo por venopunção e imediatamente condicionado em recipiente de isopor entre almofadas de gelo. Foi observado o período máximo de 1

hora entre a coleta e posterior centrifugação (3500 rpm durante 5 min) para a separação do plasma. O mesmo foi dividido em duas alíquotas de 1ml cada em tubos eppendorf e imediatamente armazenados sob congelamento à - 20°C até o uso. Foram descartadas amostras lipêmicas ou hemolisadas.

4.6.3. Determinação da AT

O método de digestão amidolítica em substrato sintético cromogênico (Stachrom® ATIII, Diagnóstica Stago, França) foi utilizado para quantificar o nível da atividade da AT, de acordo com as instruções do fabricante e adaptado para leitura em aparelho de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) segundo técnica adotada no Laboratório de Hemostasia e Coagulação do Serviço de Hematologia Clínica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ.

4.6.4. Fundamento do Teste

A AT exerce ação antitrombínica poderosa e imediata em presença de heparina. A determinação foi efetuada em duas fases:

- 1- Incubação do plasma em presença de heparina e de uma quantidade fixa e em excesso de trombina.
- 2- A trombina residual foi medida por sua atividade amidolítica em um substrato sintético cromogênico (liberação de paranilina). A leitura da microplaca de ELISA foi realizada no leitor de ELISA em comprimento de onda de 405nm. A quantidade de trombina neutralizada é proporcional à quantidade de AT presente no meio.

4.6.5 Procedimento técnico:

- As amostras de plasma foram descongeladas uma única vez a 37°C até 30 minutos antes de sua utilização
- As reconstituições do substrato cromogênico, trombina, solução tampão, AT e dos plasmas controles foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (Diagnóstica Stago). Os reativos reconstituídos foram deixados durante 1 hora em refrigeração à 4°C para estabilização antes do uso, exceto os plasmas, que estabilizam em 15 min.
- A preparação da curva de calibração foi realizada com o Unicalibrador® Stago fazendo diluições de 1:30; 1:60 e 1:90 em solução salina 0,9%. Os valores da atividade da AT, correspondentes à cada diluição foram, respectivamente, 105%, 52,5%, e 26,25%, conforme indicado pelo fabricante.
- Os plasmas controles normal e deficiente de AT e os testados foram igualmente diluídos para 1:30 em salina.
- Todas as diluições plasmáticas (dos plasmas testados e dos plasmas controles) foram feitas em duplicata.
- Foi constituída uma solução em branco, com os seguintes reagentes: ácido acético 50 µl, trombina 50 µl, substrato cromogênico 50 µl, água destilada 50 µl, seguindo a orientação do fabricante.

4.6.6. Etapas para realização do teste:

1ª. Etapa: Colocado em ordem, nos poços da microplaca de ELISA (Figura 7) pré-aquecida à 37°C em banho-maria.

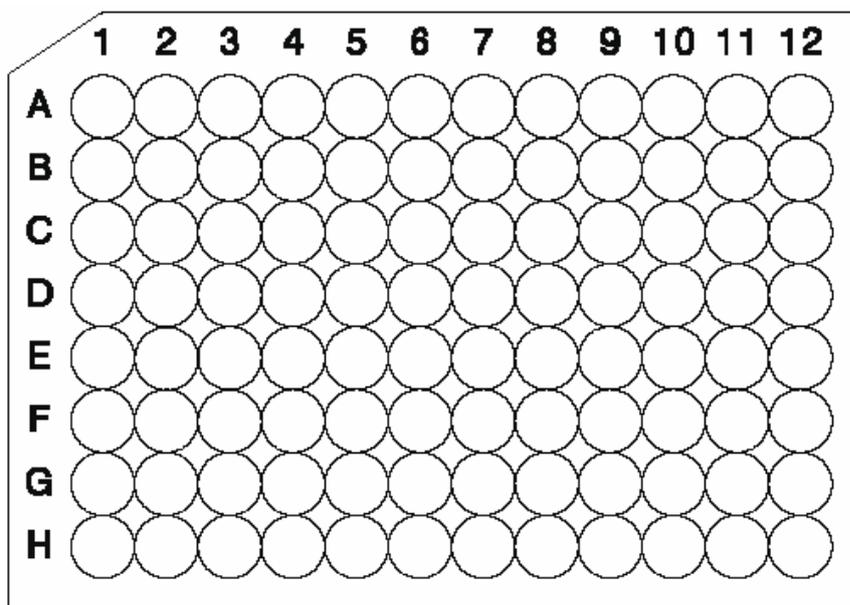


Figura 7. Representação esquemática da microplaca de ELISA.

Os reativos foram adicionados à microplaca, segundo a seqüência abaixo,

- 1º poço (A1 e A2): 200 µl da solução branca.
- 2º poço (B1 e B2): 200 µl de salina fisiológica 0,9%.
- 3º (C1 e C2), 4º (D1 e D2) e 5º (E1 e E2) poços: 50 µl das diluições 1:30; 1:60; 1:90 , respectivamente, do Unicalibrator®.
- 6º (F1 e F2) poço: 50 µl da diluição 1:30 do plasma controle normal.
- 7º (G1 e G2) poço: 50 µl da diluição 1:30 do plasma controle deficiente.
- Do 8º poço (H1 e H2) em diante (A3 ao H12): 50 µl da diluição 1:30 dos plasmas a serem testados, em duplicata.

2ª Etapa: realizada a seqüência abaixo colocando nos poços com as amostras acima para os plasmas testados:

➤ Plasma teste e padrões	50 µl
➤ Incubar	2-4 min
➤ Trombina	50 µl
Mexer levemente e incubar	1 min
➤ Substrato cromogênico	50 µl
Mexer levemente	30 seg
➤ Ácido acético puro à ½	50 µl
Mexer levemente	

Os valores das diluições de AT e suas respectivas densidades ópticas (DO) foram plotadas em gráfico para determinar a melhor curva. Os valores foram linearizados usando-se um papel log-log. Para se determinar os valores de AT das amostras dos pacientes e controles, o valor da DO foi colocado no eixo das coordenadas (Y) e uma linha horizontal foi estendida até a curva padrão. No ponto de interseção, uma linha vertical foi estendida até alcançar o eixo das abscissas (X) onde se determinou o valor da AT. Foram considerados normais os valores de AT entre 70% -120%.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos referentes às características demográficas, clínico-laboratoriais e ao tratamento foram coletados de forma contínua. As variáveis categóricas, codificadas através de números e as variáveis quantitativas foram armazenadas em banco de dados criado no programa Microsoft® Office Access 2003 (versão 6.0). Com base na análise estatística descritiva, foram determinados os valores para média, desvio-padrão (DP), amplitude, frequência e seus intervalos de 95% de confiança (IC).

Para determinar a significância das diferenças observadas entre os dados dos grupos estudados foi considerada a hipótese nula ou H_0 (ausência de diferença entre os grupos) e a hipótese alternativa H_1 (presença de diferença entre os grupos). A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste Qui-quadrado de Pearson (χ^2) para amostras independentes para variáveis categóricas; para as variáveis quantitativas com distribuição normal foi utilizado o teste t de Student (bicaudal) para comparação de médias entre dois grupos e a análise de variância de fator único (One-Way ANOVA) com pós-teste de Bonferroni para comparação entre médias de três grupos. Para análise estatística foi utilizado o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Release 12.0.0 for Windows 2003 (Chicado, Estados Unidos). As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Características da população estudada

A população estudada foi de 69 pacientes com EM, sendo 37 (53,62%) com EMSR e 32 (46,38%) com EMSP. Como grupo controle foram estudados 34 indivíduos saudáveis. Na Tabela 2 e ANEXO 2 estão relacionadas as características demográficas dos grupos estudados.

No grupo com EMSR ($n = 37$), 7 (18,9%) eram do sexo masculino e 30 (81,0%) do sexo feminino. No grupo de pacientes com EMSP ($n = 32$), 10 (31,2%) eram do sexo masculino e 22 (68,7%) do sexo feminino. No grupo controle, 12 indivíduos eram do sexo masculino (32,2%) e 22 (64,7%) do sexo feminino. Foi observada frequência absoluta maior para o sexo feminino nos pacientes com EMSR, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa em relação aos demais grupos estudados ($\chi^2 = 2,569$; $p = 0,277$).

Com relação à idade, as médias observadas nos grupos EMSR, EMSP e Controle foram 35,51 (18,00 a 59,00) anos, 47,03 (24,00 a 63,00) anos e 41,29 (21,00 a 65,00) anos, respectivamente. Os grupos diferiram significativamente (ANOVA $p = 0,0002$) com relação às médias de idade, especificamente entre os grupos EMSR *versus* EMSP ($p < 0,001$) (Tabelas 2 e 3) (Figura 8).

Tabela 2. Características demográficas dos pacientes com Esclerose Múltipla e Controles

	Esclerose Múltipla		Grupo Controle
	Surto-Remissiva (EMSR)	Secundária Progressiva (EMSP)	
Pacientes (n)	37	32	34
Sexo (%)			
Masculino	7 (18,90)	10 (31,30)	12 (35,30)
Feminino	30 (81,10)	22 (68,70)	22 (64,70)
Idade (anos)*			
Média	35,51	47,03	41,29
Desvio-padrão	10,69	8,69	13,54
IC 95%	31,94 – 39,08	43,89 – 50,16	36,56 – 46,02

* $p < 0,05$ (EMSR vs EMSP)

Tabela 3. Análise de variância de fator único com pós-teste de Bonferroni para variável idade

Comparação	Diferença Média	IC95%	Valor de p
EMSR vs EMSP	- 11,518	- 18,094 a - 4,942	< 0,001
EMSR vs GC	- 5,781	- 12,252 a 0,6907	> 0,05
EMSP vs GC	5,737	- 0,9719	> 0,05

Abreviações: EMSR= ;EMSP= ; GC= ; IC95%= .

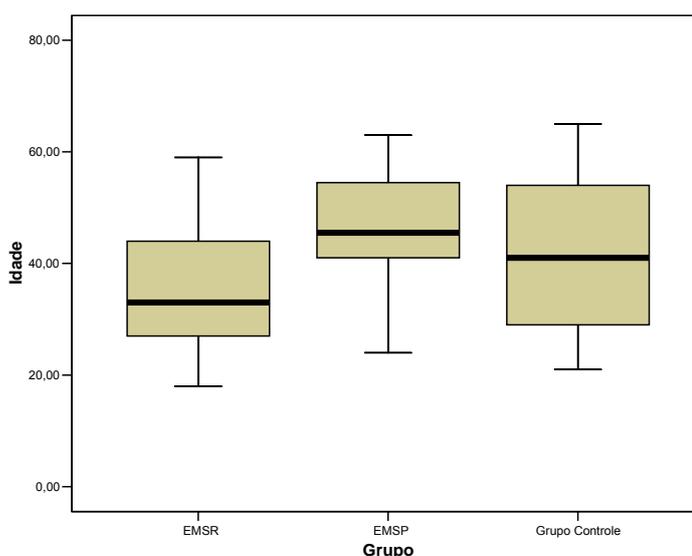


Figura 8. Diagrama em caixas da idade em uma coorte de 69 pacientes com EM (EMSR, $n = 37$; EMSP, $n = 32$) e 34 controles. A caixa central representa os valores do primeiro quartil (25th) ao terceiro quartil (75th) e a mediana é mostrada como uma linha média horizontal. A diferença entre os grupos EMSR e EMSP foi considerada significativa ($p < 0,001$).

6.2. Nível plasmático de AT

Com relação aos níveis plasmáticos de AT, os valores médios observados foram:

1. A média dos valores do nível de atividade da AT de todos os pacientes com EM (EMSR, $n=37$, e EMSP, $n=32$) foi de $109,68 \pm 18,39$ (25,00 a 147,00) %. Na análise bivariada não houve diferença significativa com a média do grupo controle ($109,44 \pm 22,08\%$) ($t = 0,0574$; $p = 0,9543$).

2. Considerando-se os dois grupos de pacientes com EM (formas EMSR e EMSP) em comparação aos controles observamos:

A AT apresentou valor médio de $107,16 \pm 16,19$ (72,00 a 147) % nos pacientes do grupo EMSR, valor de $112,59 \pm 20,53$ (25,00 a 140,00) % nos pacientes com EMSP e $109,44 \pm 22,80$ (62,00 a 152,00) % nos controles. Os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação às médias dos níveis de AT (ANOVA $p = 0,1481$) (Figura 9).

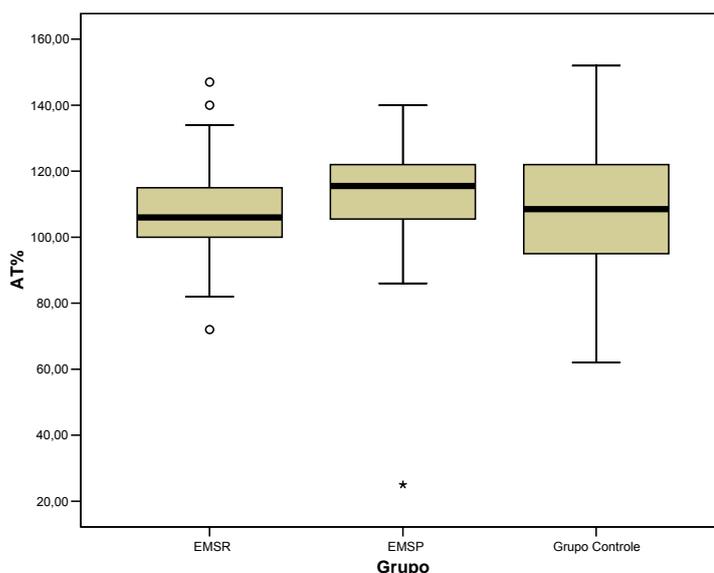


Figura 9. Diagrama em caixas da antitrombina em uma coorte de 69 pacientes com EM (EMSR, $n = 37$; EMSP, $n = 32$) e 34 controles. A caixa central representa os valores do primeiro quartil (25th) ao terceiro quartil (75th) e a mediana é mostrada como uma linha média horizontal. A diferença entre os grupos EMSR e EMSP não foi considerada significativa ($p = 0,1481$).

3. No grupo dos pacientes com EMSR ($n=37$), 30 (81%) apresentavam níveis plasmáticos normais e 7 (18,9%) apresentavam níveis elevados. Não foi detectada deficiência de AT nos pacientes com EMRS.

4. No grupo de pacientes com EMSP ($n =32$), 19 (59,3%) apresentavam níveis normais e 12 (37,5%) níveis plasmáticos elevados e 1 caso de deficiência de AT.

5. Entre os controles ($n = 34$), 23 (67,6%) apresentavam níveis normais e 10 (29,4%) apresentavam níveis elevados , sendo detectado 2 (5,8%) casos de deficiência de AT.

6. Comparação dos grupos EMSR e EMSP com controles:

Na análise bivariada não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as categorias de deficiência (< 70%), normal (70 a 120%) e elevado (> 120%) dos níveis plasmáticos de AT e os grupos estudados ($\chi^2 = 4,450$; $p = 0,348$).

7. Entre os pacientes com EM, 18 ($n =13$ para EMSR e $n = 5$ para EMSP) não apresentavam histórico de tratamento medicamentoso recente para a doença e 51 ($n = 24$ para EMSR e $n = 27$ para EMSP) estavam em tratamento. Na análise bivariada, as médias dos níveis plasmáticos de AT não foram estatisticamente diferentes em relação ao histórico de uso ou não de medicamento para tratamento da doença ($t = 0,337$; $p = 0,737$). Quando comparado com o grupo controle, a média de atividade de AT do grupo de pacientes sem medicamento ($110,94\% \pm 16,02\%$) não foi

estatisticamente diferente ($t = 0,551$; $p = 0,583$), como também em relação a média dos pacientes em uso de medicamentos ($109,23\% \pm 19,28\%$) ($t = 0,434$; $p = 0,665$).

8. Com relação à atividade da doença (surto *versus* remissão), 53/69 (76,8%) ($n = 28$ para EMSR e $n = 25$ para EMSP) estavam em remissão e 16 (23,18%) ($n = 9$ para EMSR e $n = 7$ para EMSP) estavam em surto da doença. Na análise bivariada, as médias dos níveis plasmáticos de AT não foram estatisticamente diferentes em relação à atividade da doença ($t = 0,1154$; $p = 0,9085$) e o controle (ANOVA $p = 0,9943$). A análise bivariada entre a média de AT do grupo EMSR em surto ($109,88 \pm 17,26\%$) e a do grupo controle ($109,44 \pm 22,80\%$) não revelou diferença significativa ($t = 0,4776$; $p = 0,6355$), como também a do EMSR em remissão ($107,38 \pm 16,19\%$) com o controle ($t = 0,3971$; $p = 0,6927$), entre si (EMSR em surto *vs* EMSR em remissão) ($t = 0,3088$; $p = 0,7593$) e EMSR em surto e EMSP ($112,59 \pm 20,53\%$) ($t = 0,9594$; $p = 0,3433$) e quando comparado o EMSR em remissão e o EMSP ($t = 0,9053$; $p = 0,3690$).

9. Quanto ao tempo de doença, 29 pacientes tinham mais de 10 anos de doença: 10/37 (27,0%) no grupo EMSR e 19/32 (59,3%) no grupo EMSP. O valor da média de AT do grupo ($n = 29$) ($113,14 \pm 21,04\%$) não foi significativamente diferente quando comparado com a do grupo de pacientes com menos de 10 anos de doença, 40/69 (57,9%) ($107,20 \pm 16,01\%$) ($t = 1,323$; $p = 0,1903$) e o grupo controle ($t = 0,6642$; $p = 0,5090$), e quando comparados os três grupos (ANOVA $p = 0,4789$). (Figura 10).

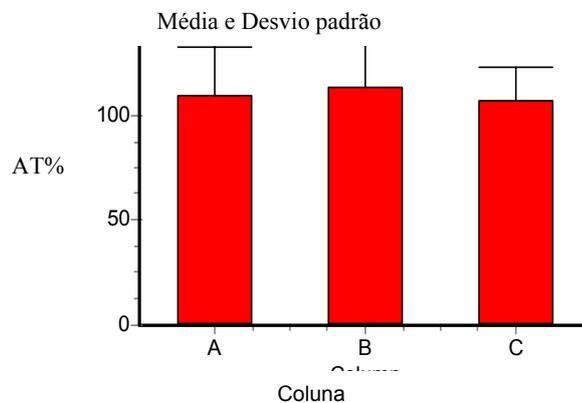


Figura 10 – Dosagem de AT de acordo com o tempo de doença. Em coluna A, grupo com <10 anos de doença; em B, com > 10 anos; em C, grupo controle. (ANOVA $p = 0,4789$).

10. Em relação ao grau de acometimento da doença, usando o EDSS, observamos que 35/69 pacientes (50,72%) tinham EDSS maior que 3,0 e 34/69 (49,27%) apresentavam valor menor ou igual a 3,0. A diferença das médias dos níveis da AT entre os dois grupos não foi significativa ($t = 1,359$; $p = 0,1788$), o grupo com EDSS >3,0 com média de $112,63 \pm 20,60\%$ e o grupo com EDSS $\leq 3,0$ com média de $106,63 \pm 15,52\%$, assim como quando comparados com o grupo controle (ANOVA $p = 0,4308$). Nos 29 pacientes com mais de 10 anos de evolução, 8 (27,5%) apresentavam EDSS $\leq 3,0$ e 21 (72,4%) apresentavam EDSS > 3,0 cujas médias de AT foram, respectivamente, $112,50 \pm 10,00\%$ e $113,85 \pm 24,71\%$. Todos os 8 pacientes com EDSS $\leq 3,0$ encontravam-se no grupo EMSR. Comparando-se a média de AT dos 8 pacientes com EDSS $\leq 3,0$ e a média dos 29 pacientes com EDSS > 3,0, não houve diferença significativa ($t = 0,0825$; $p = 0,9347$), como também em relação ao grupo controle ($t = 0,3683$; $p = 0,7146$)(Figura 11).

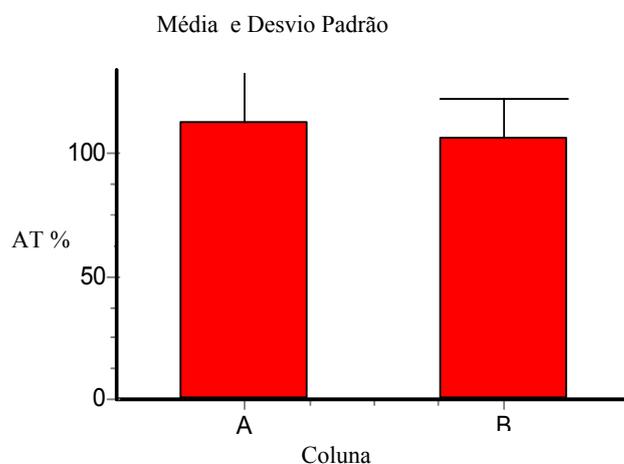


Figura 11 – Dosagem de AT de acordo com EDSS. Na coluna A, média das dosagens dos pacientes com EDSS $\leq 3,0$; na coluna B, a dosagens dos pacientes com EDSS $> 3,0$. ($t=1,359$; $p = 0,1788$),

11. A análise das diferenças das médias do grupo com menos de 10 anos de doença e EDSS $\leq 3,0$ ($104,84 \pm 16,95$ %), EDSS entre 3,5 e 6,0 ($108,33 \pm 14,90$ %) e o grupo controle não foi significativa (ANOVA $p = 0,6136$). 4 pacientes tinham EDSS $> 6,0$ e seu valor médio de AT ($117,50 \pm 5,68$ %) não foi suficiente para a análise estatística. A comparação entre as médias do grupo com EDSS $\leq 3,0$ e o grupo restante ($>3,0$) ($110,60 \pm 14,12$ %) não mostrou diferença significativa ($t = 1,104$; $p = 0,2763$).

12. Os níveis de AT encontravam-se elevados (>120 %) em 7/37 (18,9%) do grupo EMSR, 12/32 (34,5%) do grupo EMSP e 10/34 (29,4%) do grupo controle. Entre 19 pacientes com AT elevada, 12 pacientes eram do grupo EMSP (63,12%) e 7 (36,84%) eram do grupo EMSR. Dos 19 pacientes com AT elevada, 13 (61,9%) tinham EDSS $> 3,0$ (12 do grupo EMSP e 1 do grupo EMSR). O valor da média dos

níveis elevados de AT no grupo EMSR foi de $131,43 \pm 9,53$ (121,00 a 147,00) %, no grupo EMSP foi de $127,00 \pm 6,98$ (121,00 a 140,00) % e o grupo controle $136,10 \pm 13,19$ (121,00 a 152,00) %. Os grupos não mostraram diferença significativa (ANOVA $p = 0,1481$).

7. DISCUSSÃO

A população analisada nesse estudo foi dividida em dois grupos, surto-remissão e secundariamente progressiva, com o objetivo de investigarmos a participação da ação inflamatória da AT mediando e influenciando dois diferentes momentos de evolução da EM. Como era de se esperar, a diferença significativa de idade entre os 37 pacientes com forma EMSR e 32 com EMSP pode ser explicada pela evolução da doença após dez ou mais anos para formas progressivas depois de um período com surtos e remissões. Prevaleceu o sexo feminino, numa proporção de 4:1 para o grupo EMSR, 2:1 para o grupo EMSP, condição encontrada em todas as populações estudadas com EM.

O presente estudo mostra ausência de relação entre a atividade plasmática de AT e EM nas formas clínicas estudadas. Buscando os motivos para esse resultado, encontramos estudos experimentais *in vitro*, *in vivo*, apontando a relação da AT como parte de um sistema regulador inibitório natural, junto a outra proteína que exerce o mesmo efeito. Essa proteína, denominada nexina 1 (NP1) foi identificada em 1986 por Gloor e cols. e sua importância vem sendo mostrada na injúria do SNC. Tem localização perivascular, ligação aos mesmos receptores da AT, e alvo fisiológico antitrombínico com rápida e potente ação, o que têm lhe conferido papel inicial importante na preservação da integridade neurológica (Choi et al,1990). É encontrada somente no SNC, onde é produzida pelas células da glia, que alia-se ao efeito da AT plasmática com a quebra da BHE para o controle das atividades prócoagulantes e inflamatórias da trombina formada. Por estarmos estudando uma doença do SNC, e ser a expressão de NP1 mais potente, maior, mais rápida do que a AT, e restrita ao SNC, acreditamos que os níveis normais de um fator

antitrombínico associado a inflamação, como a AT, observados nesse estudo, não fossem igualmente indiferentes se, nessa mesma amostra de pacientes, tivéssemos dosado a NP1. As ações inibitórias destas duas serpinas, configuram o que Beilin chamou de capacidade inibitória antitrombinica total do SNC. Nosso estudo não evidenciou alterações na fase plasmática dessa capacidade inibitória, aqui representada pela AT. A falta da análise da NP-1 associada a AT pode, talvez, explicar os resultados negativos aqui observados.

Nossos resultados mostram, ainda, que anormalidades no nível plasmático da atividade de AT não foram associadas a períodos de surto da EM ou a períodos de remissão. Por ser a EM doença inflamatória crônica cuja fisiopatogenia está estreitamente associada à lesão da BHE, investigamos a possibilidade da AT participar dos períodos de maior ou menor atividade inflamatória da EM. Até onde sabemos, a comparação da atividade da AT com surto e remissão da EM foi pouco estudada. Nosso trabalho é o primeiro a analisar isoladamente a AT plasmática e sua relação com a EM. A falta de associação entre o nível da atividade de AT e a fase de surto ou remissão da EM sugere que o impacto inflamatório da doença não é suficiente para determinar queda expressiva da AT. A EM é uma doença órgão-específica de curso crônico com influência na coagulação diferente das doenças multi-sistêmicas agudas. A demonstração de síntese de AT no SNC é evidenciado na expressão de mRNA e síntese de AT em culturas de células astrocíticas (Dihanich et al,1991; Deschepper et al, 1991; Beilin,2004). O aumento da proteína no LCR parece não ser, apenas por extravazamento, mas sim por síntese local competindo com a NP-1 dos pericitos, tornando o balanço liquórico e plasmático estável semelhante à síntese de imunoglobulinas intra-tecal. O paradigma de síntese hepática exclusiva da AT parece rompido. Excetuando as causas que determinam a

sua produção insuficiente e os estados de perda protéica, a AT é estável no plasma. No estado de hipercoagulabilidade compensada pode não detectar anormalidades no nível sanguíneo de AT quando os mecanismos de depuração e de produção conseguem manter ainda o estado homeostático, não sendo portanto estranho, o encontro de níveis normais e até aumentados em alguns casos de nossa casuística, como nos 19 pacientes da nossa série, 12 com EMSP e 7 com EMSR. Mesmo sem valor estatístico significativo, é interessante observar a diferença dos níveis plasmáticos de AT, elevados em número maior de pacientes do que a deficiência de AT, ocorrida em somente 1 paciente com EMSP.

Para considerarmos a morbidade da EM usamos neste estudo os critérios de Weinsheinker (1995), que considera pacientes com evolução benigna aqueles que com dez ou mais anos de doença mantêm EDSS ≤ 3.0 , e comparamos com pacientes que apresentavam menos de 10 anos de doença e EDSS > 3.0 . Ao classificarmos os nossos pacientes em dois grupos de acordo com esses critérios, não encontramos associação entre a atividade de AT e gravidade da EM. Beilin (Beilin, 2005) mostrou que a capacidade inibitória da trombina pelos seus reguladores AT e NP-1 no encéfalo tem uma velocidade estabelecida através de estudos com EAE em camundongos. Os dois inibidores estão aumentados quando comparados com os controles. O pico de elevação da NP-1 ocorrendo até o 8º dia da imunização (fase pré-clínica), e da AT atingindo o mais alto score no 13º dia foram relacionados à gravidade da doença e ao seu curso clínico. Encontramos níveis plasmáticos elevados de AT em 19 pacientes, onde 13 tinham EDSS $> 3,0$ e forma progressiva da doença (12 pacientes EMSP). Nossos resultados contrariam aqueles encontrados por Kirichuk e Streknev (2003), que mostraram ser a AT normal ou alta associada a evolução benigna da EM. Quando Beilin diz que a capacidade

inibitória da trombina é composta de vários fatores complexos e que um equilíbrio final, pode ter significado clínico para o processo patológico cerebral (Beilin, 2005), podemos inferir que os resultados aqui obtidos mostram não haver, em seres humanos com EM, as alterações encontradas na EAE, e que modelos experimentais podem ter resultados divergentes.

Os níveis plasmáticos da AT não apresentaram associação com o tratamento da EM. Os pacientes do presente estudo, em surto ou em remissão, que usavam imunomodulares ou imunossupressores, não foram diferentes daqueles sem tratamento e dos controles. A AT plasmática nesta série não se mostrou como marcador da atividade ou da eficácia do medicamento, em acordo com Bielekova (2004), ao afirmar não existir até o momento um biomarcador plasmático para a EM. A medida da intensidade do surto inflamatório na EM ainda não pode ser adequadamente estimada por nenhum biomarcador específico, apesar da forte evidência daqueles da autoimunidade. Tenta-se relacionar proteínas inflamatórias, citocinas e imunoglobulinas com um tipo de padrão evolutivo específico. Pacientes com graves lesões neurológicas podem expressar muito, pouco ou nada destas moléculas (McDonald et al, 2001) Em outros, com poucas lesões ou sintomas, estes marcadores podem ser encontrados aumentados. A diversidade dos mecanismos patológicos da EM dificulta a avaliação e o fato da doença ocorrer em um local de pouca acessibilidade torna os exames de pouca disponibilidade e reprodutibilidade (Teunissen et al, 2005; Uccelli et al, 2003).

Em situações onde a AT esteve implicada em lesões cerebrais houve sempre mais de um fator de risco associado para isso. Parece natural que, um tecido especial como o do sistema nervoso, tenha a sua própria antitrombina distribuída exatamente na área perivascular. Em processos de quebra de BHE sua atuação

competiria fortemente com a ação da AT plasmática, fixando-se nas áreas próprias desta, não ocorrendo portanto o consumo, exceto nas situações de grande dano cerebral. Quando se estuda o perfil das trombozes comumente encontradas nos pacientes portadores de deficiências de AT, são raras as cerebrais (Bombeli et al, 2002) A ação neuroprotetora da NP1 poderia explicar esta ocorrência. Mais uma vez, a falta da dosagem de NP1 nesse estudo pode justificar os resultados negativos.

Se o impacto da diferença das dosagens de AT não foi observado em nosso estudo entre os grupos de pacientes EMSR e EMSP, em qualquer das variáveis analisadas, questionamos se haveria diferença entre eles e o de pacientes com a forma mais grave da doença (formas EMPP e EMPS). A intensidade e a gravidade da lesão inflamatória poderia talvez mostrar alguma diferença, visto que as alterações das proteases da coagulação são diretamente proporcionais à este evento, e a comparação desses dados poderia ser feita em futuro próximo. A análise isolada da atividade plasmática da AT não traduziu em nossa avaliação o completo evento regulador da trombina, sendo, talvez, necessário associar ao estudo a análise da NP1. A amplitude do evento inflamatório no SNC requer o aprofundamento na busca de marcadores biológicos que reflitam a intensidade do fenômeno e permitam a correlação com as proteínas da coagulação. Essa relação, se alterada, pode amplificar ou impedir uma resposta adequada (Esmon, 2004) contribuindo provavelmente para a morbidade e mortalidade da EM e outras doenças neurológicas.

As ações antiinflamatórias da AT estão em ampla investigação nos programas clínicos experimentais, como nos quadros sépticos e de insuficiência de múltiplos órgãos, onde sua utilização terapêutica está sendo indicada sem o uso da heparina

(Okagima & Uchiba, 1998; Opal, 2000; Warren et al, 2001; Amaral et al, 2004). Poucos estudos avaliaram a AT e sua atividade com a EM. Os resultados aqui obtidos podem contribuir na compreensão da fisiopatogenia da EM, da sua relação com os primeiros momentos da doença quando há lesão da BHE, e da importância, ou não, da AT no processo inflamatório em diferentes momentos.

8. CONCLUSÕES

1. A atividade da AT não foi associada com as formas clínicas da EM (EMSR ou EMSP).
2. Apenas 1 caso de deficiência de atividade da AT foi observado no grupo EMSP e 2 casos no grupo controle. Nenhuma associação foi observada entre a deficiência de AT e a EM nas formas EMSR e EMSP.
3. Os níveis plasmáticos de AT não se mostraram relacionados com o tempo de evolução da doença e com a morbidade determinada pela escala de EDSS.
4. Não houve associação entre o tratamento efetuado para a EM com a atividade de AT.
5. Os períodos de surto ou remissão da EM não apresentaram relação com a atividade de AT.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott NJ. Astrocyte – endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. **J. Anat.** 2002 Jun;200(6):629-38.

Abilgaard U. Purification of two progressive antithrombins of human plasma. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** 1967;19:190-95.

Acar G, Idiman F, Ozakbas S, Cakmakci H, Idiman E. Intrathecal ICAM-1 production in multiple sclerosis-correlation with triple-dose GD-DTPA MRI enhancement and IgG index. **J. Neurol.** 2005;252:146-50.

Adams RA, Passino M, Sachs BD, Nuriel T, Akassoglou K. Fibrin Mechanisms and Functions in Nervous System Pathology. **Mol. Interv.** 2004;4:163-176.

1-

Aird WC. Endothelium as na organ system. **Crit. Care Med.** 2004 May;32(5 suppl) S271-9.

Akassoglou K, Yu WM, Akpınar P, Strickland. Fibrin inhibits periferal nerve regeneration by arresting Schwann cell differentiation. **Neuron** 2002;33:861-75.

Akassoglou K, Adams RA, Bauer J, Mercado P et al. Fibrin depletion decreases inflammation and delays the onset of demyelination in a tumor necrosis factor transgenic mouse model for multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2004;101:6698-6703.

Allan SM, Rothwell NJ. Inflammation in central nervous system injury. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 2003 Oct 29;358(1438):1669-7.

Altieri DC, Xa receptor EPR-1. **The FASEB Journal** 1995;9:860-65.

Alves-Leon SV, Batista E, Papais-Alvarenga R, Quirico-Santos T. Determination of soluble ICAM-1 and TNF α R in the cerebrospinal fluid and serum levels in a population of Brazilian patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **Arq. Neuropsiquiatr.** 2001 Mar;59(1):18-22.

Alves-Leon SV. HLA DQB1*0602 confere susceptibilidade genética para esclerose múltipla numa população de pacientes da cidade do Rio de Janeiro. Tese. **Universidade do Brasil** 1999; 187 pg.

Amaral A, Opal MS, Vincent JL. Coagulation in sepsis. **Intens Care Med.** 2004 Jun;30(6):1032-40.

Anliker B, Chung J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. **J. Biol. Chem.** 2004; 279:20555-8.

Arai M, Goto T, Seichi A, Nakamura K. Effects of Antithrombin III on spinal cord-evoked potentials and functional recovery after spinal cord injury in rats. **Spine** 2004 Feb 15;29(4):405-12.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation and clinical implications. **Neurobiol. Dis.** 2004 Jun;16(1):1-13.

Barcellos LF, Oksenberg JR, Green AJ, Bucher P, Rimmler JB et al. Genetic basis for clinical expression in multiple sclerosis. **Brain** 2002;125:150-8.

Beilin O, Karusis DM, Korczyn AD, Gurwitz D, Aranovich R, Hantai D, Grigoriadis, Mizrahi-Kol, Chapman J. Increased Thrombin Inhibition in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **J. Neurosc Res** 2005;79:351-9.

Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. **Ann. Rev. Biochem.** 1999, 68:729-34

Bieber AJ, Kerr S, Rodriguez M. Efficient central nervous system remyelination requires T cell. **Ann. Neurol.** 2003;53:680-4.

Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. **Brain** 2004;127:1463-78.

Bombeli T, Basic A, Fehr J. Prevalence of hereditary thrombophilia in patients with thrombosis in different venous systems. **Am. J. Hematol.** 2002 Jun;70(2):126-32.

Bradl M, Flügel A. The role of T cells in brain pathology. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002, 265:141-62 / Hickley WF, Hsu BL, Kimura H. T lymphocyte entry into the central nervous system. **J. Neurosci .Res.** 1991; 28:254-60.

Bradl M, Hohlfeld. Molecular pathogenesis of neuroinflammation. **Neurol. Neurosurg. Psychiatry** 2003;74:1364-70.

Brinkhous K, Smith HP, Warner ED, Seegers WH. The inhibition of blood coagulation: An unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin into thrombin. **Am. J. Physiol.** 1939;125:683-7.

Busch G, Seitz I, Steppich B, Hess S, Eckel R, Schömig A, Ilka Ott. Coagulation Factor Xa stimulates Interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leucocytes. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 2005 Feb;25:461-6.

Caballero A, Alves-Leon S, Papais-Alvarenga R, Fernandez O, Navarro G, Alonso A. DQB1* 0602 confers genetic susceptibility to multiple sclerosis in Afro-Brazilians. **Tis. Antig.** 1999 Nov;54(5):524-6.

Cananzi AR, Milone FF, Grigoletto F, Toldo M, Meneghini F, Bortolon F, D'Andrea G. Relevance of platelet factor four (PF4) plasma levels in multiple sclerosis. **Acta Neurol. Scand.** 1987;76:79-80.

Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. **Ann. Neurol.** 1995 Apr;37(4):419-21.

Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. **Biochem. J.** 1997;327:1-16.

Carrell RW, Stein PE, Fermi G, Wardell MR: Biological implications of a 3 A structure of a dimeric antithrombin. **Struct.** 1994 Apr 15;2(4):257-70.

Carvalho A, Sant'anna G, Santos CC, Frugulhetti IP, Leon SA, Quirico-Santos T. Determination of autoantibody for myelin antigens in the serum of patients HLA-DQB1* 0602 with multiple sclerosis. **Arq. Neuropsiquiatr.** 2003 Dec;61(4):968-73. Epub 2004 Jan 6.

Choi BH, Suzuki M, Kim T, Wagner SL, Cunningham DD. Protease nexin-1. Localization in the human brain suggests a protective role against extravasated serine proteases. **Am. J. Pathol.** 1990 Oct;137(4):741-7.

Cicala C, Cirino G. Linkage between inflammation and coagulation: an update on the molecular basis of the crosstalk. **Lif. Sci.** 1988;62(20):1817-20.

Cirino G, Napoli C, Bucci M, Cicala C. Inflammation-coagulation network: are serine protease receptors the knot? **T.I.P.S.** May 2000;21:170-2.

Compston A. Risk factors for multiple sclerosis: race or place? **J. Neurol. Neurosurg. Psych.** 1990;53:821-3.

Coughlin SR. Thrombin signaling and protease-activated receptors. **Nat.** 2000;407:258-64.

Cserr HF, Harling-Berg CJ, Knopf PM. Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. **Brain Pathol.** 1992, 2:269-70.

Deschepper CF, Bigornia V, Berens ME, Lapoint MC. Production of thrombin and antithrombin III by brain and astroglial cell cultures. **Brain Res. Mol. Brain Res.** 1991 Oct;11(3-4):355-8.

Dickneider G. Antitrombin III in animal models of sepsis and organ failure. **Semin Thromb. Haemost.** 1998;24:61-9.

Dihanich M, Kaser M, Reinhard E, Cunningham D, Monard D. Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. **Neuron** 1991;6:575-81.

Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetic of Multiple Sclerosis. **Lancet Neurol.** 2004;3:104-10.

Edgington TS, Dickison CD, Ruf W, The structural basis of function of the TF.VIIa complex in the cellular initiation of coagulation. **Thromb. Haemost.** 1997;78:401-5.

Esmon CT. Does inflammation contribute to thrombotic events?. **Haemost.** 2000;30(Suppl 2):34-40.

Esmon CT: Interactions between the innate immune and blood coagulation system. **TRENDS in Immunol.** 2004 October;25(10) :536-42.

Feldman S, Izak G, Nelken. Blood coagulation studies and serotonin determinations in serum and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. **Acta Psychiatr. Neurol. Scand.**1957;32(1):37-49.

Fernandez N, Jancar S, Crespo MS: Blood and endothelium in immune complex-mediated tissue injury. **TRENDS in Pharmacol. Sci.** 2004 October; 25(10): 512-7.

Festoff BW, Smirnova IV, Ma J, Citron BA. Thrombin, its receptor and protease nexin 1, in the nervous system. **Semin. Thromb. Hemost.** 1996;22:267-71.

Flugel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE et al. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Immunity** 2001 May;14(5):547-6.

Furie B, Furie BC: The molecular basis of blood coagulation. **Cell** 1988 May 20;53(4):505-18.

Gell PGH, Coombs RRA. The classification of allergic reactions underlying disease. In **Clin. Asp. of Immunol.** 1963;317-37.

Gingrich MB, Traynelis SF. Serine proteases and brain damage – is there a link ?. **Trends Neurosc.** 2000 Sep;23(9):399-4.

Gloor S, Odnik K, Guenter J, Nick H, Monard D. A glia-derived neurite promoting factor with protease inhibitory activity belongs to the protease nexins. **Cell** 1986;47:687-93.

Götte M. Syndecans in inflammation. **The FASEB Journal** 2003 Apr;17:575-90.

Grinan M, Maiolo A. Cytokines and Hemostasis. **Haematol.** 2000;85:967-72.

Grip L, Blombäck M, Egberg N, Olsson A, Svane R, Velandar M. Antithrombin III supplementation for patients undergoing PTCA for unstable angina pectoris: a controlled randomized double-blind pilot study. **Eur. Heart J.** 1997;18:443-9.

Hemmer B, Cepok S, Nessler S, Sommer N. Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology. **Curr. Opin. Neurol.** 2002;15:227-31.

Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR. Cellular interactions in hemostasis. **Haemost.** 1996;Suppl 1:12-6.

Hofmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. Antithrombin reduces leukocyte adhesion during chronic endotoxemia by modulation of the cyclooxygenase pathway. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** 2000;279:C98-107.

Hoffman M, Monroe III DM. A cell-based Model of Hemostasis. **Thromb. Haemost.** 2001;85:958-65.

Hoffman JN, Muhlbauer D, Jochum M, Inthorn D. Effect of long-term and high-dose antithrombin supplementation on coagulation and fibrinolysis in patients with severe sepsis. **Crit. Care Med.** 2004 Sep;32(9):1968-9.

Horie S, Ishii H, Kazama M. Heparin-like glycosaminoglycan is a receptor for antithrombin III- dependent but not for thrombin-dependent prostacyclin production in human endothelial cells. **Thromb. Res.** 1992;59:895-904.

Horowitz A, Simons M. Phosphorilation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase C alpha. **J. Biol. Chem.** 1998;273:25548-51.

Hricovini M, Guerrini N, Bisio A, Torri G, Petitou M, Casu B. Conformation of heparin pentasaccharide bound to antithrombin III. **Biochem. J.** 2001 Oct 15;239(Pt 2):265-72.

Huntington JA, McCoy A, Belzar KJ, Pei XY, Gettins GW et al. The Conformational Activation of Antithrombin. **J. Biol. Chem.** 2000 May 19;275(20):15877-83.

Imberti D. Antithrombin: prospects in clinical practice. Sepsis: anticoagulant or anti-inflammatory agents?. **Miner. Anestes.** 2003 May;69(5):371-5

Inaba Y, Ichikawa M, Inoue A, Kyugashima M, Sekiguchi Y, Nakamura S, Komiyama A, Koh C. Plasma thrombin-antithrombin III complex is associated with the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Neurol. Sci.** 2001 Apr 1;185(2):89-93.

Kaneider NC, Egger P, Dunzendorf, Wiedermann. Syndecan-4 as Antithrombin Receptor of human neutrophils. **Bio. Bioph. Res. Commun.** 2001;287:42-6.

Kaneider NC, Feistritzer C, Mosheimer BA, Ricevuti G, Patsch JR, Wiedermann CL. Expression and function of syndecan in human platelets. **Thromb. Haemost.** 2005;Jun;93(6):1120-7.

Kaneider NC, Reinisch CM, Dunzendorfer S, Romisch J. Syndecan-4 mediates antithrombin-induced chemotaxis of human peripheral blood lymphocytes and monocytes. **J. Cell. Sci.** 2002;115:227-36.

Karlov VA, Makarov VA, Savina EB, Seleznev AN, Savin AA. Role of disorders of hemostatic system in the pathogenesis of multiple sclerosis and ways of correcting them. **Zh. Nevropatol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova** 1985;85(2):198-206. Abstract.

Khan SN, Belin J, Smith AD, Sidey M, Zilkha KJ. Response to platelets-activating factor of platelets from patients with multiple sclerosis. **Acta Neurol. Scand.** 1985; 71:212-20.

Kim JA, Tran ND, Yang F, Zhou W, Ficher MJ. Brain endothelial hemostasis regulation by pericytes. **J. Cer. Blood Flow Metab.** 2005 Jul 13;[Epub ahead of print]. Abstract doi:101038/sj.jcbfm.9600181.

Kirichuk VF, Streknev AG. The role of hemostasis system in the pathogenesis and course of multiple sclerosis. **Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova** 2003; Spec No 2:34-8.

Kottke-Marchant K, Duncan A; Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis. **Arch. Pathol. Lab. Med.** 2002 Nov;126(11):1326-36.

Kuenz B, Luterroti A, Khalil M, Ehling R, Gneiss C, Deisenhammer F, Reindl M, Berger T. Plasma levels of soluble adhesion molecules sPECAM-1, sP-selectin and sE-selectin are associated with relapsing-remitting disease course of multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.** 2005 Oct;167(1-2):143-9.

Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale(EDSS). **Neurol.** 1983 Nov;33(11):1444-52.

Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, et al. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. **Nat Immunol.** 2002;3:940-3.

Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, Altieri DC. Fibrinogen mediates leucocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. **Cell** 1993 Jul 2;73(7):1423-34.

Lassman H. Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. **Mult. Scler.** 1988 Jun;4(3):93-8.

Lassmann H, Rossler K, Zimprich F, Vass K. Expression of adhesion molecules and histocompatibility antigens at the blood-brain barrier. **Brain Pathol.** 1991;1:115-23.

Lee SJ, Park JY, Benveniste EN. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by proinflammatory cytokines in human astrocytes. **Glia.** 1999 Jan;25(1):21-32.

Levi M, ten Cate H, van der Poll T: Endothelium: Interface between coagulation and inflammation. **Crit. Care Med.** 2002 Vol. 30, No. 5 (suppl):S220-4.

Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H: Infection and inflammation and the coagulation system. **Cardiovasc. Res.** 2003, **60: 26-39.**

Levi M, van der Poll T, Büller HR: Bidirectional Relation Between Inflammation and Coagulation . **Circul.** 2004 June 8:2698-704.

Levi M, van der Poll T, ten Cate H. The cytokine – mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. **Eur. J. Clin Invest.** 1997;27:3-9.

Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET et al. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. **J.A.M.A.** 2003 Mar 26;289(12):1533-6.

Liaw PC, Becker DL, Stafford AR. Molecular basis for the susceptibility of fibrin-bound thrombin inactivation by heparin co-factor in the presence of dermatan sulfate but not heparin. **J. Biol. Chem.** 2001;276:20959-65.

Libby P, Sukhova G, Lee RT, Liao JK . Molecular biology of atherosclerosis. **Int. L. Cardiol.** 1997 Dec 31;62 suppl 2:S23-9.

Liu C-S, Cahng J-Y. The heparin binding site of human antithrombin III: Seletive chemical modification of Lys 114, Lys 125, and Lys 287 impairs its heparin cofactor activity. **J. Biol. Chem.** 1987; 17356-61.

Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms,challenges and oppootunities in stroke. **Nat. Ver. Neurosci.** 2002;399-415 .

Lublin F, Reingold S. Defining the course clinical of multiple sclerosis. Results of an international survey. **Neurol.** 1996; 46:907-11.

Lutton JD, Winston R, Rodman TC. Multiple sclerosis: etiological mechanism and future directions. **Exp. Biol. Med. (Maywood)** 2004 Jan;226(1):12-20.

Lyon M, Gallanger JT. Biospecific sequences and domains in heparan sulphate and the regulation of cell growth and adhesion. **Matrix Biol.** 1998;17:485-93.

Makson SM, Gebhard MM, Maksan MO, Herfarth C, Klar E. New aspects of anti-inflammatory potential of AT III: reduction of reperfusion injury after warm liver ischemia. **Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Kongressbd** 1998:115(Suppl I):385-5 (Abstract).

Mantovani A, Sozzani S, Vecchi A, Introna M, Allavena P. Cytokine activation of endothelial cells: new molecules for an old paradigm. **Thromb. Haemost.**1997; 78:406-14.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Hangtung H, Lublin F, MacFarland H, Paty D, Polman C, Reingold S, Sandberg-Wolheim M, Sibley W, Thompson A, van der Noort S. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on Diagnosis of Multiple Sclerosis. **Ann. Neurol.** 2001;50:121-7.

Miller-Andersson M, Borg H, Andersson L-O. Purification of antithrombin III by affinity chromatography. **Thrombosis Research** 1974, 5:439-53.

Miller A, Glass-Marmor L, Abraham M, Grossman I, Shapiro S, Galboiz Y. Biomarkers of disease activity and response to therapy in multiple sclerosis. **Clin. Neurol. Neurosurg.** 2004;106:249-54.

Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part 1: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. **Lancet Neurol.** 2005;4:281-8.

Minagar A, Toledo EG, Alexander JS, Kelley RE. Pathogenesis of Brain and Spinal Cord Atrophy in Multiple Sclerosis. **J. Neuroim.** 2004;14:5S-10S.

Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Isobe M, Harada N, Mizutani S, Noguchi T. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation through promotion of prostacyclin production. **Blood** 2003 Apr 15;101(8):3029-36.

Nathanson M, Savitsky JP. Platelet adhesive index studies in multiple sclerosis and other neurological disorders. **Bull NY Acad. Med.** 1952;28:462.

Nelson RB, Siman R. Thrombin and its inhibitors regulate morphological and biochemical differentiation of astrocytes in vitro. **Brain Res. Dev. Brain Res.** 1990 Jun 1;54(1):93-104.

Neu IS, Prosiegel M, Pfaffenrath V. Platelet aggregation and multiple sclerosis. **Acta Neurol. Scandinav.** 1982;66:497-504.

Noseworthy JH. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. **Nat.** 1999;399:suppl:A40-A47.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinhenker BG. Multiple Sclerosis. **N. Engl. J. Med.** 2000 Sep 28;343(13):938-52.

Oelschläger C, Leithäuser B, Römisch J, Tillmanns H, Hölschermann H. Antithrombina inhibits NF-kB signaling pathways in monocytes and endothelial cells in vitro (Abstract). **Ann. Hematol.** 2001, 80(suppl 1):A51.

Okagima K, Uchiba M. The anti-inflammatory properties of antithrombin III: new therapeutic implications. **Semin. Thromb. Hemost.** 1998;24:27-32.

Olson JK, Croxford JL, Calenoff MA, Dal Canto MC, Miller SD. A virus-induced molecular mimicry model of Multiple sclerosis. **J. Clin. Invest.** 2001 Jul;Vol 108(2):311-8.

Olson ST, Srinivasan KR, Björk I, Shore JD. Binding of High Affinity Heparin to Antithrombin III. **J. Biol. Chem.** 1981; Vol. 256, No. 21, Nov 10, pp.11073-9.

Opal Sm. Therapeutic rationale for antithrombin III in sepsis. **Crit. Care Med.** 2000 Sep;28(9 Suppl):S34-7.Review.

Opal SM, Esmon CT. Bench-to-bedside review:Functional relationship between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. **Clin. Care** 2003, 7:23-38.

Ozawa K, Suchanek G, Breitchopf H, et al. Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. **Brain** 1994;117;1311-22.

Papais-Alvarenga RM, Alves-Leon SV, Miranda Santos OM, et al. South Atlantic Project: A Brazilian Multiple Sclerosis trial. In: Arriagada RC, Nogales-Gaete J, eds. Esclerosis Multiple – Una Mirada Ibero Pan Americana. Santiago Chile: **Arrynog Ediciones**, 2002:35-45.

Paternoster DM, Fantino S, Milani M, Nicolini U, Girolani A. Efficacy of AT in pré-eclâmpsia: a case-control prospective trial. **Thromb. Haemost.** 2004 Feb;91(2):28309.

Paterson PY, Koh C-S, Kwaan HC. Role of the clotting system in the pathogenesis of neuroimmunologic disease. **Fed. Procc.** 1987 Jan; Vol 46,No 1:91-6.

Pete M, Fujita K, Wilkinson D. Myelin autoreactivity in multiple sclerosis : recognition of myelin basic protein in the context of HLADr2 products by T lymphocytes of multiple sclerosis patients and healthy donors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1990; 87:7968-72

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Pillipi M, Kappos L, Lublin FD et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis:2005 revisions to the “McDonald Criteria. **Ann. Neurol.** 2005 Nov 10;(Epub ahead of print).

Poser CM, Ritter G, Bauer HJ et al. HLA-antigens and the prognosis of multiple sclerosis. **J. Neurol.** 1981; 225: 219-21.

Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research proposals. **Ann. Neurol.** 1983;13:227-31.

Poser CM, Brinar VV. Diagnostic criteria for multiple sclerosis. **Clin. Neurol. Neurosurg.** 2001 Apr;103(1):1-11.

Poser CM, Brinar VV. The nature of multiple sclerosis. **Clin. Neurol. Neurosurg.** 2004 Jun;106(3):159-71.

Poser MC, Brinar VV. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: an historical review. **Clin. Neurol. Neurosurg.** 2004 106:147-58

Poser CM. The multiple sclerosis trait and the development of multiple sclerosis: Genetic vulnerability and environmental effect. **Clin. Neurol. Neurosurg.** 2006 Mar;108(3):227-33 (Epub 2006 Jan 6).

Pratt, C.W; Church FC. Anthitrombin: Struture and Function. **Semin. Hematol.** 1991 Jan;28(1):3-9.

Prochownik EV, Markham AF, Orkin SH. Isolation of a cDNA clone for human antithrombin III. **J. Biol. Chem.** 1983 Jul 10;258(13):8389-94.

Prochownik EV, Bock SC, Orkin SH. Intron Struture of the Human Antithrombin III Gene differs from that of other members of the Serine Protease Inhibitor Superfamily. **J. Biol. Chem.** 1985 Aug 15;260(17):9608-12.

Prosiegel M, Neu I, Mehlber. Encephalitogenic peptide and platelet aggregation in multiple sclerosis.**Acta Neurol. Scand.** 1986;73:141-4.

Quan NA, Herkenham M . Connecting cytokines and brain: a review of current issues. **Hist. Histopathol.** 2002;17:273-88.

Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstoch JC, Pike RN. Antithrombin: in control of coagulation. **J. Biochem. Cell Biol.** 2004 Mar;36(3):386-9.

Rapraeger,A.C. The coordinated regulation of heparan sulfate,syndecans and cell behavior. **Curr. Opin. Cell Biol.** 1993;5:844-53;

Rapraeger AC. Syndecan-regulated receptor signaling. **J. Cell Biol.** 2000 May 29, Vol 149, No. 5: 995-7.

Rauch U, Nemerson Y: Circulating tissue factor and thrombosis. **Semin. Thromb. Haemost.** 2000;26:379-84.

Reinhard E, Suidan HS, Pavlik A, Monard D. Glia-derived nexin/protease nexin-1 is expressed by a subset of neurons in the rat brain. **J. Neurosci. Res.** 1994 Feb 1;37(2):256-70.

Rindefleisch E. Histologisches detail zu der grauen degeneration Von gehirn und ruckenmark. **Arch. Pathol. Anat. Physiol.** 1863;26:474-8. Apud Adams et al, 2004.

Risberg B: Antithrombin: facts and new hypothesis. **Blood Coagul. and Fibrinol.** 1998 Nov;9 Suppl 3;S3-6.

Roberts HR, Monroe DM, Escobar MA. Current concepts of Hemostasis. **Anest.** 2004;100:722-30.

Roemish J, Gray E, Hoffmann JN, Wiedermann CJ. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. **Blood Coagul. Fibrinol.** 2002; 13:675-670.

Roit I, Brostoff J, Male D. Introdução ao Sistema Imune. Cap 1. **Imunol.** 1999;5ªEd.(Edit Manole S.Paulo.Br): 61-9.

Rosemberg RD; Damus PS. The Purification and Mechanism of Action of Human Antithrombin-Heparin Cofactor. **J. Biol. Chem.** 1973 Sep 25;248(18):6490-505.

Sanchez-Martin B, Grasa JM, Latorre A, Montanes MA, Garcia-Erce JA, et al. Acquired and inherited hypercoagulability among patients with cerebral venous thrombosis. **Neurol.** 2002 Oct;17(8):405-9.

Schenone M, Furie BC, Furie B. The blood coagulation cascade. **Curr. Opin. Hematol.** 2004 Jul;11(4):272-7.

Schumacher G, Beebe G, Kibler R, Kurland L, Kurtzke JP et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. **Ann. NY Acad. Sci.** 1965;122-52.

Sendem NH, Jeunhomme TM, Heemskerk JW, Wagenvoort R, van't Veer C, et al. Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. **J. Immunol.** 1998;161:4318-24.

Silverman GA, Bird PI, Carrell R, Church FC, Coughlin PB, Gettins PGW, Irving JÁ, et al. The Serpins are expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. **J. Biol. Chem.** 2001 Sept 7;276(36):33293-6.

Simon B. Blood coagulation in disseminated sclerosis and other diseases of brain stem and cord. **Arch. Neur. Psych.** 1942;42:509.

Sindern E. Role of chemokines and their receptors in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Front. Biosci.** 2004 Jan 1;9:457-63.

Smith JW, Knauer DJ. A heparin binding site in antithrombin III. Identification, purification and amino acid sequence. **J. Biol. Chem.** 1987;262:11964-72.

Souter PJ, Thomas S, Hubbard AR, Poole S, Römish J, Gray E: Antithrombin inhibits lipopolysaccharide-induced tissue factor and interleukin-6 production by mononuclear cells, human umbilical vein endothelial cells, and whole blood. **Crit. Care Med.** 2001; 29:134-9.

Stadelman C, Brück W. Inflammation and degeneration in multiple sclerosis. **Neurol. Sci.** 2003; 24:S265-S267.

Streit WJ . Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. **Glia** 2002, 40:133-9.

Strukova SM. Thrombin as a Regulator in Inflammation and Reparative Processes in Tissues. **Biochem.** 2001 (Moscow):66(1):8-18.

Stubbs MT, Bode W. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. **Thromb. Res.** 1993;9:1-58.

Tadamich S, Nishihira, Watanabe H, Riichiro A, Honda A. Macrophage Migration Inhibitory factor is induced by Thrombin and factor Xa in Endothelial Cells. **J. Biol. Chem.** 2004 Apr 2;279(14):13729-73.

Tait RC, Walker ID, Perry DJ, Islam SI, Daly ME, MacCall F, Conkie JÁ, Carrell RW: Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. **Br. J. Haematol.** 1994 May;97(1):106-12.

ten Cate JW, van der Poll, Levi M, ten Cate H, Van Deventer SJH. Cytokines: triggers of clinical thrombotic diseases. **Thromb. Haemost.** 1997; 78:415-9.

Teunissen C, Dijkstra C, Polman C. Biological markers in CFS and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. **Lancet Neurol.** 2005;32-41.

Theil DJ, Tsunoda I, Rodriguez F, Whitton JL, Fujinami RS. Viruses can silently prime for and trigger central nervous system autoimmune disease. **J. Neurovirol.** 2001 Jun;7(3)220-7.

Tintoré M, Rovira A, Rio J, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: application in first demyelinating episode. **Neurol.** 2003;60:27-30.

Uccelli A, Pedemonte E, Narciso E, Macardi G. Biological markers of inflammatory phase of multiple sclerosis. **Neurol. Sci.** 2003 Dec 24; Suppl 5:S271-4.

Uchiba M, Okagima K, Murakami K, Okabe H, Takatsuki K. Attenuation of endotoxin-induced pulmonary vascular injury by antithrombin III. **Am. J. Physiol.** 1996;270:L921-30.

Villanueva G, Danishefsky I. Conformational changes accompanying the binding of antithrombin III to thrombin. **Biochem.** 1979;18:810-8.

Vincent JL. Infection/inflammation and hemostasis. **Curr. Hematol. Rep.** 2003 Sep;2(5):407-10.

Wang H, Reiser G. Thrombin signaling in the brain: the role of protease-activated receptors. **Biol. Chem.** 2003;384:193-20.

Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, Chalupa P, Atherstone A, Penzes I, Kubler A, Knaub S, Opal SM. Caring for the critically ill patients. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized trial. **J.A.M.A.** 2001;286:1869-78.

Wasley LC, Atha DH, Bauer KA, Kaufman. Expression and characterization of human antithrombin III synthesized in mammalian cells. **J. Biol. Chem.** Oct 1987;262(30):14766-72.

Webster NR: Inflammation and coagulation system. **Br. J. Anaesth.** 2002 Aug;89(2);216-20.

Weinsheker BG, Santrach P, Bissonet AS et al. Major histocompatibility complex class II alleles and the course and outcome of MS: a population-base study. **Neurol.** 1988;51;742-7

Weinshenker BG, The natural history of multiple sclerosis. **Neurol. Clin.** 1995 Feb;13(1) :119-45.

Weitz J. A novel approach to thrombin inhibition. **Thromb. Res.** 2003;109:S17-22.

Wiedermann CJ, Romish J. The anti-inflammatory actions of antithrombin – a Review. **Act. Med. Aust.** 2002 July;29:3:89-97.

Wiederman CJ. Improvement in coagulation markers with antithrombin-beneficial in severe sepsis? **Crit. Care Med.** 2004 Sep;32(9):1891-9.

Willenborg DO, Prowse SJ. Immunoglobulin-deficient rats fail to develop experimental allergic encephalomyelitis. **J. Neuroimmunol.** 1983;5:99-109.

Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple sclerosis: current pathological concepts. **Lab. Invest.** 2001 Mar;81(3):263-81.

Winn RK, Harlan JM: The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases. **J. Thromb. Haemost.** 2005;3:1815-24.

Yamashiro K, Kiryu J, Tsujikawa A, Honjo M, Nonaka A, Miyamoto K. Inhibitory effects of antithrombin III against leucocyte rolling and infiltration during endotoxin-induced uveitis in rats. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 2001;42: 1553-60.

Yamashita Y, Oritani K, Miyoshi EK, Wall R, Kincade PW: Syndecan-4 is expressed by B lineage lymphocytes and can transmit a signal for formation of dendritic process. **J. Immunol.** 1999 May 15;162(10):5940-8.

Yamauchi T, Umeda F, Inoguchi T, Nawata H. Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1989 Sep 29;163(3):1404-11.

YentüEr SP, Akman-Demir G, Eraksoy M, Saruhan-Direskene GI, Autoreactivity to myelin antigens related to HLA associations with multiple sclerosis. **Mult. Scler.** .2002;8: 278-83.

Zaffaroni M. Biological indicators of neurodegenerative phase of multiple sclerosis. **Neurol. Sci.** 2003 Dec;24 suppl 5:S279-82.

Zuo XJ, Nicolaidou E, Okada Y, Toyida M, Jordan SC. Antithrombin III inhibits lymphocytes proliferation, immunoglobulin production and mRNA expression of lymphocyte growth factors (IL-2, γ -INF and IL-4. **Transp. Immunol.** 2001;9:1-6.

10. ANEXO 1

Escala Expandida de Estado de Incapacidade de Kurtzke (1996) (EDSS)	
Grau	Estado
0.0	Exame neurológico normal (todos grau 0 em Sistemas Funcionais [SF]; Grau cerebral 1 aceitável).
1.0	Nenhuma <u>Incapacidade</u> , <u>sinais</u> mínimos em um SF (ou seja, grau 1 excluindo Grau cerebral 1).
1.5	Nenhuma <u>Incapacidade</u> , <u>sinais</u> mínimos em mais de um SF (mais de um grau 1 excluindo grau Cerebral 1).
2	<u>Incapacidade</u> mínima em um SF (um SF, grau 2, outros 0 ou 1).
2.5	<u>Incapacidade</u> mínima em dois SF (dois SF grau 2, outros 0 ou 1).
3	<u>Incapacidade</u> moderada em um SF (um SF grau 3, outros 0 ou 1), ou <u>Incapacidade</u> leve em três ou quatro SF (três/quatro SF grau 2, outros 0 ou 1) embora totalmente ambulatoriais.
3.5	Totalmente ambulatorial porém com <u>incapacidade</u> moderada em um SF (um grau 3) e um ou dois SF grau 2; ou dois SF grau 3; ou cinco SF grau 2 (outros 0 ou 1).
4	Totalmente ambulatorial sem ajuda, auto-suficiente, de pé e aproximadamente 12 horas por dia apesar da Incapacidade relativamente grave, consistindo de um SF grau 4 (outros 0 ou 1), ou combinações de graus menores excedendo limites dos níveis anteriores. Capaz de andar sem ajuda ou sem descanso aproximadamente 500 metros.
4.5	Totalmente ambulatorial sem ajuda, de pé e aproximadamente maior parte do dia, capaz de trabalhar um dia inteiro, podendo por outro lado ter alguma limitação de atividade total ou requerer assistência mínima; caracterizado por Incapacidade relativamente grave; normalmente consistindo de um SF grau 4 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores excedendo limite dos níveis anteriores. Capaz de andar sem ajuda ou sem descanso por aproximadamente 300 metros.
5	Ambulatorial sem ajuda ou descanso para aproximadamente 200 metros; <u>Incapacidade</u> grave suficiente para diminuir todas as atividades diárias (ou seja, trabalhar todo o dia sem provisões especiais). (Os SFs normalmente equivalentes são um grau 5 sozinho, outros 0 ou 1; ou combinações de graus menores normalmente excedem as especificações para nível 4.0).
5.5	Ambulatorial sem ajuda ou descanso para aproximadamente 100 metros; <u>Incapacidade</u> grave suficiente para impedir todas as atividades diárias. (Os SFs normalmente equivalentes são

	um grau 5 sozinho, outros 0 ou 1; ou combinações de graus menores, normalmente excedendo aqueles para o nível 4.0).
6	Assistência constante intermitente ou unilateral (bengala, muleta ou suporte) obrigado a andar aproximadamente 100 metros com ou sem descanso. (Os SFs normalmente equivalentes são combinados com mais de dois SFs grau 3+).
6.5	Assistência bilateral constante (bengala, muleta ou suporte) obrigado a andar aproximadamente 20 metros sem descanso. (Os SFs normalmente equivalentes são combinados com mais de dois SF grau 3+).
7	Incapaz de andar além de 5 metros mesmo com ajuda, essencialmente restrito a cadeira de rodas; se locomove sozinho na cadeira de rodas padrão e se transfere sozinho; de pé e aproximadamente na cadeira de rodas por 12 horas ao dia. (Os SFs normalmente equivalentes são combinações com mais de um SF grau 4+; muito raramente, grau piramidal 5 sozinho).
7.5	Incapaz de dar mais que alguns passos; restrito a cadeira de rodas; pode requerer ajuda para transferir-se; locomove-se sozinho, porém não consegue se manter na cadeira de rodas padrão o dia todo; pode requerer uma cadeira de rodas motorizada. (Os SFs normalmente equivalentes são combinações com mais de um SF grau 4+).
8	Essencialmente restrito a cama ou cadeira ou conduzido em cadeira de rodas, podendo estar fora da cama maior parte do dia, preserva muita das funções de cuidados pessoais; normalmente possui uso eficiente dos braços. (Os SFs normalmente equivalentes são combinações, geralmente grau 4+ em diversos sistemas).
8.5	Essencialmente restrito a cama maior parte do dia; possui pouco uso efetivo do(s) braço(s); preserva muita das funções de cuidados pessoais. (Os SFs normalmente equivalentes são combinações, geralmente grau 4+ em diversos sistemas).
9	Paciente de cama impotente; pode comunicar-se e alimentar-se. (Os SFs normalmente equivalentes são combinações, maior parte grau 4+).
9.5	Paciente de cama totalmente impotente, incapaz de se comunicar efetivamente ou comer/engolir. (Os SFs normalmente equivalentes são combinações, na sua maioria todas grau 4+).
10	Morte devido à EM

11. ANEXO 2

Características demográficas, clínicas e os níveis de atividade plasmática de AT dos pacientes portadores de esclerose múltipla surto-remissiva, secundária progressiva e controle								
Ordem ¹	Grupo ²	Sexo ³	Idade ⁴	T.doença ⁵	Ativ. Dça ⁶	Med ⁷	EDSS ⁸	AT ⁹
1	1	1	44	2	0	1	0,0	107
2	1	2	28	1	0	1	1,0	105
3	1	2	27	0	1	1	0,0	103
4	1	1	32	0	0	1	1,0	100
5	1	1	18	1	1	1	3,0	106
6	1	1	42	0	0	1	1,0	103
7	1	2	28	0	0	1	0,0	72
8	1	2	31	1	0	1	0,0	104
9	1	2	52	1	0	1	4,0	90
10	1	2	59	0	0	1	4,0	85
11	1	2	35	0	0	0	0,0	125
12	1	2	45	0	0	1	2,0	119
13	1	2	49	0	1	1	2,5	106
14	1	2	27	0	0	0	0,0	100
15	1	2	48	1	0	0	2,5	112
16	1	2	33	0	0	1	2,0	95
17	1	2	33	1	0	0	0,0	98
18	1	2	21	0	0	0	0,0	110
19	1	2	47	1	0	0	0,0	115
20	1	2	39	1	0	0	2,0	130
21	1	2	54	1	0	1	0,0	106
22	1	2	26	0	0	0	0,0	104
23	1	2	23	0	0	1	0,0	105
24	1	2	33	1	1	1	1,0	120
25	1	2	47	0	0	0	0,0	89
26	1	2	21	0	1	0	1,0	82
27	1	2	27	0	1	1	3,0	85
28	1	2	22	0	0	1	0,0	104
29	1	2	24	0	0	0	3,0	147
30	1	1	38	0	0	0	1,0	121
31	1	1	24	0	0	1	1,0	123
32	1	2	42	1	0	1	4,0	140
33	1	2	40	0	0	0	2,0	87
34	1	2	32	1	1	1	1,0	115
35	1	2	48	0	0	1	4,0	111
36	1	2	31	0	1	1	0,0	134
37	2	1	44	0	0	1	3,0	107
38	2	2	39	1	0	1	7,5	136
39	2	1	35	0	0	1	5,0	86
40	2	2	37	0	0	1	6,5	135
41	2	2	52	1	0	0	7,5	25
42	2	2	56	1	0	1	8,0	140
43	2	2	40	0	0	1	4,5	115
44	2	1	42	1	0	1	7,0	116
45	2	1	55	1	0	0	8,0	112
46	2	1	42	0	0	1	6,5	121

Características demográficas, clínicas e os níveis de atividade plasmática de AT dos pacientes portadores de esclerose múltipla surto-remissiva, secundária progressiva e controle

Ordem¹	Grupo²	Sexo³	Idade⁴	T.doença⁵	Ativ. Dça⁶	Med⁷	EDSS⁸	AT⁹
47	2	2	24	0	1	1	7,5	124
48	2	1	48	0	0	1	4,0	108
49	2	1	54	0	0	1	5,5	93
50	2	2	62	0	0	1	5,0	104
51	2	2	57	1	0	1	6,5	113
52	2	2	44	1	0	1	5,5	131
53	2	1	39	1	0	1	6,5	121
54	2	1	40	1	0	0	8,0	105
55	2	2	52	1	0	1	5,5	106
56	2	2	55	1	0	1	6,5	103
57	2	2	40	0	1	1	3,0	87
58	2	2	46	1	0	1	8,0	132
59	2	2	47	1	1	1	7,5	122
60	2	2	60	1	0	0	7,5	122
61	2	2	52	1	0	1	7,5	105
62	2	1	44	0	1	1	4,0	120
63	2	2	42	0	0	1	3,5	117
64	2	2	44	1	0	1	5,0	123
65	2	2	50	0	1	0	6,0	115
66	2	2	43	0	0	1	6,0	111
67	2	2	63	1	0	1	6,0	114
68	2	1	45	0	1	1	4,0	120
69	2	2	56	1	1	1	6,0	121
70	3	2	51					147
71	3	2	22					95
72	3	2	24					121
73	3	2	22					110
74	3	1	39					142
75	3	2	45					116
76	3	2	54					96
77	3	2	31					128
78	3	2	54					126
79	3	2	36					120
80	3	2	21					89
81	3	1	52					122
82	3	2	37					106
83	3	1	21					114
84	3	2	38					62
85	3	2	54					152
86	3	1	33					152
87	3	2	54					84
88	3	2	28					106
89	3	2	40					88
90	3	2	32					148
91	3	1	65					115
92	3	1	21					123
93	3	1	60					62
94	3	2	57					112

Características demográficas, clínicas e os níveis de atividade plasmática de AT dos pacientes portadores de esclerose múltipla surto-remissiva, secundária progressiva e controle

Ordem ¹	Grupo ²	Sexo ³	Idade ⁴	T.doença ⁵	Ativ. Dça ⁶	Med ⁷	EDSS ⁸	AT ⁹
95	3	1	48					85
96	3	2	52					103
97	3	1	29					90
98	3	1	59					106
99	3	1	42					108
100	3	1	56					109
101	3	1	51					96
102	3	2	50					108
103	3	2	26					86

¹Ordem = número de ordem dos pacientes e controles na pesquisa

²Grupo = grupo do paciente e controle na pesquisa; 1 = EMSR; 2 = EMSP; 3 = Grupo controle

³Sexo: Masculino = 1; Feminino = 2

⁴Idade em anos

⁵T.doença = Tempo de doença: ≤ 2 anos = 0; ≥ 2,5 a 5 anos = 1; ≥ 5,5 a 9,5 anos = 2; ≥ 10 anos = 3.

⁶Ativ. Dça = Atividade de doença: em remissão = 0; em surto = 1

⁷Med = medicamento: sem uso = 0; em uso = 1

⁸EDSS = escala expandida do estado de incapacidade de Kurtzke (Kurtzke,1996) = valores de 0 a 10)

⁹AT = nível da atividade plasmática da AT em %.

12. ANEXO 3

Classificação de Gell-Coombs das reações de hipersensibilidade: mecanismos imunopatológicos e correlações clínicas (Gell & Coombs, 1996)

Tipo de hipersensibilidade	Anticorpos e/ou tipos celulares	Paradigmas clínicos associados
Tipo 1	IgE, mastócitos e basófilos	Anafilaxia, asma, urticária
Tipo 2	IgG, IgM, complemento	Anemia hemolítica autoimune, trombocitopenia autoimune
Tipo 3	IgG, IgM, complemento, leucócitos polimorfonucleares, macrófagos	Doenças do tecido conjuntivo autoimunes, glomerulonefrites, alveolitis alérgica extrínseca, doença do soro
Tipo 4	Células T e macrófagos	Infecção bacteriana ou viral com formação de granuloma

IgG = imunoglobulina G; IgM = imunoglobulina M

13. ANEXO 4

Termo de consentimento livre e esclarecido

Durante esta consulta você terá oportunidade de participar de uma pesquisa onde serão estudados pacientes portadores de Esclerose Múltipla e pessoas saudáveis para avaliação da atividade no sangue de uma proteína chamada antitrombina. Esta proteína tem atividades como anticoagulante e antiinflamatória. O objetivo do estudo é avaliar se este anticoagulante está associado com a evolução clínica da esclerose múltipla, já que esta é uma doença com características inflamatórias.

Sua participação é **VOLUNTÁRIA**, isto é, a sua decisão de participar ou não do estudo, ou abandoná-lo sem comunicação e em qualquer tempo não irá afetar de forma alguma a sua assistência médica neste ou em outro hospital. Em nenhum momento haverá interferência por nossa parte com o tratamento proposto pelo seu médico, e o resultado do exame estará disponível para os dois.

Para isso você terá comigo uma consulta no Hospital Gaffrée e Guinle no setor de Hematologia para avaliação clínica (no caso de ser uma pessoa saudável) e no Serviço de Neurologia do Hospital onde você se trata (no caso de ser portador de esclerose múltipla), devendo para isso ser encaminhado pelo seu neurologista. Se você for selecionado para inclusão nos grupos de pesquisa, será colhido 4 ml de sangue para a dosagem da antitrombina.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa ou o direito do paciente, poderá ser informado por contato através o telefone (021) 25691620, ramal 263, com a médica **Marilza Campos de Magalhães**.

Consentimento do Paciente:

1. Li com atenção o texto sobre informação do paciente”.
2. Conversei com a Dra. Marilza Campos de Magalhães
3. Tive oportunidade de fazer perguntas e discutir a pesquisa.
4. Compreendi corretamente as respostas às minhas perguntas feitas ao médico.
5. Entendi que tenho o direito de NÃO participar da pesquisa ao abandoná-lo sem apresentar motivo, sem perder nenhum dos benefícios que teria de outra forma.
6. Entendo que minhas informações pessoais podem ser revistas por pessoas devidamente autorizadas para condução da pesquisa, porém que serão estritamente **CONFIDENCIAIS** e, de forma alguma poderão tornar-se públicas.
7. **ACEITO** participar desta pesquisa acordado com o meu médico, por livre e espontânea vontade.

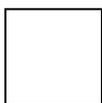
Paciente: _____ Matrícula _____

Assinatura do Paciente _____ Identidade _____

Assinatura e carimbo do médico _____ data _____

14. ANEXO 5

Folha de Coleta de Dados



Nº na pesquisa: _____ Grupo () EMRS () EMSP () controle

Data: _____

Nome: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Hospital () HUGG () Lagoa () Fundação Registro Hospitalar _____

Médico que encaminhou _____

Sexo () FEM () MASC

Idade _____

Data de início dos sintomas (ano) _____ Data do diagnóstico (Ano) _____

EDSS (escala de 0 a 10) _____ Médico _____

Uso de Medicamento:

Para EM () SIM () NÃO Qual? _____

Outros: _____

Situação clínica contempla os critérios de inclusão? () SIM () NÃO

Situação clínica contempla os critérios de exclusão? () SIM () NÃO

Situação clínica neurológica: () em surto () em remissão

Dosagem de Antitrombina:

15. ANEXO 6



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFREE E GUINLE

MEMO CEP / Nº 15 / 2005

Rio de Janeiro, 14 de março de 2005

Ilmo
Profª. Marilza Campos Magalhães
Disciplina de Clínica Médica

Conforme determinação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital
Universitário Gaffree e Guinle, em sua reunião de março de 2005, o projeto "**Antitrombina
III na esclerose múltipla: seu valor preditivo na evolução clínica**" foi aprovado
segundo a Resolução 196/96, devendo apresentar relatórios semestrais.

Atenciosamente


Marcus Vasconcellos
Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa do HUGG

*Recebido
14/03/05*

c/c Arquivo da CEP
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

16. ANEXO 7

Items Covered by Grant of Permission



The Publishing Division
of the Massachusetts Medical Society
Department of Permissions & Licensing
 860 Winter Street, Woburn, Massachusetts 02451-1413 USA
 Telephone (781) 434-7382 fax: (781) 434-7633

MMS Reference Number: PS - 2006 - 2973
 MMS Invoice Number: RY - 2006 - 2973

Source Information							Further Conditions				
Source: The New England Journal of Medicine							Format	Language	Adapted	Dollar Amount	Customer Reference
Volume	Pages	Pub. Date	Author(s)	Article Title	Type	Item					
343	938- 952	09/28/2000	Nonesworthy, Lucchinetti, Rodriguez, Weinshenker	Medical Progress: Multiple Sclerosis	F	F2	Print & Electronic	Portuguese	N	0.00	

The following information has been provided for us in your letter of request.

End Use: dissertation of the Masters Degree Course
User: students and researchers of the Masters Degree Course
Sponsor:
Date of Use: April 2006
Number of Copies:



The Publishing Division
of the Massachusetts Medical Society

Publishers of
*The New England Journal of Medicine, Journal Watch Newsletters,
& AIDS Clinical Care*

MMS Reference Number: PS - 2006 - 2973
MMS Invoice Number: RY - 2006 - 2973

Grant of Permission

March 13, 2006

HUGG
Dr. Marilza Campos de Magalhaes
General Medicine
Mariz e Barros 775 Tijuca
Rio de Janeiro RJ 20270004
Brazil

Dear Dr. Campos de Magalhaes,

Thank you for your interest in our copyrighted material, and for requesting permission for its use.

Permission is granted for limited, non-exclusive educational use of the material requested, subject to all the terms and conditions outlined throughout this document. Please review all of the following pages, including the "Basic Provisions of Grant of Permission" as well as "Items Covered by Grant of Permission." A Permissions Invoice is included as the last page, if applicable.

Thank you for your patience while your request was being processed. If you wish to contact us further, please use the address below, and cite our reference numbers on any correspondence.

Sincerely,

Jennifer Moran

A handwritten signature in cursive script that reads "Jennifer A. Moran".

Sr. Rights & Permissions Representative

Page 1

Publishing Division of the Massachusetts Medical Society
Department of Permissions & Licensing
860 Winter Street, Waltham, Massachusetts 02451-1413 USA
Tel: (781) 434 7382 · Fax: (781) 434 7633 · permissions@nejm.org

