

Lucilene Rossilho Mangerona

Trombofilias e Abortos Recorrentes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica, Curso de Mestrado Profissionalizante, da Divisão Hemocentro da Faculdade de Medicina da UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Prof^a Dr^a Izolete Aparecida Thomazini Santos

Orientadora

Botucatu – SP

2007

À Deus,

*Presença constante em minha vida,
Que incomparável e inconfundível em seu amor,
Deu-me a necessária coragem, nos momentos mais difíceis,
Para fazer este mestrado, vencendo desafios e almejando
Conquistas...*

Aos meus amados pais Erasmo e Angelina,

*Que com sabedoria e muito amor,
souberam me educar, fazendo-me compreender
os valores do estudo e do saber para a vida, não mediram
esforços ao me proporcionarem uma formação sólida,
fundamental para minhas realizações pessoais e profissionais.
Por fazer-me acreditar ser capaz de vencer mais esta etapa de
minha vida...*

*Aos meus irmãos **Lucinéia e Erasmo Júnior**,*

Pelo incentivo, carinho e palavras de conforto nos momentos importantes da minha vida.

A orientadora desta dissertação,

Profa. Dra. Izolete Aparecida Thomazini Santos

*Pela orientação precisa, pela bondade e afetividade, pelos
inúmeros momentos de conforto, apoio e estímulo,*

*Pela confiança que sempre imprimiu às nossas discussões,
Por ter-me viabilizado escolher os meus próprios caminhos e
neles ter trilhado comigo de mãos dadas.*

Muito Obrigada

A Prof^a.Dr^a. Ana Glória Pontes

*Pelo exemplo de força e determinação na busca de um ideal,
Mostrando ser possível, vencer as dificuldades com trabalho e
dedicação. Por ter-me incentivado em muitos momentos quando me
encontrava insegura ...*

*Ao Prof.Dr. António Fabron Júnior, Diretor Técnico do Hemocentro
da Faculdade de Medicina de Marília*

*As nossas vitórias só são possíveis porque existem pessoas que como
você, acreditam-nos capazes de transformar dificuldades em
conquistas e preocupações em realizações.*

*Obrigada pela oportunidade e pelo incentivo da realização de mais
esta etapa ...*

A amiga e Profª Drª Roseli Nunes da Silveira Antunes,

Pelo carinho, amizade e incentivo constante.

Às pacientes, que buscam a felicidade.

Que Deus as acompanhe em suas lutas.

Ao Diretor da Divisão Hemocentro, Dr. José Mauro Zaníní, que permitiu a realização desta pesquisa.

A Profa . Dra. . Maria Inês de Moura Campos Pardini, pela sua dedicação na coordenação deste mestrado.

Ao Prf. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado, coordenador técnico-científico da Divisão Hemocentro, mentor deste curso.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Médica da Divisão Hemocentro do Hospital das Clínicas de Botucatu, pelos ensinamentos transmitidos .

A todos os funcionários do Laboratório de Hemostasia da Divisão Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Iracema Carvalho Ferrari, Delani Mercedes M. Gonçalves, Valter José Cassinelli, que sempre contribuíram gentilmente, para que este estudo fosse concluído.

Aos funcionários do SAME, pelo fornecimento dos prontuários médicos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Regina Célia Spadín, Lillian Cristina Nadal, Nathanael Pinheiro Salles, Janete Aparecida H. Nunes Silva e Andréa Paula Deridé.

As bibliotecárias, Rosemeire Aparecida Vicente pela revisão das referências bibliográficas e Selma Maria de Jesus pela confecção da ficha catalográfica .

Aos amigos Illymac e José Henrique Vallim, pela convivência carinhosa que juntos desfrutamos neste período.

A Adriana Camargo Ferrasí, doutoranda do Laboratório de Biologia Molecular da Divisão Hemocentro , pela colaboração na realização dos procedimentos de Biologia Molecular desta Pesquisa.

A perda gestacional recorrente idiopática é multifatorial, pois envolve fatores de risco clínicos e biológicos. A trombofilia pode ser definida como uma predisposição para trombose. Anormalidades na hemostasia que estão associadas com trombofilias clínicas incluem defeitos hereditários, tais como os anticoagulantes naturais Antitrombina III, Proteína S e Proteína C ou fatores de coagulação, as mutações do fator V Leiden, gene da protrombina G20210A, metilenotetrahidrofolato redutase MTHFR C677T, e defeitos adquiridos, tal como Síndrome Antifosfolípide e a Hiperhomocisteinemia. O presente trabalho foi realizado com 70 mulheres, sendo que 35 mulheres apresentavam 3 ou mais abortos recorrentes inexplicáveis, e 35 mulheres voluntárias clinicamente normais, para todas as mulheres foram feitas as investigações para os anticoagulantes naturais da coagulação e investigação para as mutações do fator V Leiden, gene da protrombina G20210A e metilenotetrahidrofolato redutase MTHFR C677T e as deficiências adquiridas. Em nosso estudo, encontramos resultados estatisticamente significantes para a síndrome do anticorpo antifosfolípide (trombofilia adquirida). Em nosso estudo observamos um grande número de defeitos trombofílicos adquiridos sendo que alguns estão em associação com a mutação do fator V Leiden e MTHFR C677T, porém mais pesquisas são necessárias para confirmar ou contestar as causas das trombofilias, e avaliar a eficiência e segurança da trombopprofilaxia em mulheres grávidas.

Palavras Chave: Abortos Recorrentes, Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide, Trombofilia.

The idiopathic appealing gestational loss is multifactorial because it involves clinical and biological risk factors. Thrombophilia can be defined as a predisposition for thrombosis. Abnormalities in homeostasis that are associated with clinical thrombophilia include hereditary defects, such as natural anticoagulants as Antithrombin III, S Protein and C Protein or coagulation factors, mutations of V Leiden factor, gene of G20210A prothrombin, MTHFR C677T methylene reductase tetrahydrofolate, and acquired defects just as Antiphospholipid Syndrome and Hyperhomocysteinemia. The present work was accomplished with 70 women, and 35 women showed 3 or more inexplicable appealing abortions, and 35 women voluntary clinically normal. For all women were made investigations for natural anticoagulants of coagulation and investigations for mutations of V Leiden factor, gene of G20210A prothrombin, MTHFR C677T methylene reductase tetrahydrofolate, and acquired defects. In study we found statistically significant results for antiphospholipid antibody syndrome (acquired thrombophilia). In our study it was observed a great number of thrombophilics acquired defects, and some of them are associated to mutation of V Leiden factor and MTHFR C677T, however more researches are necessary to confirm or to answer the causes of the thrombophilia and to evaluate the efficiency and safety of the thromboprophylaxis in pregnant women.

Wordkey: Recurrent pregnancy, antiphospholipid syndrome, thrombophilia.

Figura 1 – Representação Esquemática do Local de Ação dos aPL na Via Comum da Cascata de Coagulação.....	37
---	----

Figura 2 – Esquema representativo da atividade da proteína C e local de ação dos aPLs	38
--	----

Figura 3 – Local de ação do anticorpo antiprotrombina e anticardiolipina na Cascata de Coagulação (GALLI & BARBUI, 1999, modificado).....	41
--	----

Tabela 1- Interpretação dos valores dos anticorpos anticardiolipina IgG (aCL IgG) e anticardiolipina IgM (aCL IgM), segundo padronização do fabricante (INOVA <i>diagnostics</i> Inc., CA. USA)	60
Tabela 2 – Combinação do Viperquik® LA – Test e do Viperquik® LA – Chek da paciente e da mistura (PP+PN).....	63
Tabela 3 - Distribuição das pacientes com abortamento habitual segundo o número de abortamentos.....	69
Tabela 4- Comparação da idade das pacientes do grupo de estudo com relação ao trimestre de perda gestacional.....	70
Tabela 5 – Característica das pacientes com presença ou ausência de trombofilia (hereditária ou adquirida) no grupo de estudo.....	71
Tabela 6 – Característica das mulheres com presença ou ausência de trombofilia (hereditária ou adquirida) no grupo controle.....	71
Tabela 7 - Prevalência do Anticorpo anticardiolipina em mulheres dos grupos de estudo e controle.....	72
Tabela 8 – Medidas descritivas das variáveis segundo grupo de estudo e controle.....	73
Tabela 9 – Medidas descritivas das variáveis segundo grupo de estudo e controle.....	74
Tabela 10 - Níveis de concentração dos anticoagulantes naturais em mulheres do grupo de estudo e controle.....	76
Tabela 11 - Níveis de concentração da Homocisteína em mulheres dos grupos de estudo e controle.....	78
Tabela 12- Distribuição do MTHFR C677T nos grupos de estudo e controle.	80

Tabela 13 – Distribuição da Mutação do Fator V Leiden nos grupos de estudo e controle.....	80
Tabela 14 - Distribuição do gene G20210A da Protrombina segundo grupo de estudo e controle.	83
Tabela 15 - Distribuição do gene da mutação do MTHFR e anticorpo anticardiolipina segundo grupo de estudo e controle.....	85
Tabela 16 - Distribuição do gene da mutação do Fator V Leiden e anticorpo anticardiolipina segundo grupo de estudo e controle.....	85
Tabela 17 - Distribuição do gene da mutação da Protrombina e anticorpo anticardiolipina segundo grupo de estudo e controle.....	86

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

%	Percentual
°C	Graus Celsius
aCL	Anticorpo anticardiolipina
aCL IgG	Anticorpo anticardiolipina isotipo IgG
aCL IgM	Anticorpo anticardiolipina isotipo IgM
AL	Anticoagulante lúpico
aPL	Anticorpo antifosfolípide
AT III	Antitrombina III
C677T	Mutação C→T na posição 677
CβS	Cistationina beta sintetase
dRVVT	Tempo de Veneno de Víbora de Russel diluído
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	E outros (as)
FVL	Mutação do Fator V Leiden
G20210A	Mutação G→A na posição 20210
HCY	Homocisteína
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LES	Lupus eritematoso sistêmico
M	Molar
mL	Mililitros
MTHFR	Metileno Tetrahydrofolato Redutase

Nm	nanômetros
OR	<i>odds ratio</i>
PBS	Tampão salina fosfato
PC	Proteína C
PCA	Proteína C Ativada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PN	Plasma Normal
PP	Plasma Paciente
PPP	Plasma Pobre em Plaqueta
PS	Proteína S
RFLP	Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição
RPCA	Resistência da Proteína C Ativada
Rpm	Rotações por minuto
SAF	Síndrome antifosfolípide
TAP	Tempo de Atividade da Protrombina
TP	Tempo de Protrombina
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado
µg	Microgramas

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	28
2 OBJETIVO	45
3 DELINEAMENTO DO ESTUDO	47
4-MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Métodos	50
5 Pacientes e Métodos	53
5.1 Determinação do tamanho amostral	53
5.2 Seleção de pacientes e critérios de inclusão	53
5.3 Estudo dos parâmetros trombofílicos	54
5.4 Métodos	55
5.5 Pesquisa da Antitrombina III	55
5.6 Pesquisa da Proteína C	56
5.7 Dosagem de Proteína S Livre	57
5.8 Pesquisa dos anticorpos anticardiolipina IgG e IGM	59
5.9 Pesquisa do anticorpo anticoagulante lúpico	60
5.9.1 Estudo da Coagulação	61
5.9.2 Tempo de tromboplastina parcial ativado	62
5.9.3 Tempo de protrombina	62
5.9.4 Tempo de Veneno da Víbora de Russel Diluído (dRVVT)	63
5.10 Dosagem de Homocisteína	64
5.11 Pesquisa da Mutação do Fator V Leiden	65
5.12 Pesquisa da Mutação do Gene da Protrombina G20210A	65
5.13 Pesquisa da Mutação do Metilenotetrahidrofolato Redutase MTHFR C677T	65
5.14 Análise Estatística	66
5.14.1 Metodologia Estatística	66
5.15 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	67

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6.1	Avaliação Laboratorial	71
6.2	Mutação do metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR) C677T.....	79
6.3	Mutação do Fator V Leiden	80
6.4	Mutação do gene da protrombina	81
7	ASSOCIAÇÃO DE FATORES TROMBOFÍLICOS HEREDITÁRIOS OU ADQUIRIDOS	84
8	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	91
	ANEXOS	105

1 INTRODUÇÃO

O sucesso da gravidez é dependente do desenvolvimento e conservação da circulação placentária adequada. Anormalidades da vasculatura placentária podem resultar em patologias gestacionais, incluindo abortos espontâneos no primeiro e segundo trimestre, restrição ao crescimento uterino, morte fetal intra-uterina e pré-eclâmpsia (SALAFIA et al.,1995).

A gravidez é um estado de hipercoagulabilidade, que se deve em parte às alterações fisiológicas na coagulação e sistema fibrinolítico e, portanto, tem um potencial para interação com trombofilia adquirida e hereditária. A principal forma de trombofilia hereditária inclui a deficiência de proteínas anticoagulantes endógenas, Antitrombina III, Proteína C e Proteína S, anormalidades dos fatores procoagulantes, particularmente Fator V Leiden. A variante do gene da protrombina, a qual apresenta a substituição de uma guanina por uma adenina na posição 20210 do gene (G20210A) e a presença em homozigose do gene que codifica a metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) que apresenta uma timina em lugar de uma citosina na posição 677 (C677T), a qual em conjunto com a dieta alimentar insuficiente em vitamina B, associa-se com a hiperhomocisteinemia, aumentando assim, o risco de trombose (GREER et al., 2003).

A primeira trombofilia hereditária foi descoberta em 1965 por Egeberg, a deficiência da Antitrombina III e, foi encontrada no estudo de uma família, na qual diversos membros eram afetados por trombose venosa (EGEBERG, 1965; BECK et

al.,1965). É a mais trombogênica de todas as trombofilias hereditárias. Com um risco de tempo de vida 70 – 90% de tromboembolismo (GIRLING, 1998; CAVENAGH, COLVIN, 1996).

A Antitrombina III, é uma glicoproteína, vitamina K independente, um componente de eixo do sistema de anticoagulante natural, agindo como um principal inibidor da trombina e outras serinoproteases (PAIDAS et al., 2004). Quando ligada ao sulfato de heparan presente nas células endoteliais neutraliza os procoagulantes, a trombina, o fator XIa, Xa, IXa (SELIGSOHN et al ., 2001).

A deficiência de Antitrombina III, é uma doença autossômica dominante, é o mais importante inibidor fisiológico da trombina e inibidor dos fatores Xa, IXa, e XIIa (RAO et al.,1997).

Preston et al., (1996), relata que mulheres com deficiência de Antitrombina III apresentam risco aumentado de natimortos (*odds ratio* 5,2, 95% CI 1,5 to 18,1), e uma margem aumentada na taxa de abortos (*odds ratio* 1,7, 95% CI 1,0 to 2,8).

A prevalência na população geral comparada com a prevalência de 0,5–1,0% em paciente com tromboembolismo venoso sugere que a deficiência de Antitrombina aumente o risco trombótico, no mínimo 50 vezes em mulheres não grávidas (WALKER, 2000).

Estudos familiares sugerem que a deficiência de Antitrombina é o defeito mais severo quando comparado com a deficiência de Proteína C ou Proteína S, com

mais pacientes sofrendo evento trombótico antes da idade de 25 anos (THALER, LECHNER, 1981; HIRSH et al., 1989).

A prevalência da deficiência de Antitrombina é baixa, 1/1000 para 1/5000, isto é, somente presente em 1% das pacientes com tromboembolismo (SUGIMURA et al., 1999). O risco de trombose entre as mulheres afetadas é de 60% durante a gravidez e 33% durante o puerpério (LOCKWOOD, 2002).

Na década de 1980, defeitos genéticos resultando em deficiência de PC e PS foram reconhecidos pela primeira vez como causas de trombofilia familiar. Deficiências heterozigóticas de PC e PS são associadas a risco estimado para ocorrência de tromboembolismo venoso aproximadamente 10 vezes maior em comparação a indivíduos normais. A homozigose para deficiência de PC ou PS é associada ao quadro clínico grave de *púrpura fulminans neonatal*, caracterizado por trombose de microcirculação que se manifesta logo após o nascimento (ZAGO et al., 2005).

A Proteína C é um anticoagulante natural que inativa os fatores Va e VIIIa (GIRLING et al., 1998). A deficiência desta proteína pode ser encontrada em aproximadamente 1 em 500 indivíduos saudáveis (TAIT et al., 1995). É provável que a incidência da deficiência de Proteína S seja similar com relação à deficiência da Proteína C (de STEFANO et al., 1996).

A proteína C é uma glicoproteína vitamina K dependente, tornando-se ativada (APC) pela trombina na presença da trombomodulina na superfície das células endoteliais (PAIDAS et al., 2004). A proteína S é uma glicoproteína vitamina K dependente que possui diversas funções anticoagulantes, incluindo a atividade

como um cofator não enzimático, o cofator da proteína C ativada (APC) (DAHLBACK, 1991). Na circulação, 60% da proteína S está ligada a C4b proteína reguladora da via do complemento, permanecendo 40% livre, ela livre age como como fator da PCA clivando os fatores Va e VIIIa. Concentrações de proteína S estão reduzidas na gravidez e em mulheres fazendo uso de contraceptivos orais (COMP et al., 1986 ; MALM, 1988).

Sanson et al., (1996) observou aumento em duas vezes mais nas perdas fetais após 8 semanas de gestação entre mulheres com trombofilia hereditária comparada com parentes naturais. O risco foi maior para deficiência de Proteína C e Antitrombina III do que para deficiência de Proteína S.

A prevalência de heterozigose para deficiência de PC na população geral é aproximadamente 0,3% (Tait et al., 1995) e deficiência de PC é relatada em torno de 3% em pacientes não selecionados com história de tromboembolismo venoso, (Heijoe et al.,1990; Mateo et al., 1997; Koster et al.,1995) apontando para o risco relativo de tromboembolismo venoso em mulheres não grávidas em torno de 10.

Algumas anormalidades hereditárias, especialmente do sistema de coagulação, estão intimamente associados com o aumento da predisposição a trombofilia. Por exemplo, as deficiências genéticas dos inibidores da coagulação antitrombina (AT), proteína C (PC) e proteína S (PS) são raras, mas os fatores de risco bem estabelecidos para trombofilia (SELIGSON, ZILVELIN, 1997). No ano de 1993, uma nova anormalidade envolvida na etiologia da trombofilia foi descoberta, isto é, caracterizada pela resistência do fator V da coagulação, mediada pela

neutralização da PC (um fenótipo conhecido como resistência da proteína C ativada, APCR) (DÄHLBACK et al., 1993).

A resistência da Proteína C ativada e a mutação do Fator V Leiden, estão associados com a perda fetal tardia (Roque et al., 2001; Younis et al., 2000), relatam que a resistência da Proteína C ativada e a mutação do Fator V Leiden podem estar associado ao primeiro e segundo trimestre de perda fetal recorrente. Estudos realizados encontraram que mulheres com aborto primário, têm maior frequência, para mutação do Fator V Leiden, em torno de 28%, comparadas com 3% do grupo controle (WRAMSBY et al., 2000).

A mutação do fator V Leiden (FVL) resulta de uma substituição da adenina por guanina na posição 1691 do gene do fator V exon 10, causando substituição do aminoácido glutamina pela arginina na posição 506 no polipeptídeo do fator V (FVQ506), tornando-o resistente a clivagem pela APC (DÄHLBACK, 1994).

A frequência da mutação do fator V Leiden varia entre diferentes grupos étnicos. A mutação está presente em 5,2% dos caucasianos, 1,2% dos africanos americanos (Ridker et al., 1997) e 5% - 9% dos europeus, enquanto é raro na Ásia e população africana (LOCKWOOD, 2001; RIDKER et al., 1997). Já a mutação do FVL é hereditária com característica autossômica dominante (BERTINA et al., 1994; VOORBERG et al., 1994).

A resistência da Proteína C ativada, na ausência da mutação do Fator V Leiden, tem sido recentemente associada com a perda fetal (TAL et al., 1999; BRENNER et al., 1997). Estudos prospectivos relatam que a Proteína C ativada foi o defeito trombofílico mais comum, encontrado em 39% das mulheres com perdas

fetais, comparadas com apenas 3% das mulheres do grupo controle (SARIG et al., 2002).

Em 1996, Poort et al., relata que a mutação no gene da protrombina G20210A, está associada com aumento de risco significativo para trombose, e mais tarde nas complicações obstétricas (PAIDAS et al., 2004). A presença de heterozigose na mutação do gene da protrombina está presente em 2% a 3% dos europeus, aumentando os níveis de protrombina na circulação em torno de 150 a 200% (LOCKWOOD et al., 2001). Entretanto, Gerhardt et al., 2000, relata um estudo caso controle 17% de tromboembolismo em grávidas.

O mais recente defeito hereditário trombofílico descrito é a transição de uma guanina para uma adenina na posição 20210 da região 3' não traduzida do gene que codifica a protrombina. Este polimorfismo está associado com aumento da concentração plasmática de protrombina, e um risco aumentado ao tromboembolismo venoso (POOR et al., 1996).

A mutação para o gene da protrombina (G20210A), presente em 2 a 3% da população geral está associado com risco de trombose aumentado em três vezes (POORT et al., 1996; MARGAGLIONE et al., 1998).

Kupferminc et al., (1999) em estudo com mulheres com complicações severas na gravidez identificou em 10% delas a mutação do fator II G20210A, comparadas com 3% do controle.

A má nutrição e a má absorção do folato e vitamina B₁₂ ou um defeito enzimático hereditário, tal como, a deficiência da metilenotetrahidrofolato redutase

(MTHFR), pode resultar em hiperhomocisteinemia. Portanto, hiperhomocisteinemia associada a doença vascular são provavelmente causadas pela interação entre fatores nutricionais e genéticos (WOUTERS et al., 1993).

Quere et al., (1998) em um estudo retrospectivo com 100 mulheres nulíparas com perdas fetais recorrentes de causas desconhecidas, encontrou uma incidência de 12% de hiperhomocisteinemia. Vinte por cento (20%) tinha o genótipo para mutação MTHFR, e 15% apresentavam baixas concentrações plasmáticas de folato.

A homocisteína é um aminoácido que está envolvido em diversos processos metabólicos, incluindo a via de metilação e sulfuração (HAGUE, 2003). Vários fatores dietéticos, metabólicos e ambientais têm sido identificado como importante modificadores de concentrações de homocisteína na circulação. Assim, para a deficiência de várias vitaminas dentre elas a vitamina B12, o ácido fólico, e a insuficiência renal, a deficiência tireoidiana em fumantes promove a hiperhomocisteinemia (HAGUE, 2003).

A gravidez, por outro lado, está associada com baixa concentração plasmática de homocisteína (ANDERSON, 1992; HAGUE et al., 1997). Distúrbios do metabolismo materno fetal, têm sido associado com defeitos no tubo neural fetal, com várias condições caracterizadas pela vasculopatia placentária, tal como pré-eclampsia, placenta abrupta, e com perda fetal recorrente (HAGUE, 2003).

Por outro lado, a deficiência de CβS (cistationina β sintetase), tem sido agora reconhecido como um polimorfismo genético de outras enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína. Uma dessas, MTHFR (metilenotetrahidrofolato

redutase), é a enzima utilizada para a síntese do 5-metilenotetrahidrofolato, que doa um radical metil para a conversão de homocisteína em metionina. Uma variante termolábil C677T do gene para MTHFR tem sido associada com uma leve a moderada tendência a hiperhomocisteinemia, particularmente na presença da deficiência de ácido fólico (van der PUT et al., 1997).

A hiperhomocisteinemia pode resultar de anormalidades de algumas das enzimas na via da metionina, da cistationina β , sintetase ou metilenotetraidrofolato redutase (RAO et al., 1997; NAURATH et al., 1995).

Nelen et al., (1997), observou que mulheres que apresentaram homozigose para variante da MTHFR têm maior risco de abortos consecutivos antes da 17ª semana gestacional, quando comparado ao grupo controle de grávidas com êxito.

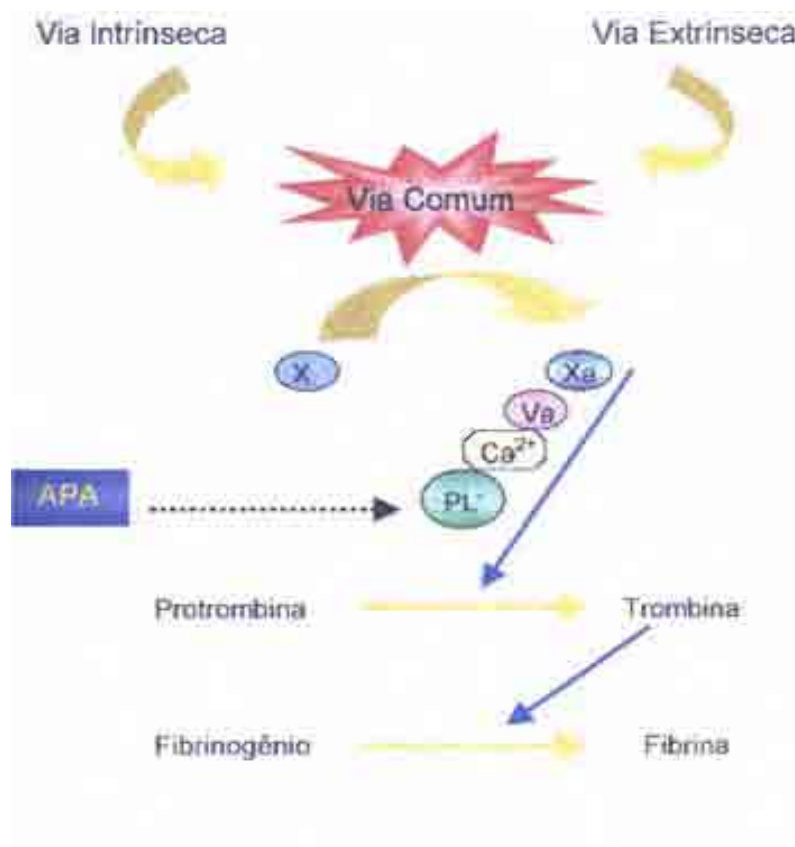
A síndrome antifosfolípide (SAF) é amplamente reconhecida como um fator de risco para numerosas complicações obstétricas, incluindo abortos, restrição ao crescimento intrauterino, pré-eclâmpsia e morte fetal (CARP, 2004).

Os anticorpos antifosfolípides (aPL) representam uma grande família de imunoglobulinas com afinidades variáveis por fosfolípides, por complexos de proteínas e fosfolípides, ou através de ambos (LEVINE et al., 2002). Eventos trombóticos são descritos em aproximadamente 30% dos pacientes com anticorpos antifosfolípides (Gastineau et al., 1985), com incidência de 2,5% paciente/ano (FINAZZI et al., 1996). Existem dois tipos de anticorpos antifosfolípides: anticorpo anticardiolipina (aCL) e anticoagulante lúpico (LA) (GALLI et al., 1997).

Historicamente, os anticorpos antifosfolípides (aPL) foram notados primeiro em pacientes que apresentavam teste positivo para sífilis sem sinais de infecção. Subseqüentemente em 1952, Conley e Hartmann foram os primeiros a descrever um anticoagulante circulante na doença de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). Bowie et al., (1963), chamou a atenção para o envolvimento dos anticoagulantes circulantes em pacientes com LES e eventos tromboembólicos. Feinstein e Rapaport (1972), sugeriram um nome para este anticoagulante circulante, “anticoagulante lúpico”. Nilsson et al., (1975), identificaram uma associação do anticoagulante lúpico (LA) com abortos espontâneos recorrentes. Hughes (1985), descreveu a associação entre anticorpos antifosfolípides (aPL), trombose venosa e arterial. Mais tarde, onde foi identificado como uma entidade distinta, a síndrome do anticorpo anticardiolipina. Harrys et al., (1987), relatou como síndrome antifosfolípide (SAF).

Os aPL parecem interferir tanto na via procoagulante como na via anticoagulante. A superfície fosfolipídica utilizada na maioria dos testes de coagulação *in vitro* favorece a inibição da via procoagulante, prolongando o tempo de coagulação, enquanto o microambiente das membranas celulares *in vivo* podem promover uma maior inibição da via anticoagulante, levando à trombose (ESMON et al., 2000).

Os aPL, principalmente o LA, parecem preferencialmente dirigir-se a fosfolípides plaquetários no complexo protrombinase (Va, Xa, Ca^{++} , PL^-) (GALLI et al., 1988) (Figura 1).

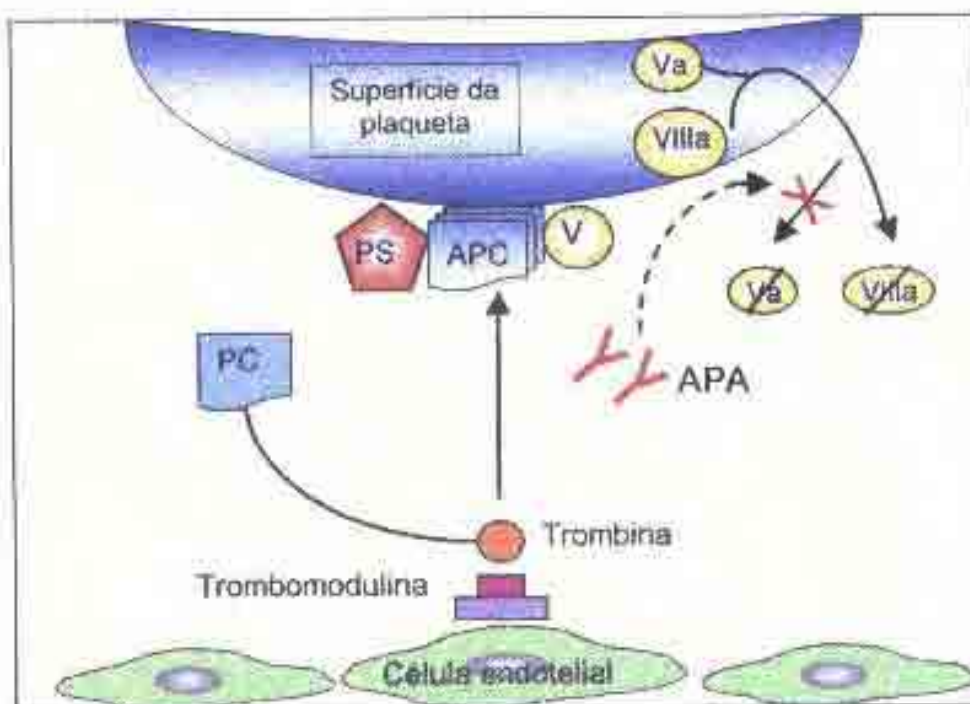


Fonte: Chiuso, 2003

Figura 1 – Representação Esquemática do Local de Ação dos aPL na Via Comum da Cascata de Coagulação.

Os aPL parecem atuar em outras etapas da coagulação, como na proteína C ativada (APC) (OOSTING et al., 1993). Esse anticorpo inibe o processo de inativação do fator V ativado (FVa) pela proteína C ativada (APC) na superfície fosfolipídica (MALIA et al., 1990; SMIRNOV et al., 1995). A proteína C (PC) é uma glicoproteína plasmática e sua ativação ocorre quando a trombina (IIa) liga-se a trombomodulina, uma proteína que constitui a superfície das células endoteliais vasculares.

A APC atua como um anticoagulante pela inativação proteolítica dos fatores Va e VIIIa, limitando assim, a geração de trombina. Para desempenhar essa função, a PCA necessita de um cofator, a proteína S (PS) e o fator V (ROUBEY, 1996) (figura 2). Havendo inibição pelos aPLs, há impedimento da cascata de coagulação, resultando em trombose (OOSTING et al., 1993).



Fonte: Chiuso, 2003

Figura 2 – Esquema representativo da atividade da proteína C e local de ação dos aPLs

Uma nova hipótese sobre o mecanismo de ação dos aPL demonstra que, apesar do nome, estes anticorpos não se ligam a fosfolípidos, mas são direcionados a proteínas plasmáticas com afinidade por fosfolípidos (GALLI & BARBUI, 1999). Este conceito baseia-se nos estudos de McNeil et al., (1990), e Galli et al., (1990), que demonstraram de forma independente e simultânea, a necessidade de um

cofator sérico para a ligação dos aCL aos fosfolípides aniônicos. Este cofator é a β_2 glicoproteína I (β_2 GPI), uma glicoproteína plasmática de 50Kd, que está presente no plasma na concentração de aproximadamente 200 microgramas/mL (ROUBEY, 1996). A β_2 GPI é sintetizada por várias células como: hepatócitos, células endoteliais e células da placenta, porém sua síntese maior ocorre no fígado (STEINKASSER et al., 1991).

Existem evidências de que sua ação *in vitro* ocorra na participação do sistema de coagulação, inibindo a atividade protrombinase (Galli et al., 1992), a geração do fator Xá pelas plaquetas (Shi et al., 1993), a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP) segundo Nimpf et al., (1987) é a fase de contato da via intrínseca da coagulação (SCHOUSBOE, 1985).

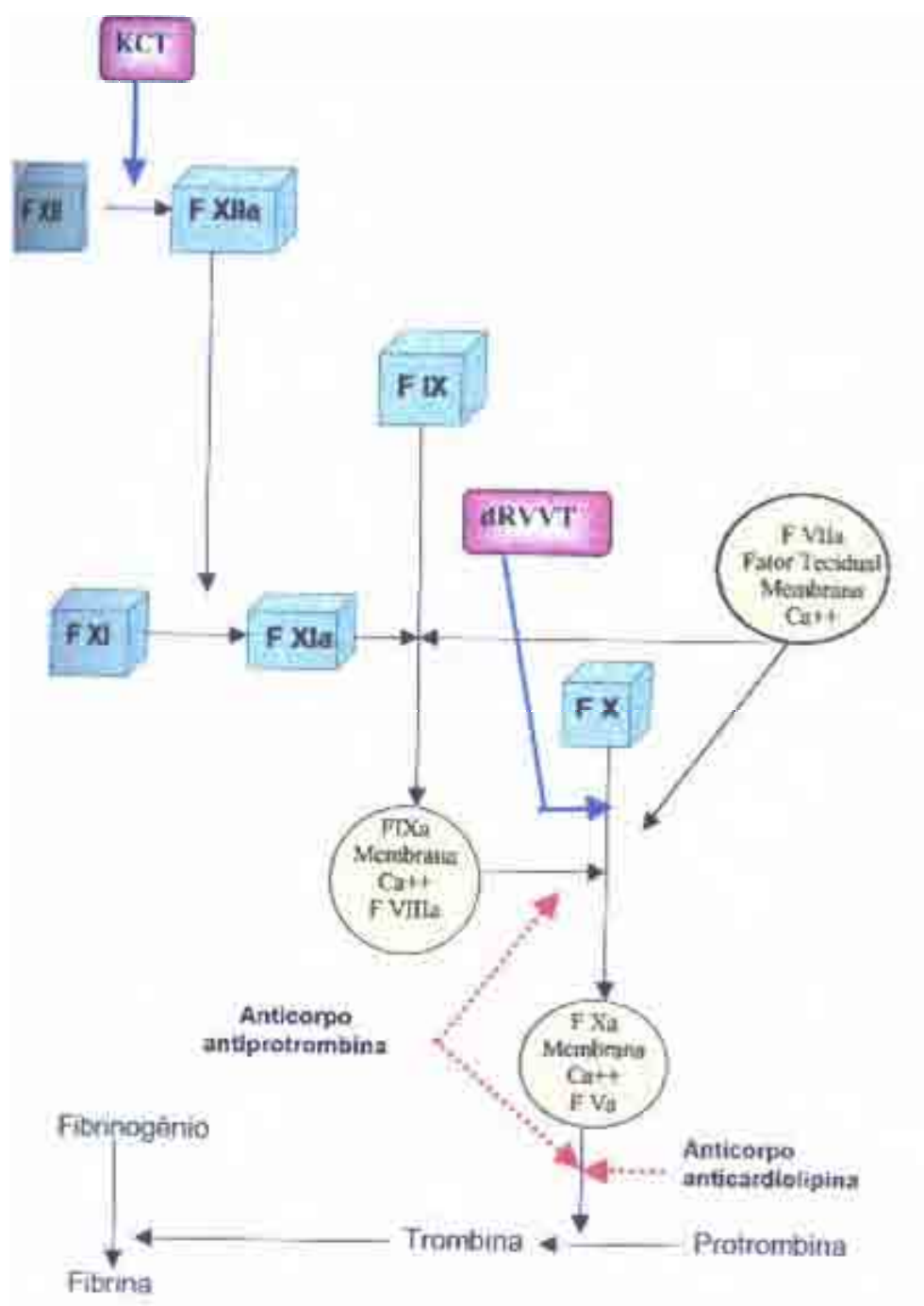
A função fisiológica da β_2 GPI não está bem esclarecida. No entanto, sabe-se que ela atua como um anticoagulante natural, inibindo a ativação do fator XII na via intrínseca da cascata de coagulação (GOLDMISMITH et al., 1994).

Deste modo, podemos dizer que a β_2 GPI ligada a superfícies como, por exemplo, os fosfolípides das membranas celulares, sofre uma modificação na sua conformação e os aPL ligam-se aos novos epítomos expostos (GREAVES, 1999). Os aPL parecem desregular os efeitos da β_2 GPI sobre a cascata de coagulação, resultando em trombose (GOLDMISMITH et al., 1994; BORCHMAN et al., 1995).

Outros alvos antigênicos dos aPL incluem: a protrombina (Bever et al., 1991), o cininogênio de alto e baixo peso molecular (Sugi & McIntyre, 1995), a anexina V (Matsuda et al., 1994) e a PS (OOSTING et al., 1993; PENGU et al., 1996).

Os anticorpos direcionados contra a protrombina e contra a β_2 GPI parecem ser os mais especificamente envolvidos na SAF (ROUBEY, 2000).

Entretanto, os anticorpos direcionados contra a β_2 GPI são detectados pelo teste do dRVVT (Galli & Bevers, 1990; Galli et al., 1995; Galli et al., 1999), que avalia a conversão de protrombina em trombina (GALLI & BARBUI, 1999) (Figura 3).



Fonte: Chiuso, 2003

Figura 3 – Local de ação do anticorpo antiprotrombina e anticardiolipina na Cascata de Coagulação (GALLI & BARBUI, 1999, modificado).

O critério aceito para o diagnóstico da síndrome antifosfolípide (SAF) é o critério de “Sapporo” (WILSON et al., 1999). Este critério definiu a característica clínica da perda fetal, como também uma morte fetal inexplicada do feto morfollogicamente normal acima de 10 semanas de gestação, ou 3 ou mais abortos consecutivos, inexplicados antes de 10 semanas de gestação.

Raí et al., (1995), examinou a prevalência de SAF entre 500 mulheres com abortos recorrentes consecutivos. Eles encontraram que 15% delas tinham persistentemente testes positivos para anticorpos antifosfolípide (62% somente anticoagulante lúpico (AL), 15% anticorpo anticardiolipina isotipo IgG positivo (aCLIgG), 9% anticorpo anticardiolipina isotipo IgM positivo (aCLIgM), 14% AL e aCL).

Os anticorpos antifosfolípidos são encontrados em 1% a 5% dos indivíduos saudáveis, a incidência aumenta com a idade e com doença crônica coexistente. A síndrome ocorre mais comumente em jovens de meia idade e adultos; porém, também podem ocorrer em crianças e nos idosos. Entre os pacientes com LES, a prevalência de aPL é alta, intervalos entre 12% a 30% para aCL, e 15% a 34% para AL (GEZER et al., 2003). No geral, o aCL ocorre aproximadamente 5 vezes mais do que o AL nos pacientes com SAF (BICK, 1994; RAND, 2003). Esta síndrome é a causa mais comum de trombofilia adquirida, associada com outras trombooses arterial e venosas ou ambas (GEZER et al., 2003).

A frequência de anticorpo antifosfolípide (aPL) na população geral não é bem documentada mas tem sido estimado ser entre 1% e 2% (ROSENDAAL, 1999; CREAGH et al., 1991).

Na gravidez, os anticorpos antifosfolípidos implicam em ser a causa da perda fetal em todos os estágios da gravidez, disfunção placentária no terceiro trimestre, restrição ao crescimento intra-uterino e pré-eclâmpsia (CARP,2004).

Assim, a investigação clínico–laboratorial de pacientes com abortos recorrentes, revelará a presença de fatores de risco adquiridos ou hereditários para essa patologia.

2 OBJETIVO

Avaliar a incidência de alterações trombofílicas congênicas ou adquiridas em mulheres com abortos recorrentes, comparando com mulheres voluntárias normais sem doenças clinicamente detectáveis e que tiveram pelo menos uma gestação bem sucedida.

3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Serão estudados 2 grupos com 35 mulheres em cada um deles, sendo:

– **Grupo de Estudo.** Mulheres com perdas fetais, classificadas segundo critérios estabelecidos.

Organização Mundial de Saúde definiu o aborto como sendo perda fetal ou embriônica, pesando 500 gramas ou menos, o qual é similar para 20 –22 semanas de idade gestacional (KRABBENDAM et al., 2004).

- **Grupo Controle.** Mulheres normais com uma ou mais gestação.

4- MATERIAL E MÉTODOS

-Kit para dosagem de Proteína C – método Substrato Cromogênico.

-Kit para dosagem de Antitrombina III – método Substrato Cromogênico.

-Kit para dosagem de Proteína S – método ELISA.

-Kit para detecção do anticorpo anticardiolipina IgG e IgM – método ELISA.

-Detecção do anticoagulante lúpico - método coagulométrico: tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) e o tempo de veneno de víbora de Russell diluído (DRVVT).

-Detecção de homocisteína - método FPIA.

-Detecção da mutação do Fator V de Leiden – método PCR-RFLP.*

-Detecção da mutação no gene da protrombina – método PCR-RFLP.

-Detecção da mutação do metilenotetraidrofolato redutase – PCR-RFLP.

* Polymerase chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

4.1 Métodos:

Avaliar pelo método ELISA a frequência de deficiência de Proteína S e anticorpo anticardiolipina IgG e IgM em 35 pacientes com perdas fetais, atendidas pela Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp e 35 mulheres normais, atendidas pela Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp pareadas por idade gestacional e que consentirem colaborar com a pesquisa.

Avaliar pelo método coagulométrico a frequência do Anticoagulante Lúpico (LA) em 35 pacientes com perdas fetais, atendidas pela Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp e 35 mulheres normais, atendidas pela Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pareadas por idade gestacional e que consentirem colaborar com a pesquisa.

Avaliar pelo método substrato cromogênico a frequência de deficiência de Proteína C e Antitrombina III em 35 pacientes com perdas fetais, atendidas pela Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Botucatu– Unesp e 35 mulheres normais, atendidas pela Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pareadas por idade gestacional e que consentirem colaborar com a pesquisa.

Avaliar pelo método de Imunoensaio de Fluorescência Polarizada (FPIA), a frequência da homocisteína em 35 pacientes com perdas fetais, atendidas pela Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Botucatu– Unesp e 35 mulheres normais, atendidas pela Disciplina de Ginecologia da Faculdade de

Medicina de Botucatu – Unesp, pareadas por idade gestacional e que consentirem colaborar com a pesquisa.

Avaliar pelo método PCR-RLFP a frequência das mutações Fator V Leiden (G1691A), a mutação no gene da protrombina (G20210A) e a mutação da metilenotetraidrofolato redutase (C677T) em 35 pacientes com perdas fetais, atendidas pela Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp e 35 mulheres normais, atendidas pela Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pareadas por idade gestacional e que consentirem colaborar com a pesquisa.

5 Pacientes e Métodos

5.1 Determinação do tamanho amostral

Para a determinação do tamanho amostral (ZAAR, 1999), utilizou-se como referência:

80% do poder do teste estatístico.

95% de confiança para as estimativas.

Erro de precisão de 10% para as comparações dos grupos.

5.2 Seleção de pacientes e critérios de inclusão

Foram incluídas no grupo de estudo 35 pacientes convidadas a fazer parte desta pesquisa. Estas eram acompanhadas no ambulatório de Esterilidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período de 2003 a 2006, de acordo com os seguintes critérios:

História de 3 ou mais abortamentos espontâneos consecutivos, antecidos ou não de parto;

Idade entre 18 e 41 anos e

Ciclos menstruais regulares.

Para o grupo controle, foram selecionadas 35 mulheres voluntárias, comprovadamente férteis (história de pelo menos 1 gestação normal e bem sucedida, sem história de abortamento);

Idade entre 18 e 38 anos.

Os critérios de exclusão para o grupo de estudo compreendiam:

Não estar grávida;

Não estar fazendo uso de contraceptivo oral.

Para o grupo controle:

Não estar grávida;

Não estar fazendo uso de contraceptivo oral pelo menos há 3 meses;

Não ter história de trombose familiar.

5.3 Estudo dos parâmetros trombofílicos

Para ambos os grupos foram realizados os seguintes testes;

Dosagem da Antitrombina III (AT III), Proteína S (PS) e Proteína C (PC).

Pesquisa da Síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAF) que compreende a dosagem do anticorpo anticardiolipina (aCL) e do anticoagulante lúpico (LA).

Pesquisa dos níveis de homocisteína.

Investigação da frequência das mutações do fator V Leiden (FVL), gene da protrombina (G20210A) e a mutação da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR C677T).

5.4 Métodos

Foram coletados 15 ml de sangue periférico, distribuídos em 5 tubos de polipropileno, sendo que 2 deles eram com gel separador para a obtenção de soro, 2 contendo citrato de sódio 3,2% na razão de 9:1 para pesquisa dos anticoagulantes naturais e anticoagulante lúpico e 1 tubo com EDTA para a investigação das mutações. Os tubos coletados para a investigação dos anticoagulantes naturais e anticoagulante lúpico foram centrifugados a 2.500 rpm (rotações por minuto) durante 15 minutos, para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP) e foram aliquotados e congelados a -20°C até a realização dos testes.

5.5 Pesquisa da Antitrombina III

Realizado pela técnica substrato cromogênico – Kit Helena Laboratories (Chrom Z – AT).

Princípio: O método baseia-se em 2 estágios:

1º estágio: a trombina é adicionada ao plasma diluído contendo AT III na presença do excesso de heparina.

2º estágio: após o período de incubação inicial, a trombina residual é determinada com o substrato cromogênico específico da trombina. A atividade da trombina residual é inversamente proporcional a concentração de AT III.

O procedimento foi realizado no aparelho PACKS®-4 Analyser,

75µL do plasma do paciente foi incubado por um período de três minutos;

Em seguida adicionou-se 75µL de trombina , incuba-se por mais 1 minuto;

Então coloca-se 75µL do substrato e completa a reação.

A leitura é determinada pela densidade ótica da amostra contra a curva de calibração já existente.

Os resultados são registrados em porcentagem (%), o valor de referência compreende de 75% –125%.

5.6 Pesquisa da Proteína C

Realizado pela técnica substrato cromogênico – Kit Helena Laboratories (Chrom Z – PC).

Princípio:

A proteína C plasmática é ativada por uma fração do veneno de serpente Agkistrodon contortrix. A quantidade de Proteína C ativada (APC) é determinada e monitorada pela taxa da hidrólise do substrato cromogênico específico para PC. A

liberação da pNA é medida num comprimento de onda de 405 nm e é proporcional ao nível de PC.

O procedimento foi realizado no aparelho PACKS®-4 Analyser,

75 µL do plasma do paciente foi incubado por três minutos;

Em seguida adicionou-se 75 µL do ativador e incubou-se por mais 5 minutos;

Então coloca-se 75 µL do substrato de PC e completa a reação.

A leitura é determinada pela densidade ótica da amostra com a curva de calibração já existente.

Os resultados são registrados em porcentagem (%), valor de referência que compreende de 65% –145%.

5.7 Dosagem de Proteína S Livre

A pesquisa de Proteína S (PS) livre foi realizada pela técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Aplicaram-se os imunoensaios anti-human protein A antibody (HPR)[®], conforme padronização do fabricante (Helena Laboratories, Beaumont, Texas).

Princípio:

O método imunoensaio ou de captura, com excesso de anticorpo marcado, é o mais utilizado para antígenos polivalentes. A fase sólida é

sensibilizada com anticorpo específico. A amostra em teste, onde se vai pesquisar o antígeno, é incubado com a fase sólida e a seguir, incuba-se com excesso de anticorpo específico marcado com a enzima. A reação é revelada pela adição do substrato. A taxa de degradação é proporcional á concentração do antígeno.

Em um tubo estéril, diluiu-se a amostra em diluente próprio. Posteriormente, as amostras e os controles positivo e negativo para PS, pré-diluídos e fornecido pelo fabricante, foram adicionados na microplaca. Esta é, previamente revestida com antígeno de PS purificado, preservado em seu estado nativo. Incubaram-se as amostras na placa por 40 minutos à temperatura ambiente, para permitir que qualquer anticorpo antiproteína S presente se ligasse ao antígeno imobilizado. Posteriormente, a placa foi introduzida em uma lavadora de microplaca de ELISA, modelo Spectra (SLT[®], Áustria), que realizou automática e seqüencialmente três lavagens dos poços, utilizando uma solução de PBS concentrado.

Adicionou-se, então, o conjugado enzimático de PS a cada poço, e uma segunda incubação de dez minutos permitiu que a enzima marcada com PS anti-humana se ligasse a qualquer anticorpo da amostra. Em seguida, uma nova lavagem da placa e um substrato de peroxidase, seguida de uma terceira incubação, que sofreu uma mudança de cor na presença da enzima conjugada, foi adicionado a cada poço. Finalmente, introduziu-se a placa em uma leitora de microplaca de ELISA, modelo Spectra (SLT[®], Áustria), e a presença ou a ausência da PS livre foram determinadas pela comparação da densidade ótica da amostra com uma curva de calibração de seis pontos.

Os resultados semi-quantitativos em unidades padrão de PS livre são dados em porcentagem (%). O intervalo normal de referência para de PS livre para esta análise é de 50% –150%.

5.8 Pesquisa dos anticorpos anticardiolipina IgG e IGM

A pesquisa dos anticorpos anticardiolipina (aCL) foi realizada pela técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Aplicaram-se os imunoensaios, **QUANTA** Life™ ACA IgG (HRP)[®] e **QUANTA** Life™ ACA IgM (HRP)[®], conforme padronização do fabricante (**INOVA diagnostics** Inc, CA, USA).

Em tubo estéril, diluiu-se o soro do paciente em diluente próprio para este fim. Posteriormente, as amostras de cada paciente e os controles positivo e negativo para IgG ou IgM, pré-diluídos e fornecidos pelo fabricante, foram adicionados na microplaca. Esta é previamente revestida com antígeno de cardiolipina purificado, preservado em seu estado nativo. Incubaram-se as amostras na placa por 30 minutos à temperatura ambiente, para permitir que qualquer anticorpo anticardiolipina presente se ligasse ao antígeno imobilizado.

Posteriormente, a placa foi introduzida em uma lavadora de microplaca de ELISA, modelo Spectra (SLT[®], Áustria), que realizou automática e seqüencialmente três lavagens dos poços, utilizando uma solução de PBS concentrado. Adicionou-se, então, o conjugado enzimático IgG ou IgM a cada poço, e uma segunda incubação permitiu que a enzima marcada com IgG ou IgM anti-humano se ligasse a qualquer anticorpo da paciente. Em seguida, foi realizada nova lavagem da placa e um substrato de peroxidase, que sofre uma mudança de cor na presença da enzima conjugada, foi adicionado a cada poço. Finalmente, introduziu-se a placa em uma

leitora de microplaca de ELISA, modelo Spectra (SLT[®], Áustria), e a presença ou a ausência dos aCLs foram determinadas pela comparação da densidade ótica da amostra com uma curva de calibração de cinco pontos.

Os resultados são semi-quantitativos em unidade de GPL ou MPL correspondente à atividade de ligação de um mg/mL do anticorpo IgG ou IgM, respectivamente. A interpretação dos valores está representada na tabela 1.

Tabela 1- Interpretação dos valores dos anticorpos anticardiolipina IgG (aCL IgG) e anticardiolipina IgM (aCL IgM), segundo padronização do fabricante (INOVA diagnostics Inc., CA. USA)

Anticorpos anticardiolipina	Indeterminado	Negativo	Positivo	Positivo alto
ACL IgG (GPL)	≤ 15	16 a 20	21 a 80	> 80
ACL IgM (MPL)	≤ 12,5	13 a 20	21 a 80	> 80

5.9 Pesquisa do anticorpo anticoagulante lúpico

A pesquisa do AL foi realizada através dos seguintes testes de coagulação sanguínea:

Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA);

Tempo de protrombina (TP) e o

Tempo de veneno da Víbora de Russel diluído (dRVVT).

O AL, anticorpo de natureza auto-imune, é diluído contra fosfolípidos, o que faz com que ele interfira *in vitro*, com o agente utilizado nos testes de coagulação, como a cefalina e a tromboplastina. O que observa-se é um prolongamento nos tempos de coagulação, embora não haja inibição da coagulação *in vivo*.

A detecção destes inibidores obedece ao princípio geral de que em sua presença o prolongamento do tempo de coagulação existente não é corrigido pela adição de um plasma normal. Isso possibilita diferenciar em prolongamento do tempo de coagulação causada pela deficiência de um determinado fator, pois neste caso, o tempo seria plenamente corrigido pela adição do plasma normal.

5.9.1 Estudo da Coagulação

A coleta de sangue com tubos contendo citrato de sódio a 3,2% foram centrifugados a 2500 rpm durante 15 minutos. Em seguida, fez-se a separação do extrato plasmático e uma nova centrifugação foi realizada para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP).

O *pool* de plasmas normais (PN) utilizado nos testes foi constituído do plasma de dez indivíduos doadores de sangue, aparentemente saudáveis, que apresentavam resultados negativos para o AL quando testados com TTPA, o TP e o dRVVT.

Todas as provas de coagulação sanguínea foram realizadas automaticamente em um coagulômetro modelo *Trombolyze Compact* (Behnk Elektronik®, Germany)

5.9.2 Tempo de tromboplastina parcial ativado

O TTPA foi realizado através da incubação, a 37°C, de 0,1mL do PPP com 0,1 mL do reagente comercial Platin® LS (bioMérieux, France), durante cinco minutos. Após a ativação, foi adicionado 0,1 mL de CaCl_2 0,025M e registrou o tempo de coagulação.

5.9.3 Tempo de protrombina

O TP foi realizado através da incubação, a 37°C, de 0,1 mL do PPP com 0,1 mL do reagente comercial Simplastim® Excel S (bioMérieux, France), durante cinco minutos. Em seguida, o tempo de formação do coágulo foi observado.

Os resultados do TP ou TTPA foram considerados anormais quando relação plasma do paciente (PP)/ PN foi maior do que 1,25. Nestes casos, fez-se uma mistura em partes iguais do plasma do paciente com o plasma normal (PP + PN), e repetiram-se os testes imediatamente e, após a incubação dessa mistura por 2 horas a 37°C. Se o TP ou TTPA da mistura foram corrigidos, caindo para um valor inferior a 1,25, considerou-se deficiência de fator, caso contrário, considerou-se a presença de um inibidor.

5.9.4 Tempo de Veneno da Víbora de Russel Diluído (dRVVT)

O dRVVT foi avaliado por meio de reagentes comerciais Viperquik[®] LA – Test e Viperquik[®] LA – Chek (bioMérieux, *France*). Inicialmente, 0,2 mL de plasma citratado foram incubados por um minuto a 37°C. Após este período, foram adicionados 0,2 mL do reagente Viperquik[®] LA – Test e registrou-se o tempo de coagulação. Quando a razão PP/PN foi maior do que 1,20 realizou-se o teste Viperquik[®] LA – Chek. Considerou-se o resultado anormal quando a razão LA – Test / LA – Chek foi maior que 1,3. Em seguida, os dois testes, (LA – Test e LA – Chek), foram repetidos com a mistura do plasma da paciente com o plasma normal – PP+PN e o resultado foi analisado de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 – Combinação do Viperquik[®] LA – Test e do Viperquik[®] LA – Chek da paciente e da mistura (PP+PN)

Viperquik [®] LA – Test		Viperquik [®] LA – Chek		Diagnóstico
Paciente	Mistura (PP+PN)	Paciente	Mistura (PP+PN)	
Normal	Normal	Normal	Normal	AL Ausente
Anormal	Anormal	Normal	Normal	AL presente
Anormal	Normal	Anormal	Normal	Deficiência de fator
Anormal	Anormal	Anormal	Normal	AL e deficiência de fator
Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Outro Inibidor

5.10 Dosagem de Homocisteína

Realizado pela técnica de Imunoensaio da Fluorescência Polarizada (FPIA).

Kit Abbot Laboratórios do Brasil LTDA. Divisão Diagnósticos.

Princípio:

O ensaio foi realizado no aparelho AxSYM[®] Homocisteína, baseia-se na tecnologia do Imunoensaio de Fluorescência Polarizada (FPIA).

A homocisteína (HCY) ligada (forma oxidada) é reduzida à forma livre da homocisteína que é convertida enzimaticamente em S-adenosil- L-homocisteína (SAH). A homocisteína, a mistura bissulfídrica e as formas ligadas às proteínas de HCY na amostra são reduzidas à forma livre de HCY através do uso de ditioneitol (DTT).

A HCY livre é convertida em SAH pela utilização de SAH hidrolase e o excesso de adenosina. O excesso de adenosina na solução de pré-tratamento aciona a conversão de HCY em SAH pela SAH hidrolase bovina.

A amostra, a solução de pré-tratamento, a solução de diluente e a SAH hidrolase são pipetadas para uma cavidade da célula de reação para fazer a mistura de pré-diluição (conforme padronização do fabricante).

Uma alíquota da mistura de pré-diluição, anticorpos e solução diluente são transferidos para a cuveta da célula de reação.

O marcador, a solução diluente e uma segunda alíquota da mistura de pré-diluição são transferidas para a cuveta.

A SAH e o marcador de fluoresceína competem pelos locais de ligação na molécula do anticorpo monoclonal.

A intensidade da luz fluorescente polarizada é medida pelo conjunto óptico FPIA. A unidade de apresentação de resultados estabelecida como padrão para o ensaio AxSYM Homocisteína é $\mu\text{mol/L}$, valor de referência que compreende de $3,36\mu\text{mol/L}$ – $20,44\mu\text{mol/L}$.

5.11 Pesquisa da Mutação do Fator V Leiden

5.12 Pesquisa da Mutação do Gene da Protrombina G20210A

5.13 Pesquisa da Mutação do Metilenotetrahidrofolato Redutase

MTHFR C677T

A investigação das mutações foi realizada pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), seguida pela análise de fragmento da enzima de restrição (RFLP) conforme (BERTINA et al., 1994; POORT et al., 1996; ARRUDA et al., 1997). As análises foram feitas em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular da Divisão Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu.

5.14 Análise Estatística

5.14.1 Metodologia Estatística

O estudo da associação entre trombofilias e abortos recorrentes foi realizado utilizando o teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinomiais (GOODMAN,1964;1965).

Foram utilizadas letras minúsculas para indicar os resultados das comparações entre grupos fixados a categoria de resposta e, letras maiúsculas, nas comparações das categorias de respostas dentro do grupo. Para a interpretação das letras deve-se proceder da seguinte maneira:

i) as proporções seguidas de pelo menos uma letra minúscula não diferem quanto aos respectivos grupos na categoria de resposta em consideração;

ii) duas proporções seguidas de pelo menos uma letra maiúscula não diferem quantos as respectivas categorias de resposta, dentro do grupo em consideração

Todas as conclusões, no presente trabalho, foram desenhadas no nível de 5% de significância.

5.15 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Anexo 1)

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram estudadas 70 mulheres, que foram convidadas a fazer parte desta pesquisa. Estas, foram divididas em dois grupos, sendo 35 com abortamento de repetição, onde a idade variou 18 a 41 anos com média $30,1 \pm 6,23$ anos e 35 mulheres voluntárias sadias que fizeram parte do grupo controle, com idade compreendida de 18 a 38 anos, com média de $32,8 \pm 4,03$ anos.

Tabela 3 - Distribuição das pacientes com abortamento habitual segundo o número de abortamentos.

Número de abortamentos	n	%
Três	23	65,8
Quatro	8	22,8
Seis	1	2,8
Sete	2	5,8
Quatorze	1	2,8
Total	35	100

Em nossa casuística, observamos maior número de mulheres com três e quatro abortos (88,6%).

A idade gestacional dos abortamentos variou de primeiro a segundo trimestre de gestação, ocorrendo maior perda no primeiro trimestre.

Tabela 4- Comparação da idade das pacientes do grupo de estudo com relação ao trimestre de perda gestacional.

Medida Descritiva	Idade	Frequência de Abortos		Porcentagem de Aborto	
		1º	2º	1º	2º
		trimestre	trimestre	trimestre	trimestre
Valor mínimo	18	0	0	0,00	0,00
1º Quartil	25	3	0	75,00	25,00
Mediana	31	3	0	100,0	0,00
3º Quartil	36	3	1	100,0	0,00
Valor máximo	41	13	6	100,0	100,0
Média	30,5	3,2	0,6	84,56	15,44
Desvio-padrão	6,4	2,1	1,2	25,74	25,74
Resultado do teste estatístico		P<0,001		P<0,001	

Em nossos resultados observamos que existe diferença estatisticamente significativa de perda no primeiro trimestre quando comparada com perdas no segundo trimestre

Tabela 5 – Característica das pacientes com presença ou ausência de trombofilia (hereditária ou adquirida) no grupo de estudo.

	Trombofilia	Sem trombofilia	n
nº de pacientes	29	6	35
Média de idade	29,8	31,5	
Intervalo de idade	18-38	25-41	

Tabela 6 – Característica das mulheres com presença ou ausência de trombofilia (hereditária ou adquirida) no grupo controle.

	Trombofilia	Sem trombofilia	n
nº de mulheres	25	10	35
Média de idade	33,5	31,2	
Intervalo de idade	28-38	24-37	

Podemos observar que tanto no grupo de estudo quanto no grupo controle encontramos resultados que sugerem a presença de trombofilia.

6.1 Avaliação Laboratorial

Quando avaliamos os anticorpos antifosfolípides, a presença do anticoagulante lúpico (AL) foi detectada em apenas uma 1 (2,8%) paciente, enquanto no grupo controle, não detectamos a presença desse anticorpo. Nosso resultado está de acordo com a literatura (MTIRAUI, 2004).

Quando avaliamos o anticorpo anticardiolipina (aCL) nas pacientes, 21 (60,0%) foram positivas, sendo que 6 (17,1%) apresentaram aCL IgG e Ig M, 11 (31,4%) apresentaram somente IgG e 4 (11,4%) somente IgM.

No grupo controle observa a presença do anticorpo anticardiolipina (aCL) em 12 (34,3%) , sendo que 5 (14,3%) apresentaram IgG e IgM, 4 (11,4%) somente IgG e 3 (8,6%) somente IgM .

Tabela 7 - Prevalência do Anticorpo anticardiolipina em mulheres dos grupos de estudo e controle.

	Grupo de Estudo (n=35)	Grupo Controle (n=35)
ACL IgG + IgM	06 (17,1%)	05 (14,3%)
aCL IgG	11 (31,4%)	04 (11,4%)
aCL IgM	04 (11,4%)	03 (08,6%)
Total	21 (60,0%)	12 (34,3%)

Nossos resultados demonstraram que, o anticorpo anticardiolipina , foi significativamente mais freqüente em mulheres com aborto de repetição (60,0%) quando comparadas com mulheres do grupo controle (34,3%), que foram semelhantes aos da literatura, onde relata freqüência entre 3,5 e 50%, a depender da população estudada (RAI et al, 1995). Higashiro et al, (1998) relata uma diferença significativa na prevalência de aCL entre casos e controles 17.4% versus 4.0%, porém, aCL foi mais comum em mulheres com história de perdas no segundo e terceiro trimestre. Branch et al., 1997; Maclean et al., 1994; Out et al., 1991; Parazzini et al., 1991; Petri et al., 1987; Yetman, 1996; afirmam que

aproximadamente 20% de mulheres com abortos recorrentes apresentam o teste para aCL positivo ou ainda a presença de AL. Brenner et al., (1997), também reportam a prevalência de aCL e/ou AL, porém sem evidências de que estes anticorpos acarretam abortos recorrentes. Esta grande variabilidade entre os estudos existentes, deve-se a seleção de pacientes com três ou mais perdas gestacionais consecutivas, a doenças associadas e ao uso de medicamentos que possam interferir nos resultados, ou ainda à flutuação dos títulos de anticorpos e à falta de padronização nos testes laboratoriais empregados. (RAI et al., 1995; VINATER et al., 2001; GEZER, 2003; PIERANGELI & HARRIS, 2005).

Tabela 8 – Medidas descritivas das variáveis segundo grupo de estudo e controle.

Variável	Medida Descritiva	Grupo		Resultado do Teste Estatístico (P=Valor)
		Estudo	Controle	
aCL IgG	Valor mínimo	6	7	P<0,005
	1º Quartil	15	14	
	Mediana	20	17	
	3º Quartil	30	21	
	Valor máximo	48	28	
	Média	23,1	17,3	
	Desvio-padrão	10,3	5,1	

Teste t de Student para amostras independentes , (ZAAR,1999).

Em nossos resultados observamos que existe diferença estatisticamente significativa na frequência de aCL IgG no grupo de estudo quando comparamos com a frequência de aCL IgG no grupo controle.

Tabela 9 – Medidas descritivas das variáveis segundo grupo de estudo e controle.

Variável	Medida Descritiva	Grupo		Resultado do Teste Estatístico (P=Valor)
		Estudo	Controle	
aCLIgM	Valor Mínimo	7	7	P>0,05
	1º Quartil	12	11	
	Mediana	17	14	
	3º Quartil	21	20	
	Valor máximo	52	57	
	Média	17,7	16,9	
	Desvio-padrão	8,9	10,6	

Teste t de Student para as amostras independentes, (ZAAR, 1999).

Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência do aCL IgM no grupo de estudo quando comparamos com a frequência de aCL IgM no grupo controle.

O percentual elevado de aCL IgM verificado pode ser decorrente dos valores de referência preconizada, a serem baseados em população nortes americanos e não existirem valores preconizados, tanto para as pacientes que realizam exames em nosso laboratório como na população brasileira.

Dados, de Silver, et al, (1996) e Pierangeli, Harris (2005), demonstram que mulheres com presença de anticorpos IgM ou ainda baixos títulos de anticorpos IgG têm menor risco para desenvolver complicações clínicas e obstétricas

relacionadas aos anticorpos antifosfolípides, em relação a mulheres com título de aCL IgG médio ou alto.

A presença de anticoagulante lúpico foi detectada em apenas um caso (2,8%) no grupo de estudo, enquanto no grupo controle todos foram negativos. Na literatura, (Mtiraoui et al., 2004), a frequência varia de 3% a 48% concordando com nossos resultados. O autor afirma que esta diferença relatada na frequência pode ser devido ao critério de seleção não uniforme, alguns estudos incluem somente mulheres com 2 ou mais abortos somente no primeiro trimestre (MacLean, et al, 1994), ou em ambos primeiro e segundo trimestres, (Oshiro et al, 1996), outros adotam acima de 3 abortos, (Parke et al., 1991), ou ainda morte útero fetal, (OUT et al., 1991). Por outro lado, outro fator que pode ter influência, são diferenças técnicas como os ensaios utilizados na investigação do AL que podem diferir em sensibilidade e especificidade, (LAWRIE et al., 1999). Haywood & Brown (1991), descrevem que o anticorpo antifosfolípides tem sido encontrado em 10 a 20% de mulheres com abortos recorrentes, comparadas com 2 a 5 % de mulheres sem história prévia de abortos. Assim, o mecanismo exato que promove a perda fetal, não está inteiramente esclarecido. Sabe-se, que os anticorpos antifosfolípides podem causar insuficiência útero placentária por interferir com o anexin V trofoblástico, aumentando a invasão trofoblástica ou produção hormonal. A anexin V é uma proteína ligada a fosfolípide com potente atividade anticoagulante que está marcadamente reduzida na vilosidade placentária em mulheres grávidas com síndrome antifosfolípide. No entanto, a redução do anexin V na síndrome antifosfolípide é considerada um importante mecanismo no desenvolvimento de trombose e perda fetal, (RAND et al., 1997; DONOHOE et al., 2000).

Vinatier, et al., (2001), descreve a prevalência de anticorpo antifosfolípides em abortos recorrentes. O anticorpo anticardiolipina variou de 4.6% e 50.7%, com uma incidência média de 15.5%. A prevalência de anticoagulante lúpico variou de 0 e 14% com uma incidência média de 8.3%

Rai et al., (1995), relatam a prevalência de anticorpos antifosfolípides (aPL) entre 500 mulheres com abortos recorrentes consecutivos. Perceberam que 15% apresentavam persistentemente testes positivos para anticorpos antifosfolípides (aPL), (62% somente anticoagulante lúpico, 15% anticorpo anticardiolipina IgG, 9% anticorpo anticardiolipina IgM, 14% anticoagulante lúpico e anticorpo anticardiolipina).

Tabela 10 - Níveis de concentração dos anticoagulantes naturais em mulheres do grupo de estudo e controle.

	Grupo de Estudo N=35	Grupo Controle N=35
Antitrombina III (%)	72,5 – 114,4	73 – 205
Proteína S (%)	80 - 250	70 – 250
Proteína C (%)	85 - 152	80 - 150

Em nosso estudo não encontramos deficiência das proteínas anticoagulantes endógenas, Proteína C, S e a Antitrombina III, tanto no grupo de estudo como no grupo controle, apenas duas mulheres do grupo de estudo e uma mulher do grupo controle apresentaram a dosagem de antitrombina III próximo ao limite inferior. Mulheres em idade reprodutiva com deficiência de uma das proteínas anticoagulante endógenas, apresentam risco relativo três vezes maior de ter um

episódio tromboembólico do que homens na mesma faixa etária, (BUCCIARELLI et al., 1999). Existem vários estudos envolvendo deficiência de Proteína S, mas a maioria consiste em descrições de casos isolados de mulheres com abortos recorrentes e presença de outros fatores de trombofilia, (ESPANA et al., 1999). Kupferminc, (1999), relata em seu estudo a incidência de mulheres com trombofilia e complicações obstétricas sendo que, 8% apresentavam deficiência de algum inibidor natural, ou seja, Proteína S, Proteína C ou Antitrombina III. Já para o grupo controle, as mulheres com trombofilia e sem complicações obstétricas foi de 1%.

Quando estudamos complicações associadas à gravidez, dados de estudo do *European Prospective Cohort on Thrombophilia* (EPCOT) mostram um aumento no risco de natimorto entre mulheres com deficiência de Proteína C (1.2% vs 0,6 *odds ratio* 2,3, 95% CI 0,6 a 8.3) e proteína S (1,9% vs 0,6%, *odds ratio* 3,3, 95% CI 1,0 a 11,3) , porém nenhuma diferença significativa no risco de aborto comparado com os controles (15,8% vs 11,6% e 14,6% vs 11,6% respectivamente) (PRESTON et al., 1996). Brenner et al., (1997), em estudo com 39 mulheres com aborto recorrente, assim como nosso estudo, o autor não encontrou nenhum caso de deficiência dessas proteínas, enquanto Dilley et al., (2002), encontrou uma diminuição dos níveis de proteína S, C e antitrombina, porém, não foi descrito como deficiência pois os níveis estavam próximos ao limite inferior, assim como em nosso caso a respeito da antitrombina III.

Tabela 11 - Níveis de concentração da Homocisteína em mulheres dos grupos de estudo e controle.

	Grupo de Estudo (n=33)	Grupo Controle (n=34)
Níveis (μmol/L)	3,65 - 21,99	4,51 – 9,7

Apenas um caso de hiperhomocisteinemia foi encontrado em nosso grupo de estudo. Essa paciente apresentou uma complicação levando a um quadro de acidente vascular cerebral (AVC). No grupo controle todas mulheres estavam com níveis dentro da normalidade. Dois estudos têm demonstrado o risco de tromboembolismo venoso associado com concentrações levemente alteradas, (DEN HEIJER et al., 1996; SIMIONI et al., 1996).

Hiperhomocisteinemia pode ser o resultado de condições genéticas e adquiridas (D'Angelo et al., 1997), incluindo a redução de vitamina B6, B12 ou concentração de Folato (UBBINK et al., 1993). A hiperhomocisteinemia clássica é incomum, mas a variante 677 C→T no gene que codifica o metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) o qual conduz para a produção de uma variante termo lábil da enzima MTHFR em concentrações levemente alteradas é comum.(FROSST et al., 1995; KANG et al., 1988). Estudos relatam dados que suportam a noção de hiperhomocisteinemia com ou sem uma contribuição genética para o MTHFR C677T como um fator de risco significativo de aborto recorrente . Isto tem sido reconhecido, porém, que ambos hiperhomocisteinemia e o polimorfismo MTHFR C677T não são necessários nem suficiente para o desenvolvimento do aborto

recorrente idiopático. Supõe-se que distúrbios no metabolismo do folato, agem como cofatores no processo de doença multifatorial, (UNFRIED et al., 2002).

6.2 Mutação do metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR) C677T

A mutação do MTHFR foi realizada nos pacientes do grupo de estudo, onde 19 (54,3%) apresentaram genótipos normais, 14 (40%) apresentaram heterozigose e apenas 2 (5,7%) apresentaram homozigose.

Para o grupo controle a mutação do MTHFR foi realizada em mulheres normais, onde 15 (45,4%) apresentaram genótipos normais, e 13 (39,3%) apresentaram heterozigose e 5 (15,1%) apresentaram homozigose.

Em nossos estudos obtivemos resultado surpreendente, pois o grupo de estudo apresentou menor número de pacientes com a mutação do gene C677T para o MTHFR homozigoto (5.7%), e o grupo controle apresentou (15,1%). Mulheres que fizeram parte do grupo controle tinham pelo menos uma gestação normal, o que podemos sugerir que a mutação para o gene C677T do MTHFR sozinha, não está associada com abortos recorrentes em nosso estudo. Nossos dados estão de acordo com a literatura Pihusch et al., (2001), que relata no grupo de estudo 39,6% de heterozigose versus, 14,9% de homozigose e para o grupo controle, 41,8% para heterozigose versus, 12,3% para homozigose. Para Coulam et al., (2006) mulheres com história de abortos recorrentes têm mutação homozigose para o gene C677T do MTHFR mais freqüente que do que os controles. Novamente, destacamos que nossa população estudada apresenta algumas características que as tornam diferentes da população analisada por outros autores.

Tabela 12 - Distribuição do MTHFR C677T nos grupos de estudo e controle.

Grupo	MTHFR			Total
	Normal	Heterozigoto	Homozigoto	
Controle	15(0,469) a B	12(0,375) a B	5(0,156) a B	32
Estudo	19(0,543) a B	14(0,400) a B	2(0,057) a B	35

Letras Minúsculas (a), determinando associação entre os grupos.

Letras Maiúsculas (B), determinando associação dentro os grupos.

6.3 Mutação do Fator V Leiden

A mutação do Fator V Leiden para heterozigose foi observada em 3 (8,8%) no grupo de estudo, e nas mulheres do grupo controle observou-se que 7 (20%) apresentaram heterozigose para o Fator V Leiden. Nossos dados diferem da literatura e foram intrigantes, pois o grupo de estudo apresentou menor frequência de mutações. Para homozigose a mutação do Fator V Leiden não foi observada, tanto no grupo de estudo como no grupo controle.

Tabela 13 – Distribuição da Mutação do Fator V Leiden nos grupos de estudo e controle.

Grupo	Fator V leiden			Total
	Normal	Heterozigoto	Homozigoto	
Controle	28(0,800) a B	7 (0,200) a B	--	35
Estudo	31(0,912) a B	3 (0,088) a B	--	34

Letras Minúsculas (a), determinando associação entre os grupos.

Letras Maiúsculas (B), determinando associação dentro os grupos.

A mutação do Fator V Leiden é a mais prevalente trombofilia hereditária em caucasianos, onde a incidência varia de 1 a 10% (REES et al., 1995). Dizon-Townsoon et al., (1997), relata em seu estudo com 40 casos selecionados de abortos recorrentes, (22 no primeiro trimestre e 18 no segundo trimestre), o autor não encontrou nenhuma portadora da mutação do Fator V Leiden.

Mousa et al., 2001, relatam a prevalência da mutação genética para Fator V Leiden, Fator II G20210A, C677T da metilenotetraidrofolato redutase em 102 mulheres com graves complicações na gravidez e 44 controles saudáveis. Nesse total, as diferenças não foram significantes na prevalência das três mutações genéticas entre os dois grupos. Mutações genéticas para Fator V Leiden, Fator II G20210A, C677T de metilenotetraidrofolato redutase foram identificadas em 2%, 11% e 5% das mulheres com complicações graves na gravidez comparadas com 3%, 2%, e 2% dos controles respectivamente.

6.4 Mutação do gene da protrombina

A mutação do gene da Protrombina (G20210A) para heterozigose, foi encontrada em 2 (5,8%) das pacientes do grupo de estudo. No grupo controle apenas 1 (3,03%) apresentou heterozigose para mutação do gene da Protrombina (G20210A).

A mutação do gene da protrombina (G20210A) é uma trombofilia hereditária dominante, a qual resulta em uma concentração aumentada de

protrombina plasmática e um aumento de 2.8 vezes do risco de trombose (WALKER, 2005; HIGGINS, 2000).

Carp et al. 2002 relatam a prevalência genética para a mutação do fator V Leiden, fator II G20210A e metilenotetrahidrofolato redutase C677T em 108 mulheres com 3 ou mais perdas fetais exclusivamente no primeiro trimestre, ou mistura primeiro e segundo trimestre de perda, com a prevalência encontrada em 82 mulheres férteis controle sem abortos. Nenhuma mulher tanto no grupo de estudo quanto no grupo controle apresentou homozigose para as mutações do fator V Leiden e fator II G20210A, não havendo diferença estatisticamente significativa nas prevalências dessas mutações fator V Leiden e fator II G20210A entre os grupos de estudo e controle, em nosso trabalho obtivemos o mesmo resultado quanto às mutações do fator V Leiden e a mutação do gene da protrombina G20210A. A prevalência de homozigose para a mutação do MTHFR C677T foi maior no grupo de estudo, mas não houve diferença estatisticamente significante, diferindo do nosso trabalho pois a homozigose para a MTHFR C677T foi observada uma maior prevalência no grupo controle quando comparadas ao grupo de estudo. Este resultado foi intrigante pois, mulheres consideradas normais com pelo menos uma gestação normal apresentou resultado para a mutação do MTHFR, o que confirma a hipótese que a mutação sozinha não causa o aborto.

Tabela 14 - Distribuição do gene G20210A da Protrombina segundo grupo de estudo e controle.

PROTROMBINA				
Grupo	Normal	Heterozigoto	Homozigoto	Total
Controle	32(0,980) a B	1 (0,030) a B	--	33
Estudo	32(0,941) a B	2 (0,058) a B	--	34

Letras Minúsculas (a), determinando associação entre os grupos.

Letras Maiúsculas (B), determinando associação dentro os grupos.

7 ASSOCIAÇÃO DE FATORES TROMBOFÍLICOS HEREDITÁRIOS OU ADQUIRIDOS

Em nossa pesquisa observamos algumas pacientes com associações de fatores principalmente anticorpos anticardiolipina e o MTHFR, que condiz com a literatura (COUTO et al., 2003).

A associação entre a mutação do MTHFR e o anticorpo anticardiolipina (aCL), foram observadas em 9 (25,7%) pacientes do grupo de estudo, onde 6 (17,1%) apresentaram isotipos IgG e IgM positivos e heterozigose para o MTHFR, apenas 1 (2,8%) apresentou isotipo IgG positivo e heterozigose para o MTHFR, 2 (5,7%) apresentou aCL isotipo IgM positivo sendo que uma apresentou heterozigose e outra homozigose para o MTHFR.

Para o grupo controle esta associação foi observada em 8 (22,8%) , onde 2 (5,7%) apresentaram tanto aCL IgG como a IgM, e heterozigose para o MTHFR, 3 (8,6%) apresentaram aCL IgG e homozigose para o MTHFR, e 2 (5,7%) foram observados aCL IgM e heterozigose para o gene C667T da mutação MTHFR e (1) uma homozigose para o MTHFR.

Tabela 15 - Distribuição do gene da mutação do MTHFR e anticorpo anticardiolipina segundo grupo de estudo e controle.

GENE DO MTHFR e ANTICORPO ANTICARDIOLIPINA					
Grupo	Heterozigose + aCL IgG e IgM	Heterozigoto + aCL IgG	Heterozigose + aCL IgM	Homozigose + aCL IgG	Homozigose + aCL IgM
Controle	2 (5,7%)	--	2(5,7%)	3 (8,6%)	1 (2,8%)
Estudo	6 (17,1%)	1(2,8%)	1(2,8%)	--	1 (2,8%)

Foram então, associados à mutação do Fator V Leiden e o anticorpo anticardiolipina (aCL), onde 2 (5,7%) das pacientes do grupo de estudo apresentaram 1 (2,8%) isotipo IgG positivo e 1 (2,8%) isotipo IgM positivo e ambas heterozigose para a mutação do Fator V Leiden.

No grupo controle apenas 1 (2,8%) apresentou isotipo IgG e IgM positivo e heterozigose para a mutação do Fator V Leiden.

Tabela 16 - Distribuição do gene da mutação do Fator V Leiden e anticorpo anticardiolipina segundo grupo de estudo e controle.

GENE DO FATOR V LEIDEN e ANTICORPO ANTICARDIOLIPINA					
Grupo	Heterozigose + aCL IgG e IgM	Heterozigoto + aCL IgG	Heterozigose + aCL IgM	Homozigose + aCL IgG	Homozigose + aCL IgM
Controle	1 (2,8%)	--	--	--	--
Estudo	--	1(2,8%)	1(2,8%)	--	--

A associação entre a mutação do gene da Protrombina (G20210A) com o anticorpo anticardiolipina (aCL), no grupo de estudo foi encontrada em 2 (5,7%), onde 1 (2,8%) apresentou isotipo IgG positivo e 1 (2,8%) apresentou isotipo IgM positivo e ambos heterozigose para mutação.

No grupo controle, 1 (2,8%) das mulheres normais apresentou aCL isotipo IgG positivo e heterozigose para mutação do gene da Protrombina (G20210A).

Tabela 17 - Distribuição do gene da mutação da Protrombina e anticorpo anticardiolipina segundo grupo de estudo e controle.

GENE DA PROTROMBINA e ANTICORPO ANTICARDIOLIPINA					
Grupo	Heterozigose + aCL IgG e IgM	Heterozigoto + aCL IgG	Heterozigose + aCL IgM	Homozigose + aCL IgG	Homozigose + aCL IgM
Controle	--	1 (2,8%)	--	--	--
Estudo	--	1(2,8%)	1(2,8%)	--	--

Dados na literatura confirmam que a trombofilia mais comum é a adquirida, esta se manifesta pelo título elevado de anticorpo antifosfolípide circulante (REGAN et al., 2002).

Em torno de 40% dos pacientes com tromboembolismo e aproximadamente 30% das pacientes com complicações obstétricas, têm associação com trombofilia hereditária (DEKKER et al.,1995; HILLER et al., 1998).

Alguns investigadores têm relatado que pacientes com anticorpos antifosfolípides têm uma chance maior de ter trombofilia hereditária concomitante (OGUNYEMI et al., 2003; BROUWER et al., 2004).

Estudo do *European Prospective Cohort on Thrombophilia* (EPCOT), tem relatado que o fator V Leiden combinado com outro defeito trombofílico tinha um risco aumentado de perda fetal (PRESTON et al., 1996).

Em nosso estudo os resultados sugerem que as perdas fetais recorrentes estão associadas com a trombofilias adquiridas.

Dentre os fatores adquiridos estudados o aCL foi encontrado com maior frequência, tanto no grupo de estudo como no grupo controle, sendo que aCL IgG apresentou uma diferença estatisticamente significativa no grupo de estudo quando comparada ao grupo controle.

Finalmente, teríamos que estar conscientizando as mulheres, quanto ao uso não só de contraceptivos orais como também de certos medicamentos, pois podem desenvolver anticorpos circulantes adquirindo a trombofilia, e a ainda, necessidade de estar implantando testes laboratoriais como *screening* em mulheres que apresenta trombozes ou perdas fetais recorrentes para melhor diagnosticar a síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAF).

8 CONCLUSÃO

- Existe uma associação significativa entre os valores elevados de aCL IgG e IgM no grupo de estudo, o qual nos faz sugerir que a síndrome antifosfolípide (trombofilia adquirida) está intimamente relacionada com os abortos recorrentes.

- A predisposição genética para trombose não se pronunciou em nosso trabalho, talvez devido à seleção das pacientes tanto do grupo de estudo como do controle, a etnia, problemas ambientais, ou até mesmo devido às perdas se deram nos primeiros trimestres gestacionais.

- Nenhuma associação com os anticoagulantes naturais foi observada.

- Houve apenas um caso de associação de três variáveis, na qual esta paciente estava com AVC e seus resultados foram uma associação com trombofilia hereditária e adquirida, pois a mesma apresentava AL positivo, altos títulos do anticorpo anticardiolipina IgG e IgM, hiperhomocisteinemia e heterozigose para MTHFR C677T.

- Novos estudos são necessários para o entendimento de mecanismos e descoberta de novos fatores, ou ainda para minimizar a causa, seja ela hereditária ou adquirida para que se possa desenvolver uma trombopprofilaxia, evitando assim os abortos recorrentes como também outras causas das trombofilias.

REFERÊNCIAS*

ANDERSSON, A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Bioch.**, v.30, p.377-379, 1992.

ARRUDA, V.R. et al. The mutation Ala 677-Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk for arterial disease and venous thrombosis. **Thromb. Haemost.**, v.77, p.818-821, 1997.

BERTINA, R.M. et al. Mutation in the blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature**, v.369, p.64-67, 1994.

BECK, E.A.; CHARACHE, P.; JACKSON, D.P. A new inherited coagulation disorder caused by an abnormal fibrinogen ('fibrinogen Baltimore'). **Nature**, v.208, p.43-45, 1965.

BEVERS, E.M. et al. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. **Tromb. Haemost.**, Stuttgart, v.66, n.6, p.629-632, dec. 1991.

BICK, R.L. Hypercoagulability and thrombosis syndrome. **Med. Clin. North. Am.**, v.78, p.635-665, 1994.

BORCHMAN, D. et al. Interactions and molecular structure of cardiolipin and beta 2-glycoprotein I. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.102, n.2, p.373-378, nov. 1995.

BOWIE, E.J.W. et al. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. **J. Lab. Clin. Med.**, v.62, p.416-430, 1963.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 1997.240p.

BRANCH, D.W. et al. Antiphospholipid antibodies other than lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with recurrent pregnancy loss, fertile controls, and antiphospholipid syndrome. **Obstet. Gynecol.**, v.89, 549-555, 1997.

BRENNER, B. et al. Activated protein C resistance can be associated with recurrent fetal loss. **Br. J. Haematol.**, v.97, n.3, p.551-554, 1997.

BROUWER, J.L. et al. The contribution of inherited and acquired thrombophilic defects, alone or combined with antiphospholipid antibodies to venous and arterial thromboembolism in patients with systemic lupus erythematosus. **Blood**, v.104, p.143-148, 2004.

BUCCIARELLI, P. et al. Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antithrombin, protein C, protein S deficiency, or activated protein resistance. **Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.**, v.19, p.1026-1033, 1999.

CARP, H.J.A. **Antiphospholipid syndrome in pregnancy**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.129-135, 2004.

CARP, H. et al. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. **Human Reproduction** Vol.17, N°6 pp.1633-1637, 2002.

CAVENAGH, J.D.; COLVIN, B.T. Guidelines for the management of thrombophilia. **Postgrad. Med. J.**, v.72, p.87-94, 1996.

CHIUSO F. Avaliação do desempenho dos reagentes do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) utilizados para detectar o anticoagulante lúpico. Tese de Mestrado, UNESP, Botucatu, 2003.

COMP, P.C. et al. Functional and immunologic protein S levels are decreased during pregnancy. **Blood**, v.68, p.881-885, 1986.

CONLEY, C.L.; HARTMANN, R.C. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. **J. Clin. Invest.**, v.31, p.621-622, 1952.

COULAN C.B.; JEYENDRAN R.S.; FISHEL L.A.; ROUSSEV R. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutation are risk factors for recurrent miscarriage. **Am. J. Reprod. Immunol.** v.55, p.360-368, 2006.

COUTO E., et al. Association of anticardiolipin antibody and C677T in methylenetetrahydrofolate reductase mutation in women with recurrent spontaneous abortions: a new path to thrombophilia? **São Paulo Med. J.** v.123, n.1, p.01-12, 2005.

DAHLBÄCK B: Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant pathway. **Thromb. Haemost.**, v.66, p.49-61, 1991.

DAHLBÄCK, M.; CARLSSON, P.; SVENSSON, Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.1004 – 1008, 1993.

D'ANGELO, A.; SELHUB, J. Homocysteine and thrombotic disease. **Blood**, v.90, p.1-11, 1997.

DEN HEIJER, M. et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep vein thrombosis. **N. Engl. J. Med.**, v.334, p.759-762, 1996.

De STEFANO V.; FINAZZI. G.; MANNUCCI. P.M. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes and management. **Blood**, v.87, p.3531-3544, 1996.

DILEY, A. et al. Mutations in the factor V, prothrombin and MTHFR genes are not risk factors for recurrent fetal loss. **J. Matern. Fetal Neonat. Med.**, v.11, p.176-182, 2002,

DIZON-TOWNSON, D.S. et al. The factor V Leiden mutation is not a common cause of recurrent miscarriage. **J. Reprod. Immunol.**, v.34, p.217-223, 1997.

- DONOHUE, S. et al. Ontogeny of beta 2-glycoprotein I and annexin V in villous placenta of normal and antiphospholipid pregnancies. **Thromb. Haemost.**, v.84, p.32-8, 2000.
- EGEBERG, O. Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. **Thromb. Diath. Haemorrh.**, v.13, p.516-530, 1965.
- ESMON, N.L. et al. Antiphospholipid antibodies and the protein C pathway. **J. Autoimmun.**, London, v.15, n.2, p.221-225, sep. 2000.
- ESPANA, F. et al. Factor V Leiden and antibodies against phospholipids and protein S in a young woman with recurrent thromboses and abortion. **Haematology**, v.184, p.80-84, 1999.
- FEINSTEIN, D.I.; RAPAPORT, S.I. Acquire inhibitors of blood coagulation. **Prog. Hemost. Thromb.**, v.1, p.75-95, 1972.
- FINAZZI, G. et al. Natural history in risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies a 4 year prospective study from the Italian registry. **An. J. Med.**, v. 300, n.6, p.530-536, 1996.
- FROSST, P. et al. A candidate genetic risk for vascular disease: a common mutation in methylene tetrahydrofolate reductase. **Nat. Gent.**, v.10, p.111-113, 1995.
- GALLI, M. et al. Interaction between platelets and lupus anticoagulant. **Eur. J. Haematol.**, Copenhagen, v.41, n.1, p.88-94, jul. 1988.
- GALLI, M.; BEVERS, E.M. Beta 2-glycoprotein I for binding of anticardiolipin antibodies to cardiolipin. **Lancet**, London, v.336, n.8720, p.1952-1953, oct. 1990.
- GALLI, M. et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. **Lancet**, London, v.335, n.8705, p.1544-1547, jun. 1990.
- GALLI, M. et al. Anticoagulant activity of β_2 – glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. **Thromb. Haemost.**, Stuttgart, v.68, n.3, p.297-300, sep. 1992.
-

- GALLI, M. et al. Kaolin clotting time and dilute Russell's viper venom time distinguish between prothrombin-dependent and β_2 – glycoprotein I dependent antiphospholipid antibodies. **Blood**, Duluth, v. 86, n.2, p.617-623, jul. 1995.
- GALLI, M.; BARBUI, T. Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. **Blood**, Duluth, v.93, n.7, p.2149-2157, apr. 1999.
- GALLI, M. et al. The risk of thrombosis in patients with lupus anticoagulant is predicted by their specific coagulation profile. **Thromb. Haemost.**, Stuttgart, v.81, n.5, p.695-700, may. 1999.
- GASTINEAU, D.A. et al. Lupus anticoagulant: an analysis of the clinical and laboratory features of 219 cases. **Am. J. Hematol.**, New York, v.19, n.3, p.265-275, jul. 1985.
- GERHARDT, A. et al. Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. **N. Engl. J. Med.**, v.342, p.374-380, 2000.
- GEZER, S. Antiphospholipid syndrome. **Dis. Mon.**, v.49, p.691-742, 2003.
- GIRLING, J.; de SWIET, M. Inherited thrombophilia and pregnancy. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.**, v.10, p.135-144, 1998.
- GOODMAN, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Ann. Math. Stat.**, v.35, n.2, p.716–725, 1964.
- GOODMAN, L.A. On Simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. **Technometrics**, v.7, n.2, p.247–254, 1965.
- GOLDMISMITH, G.H. et al. Inhibition of protrombin activation by antiphospholipid antibodies and beta 2-glycoprotein I. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v.87, p.548-554, jul. 1994.
- GREER, I.A. Thrombophilia: implications for pregnancy outcome. **Thromb. Res.**, v.109, p.73-81, 2003.
-

- GREAVES, M. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. **Lancet**, London, v.353, n.9183, p.1348-1353, apr. 1999.
- HAGUE, W.M. Homocysteine and pregnancy. **Obstet. Gynecol.**, v.17, n.3, p.459-469, 2003.
- HAGUE, W.M. et al. South Australian experience with hyperhomocysteinaemia as a risk factor in obstetrics. Time for a trial? **Nether. J. Med.**, v.52, p.524, 1997.
- HARRIS, E.N.; HUGHES, G.R.; GHARAVI, A.E. Antiphospholipid antibodies: an elderly statesman dons new garments. **J. Rheumatol.**, v.13, suppl. 14, p.208-213, 1987.
- HAYWOOD, L.; BROWN, M.D. Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. **Obstet. Gynecol.**, v.34, p.1-17, 1991.
- HEIJBOER, H. et al. Deficiencies of coagulation inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep vein thrombosis. **N. Engl. J. Med.**, v.332, p.1512-16, 1990.
- HIGASHIRO, M. et al. Anticardiolipin antibody and anticardiolipin beta-2-glycoprotein I antibody in patients with recurrent fetal miscarriage. **J. Perinatol. Med.**, v.26, n.5, p.384-389, 1998.
- HIGGINS J. Pregnancy and the impact of inherited thrombophilias. **Aust N Z J. Obstet. Gynaecol.**, v.40, p.118-121, 2000.
- HIRSH, J.; PIOVELLA, F.; PINI, M. Congenital antithrombin III deficiency: Incidence and clinical features. **Am. J. Med.**, v.87, suppl., p.34-38, 1989.
- HUGHES, G.R. The anticardiolipin syndrome [editorial]. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v.3, p.285-286, 1985.
- KANG, S.S. et al. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. **Am. J. Hum. Genet.**, v.43, p.414-421, 1988.
-

KOSTER, T. et al. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis, Leiden thrombophilia study. **Blood**, v.85, p.2756-2761, 1995.

KRABBENDAM, I. et al. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a critical appraisal of literature. **Rev. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.118, p.143-153, 2005.

KUPFERMINC, M.J. et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. **N. Engl. J. Med.**, v.340, p.9-13, 1999.

LAWRIE, A.S. et al. The sensitivity and specificity of commercial reagents for the detection of lupus anticoagulant show marked differences in performance between photo-optical and mechanical coagulometers. **Thromb. Haemost.**, v.81, p.758-762, 1999.

LEVINE, J.S.; BRANCH, D.W.; RAUCH J. Medical Progress: the antiphospholipid syndrome. **N. Eng. J. Med.**, v.346, n.10, p.752-763, 2002.

LOCKWOOD, C.J. Inherited thrombophilias in pregnant patients. **Prenat. Neonat. Med.**, v.6, p.3-14, 2001.

LOCKWOOD, C.J. Inherited thrombophilias in pregnant patients. Detection and treatment paradigm. **Obstet. Gynecol.**, v.99, p.333-341, 2002.

MACLEAN, M.A. et al. The prevalence of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with a history of first trimester miscarriages. **Br. J. Obstet. Gynecol.**, v.101, p.103-110, 1994.

MALIA, R.G. et al. Inhibition of activated protein C and its cofactor protein S by antiphospholipid antibodies. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v.76, n.1, p.101-107, sep. 1990.

MALM, J. et al. Changes in the plasma levels of vitamin K dependent protein C and protein S and C4b binding protein during pregnancy and oral contraception. **Br. J. Haematol.**, v.68, p.437-444, 1988.

MARGAGLIONE, M. et al. Increased risk for venous thrombosis in carries of prothrombin G (A20210 gene variant). **Ann. Intern. Med.**, v.129, p.89-93, 1998.

MATEO, J. et al. Laboratory evaluation and clinical characterization of 2132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism- results of the Spanish multicentre study on thrombophilia (EMET-study). **Thromb. Haemost.**, v.77, p.444-451, 1997.

MATSUDA, J. et al. Anti-annexin V antibody in systemic lupus erythematosus patients with lupus anticoagulant and/or anticardiolipin antibody. **Am. J. Hematol.**, New York, v.47, n.1, p.56-58, sep. 1994.

MCNEIL, H.P. et al. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that include a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.87, n.11, p.4120-4124, jul. 1990.

MTIRAOU, N. et al. Prevalence of antiphospholipid antibodies, factor V g1691A (Leiden) na prothrombin g20210A mutation in early and late recurrent pregnancy loss. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.119, p.164-170, 2005.

MOUSA, H.A.; ALFIREVIĆ, Z. Thrombophilia and adverse pregnancy outcome. **Croat Med. J.**, v.42, p.135-145, 2001.

NAURATH, H.J. et al. Effects of vitamin B12, folate and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentration. **Lancet**, v.346, p.85-89, 1995.

NELEN, W.L. et al. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. **Lancet**, v.350, p.861, 1997.

NILSSON, I.M. et al. Intrauterine death and circulating anticoagulant "antithromboplastin". **Acta Med. Scand.**, v.197, p.153-159, 1975.

NIMPF, J.; WURM, H.; KOSTNER, G.M. Beta 2-glycoprotein I (apo H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. **Atherosclerosis**, Limerick, v.63, n.2, p.109-114, feb. 1987.

OGUNYEMI, D. et al. Association between inherited thrombophilias antiphospholipid antibodies and lipoprotein A levels and venous thromboembolism in pregnancy. **Am. J. Perinatal.**, v.20, p.17-24, 2003.

OOSTING, J.D. et al. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: na explanation for their pathogenic mechanism? **Blood**, Duluth, v.81, n.10, p.2618-2625, may. 1993.

OSHIRO, B.T. et al. Branch DW. Antiphospholipid antibodies and fetal death. **Obstet. Gynecol.**, v.87, p.489-4993, 1996.

OUT, H.J. et al. Prevalence of antiphospholipid antibodies in patients with fetal loss. **Ann. Rheum. Dis.**, v.50, p.553-557, 1991.

PAIDAS, M.J.; KU, D.H.; ARKEL, Y.S. Screening and management of inherited thrombophilias in the setting of adverse pregnancy outcome. **Clin. Perinatol.**, v.31, p.783-805, 2004.

PARAZZINI, F. et al. Antiphospholipid antibodies and recurrent abortion. **Obstet. Gynecol.**, v.77, p.854-858, 1991.

PARKE, A.L. et al. The prevalence of antiphospholipid antibodies in womes with recurrent spontaneous abortion, women with successful pregnancies, and women who have never been pregnant. **Arth Rheum.**, v.34, 1231-1235, 1991.

PENGO, V. et al. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma protein in patients with thrombosis and phospholipid-reactive antibodies. **Thromb. Haemost.**, Stuttgart, v.75, n.5, p.721-724, may. 1996.

PETRI, M. et al. Antinuclear antibody lupus anticoagulant, and anticardiolipin antibody in women with idiopathic habitual abortion. A controlled prospective study of forty-four women. **Arthritis Rheum.**, v.30, p.601-606, 1987.

PIERONGELI, S.S.; HANNIS, E.N. Clinical laboratory testing for the antiphospholipid syndrome. **Clin. Chim. Acta**, v.357, p.17-53, 2005.

PIHUSCH, R. et al. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v.46, p.124-131, 2001.

POORT, S.R. A common genetic variation in the 3' – untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood**, v.88, p.3698-3703, 1996.

PRESTON, F.E. et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. **Lancet**, v.348, p.913-916, 1996.

PROTEIN REFERENCE UNIT. **HANDBOOK OF CLINICAL IMMUNOCYTOCHEMISTRY**. Sheffield: PRU Publications, 2000.

QUERE, I.; BELLET, H.; HOLFFET, M. A woman with five consecutive fetal deaths: Case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. **Fertil. Steril.**, v.69, p.152-154, 1998.

RAI, R.S.; et al. Antiphospholipid antibodies and beta-2-glycoprotein-I in 500 women with recurrent miscarriage: results of a comprehensive screening approach. **Hum. Reprod.**, v.10, p.2001-2005, 1995.

RAND, J.H. The antiphospholipid syndrome. **Annu. Rev. Med.**, v.54, p.409-24, 2003.

RAND, J.H.; et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome: a possible thrombotic mechanism. **N. Engl. J. Med.**, v.337, p.154-160, 1997.

-
- RAO, A.K.; SHETH, S.; KAPLAN, R. Inherited hypercoagulable states. **Vasc. Med.**, v.2, p.313-320, 1997.
- REES, D.C.; COX, M.; CLEGG, J.B. World distribution of factor V Leiden. **Lancet**, v.346, p.1133-1134, 1995.
- RIDKER, P.M. et al. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 277, p.1305-1307, 1997.
- ROQUE, H. et al. Maternal thrombophilia is associated with second and third trimester fetal death. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.184, S27, 2001. Abstract.
- ROUSENDAL, F.R. Risk factor for venous thrombotic disease. **Thromb. Haemost.**, v.82, p.610-619, 1999.
- ROUBEY, R.A.S. Review: Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. **Arthritis Rheum.**, Philadelphia, v.39, n.9, p.1444-1454, sep. 1996. Disponível em: <http://ovidRoubeyarthritisrheum>. Acesso em 20 dez. 2006.
- ROUBEY, R.A.S. Update on antiphospholipid antibodies. **Curr. Opin. Rheumatol.**, Philadelphia, v.12, n.5, p.374-378, sep. 2000.
- SALAFIA, C.M. et al. Intrauterine growth restriction in infants of less than thirty-two week's gestation: associated placental pathologic features. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.173, p.1049-1057, 1995.
- SARIG, G. et al. Thrombophilic is common in women with pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. **Fertil. Steril.**, v.77, p.342-347, 2002.
- SANSON, B.J. et al. The risk of abortion and stillbirth in antithrombin, protein C, and protein S-deficient women. **Thromb. Haemost.**, v.75, p.387-388, 1996.
-

SCHOUSBOE, I. Beta 2-glycoprotein I: a plasma inhibition of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. **Blood**, Duluth, v.66, n.5, p.1086-1091, nov. 1985.

SHI, W. et al. Anticardiolipin antibodies block the inhibition by beta 2-glycoprotein I of the factor Xa generating activity of platelets. **Thromb. Haemost.**, Stuttgart, v.70, n.2, p.342-345, aug. 1993.

SILVER, R.M. et al. Anticardiolipin antibodies: clinical consequences of "low titers". **Obstet. Gynecol.**, v.87, p.494-500, 1996.

SIMIONI, P. et al. Hyperhomocysteinaemia and deep vein thrombosis. A case control study. **Thromb. Haemost.**, v.76, p.883-886, 1996.

SMIRNOV, M.D. et al. On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies. **J. Clin. Invest.**, New York, v.95, n.1, p.309-316, jan. 1995.

STEINKASSERER, A. et al. Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human beta 2-glycoprotein I. **Biochem. J.**, London, v.277, n.2, p.387-391, jul. 1991.

SUGIMURA, M. et al. Detection of decreased response to activated protein C during pregnancy by an endogenous thrombin potential-based assay. **Semin. Thromb. Hemost.**, v.25, p.497-502, 1999.

SUGI, T.; MCINTYRE, J.A. Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex. **Blood**, Duluth, v.86, n.8, p.3083-3089, oct. 1995.

TAIT, T.C. et al. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. **Thromb. Haemost.**, v.73, p.87-93, 1995.

TAL, J. et al. A possible role for activated protein C resistance in patients with first and second trimester pregnancy failure. **Hum. Reprod.**, v.14, p.1624-1627, 1999.

THALER, E.; LECHNER, K. Antithrombin III deficiency and thromboembolism. **Clin. Haematol.**, v.10, p.369-90, 1981.

UBBINK, J.B. et al. Vitamin B12, vitamin B6 and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinaemia. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.57, p.47-53, 1993.

UNFRIED, G. et al. The C677T Polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and idiopathic recurrent miscarriage. **Am. Coll. Obstet. Gynecol.**, v.99, n.4, p.614-619, 2002.

URI S.; LUBETSKY, A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. **N Engl J Med.**, v.344, n.16, p.1222-1231, 2001.

Van Der PUT, N.M.; ESKES, T.K.; BLOM, H.J. Is the common 677C → T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. **Q. J. Med.**, v.90, p.111-15, 1997.

VINATIER, D. et al. Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriages. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.96, p.137-150, 2001.

VOOBERG, J. et al. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg 506 of factor V. **Lancet**, v.343, p.1535-1536, 1994.

YETMAN, D.L.; KUTTCH, W.H. Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other antiphospholipid antibodies. **Fertil. Steril.**, v.66, p.540-546, 1996.

YOUNIS J.S. et al. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation can occur as well as second-trimester recurrent pregnancy loss. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v.43, p.31-35, 2000.

WALKER, I.D. Thrombophilia in pregnancy **J. Clin. Pathol**, v.53, p.573-580, 2000.

WILSON, W.A. et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. **Arthritis Rheum.**, v.42, p.1309-1311, 1999.

WOUTERS, M.G.A.J.; BOERS, G.H.J.; BLOM, H,L. Hyperhomocysteinemia: A risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. **Fertil. Steril.**, v.60, p.820-825, 1993.

WRAMSBY, M.L. et al. Primary habitual abortions are associated with high frequency of factor V Leiden mutation. **Fertil. Steril.**, v.74, p.987-991, 2000.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2005.

ZAAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4th ed. New Jersey:Prentice-Hall, 1999. 663 p.

ANEXOS





Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junini, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 13.618-970
Fone/fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail: secretaria@fmed.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 07 de novembro de 2005

Nº. 388/2005-CGP

Ilustríssima Senhora
Profª Drª Izolete Aparecida Thomazini Santos
Divisão de Hemocentro
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Izolete,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Trombofilias e abortos recorrentes", de autoria de Lucilene Rossilho Mangerona, orientado por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 07 de novembro de 2005.

Situação do Projeto: APROVADO

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelhippi
Secretário do CEP

ANEXO 2 -
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ fui satisfatoriamente informada sobre o Projeto de Pesquisa: “Trombofilias e Abortos Recorrentes”, desenvolvido na Divisão Hemocentro nos Laboratórios de Hemostasia e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Botucatu.

O trabalho tem como objetivo compreender melhor algumas alterações que acontecem no sangue de mulheres que apresentaram abortos recorrentes. Estou ciente que serão coletados 15 ml de sangue uma vez e a coleta de sangue será feita com material estéril e descartável, não oferecendo risco para minha saúde. Em qualquer momento poderei deixar de participar do projeto, sem prejuízo do atendimento médico. Estou ciente também que a divulgação dos resultados do projeto não serei identificada.

Botucatu, ____ de _____ de 20____.

Lucilene Rossillho Mangerona
Pesquisadora responsável

Paciente

lucilenerm@flash.tv.br - Rua Paraíba, nº 694 - Fone (14) 3433-3967 - Marília-SP.

Profa.Dra.Izolete Ap. Thomazini Santos - Bióloga Responsável pelo laboratório de hemostasia do HC da FM de Botucatu, Fone: (14) 3811-6041 ramal 213 - izolete@fmb.unesp.br

ANEXO 3 –
CONSENTIMENTO ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM
PESQUISA APLICADA

Eu,----- fui satisfatoriamente informada sobre o Projeto de Pesquisa: “Trombofilias e Abortos Recorrentes”, desenvolvido na Divisão Hemocentro nos Laboratórios de Hemostasia e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Botucatu, sobre a necessidade de amostras de sangue para os controles de exames de coagulação de mulheres normais. Estou ciente que serão coletados 15 ml de sangue de uma vez e a coleta de sangue será feita com material estéril e descartável, não oferecendo risco para minha saúde. Estou também ciente caso haja alguma alteração que serei notificado caso se identifique alguma alteração.

Botucatu, de de 2006.

Lucilene Rossilho Mangerona

Controle

lucilenerm@flash.tv.br – Rua Paraíba, nº 694 – Fone (014) 3433-3967- Marília-SP.

ProfªDra.Izolete Ap. Thomazini Santos – Bióloga Responsável pelo laboratório de hemostasia do HC da FM de Botucatu, Fone (014) 3811-6041 ramal 213-

izolete@fmb.unesp.br

**ANEXO 4 –
PROTOCOLO PARA ENTREVISTA DAS PACIENTES DOS GRUPOS DE ESTUDO
E CONTROLE**

Nome: _____ Data: / /

Idade :

Registro: _____ Sexo: ()Fem ()Masc

Cidade: _____ Telefone:

Nº Gestação: ()

Nº Perda: ()

Nº Aborto: ()

1º Aborto:

2º Aborto:

3º Aborto:

4º Aborto:

5º Aborto:

6º Aborto:

7º Aborto:

8º Aborto:

9º Aborto:

Antecedentes Familiares:

Antecedentes Particulares:

Faz uso de Anticoncepcional (Pílula) : sim () não ()

Observação:

ANEXO 5

Protocolo dos Resultados dos Testes Laboratoriais dos grupos estudo e controle

Nome:.....Registro:.....

Método

ACL ☐ aCL IgG (GPL) ☐ aCL IgM (MPL) ElisaClasse do ACL ☐ IgG ☐ IgMAL ☐ Positivo ☐ Negativo CoagulométricoDosagem de Proteína C ☐ ☐ ☐ % CromogênicoDosagem de Proteína S ☐ ☐ ☐ % ElisaDosagem de Antitrombina III ☐ ☐ ☐ % CromogênicoDosagem de Homocisteína ☐ ☐ ☐ µmol/L FPIAFator V de Leiden ☐ Normal ☐ Hetero ☐ Homo PCR-RFLP

Mutação G20210A no gene da protrombina

☐ Normal ☐ Hetero ☐ Homo PCR-RFLPMutação C677 no gene da MTHFR ☐ Normal ☐ Hetero ☐ Homo PCR-RFLP