

EGLÉ CRISTINA COUTO DE CARVALHO

**ESTUDO COMPARATIVO DA FREQUÊNCIA
DE FATORES TROMBOGÊNICOS ENTRE
MULHERES COM ABORTO ESPONTÂNEO
RECORRENTE E MULHERES FÉRTEIS**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Tocoginecologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO BARINI
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. JOYCE MARIA ANNICHINO-BIZZACCHI

UNICAMP
2001

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C253e Carvalho, Egle Cristina Couto de
Estudo comparativo da freqüência de fatores trombogênicos entre mulheres com aborto espontâneo recorrente e mulheres férteis / Egle Cristina Couto de Carvalho. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : Ricardo Barini, Joyce Maria Annichino-Bizzachi
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cardiolipinas. 2. Trombose. 3. Anticorpo. I. Ricardo Barini. II. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: EGLE CRISTINA COUTO DE CARVALHO

Orientador: Prof. Dr. RICARDO BARINI

Co-Orientadora: Profa. Dra. JOYCE MARIA ANNICHINO-BIZACCHI

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 11/09/2001

Dedico este trabalho a

Paula e Júlia

Agradecimentos

Prof. Dr. Ricardo Barini, pela orientação neste trabalho e pela preciosa amizade sedimentada ao longo dos anos

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Prof. Dr. João Luiz Pinto e Silva

Prof. Dr. Renato Passini Júnior

Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

Prof. Dr. Sang Choon Cha

Prof. Dr. Belmiro Gonçalves Pereira

Prof. Dr. Antonio Fernandes Moron

Prof. Dr. José Carlos Gama da Silva

Profa. Dra. Helaine Maria Besteti Mayer Pires Milanez

Profa. Dra. Eliana Martorano do Amaral Freitas da Silva

Profa. Dra. Mary Angela Parpinelli

Profa. Dra. Angela Maria Bacha

Prof. Dr. José Hugo Sabatino

Dra. Fernanda Garanhani de Castro Surita

Dra. Roxana Knobel

Dra. Renata Zaccaria

Dr. Marcelo Luís Nomura

Prof. Dr. Luis Bahamondes

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Ataliba de Carvalho Júnior

Paulo Couto

Neide Gisoldi Couto

Evelyn Regina Couto

Conceição Aparecida Silva Santos

Silmara Inês Ferraz dos Santos Silva

Klesio Divino Palhares

Luzia Gonçalves de Aguiar

William Alexandre Oliveira

Tatiane Giampauli Anacleto

Sueli Chaves

Devanira de Souza Paixão

Lúcia Helena de Siqueira

Andrea Maria Galizoni Quaiotti

Zoraide Fátima Pereira Gregório

Edson Zangiacomi Martinez

Maria Edite de Almeida

Ximena Carmen Arce Spejo

Aparecida Satiko Nagamati Pereira

Arlete da Rocha

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Residentes do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Para a realização deste trabalho foi obtido um financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, processo número 98/12403-0

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	
Resumo	
Summary	
1. Introdução	19
1.1. Causas Adquiridas.....	24
1.2. Causas Hereditárias	30
2. Objetivos	45
2.1. Objetivo geral.....	45
2.2. Objetivos específicos.....	45
3. Sujeitos e Métodos	47
3.1. Seleção dos sujeitos	47
3.2. Técnica laboratorial	49
3.3. Variáveis em estudo	49
3.4. Coleta de dados.....	51
3.5. Tamanho da amostra.....	52
3.6. Processamento e análise dos dados.....	54
3.7. Aspectos éticos.....	55
4. Resultados	57
5. Discussão	65
6. Conclusões	77
7. Referências Bibliográficas	79
8. Bibliografia de Normatizações.....	99
9. Anexos	101
9.1. Anexo 1	101
9.2. Anexo 2.....	103
9.3. Anexo 3.....	125
9.4. Anexo 4.....	127
9.5. Anexo 5.....	129
9.6. Anexo 6.....	131

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

ACGL	Anticoagulante lúpico
ACL	Anticorpo anticardiolipina
AER	Aborto espontâneo recorrente
C677T	Mutação C? T na posição 677
ATIII	Antitrombina III
? 2-GPI	Beta 2-glicoproteína I
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRVVT	<i>Dilute Russell Viper Venom Time</i>
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPI INFO	<i>Epidemiological Information</i>
<i>et al.</i>	E outros (as)
G20210A	Mutação G? A na posição 20210
HC	Número de registro do Hospital de Clínicas da UNICAMP
IC	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
KCT	<i>Kaolin Clotting Time</i>

kD	Kilodaltons
L	Litros
LA	<i>Lupus anticoagulant</i>
M	Molar
µg	Microgramas
µM	Micromoles
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MTHFR	Metileno tetrahidrofolato redutase
NK	<i>Natural killer</i>
Nm	Nanômetros
OR	<i>Odds ratio</i>
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Rpm	rotações por minuto
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TP	Tempo de protrombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcialmente ativado
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
%	Percentual
°C	Graus Celsius

Resumo

A presença de alguns fatores trombogênicos adquiridos e hereditários tem sido associada ao antecedente de aborto espontâneo recorrente (AER). Para avaliar esta associação, foi realizado um estudo caso-controle envolvendo 88 mulheres com antecedente três ou mais abortos espontâneos e consecutivos (Grupo 1) e 88 mulheres com pelo menos uma gestação bem sucedida (Grupo 2), atendidas no Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), e pareadas por raça e idade. Foram pesquisados: anticorpo anticardiolipina (ACL), anticoagulante lúpico (ACGL), deficiência das proteínas C, S e antitrombina III (ATIII), fator V de Leiden, mutação G20210A no gene da protrombina e mutação C677T no gene da enzima metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR). As técnicas utilizadas foram: Enzyme Linked Immunosobent Assay (ELISA) para a pesquisa do ACL, dilute Russell Viper Venom Time (dRVVT) para a pesquisa do ACGL, método coagulométrico para determinação da atividade das proteínas C e S, e método cromogênico para a determinação da atividade da ATIII. Para os métodos de biologia molecular, o DNA foi amplificado através da técnica Polymerase Chain Reaction (PCR). O

ACL foi encontrado em 11 mulheres do Grupo 1 e em uma do Grupo 2 [OR 12,4 (IC 95% 1,5 a 98,5)]. A mutação heterozigota C677T no gene da enzima MTHFR foi encontrada em 59 mulheres do Grupo 1 e em 35 do Grupo 2 [OR 3,1 (IC95% 1,7 a 5,7)]. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos estudados para os demais fatores trombogênicos. O estudo da associação de fatores mostrou que a presença concomitante do ACL e da mutação heterozigota C677T no gene da MTHFR foi detectada em 8 mulheres do Grupo 1 e em nenhuma do Grupo 2 ($p < 0,01$). Concluimos que o ACL e a mutação heterozigota C677T no gene da MTHFR apresentam relação estatística com o antecedente de AER.

Summary

The presence of acquired and heritable thrombogenic factors has been associated with recurrent spontaneous abortion (RSA). A case-control study was performed to evaluate this association. 88 women with three or more spontaneous and consecutive abortions (Group 1) and 88 women with at least one well succeeded pregnancy (Group 2), from Departamento de Tocoginecologia - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), matched by race and age were studied. Blood analysis included anticardiolipin antibody (ACA), lupus anticoagulant (LA), protein C, S and antithrombin III (ATIII) deficiencies, Leiden factor V, mutation G20210A in prothrombin gene and mutation C677T in methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. Laboratory techniques were: ELISA for ACA, dilute Russell Viper Venom Time (dRVVT) for LA, coagulometric method for protein C and S activity and chromogenic method for ATIII activity. DNA was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR). ACL was detected in 11 women from Group 1 and one from Group 2 [OR 12,4 (IC 95% 1,5 a 98,5)]. Heterozygous C677T in MTHFR gene was detected in 59 women from Group 1 and 35 from Group 2 [OR 3,1 (IC95% 1,7 a 5,7)]. No other thrombogenic factor had significant

statistical difference between both groups. The concomitant presence of ACL and heterozygous C677T in MTHFR gene was detected in 8 women from Group 1 and none from Group 2 ($p < 0,01$). We conclude that ACL and heterozygous C677T in MTHFR have statistical association with RSA.

1. Introdução

Dá-se o nome de aborto espontâneo recorrente (AER) à história reprodutiva de três ou mais abortos espontâneos sucessivos, situação que ocorre em 1 a 2% das mulheres em idade reprodutiva (REGAN *et al.*, 1998) e representa um grande desgaste emocional na vida de um casal.

Vários têm sido os fatores associados à ocorrência de AER. Há muito tempo a ciência procura conhecer melhor sua etiologia, buscando alternativas terapêuticas que possam produzir melhores resultados gestacionais. Entretanto, em aproximadamente metade dos casos, a etiologia permanece desconhecida (COSTA *et al.*, 1993), sugerindo a necessidade de novos caminhos para sua elucidação.

Diversos fatores etiológicos têm sido relacionados ao AER. JONES (1949) e CSAPO, PULKKENEN, WIEST, (1973) mostraram a associação entre insuficiência de corpo lúteo e perdas gestacionais precoces. O mecanismo sugerido para estas perdas foi baixa produção de progesterona, levando à maturação endometrial insuficiente para suportar a nidação e desenvolvimento do ovo (BOTELLA,

1962). Consideram-se as ações miorreaxante e imunossupressora da progesterona como adjuvantes na manutenção da gestação inicial (REIN, 1991).

A prevalência dos defeitos da fase lútea nos casos de AER varia de 5,1% a 60% (THO, BYRD, McDONOUGH, 1979; DUDLEY & BRANCH, 1989). Não há consenso a respeito dos critérios de diagnóstico, mas a duração desta fase inferior a onze dias pela curva de temperatura basal tem sido relacionada à insuficiência lútea (LENTON, LANDGREN, SEXTON, 1984). A dosagem de progesterona sérica tem os inconvenientes de sua ampla variação devido ao caráter pulsátil de sua produção e de não revelar a responsividade endometrial. A biópsia de endométrio na fase lútea tardia, mostrando atraso de desenvolvimento histológico maior que dois dias, tem sido o método mais acreditado para o diagnóstico (DALY et al., 1983).

As anomalias cromossômicas estão presentes em 4 a 8% dos casais com antecedente de AER (HARGER *et al.*, 1983). THO *et al.* (1979), estudando 100 casais com este antecedente, encontraram malformações nos abortos de 25 casais. Entretanto, analisando o cariótipo paterno e materno, em apenas 12 casos encontraram translocação cromossômica balanceada. BOUÉ (1988), por sua vez, identificou translocações balanceadas em 7,2% dos casos. A presença de mosaicismo no cariótipo materno ou paterno responderia por uma parcela de abortos recorrentes comparável àquela por translocações balanceadas (SACHS, JOHODA, VAN HEMEL, 1985).

Os defeitos anatômicos do útero são outras causas relatadas de AER. Neste grupo incluem-se a incompetência istmo-cervical, os septos uterinos, os

miomas que fazem saliência para a cavidade uterina e as sinéquias uterinas (COSTA, 1994). A participação dos defeitos anatômicos nos casos de AER é estimada entre 15% e 27% (HARGER *et al.*, 1983; STRAY-PETERSEN & STRAY-PETERSEN, 1984).

Algumas doenças maternas como a hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus e o hipo ou hipertireoidismo, embora sejam mais comumente causa de óbito fetal, podem levar ao AER (PRITCHARD, McDONALD, GANT, 1985; COSLOVSKY & WAISSMAN, 1987; THOMAS & REID, 1987). Infecções maternas por *Chlamydia trachomatis*, *Brucella abortus*, Citomegalovirus, *Toxoplasma gondii*, *Herpes simplex*, *Mycoplasma hominis* e *Listeria monocytogenes* têm sido implicadas como causa de aborto; porém, a maioria dos autores da atualidade é cética em aceitar estas infecções como causa de AER (CARP *et al.*, 1990).

O fator imunológico, tanto alo-imune quanto auto-imune, vem adquirindo um papel cada vez mais importante no estudo dos fatores etiológicos do AER. O fator alo-imune, cujo evento inicial é uma anormalidade que impede a mãe de desenvolver respostas imunológicas essenciais para a sobrevivência do conceito geneticamente estranho (OBER *et al.*, 1999), tem mostrado resultados promissores quando tratado. A atividade aumentada das células NK ("*natural killer*") parece ter relação com pior prognóstico gestacional e aumento na incidência de abortos precoces (AOKI *et al.*, 1995). A imunização com linfócitos suprime a atividade destas células (KWAK *et al.*, 1998). Pacientes que receberam injeção intradérmica de linfócitos do parceiro apresentaram melhores resultados gestacionais do que as que não receberam este tratamento (RAMHORST *et al.*, 2000).

A associação entre auto-anticorpos e perda gestacional já foi amplamente divulgada. Em estudo para avaliar a incidência de anticorpos anti-tireoidianos em mulheres com perda gestacional recorrente ou pré-eclâmpsia, eles foram encontrados em 37,7% das primeiras e em 33,3% das mulheres com pré-eclâmpsia, contra 14,5% dos controles. Esta diferença estatisticamente significativa confirmou a associação entre a auto-imunidade de tireóide e complicações obstétricas (MECACCI *et al.*, 2000). Os anticorpos contra antígenos nucleares e o ácido desoxirribonucleico, encontrados freqüentemente em pacientes com doenças auto-imunes, também já foram associados à ocorrência de AER (KAIDER *et al.*, 1999; QURESHI *et al.*, 2000).

O anticoagulante lúpico (ACGL), um dos anticorpos antifosfolípidos, foi identificado inicialmente em pacientes lúpicas (FEINSTEIN & RAPAPORT, 1972). Posteriormente também foi identificado em pacientes não portadoras de lupus e apresentou associação com o antecedente de AER em várias séries, como será visto adiante. A importância de outros anticorpos antifosfolípidos na gênese do AER foi amplamente descrita na literatura, em especial os anticorpos anticardiolipina (ACL) (HARRIS *et al.*, 1986; TRIPLETT, 1992; KWAK *et al.*, 1994) e antifosfatidiletanolamina (SUGI *et al.*, 1999).

A associação entre AER e o antecedente de trombose venosa materna é bastante conhecida (LUBBE, WALKOM, ALEXANDER, 1982; HUGHES, 1983; HARRIS *et al.*, 1986; TRIPLETT, 1992; MOLTA *et al.*, 1993; ARTHURS *et al.*, 1994). A trombose venosa profunda é uma doença comum. Sua incidência na população geral é de um para cada mil habitantes (POORT *et al.*, 1996).

Fatores de risco bem estabelecidos incluem cirurgia recente, doença maligna, gestação e trabalho de parto, uso de anticoncepcional oral e imobilização prolongada (KOSTER *et al.*, 1993; DALHBACK, 1995).

Trombofilia é um termo aplicado a pacientes com tendência a trombose, com idade precoce ou recorrência freqüente, forte história familiar ou localizações não usuais e migratórias. A definição de trombofilia hereditária é: “tendência geneticamente determinada a tromboembolismo venoso e/ou arterial”. Anormalidades dominantes ou combinações de defeitos menos graves podem expressar-se clinicamente pela ocorrência de trombose espontânea em idade precoce, recorrência freqüente ou história familiar. Tendências leves podem ser descobertas por investigação laboratorial ou pela ocorrência de trombose na presença de fatores de risco. Todas as influências genéticas e suas interações não são, todavia, completamente entendidas (LANE *et al.*, 1996).

A trombofilia familiar pode causar abortos e sérias complicações na gravidez, além de falhas de implantação nos casos de fertilização *in vitro*. Tal estado parece interferir no desenvolvimento do sistema vascular útero placentário, tornando-o ineficaz (GLUECK *et al.*, 2000).

Trombofilia adquirida é a tendência a trombose desenvolvida ao longo da vida, definida pela presença de algum dos fatores trombofílicos sem características hereditárias, como o ACL e o ACGL. A trombofilia hereditária ou adquirida pode ser encontrada em 50 a 65% das mulheres com AER de causa desconhecida (BRENNER, 1999), assim como em mulheres com outras patologias vasculares

placentárias como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intra-uterino e descolamento prematuro de placenta (KUPFERMINC *et al.*, 1999).

As principais causas citadas como responsáveis pela tendência à trombose arterial ou venosa podem ser então didaticamente divididas em adquiridas e hereditárias. Entre as adquiridas, destacam-se o ACL e o ACGL. Dentre as hereditárias, a deficiência das proteínas C, S e antitrombina III (ATIII) e as mutações fator V de Leiden, a mutação G20210A do gene da protrombina e C677T no gene da enzima metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR). Questionamos se estas condições, sabidamente relacionadas com a ocorrência de trombose, podem ser associadas ao AER.

1.1. CAUSAS ADQUIRIDAS

1.1.1. Anticorpo anticardiolipina

O ACL é um dos anticorpos antifosfolípidos, que são imunoglobulinas que reagem contra fosfolípidos de membrana carregados negativamente (TRIPLETT, 1992). A presença deste anticorpo foi associada a eventos trombóticos e à ocorrência de sofrimento fetal, com sugestão de que ele reagiria com antígenos placentários, inibindo o crescimento da placenta e o transporte de nutrientes (LOCKSHIN *et al.*, 1985).

A incidência dos anticorpos antifosfolípidos em gestações normais varia de 0% a 22% (TRIPLETT, 1992). Uma revisão recente resumiu a prevalência dos anticorpos antifosfolípidos em diferentes populações: 5,3% em pacientes obstétricas

normais, 24% em mulheres submetidas a vários ciclos de fertilização *in vitro*, 37% em mulheres com lúpus eritematoso sistêmico e 28% em mulheres com AER (KANERIA & VISHWANATHAN, 1999). Séries retrospectivas e prospectivas de gestantes com anticorpos antifosfolípidos demonstraram claramente que a frequência de morte fetal é mais alta em mulheres com positividade para estes anticorpos (LOCKSHIN, QAMAR, LEVY, 1990), principalmente com o ACL do tipo IgG (LYNCH *et al.*, 1994).

Os títulos de ACL podem variar durante a gestação (COWCHOCK *et al.*, 1984), e sua ascensão parece estar relacionada com pior prognóstico gestacional (KWAK *et al.*, 1994). Quando pacientes com positividade para ACL foram agrupadas segundo os títulos em altamente positivas, fracamente positivas e normais, foi encontrada forte correlação estatística entre trombose, perda fetal recorrente e títulos altamente positivos (HARRIS *et al.*, 1986).

Estudando 737 mulheres saudáveis, LOCKWOOD *et al.* (1989) encontraram associação entre resultados positivos para ACL e recém-nascidos de baixo peso ou aborto espontâneo. Entretanto, na população brasileira, um estudo com 156 mulheres não mostrou associação entre AER e a presença do ACL até seis meses após o aborto (COUTO *et al.*, 1998).

O isótipo do anticorpo tem importância clínica e deve ser avaliado. A presença de altos títulos de IgG parece ser mais significativa do que os títulos de IgM na identificação de mulheres com risco para aborto (HARRIS, 1987;

PARKE, WILSON, MAIER, 1991). Quanto mais alto o nível do ACL-IgG, maior o valor preditivo e a especificidade do teste (HARRIS *et al.*, 1986).

Importantes variações dos resultados laboratoriais dos anticorpos antifosfolípidos durante a gravidez em mulheres com síndrome antifosfolípide não permitem estabelecer o prognóstico da gestação a partir de pesquisas isoladas. A detecção do ACL e do ACGL parece ser significativamente maior no primeiro trimestre da gestação em mulheres que têm a síndrome antifosfolípide, mas resultados transitórios positivos já foram vistos em mulheres sem síndrome antifosfolípide (TOPPING *et al.*, 1999).

Com a evolução das técnicas laboratoriais para a identificação dos anticorpos antifosfolípidos, foi visto que a ligação dos ACL a lipossomas que continham fosfolípidos (cardiolipina ou fosfatidilserina) só se fazia na presença de plasma ou soro, indicando a necessidade de um componente plasmático. Este componente, chamado inicialmente de "ACL-cofator", foi identificado como um polipeptídeo com propriedades muito parecidas com a β 2-glicoproteína I (GALLI *et al.*, 1990). YAMAMOTO *et al.* (1993), estudando gestantes com pré-eclâmpsia, mostraram que a detecção dos anticorpos antifosfolípidos por ELISA utilizando o complexo cardiolipina- β 2-glicoproteína I (β 2-GPI) foi maior do que quando utilizada apenas a cardiolipina. Foi depois confirmado que é necessária a ligação da cardiolipina à β 2-GPI para que ela funcione como antígeno. A β 2-GPI tem efeitos conhecidos sobre a agregação plaquetária, a atividade da protrombinase plaquetária e a via intrínseca da coagulação. Isto fortalece a hipótese de que ela esteja implicada na patogênese dos efeitos trombóticos (KAMPE, 1994).

O estudo do ACL isolado e associado ao anticorpo anti- β 2-glicoproteína I em mulheres com AER mostrou que a presença deste não identifica pacientes adicionais que eram anteriormente negativas para o ACL. A presença do anti- β 2-glicoproteína I apresentou forte associação com a síndrome antifosfolípide, mas não com perda fetal recorrente (LEE et al., 1999).

A descrição da síndrome antifosfolípide na década de 80 deu suporte à “teoria da trombose” para explicar perdas fetais de repetição. Entretanto, a síndrome antifosfolípide explica 5% a 10% dos casos, e o mecanismo de ação não está completamente esclarecido (YOUNIS et al., 2000). A pesquisa de outros fatores de trombofilia faz-se necessária.

Há pacientes com positividade para anticorpos antifosfolípidos sem evidência clínica de trombose, mesmo na presença da β 2-GPI. Para estes, uma possibilidade seria a pesquisa dos anticorpos antifosfolípidos fixadores de complemento. Em um estudo com 189 pacientes com doença reumática, o ACL fixador de complemento foi encontrado em 83,9% dos pacientes com síndrome antifosfolípide. Destes, 96,4% tinham história de trombose ou AER (MUNAKATA et al., 2000).

A pesquisa de história familiar na síndrome antifosfolípide mostrou resultados interessantes. De 108 pacientes com síndrome antifosfolípide, 78% tinham história de um ou mais parentes com pelo menos um parâmetro clínico para a síndrome. Este achado sugere uma contribuição genética para a síndrome antifosfolípide (WEBER et al., 2000).

Recentemente, foi evidenciada a ação supressora do soro de mulheres com AER e testes positivos para o ACL sobre a proliferação de células endoteliais de veias do cordão umbilical (ARAKAWA *et al.*, 1999). Talvez a anormalidade no desenvolvimento do endotélio seja um dos eventos básicos para o desenvolvimento de trombose, sugerindo mais um caminho para novas investigações.

1.1.2. Anticoagulante lúpico

Em 1952, CONLEY & HARTMANN detectaram, em alguns pacientes, um prolongamento inexplicável dos testes de coagulação. Realizando uma mistura de quatro partes de plasma pobre em plaquetas de paciente e uma parte de plasma normal, foi notada a presença de um anticoagulante ou inibidor específico circulante. Em 1954, BEAUMONT¹ descreveu a primeira associação entre perda fetal recorrente e a presença de um anticoagulante. Em 1955 também foi descrito tal anticoagulante em uma paciente com resultados cronicamente falso-positivos para sífilis (FRICK, 1955). Mais tarde foi encontrada associação entre anticorpos circulantes e episódios de trombose (BOWIE *et al.*, 1963). Em 1972 foi proposto o termo anticoagulante lúpico, pois o anticorpo havia sido descrito inicialmente em pacientes portadoras de lupus eritematoso sistêmico. Foi definido como “imunoglobulina que interfere com um ou mais testes de coagulação fosfolípide-dependentes, como o tempo de tromboplastina parcialmente ativado (TTPA) e o tempo de protrombina (TP)” (FEINSTEIN & RAPAPORT, 1972).

¹BEAUMONT apud TRIPLETT, D.A. - Obstetrical complications associated with antiphospholipid antibodies. In: COULAM, C.B.; FAULK, W.P.; McINTYRE, J.Á. (eds.) Immunological obstetrics. London, Norton Medical Books, 1992. p. 379.

O ACGL liga-se a epitopos na porção fosfolipídica da protrombinase (um complexo dos fatores X ativado, V ativado, fosfolípidos e cálcio) (FEINSTEIN, 1985). Notou-se que pacientes com o ACGL não apresentavam maiores sangramentos do que pacientes sem ele, mas sim predisposição a fenômenos tromboembólicos (LOCKSHIN *et al.*, 1990). Entretanto, o termo “anticoagulante lúpico” já estava difundido na literatura e persistiu.

Muitos dos casos de positividade não são encontrados em pacientes com evidência de doença auto-imune, mas sim com história de exposição a drogas (clorpromazina, procainamida, hidralazina, quinidina, antibióticos, fenitoína), de infecções bacterianas, por protozoários (*P. carinii*) e virais (SIDA), e de doenças linfoproliferativas (leucemia, linfoma, macroglobulinemia) (TRIPLETT, 1992).

Os anticorpos antifosfolípidos, o ACGL e os testes biológicos para sífilis freqüentemente são positivos na mesma paciente, variando a concordância entre 0% e 50%. Os níveis de ACGL podem flutuar durante a gestação (LOCKSHIN *et al.*, 1990). Pacientes com ACGL persistentemente elevado têm alto risco para eventos trombóticos venosos e/ou arteriais e perda gestacional. Nas gestações em que este anticorpo está presente, não são raras as complicações que levam à prematuridade ou restrição de crescimento intra-uterino (TRIPLETT, 1992).

GLEICHER & FRIBERG (1985) mostraram forte associação entre a presença do ACGL e perda gestacional recorrente. A presença simultânea do ACGL e outros anticorpos antifosfolípidos parece ter maior associação com abortos precoces (MacLEAN *et al.*, 1994).

1.2. CAUSAS HEREDITÁRIAS

1.2.1. Proteínas C e S

A descoberta das proteínas C e S, dois anticoagulantes naturais do plasma, trouxe novas idéias para o esclarecimento da etiologia das doenças tromboembólicas venosas. A proteína C é uma glicoproteína sintetizada no fígado, dependente da vitamina K (DE STEPHANO, FINAZZI, MANUCCI, 1996). É ativada no endotélio pelo complexo trombina-trombomodulina com a clivagem de ligação peptídica (LANE *et al.*, 1996).

Dentre os fatores de risco hereditários para trombose, a deficiência da proteína C incide em 2 a 5% dos indivíduos com doença tromboembólica e em 10 a 15% dos jovens com trombose recorrente (DALHBACK, 1995). Esta deficiência é transmitida por herança autossômica dominante (DE STEPHANO *et al.*, 1996), e os membros da mesma família que apresentam-na têm risco de 50% de ter trombose antes dos 40 anos de idade.

A prevalência da deficiência de proteína C em mulheres com perdas recorrentes varia na literatura. Um estudo com 52 mulheres com dois ou mais abortos antes de 16 semanas de idade gestacional encontrou deficiência de proteína C em 4,7% (COUMANS *et al.*, 1999). Na avaliação de 424 mulheres com dois ou mais abortos, esta deficiência foi encontrada em 25,5%, mas o número de pacientes que evoluíram para aborto espontâneo na gestação subsequente não variou entre as que tinham deficiência de proteína C e as que não tinham (OGASAWARA *et al.*, 2001).

PRESTON *et al.* (1996), estudando 1384 mulheres, obtiveram resultados que indicaram maior risco de aborto espontâneo e natimortos para deficiências isoladas ou associadas de proteína C, proteína S e ATIII. Entretanto, o *Nimes Obstetricians and Haematologists Study* (NOHA), comparando 500 mulheres com AER e 100 mulheres férteis saudáveis, não mostrou diferença na prevalência da deficiência da proteína C (GRIS *et al.*, 1997).

A proteína S é uma glicoproteína plasmática dependente da vitamina K. É sintetizada no fígado, células endoteliais, megacariócitos e células de Leydig (LANE *et al.*, 1996). Sua deficiência ocorre em 2,2% de pacientes com trombose venosa. Extrapolando para a população geral, para a qual não existem dados disponíveis, chegamos a 1:33.000 (DE STEPHANO *et al.*, 1996).

Estudos envolvendo a deficiência da proteína S em mulheres com AER são raros. Descrições de casos isolados de mulheres com AER e presença de outros fatores de trombofilia, pode-se encontrar a pesquisa da proteína S. ESPANA *et al.* (1999) descreveram o caso de uma mulher que tinha antecedente de AER e que se mostrou positiva para o fator V de Leiden e deficiência da proteína S. Em uma avaliação de fatores de trombofilia em 424 mulheres com dois ou mais abortos de primeiro trimestre, uma alta prevalência da deficiência de proteína S foi encontrada: 44,8%. Da mesma maneira que com a proteína C, a ocorrência de aborto espontâneo na gestação subsequente não diferiu entre as mulheres que tinham ou não deficiência da proteína S (OGASAWARA *et al.*, 2001). Em um estudo com 52 mulheres com dois ou mais abortos antes de 16 semanas, a deficiência de proteína S foi encontrada em

17,4% (COUMANS *et al.*, 1999). Da mesma forma que com a proteína C, o estudo NOHA (Nimes Obstetricians and Haematologists Study) não mostrou diferença quanto à prevalência da deficiência da proteína S entre mulheres com AER e mulheres férteis (GRIS *et al.*, 1997).

1.2.2. Antitrombina III

Em 1965 descreveu-se a deficiência da ATIII (EGEBERG, 1965) e, por muitos anos, a deficiência desta proteína anticoagulante foi a única causa identificada de trombofilia hereditária (DE STEPHANO *et al.*, 1996).

A ATIII é uma glicoproteína plasmática de cadeia única, que pertence à família das serpinas (*Serine Protease Inhibitors*) (LANE *et al.*, 1996). Sintetizada no fígado, inativa a trombina e outras enzimas da anticoagulação pela formação de um complexo entre o sítio ativo da protease e o centro reativo da ATIII (DE STEPHANO *et al.*, 1996). É um dos mais importantes reguladores fisiológicos da formação de fibrina (LANE *et al.*, 1996).

A freqüência da deficiência da ATIII na população geral assintomática é de 1:2.000 a 1:5.000. Em pacientes com história de trombose venosa, ocorre em 1,1% a 2,4%. A herança é autossômica dominante e a maioria é de heterozigotos, com atividade de ATIII variando de 40 a 70% do normal. Homozigotos são extremamente raros (DE STEPHANO *et al.*, 1996).

Aproximadamente metade dos episódios trombóticos ocorre em associação com fatores de risco circunstanciais (cirurgias, gestação, imobilização). Na

deficiência da ATIII, o risco de trombose é considerado maior do que na deficiência da proteína C ou de proteína S, variando, durante a gestação e puerpério, de 31 a 44%. O uso de anticoncepcional oral associa-se com maior risco de trombose, principalmente em mulheres com deficiência da ATIII ou resistência à proteína C ativada (DE STEPHANO *et al.*, 1996).

A queda do nível plasmático de ATIII também já foi relacionada à ocorrência de pré-eclâmpsia. Sugere-se que o dano endotelial que ocorre nesta condição seja resultado de um defeito na anticoagulação natural do plasma, que envolve a ATIII. Sabe-se que a formação de um complexo entre a ATIII e um proteoglican produzido pelo endotélio protege este mesmo endotélio contra a lesão provocada por proteases circulantes. Assim, a deficiência de ATIII deixaria o endotélio vascular mais vulnerável às lesões induzidas por enzimas, funcionando como evento fisiopatológico central na pré-eclâmpsia (GALSTIAN *et al.*, 1992).

Na avaliação de fatores de trombofilia em 424 mulheres com dois ou mais abortos de primeiro trimestre, a prevalência da deficiência de ATIII foi de 5,3% (OGASAWARA *et al.*, 2001). Entretanto, o estudo da prevalência da deficiência da ATIII em mulheres com AER não mostrou diferença quando comparada com aquela de mulheres férteis (GRIS *et al.*, 1997). Em um estudo com 52 mulheres com dois ou mais abortos antes de 16 semanas de idade gestacional, a deficiência da ATIII não foi encontrada (COUMANS *et al.*, 1999).

1.2.3. Fator V de Leiden

O estudo da trombose familiar progrediu muito nos últimos anos. A presença de famílias com trombose sugeria um defeito genético, e vários membros apresentavam resistência à proteína C ativada. Após investigação, excluíram-se alguns dos possíveis mecanismos: uma proteína mutante que atuaria como inibidor da proteína C ativada, um defeito funcional da proteína S, uma mutação no gene do fator VIII, auto-anticorpos contra proteína C ou anticorpos antifosfolípidos inibindo a função da proteína C ativada. As possibilidades restantes eram: uma mutação no gene do fator V alterando um dos sítios de clivagem ou função deficiente de um cofator desconhecido da proteína C ativada. A resistência à proteína C ativada era corrigida por uma fração protéica do plasma normal, que, purificada, mostrou-se idêntica ao fator V intacto, o que sugeriu que a resistência à proteína C ativada fosse resultado de defeito no gene do fator V. Em experimentos com mistura de plasma, a resistência à proteína C ativada foi corrigida por todos os plasmas com deficiências, exceto por aquele com deficiência do fator V. O fator V isolado corrigiu a resistência à proteína C ativada (DALHBACK, 1995).

Foi identificada uma mutação no gene do fator V como base molecular para o fenótipo da resistência à proteína C ativada na maioria dos indivíduos afetados. Esta mutação foi encontrada em 50% das famílias com trombofilia e em 20% dos pacientes com trombose (LANE *et al.*, 1996).

O fator V é uma glicoproteína plasmática de cadeia única, sintetizada no fígado e megacariócitos. Durante a coagulação, é convertido em fator V ativado pela trombina e/ou fator Xa. Atua como cofator não enzimático da protrombinase,

aumentando sua eficiência catalítica em aproximadamente duas mil vezes (LANE *et al.*, 1996).

O fator Va não é apenas um cofator na reação da protrombinase, mas também um cofator na inativação do fator VIIIa pela proteína C ativada. O gene do fator V foi mapeado no cromossomo 1 e está intimamente ligado ao gene da ATIII. (LANE *et al.*, 1996).

Em 1994 foi descrita uma mutação no gene do fator V (fator V de Leiden), responsável por 95% dos casos de resistência à proteína C ativada. A mutação, que ocorre em um dos sítios de clivagem da proteína C ativada no fator V, é uma transição de G para A na posição 1691, que prediz a substituição de arginina por glutamina. Esse fator V mutante é menos susceptível à inativação pela proteína C ativada do que o fator V normal (BERTINA *et al.*, 1994).

A mutação no gene do fator V causa um estado de hipercoagulação através da lentificação da inativação do fator Va pela proteína C ativada (DE STEPHANO *et al.*, 1996). O fator V mutante expressa atividade pró-coagulante normal, mas é menos sensível à degradação mediada pela proteína C ativada, o que resulta em estabilização do complexo protrombinase, aumento na geração de trombina e ativação retrógrada dos fatores V e VIII. A taxa aumentada de ativação da cascata de coagulação, concomitante com a perda da atividade do fator V dependente da proteína C ativada, potencializa a resistência à proteína C ativada e resulta em hipercoagulação (DALHBACK, 1995).

O fator V de Leiden é comum em pacientes com trombose, estando presente em aproximadamente 20% a 40% daqueles com um episódio de trombose venosa profunda. Sua frequência no Brasil é similar à descrita, apesar das diferenças étnicas entre as populações (ARRUDA *et al.*, 1995). A população brasileira é altamente miscigenada e deriva de imigrantes vindos de Portugal, Espanha, Itália, África, Ásia e Europa Central, cuja porcentagem varia nas diferentes regiões do Brasil.

A frequência do fator V de Leiden em populações caucasianas é de aproximadamente 6% (LANE *et al.*, 1996). Estudos em famílias sugerem que o fator V de Leiden é herdado como um traço autossômico dominante (KOSTER *et al.*, 1993; DALHBACK, 1995). Foi encontrada a mutação no gene do fator V na maioria (94%) das famílias com resistência hereditária à proteína C ativada (DALHBACK, 1995).

A alta prevalência do fator V de Leiden na população geral sugere seleção genética positiva envolvida. Durante a evolução, um discreto estado de hipercoagulabilidade pode ter conferido certa vantagem em situações como lesão traumática e gravidez (DALHBACK, 1995).

RAI *et al.* (1996), investigando a relação entre a resistência à proteína C ativada e perdas gestacionais de segundo trimestre, verificaram que a prevalência da resistência à proteína C ativada foi mais alta entre as mulheres com perdas de segundo trimestre, quando comparadas com mulheres com história de perdas no primeiro trimestre e com um grupo controle de multíparas sem história de

abortos. Entretanto, DIZON-TOWSON *et al.* (1997a), estudando 40 casais com AER e 25 casais com fertilidade comprovada (sete ou mais nascidos vivos) não encontraram relação entre a presença do fator V de Leiden e o antecedente de AER. O fator V de Leiden apenas foi encontrado como heterozigose em um parceiro de cada grupo, e em nenhuma das mulheres estudadas. Em outro estudo do mesmo autor, entretanto, foi encontrado um aumento de duas vezes na frequência de aborto nos portadores do fator V de Leiden quando comparada com a frequência de abortos em gestantes não selecionadas (8,6% x 4,2%) e de dez vezes na frequência de infarto placentário quando os portadores eram os fetos (DIZON-OWSON *et al.*, 1997b).

Em 1997, um estudo avaliando mulheres com antecedente de AER em suas gestações atuais, concluiu que a resistência à proteína C ativada, tanto devida à presença da mutação fator V de Leiden quanto a adquirida, é causa potencial de insuficiência vascular placentária (BRENNER *et al.*, 1997).

Uma incidência de 21% foi encontrada para o fator V de Leiden em mulheres com dois ou mais abortos. Destas, sete engravidaram e foram tratadas com enoxaparina 40 mg/dia e ácido acetil salicílico 100 mg/dia desde o início da gestação. Cinco pacientes heterozigotas para o fator V de Leiden, tiveram nascidos vivos. As duas pacientes homozigotas evoluíram para aborto espontâneo (YOUNIS *et al.*, 2000).

Recentemente, foi mostrada clara associação entre a presença do fator V de Leiden e AER. A mutação do fator V de Leiden foi encontrada com maior

freqüência entre abortadoras primárias de segundo trimestre, com três ou mais perdas, e sua freqüência não diferiu entre mulheres com ou sem patologia associada (FOKA *et al.*, 2000). Em estudo brasileiro, o fator V de Leiden foi encontrado em 7,1% de 56 mulheres com AER e em 1,6% de 384 controles saudáveis (SOUZA *et al.*, 1999).

Em um estudo caso-controle em que foram avaliados três tipos de mutação (fator V de Leiden e as mutações G20210A no gene da protrombina e C677T no gene da enzima MTHFR), apenas o fator V de Leiden mostrou associação com o antecedente de AER (WRAMSBY, STEN LINDER, BREMME, 2000).

A presença do fator V de Leiden não é incompatível com resultados gestacionais normais, e algumas mulheres com AER apresentam resistência à proteína C ativada, mas não apresentam mutações (YOUNIS *et al.*, 2000). Por outro lado, há vários relatos sugerindo que o fator V de Leiden não é fator predisponente para AER (BALASH *et al.*, 1997; DIZON-TOWSON *et al.*, 1997a; PAUER, NEESEN, HINNEY, 1998; KUTTEH, PARK, DEITCHER, 1999).

1.2.4. Mutação G20210A no gene da protrombina

A protrombina é o precursor da protease trombina, enzima chave nos processos de hemostasia e trombose, que exibe atividade procoagulante e anticoagulante. Uma transição no gene da protrombina G? A na posição 20210 foi encontrada em 18% dos pacientes com história pessoal e familiar de trombose venosa, em 6,2% de pacientes com primeiro episódio de trombose

venosa profunda (POORT *et al.*, 1996) e em 0,7% a 4 % da população normal (ROSENDAAL *et al.*, 1998).

A mutação G20210A no gene da protrombina parece ser mais comum no sul da Europa (3%) (ROSENDAAL *et al.*, 1998). Portadores do alelo G20210A apresentam níveis plasmáticos de protrombina mais altos do que os controles e risco 2,8 vezes maior de trombose (POORT *et al.*, 1996). Na população brasileira, esta mutação foi encontrada em 6,2% dos pacientes com trombose venosa profunda (ARRUDA *et al.*, 1997).

O alelo G20210A está associado com níveis elevados de protrombina. Os portadores têm níveis de protrombina mais altos, e este aumento, por si só, é fator de risco para trombose (POORT *et al.*, 1996).

O nível elevado de protrombina pode ser considerado um mecanismo para trombose, mas outros fatores além do alelo G20210A podem ser responsáveis. Não é claro como os níveis elevados de protrombina estimulariam a formação de trombose. Eles podem causar um desequilíbrio entre os sistemas procoagulante e anticoagulante (POORT *et al.*, 1996).

Em oitenta pacientes com AER e cem controles saudáveis, a mutação G20210A no gene da protrombina foi encontrada com maior frequência nas primeiras, sendo responsável por um risco quatro vezes maior de aborto. A prevalência deste polimorfismo não diferiu significativamente entre mulheres com dois abortos e mulheres com três ou mais, mas conferiu risco significativo para aborto primário (FOKA *et al.*, 2000). Esta mutação também foi encontrada com maior

freqüência em mulheres com pré-eclampsia, descolamento prematuro de placenta, restrição de crescimento intra-uterino e óbito fetal (KUPFERMINC *et al.*, 1999).

1.2.5. Mutação C677T no gene da metileno tetraidrofolato redutase

Após observar a indução de óbito fetal pelo antagonista do ácido fólico, ácido 4-aminopteroilglutâmico, THIERSCH, em 1952, sugeriu que os abortos poderiam ser causados por deficiência de ácido fólico. Vários estudos investigaram a relação entre a deficiência de folato e perdas gestacionais precoces nas décadas subsequentes (FRIEDMAN *et al.*, 1977). Concluiu-se que baixas concentrações de folato poderiam identificar mulheres com predisposição ao aborto espontâneo. Um estudo posterior não encontrou baixas concentrações de folato, mas a investigação foi feita após a gestação, e não no seu decorrer (WOUTERS *et al.*, 1993). Outros marcadores de disfunção no mecanismo de folato mostraram relação com perdas gestacionais recorrentes e precoces, incluindo a concentração total elevada de homocisteína plasmática (STEEGERS-THEUNISSEN *et al.*, 1992; WOUTERS *et al.*, 1993; QUERE *et al.*, 1998; COUMANS *et al.*, 1999).

A homocisteína é um aminoácido derivado da conversão metabólica da metionina. No metabolismo intracelular, sofre remetilação para metionina ou transulfuração para cisteína, estando envolvidos neste processo o folato e a cobalamina ou vitamina B12 (DE STEPHANO *et al.*, 1996; NELEN *et al.*, 2000). A homocisteína é oxidada no plasma em homocistina e homocisteína-cistina, ambas referidas como homocisteína total (DE STEPHANO *et al.*, 1996). Várias condições herdadas ou adquiridas podem causar hiperhomocisteinemia, como

deficiências de vitaminas, causas genéticas ou atividade enzimática reduzida (DE STEPHANO *et al.*, 1996; NELEN *et al.*, 2000).

A insuficiência renal crônica e outros fatores que interferem com o metabolismo do folato, como o uso de metotrexate ou anticonvulsivantes, ou com o metabolismo da cobalamina, como o óxido nítrico, podem causar hiperhomocisteinemia leve ou moderada. A hiperhomocisteinemia leve ou moderada aumenta o risco para acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio, doença arterial periférica e estenose das artérias carótidas extracranianas (DE STEPHANO *et al.*, 1996).

A frequência da hiperhomocisteinemia severa na população geral é 1:200.000 a 1:335.000. Indivíduos afetados apresentam retardo mental, anomalias esqueléticas, doença vascular arterial prematura e trombose venosa profunda com ou sem embolia pulmonar (64%), tromboflebite (24%) e trombose de veias cerebrais ou mesentéricas (12%) (DE STEPHANO *et al.*, 1996).

Recentemente, a mutação C677T no gene da MTHFR foi descrita como maior responsável pela hiperhomocisteinemia moderada. Essa mutação leva à formação da enzima MTHFR termolábil, que apresenta apenas 50% de atividade, o que explica o aumento da homocisteína plasmática (LANE *et al.*, 1996). Na população brasileira normal, esta mutação foi encontrada em 8,6% dos indivíduos (SEIXAS *et al.*, 2000).

O primeiro estudo a sugerir uma associação entre hiperhomocisteinemia e AER foi publicado em 1992 (STEEGERS-THEUNISSEN *et al.*). Posteriormente,

outros confirmaram tais achados (WOUTERS *et al.*, 1993; COUMANS *et al.*, 1999). Um estudo que avaliou 100 mulheres com AER, a hiperhomocisteinemia foi encontrada em 12%. Destas, 20% apresentavam a mutação C677T no gene da MTHFR, e 15% tinham baixa concentração de folato plasmático. As mulheres que apresentavam a associação destes dois fatores tinham maiores níveis de homocisteinemia (QUERE *et al.*, 1998).

A comparação dos riscos relativos associados a altas concentrações de homocisteína e baixas concentrações de folato mostrou diferenças entre as abortadoras primárias e secundárias. Em abortadoras primárias, o metabolismo alterado de homocisteína ou folato pareceu ter efeito maior do que em abortadoras secundárias, sugerindo que, nas primeiras, o distúrbio pode ser permanente, decorrendo de distúrbio metabólico intrínseco, e não ambiental. O risco relativo para AER aumentou conforme diminuíram os níveis séricos de ácido fólico e aumentaram os de homocisteína (NELEN *et al.*, 2000).

Estudando apenas os casos de homozigose na mutação C677T no gene da MTHFR, FOKA *et al.* (2000) não encontraram associação entre esta mutação e o antecedente de AER, o que confirma outros encontrados na literatura (KUTTEH *et al.*, 1999).

Para outras complicações gestacionais, como pré-eclâmpsia severa, descolamento prematuro de placenta, restrição de crescimento intra-uterino e óbito fetal, a comparação entre mulheres com pelo menos uma destas complicações e mulheres que tiveram gestações não complicadas, mostrou que a homozigose

para a mutação C677T no gene da MTHFR esteve presente nas primeiras com diferença estatisticamente significativa (KUPFERMINC *et al.*, 1999).

Está bem estabelecido que combinações de fatores de trombofilia, hereditários ou adquiridos, aumentam o risco de trombose (ZÖLLER *et al.*, 1995). Questiona-se se estas combinações também podem aumentar o risco de AER (BRENNER, 1999).

A ocorrência de AER pode alterar completamente a vida de um casal, fazendo com que seu dia-a-dia passe a existir em função da identificação de algum possível fator etiológico que permita o tratamento e evolução normal de uma futura gestação. Além disso, todo o núcleo familiar (pais, sogros, irmãos, primos) acaba por se envolver na investigação e sugerir algum tipo de tratamento, tornando a situação, por muitas vezes, insustentável emocionalmente e de grande sofrimento. Este é, na maioria das vezes, o cenário que o médico que trata pacientes com AER encontra em seus primeiros contatos com o casal. A ansiedade salta aos olhos frente à possibilidade de novas investigações que possam levar à identificação de algum fator etiológico, com conseqüente possibilidade terapêutica. Assim, justificam-se os esforços para que sejam realizadas pesquisas nesta linha, abrindo novos caminhos para que casais com AER possam vir a ter, no futuro, gestações bem sucedidas. A maior parte dos fatores trombofílicos aventados como possíveis fatores etiológicos para AER gera, ainda, muita controvérsia na literatura mundial. Para tentar contribuir no esclarecimento destas questões, foi realizado este trabalho.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a associação entre a presença de fatores trombogênicos e o antecedente de AER.

2.2. Objetivos específicos

1. Comparar a frequência dos fatores trombogênicos adquiridos, ACL e ACGL, entre mulheres com antecedente de AER e mulheres que tiveram pelo menos uma gestação bem sucedida.
2. Comparar a frequência dos fatores trombogênicos hereditários, deficiência das proteínas C, S e ATIII e mutações fator V de Leiden, G20210A no gene da protrombina e C677T no gene da MTHFR, entre mulheres com antecedente de AER e mulheres que tiveram pelo menos uma gestação bem sucedida.
3. Pesquisar qual associação destes fatores está estatisticamente associada ao antecedente de AER.

3. Sujeitos e Métodos

3.1. Seleção dos sujeitos

Desenvolveu-se um estudo caso-controle no período de janeiro de 1999 a agosto de 2000 envolvendo, no Grupo 1, 88 mulheres do Ambulatório de Aborto Recorrente do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), que apresentavam antecedente de AER, ou seja, três ou mais abortos espontâneos consecutivos.

No Grupo 2, foram incluídas 88 mulheres do Ambulatório de Planejamento Familiar do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Para compor este grupo, as mulheres deveriam ter o antecedente de pelo menos uma gestação bem sucedida. Os critérios de exclusão para o Grupo 2 foram: história de AER, óbito fetal de causa desconhecida, fenômenos tromboembólicos, hipertensão gestacional, má história obstétrica ou baixo peso ao nascer. O prazo máximo entre o último parto e a data da coleta de sangue foi de dois anos; o prazo mínimo foi de seis meses.

As pacientes dos dois grupos foram pareadas por idade (até 20 anos, 21 a 25 anos, 26 a 30 anos, 31 a 35 anos, 36 anos ou mais) e por raça/cor (branca ou não branca, até terceira geração ascendente).

Todas foram informadas sobre os objetivos e a metodologia do estudo, e admitidas após a assinatura do termo de “Consentimento Pós-Informação” (Anexo 1).

Foram coletados de cada paciente 40 mL de sangue de veia periférica, com seringa e agulha descartáveis, para pesquisa do ACL, ACGL, deficiência das proteínas C, S e ATIII e as mutações fator V de Leiden, G20210A no gene da protrombina e C677T no gene da MTHFR, através do estudo do ácido desoxirribonucleico (DNA).

Quando os resultados de dosagem de proteína C ou S encontravam-se abaixo dos valores normais (Anexo 2), as pacientes de ambos os grupos estudados foram reconvocadas e, após a reposição preventiva com vitamina K por via oral (1 ampola de 10mg de Kanakion® por dia por 3 dias), o exame foi repetido. Quando os resultados da dosagem de antitrombina encontravam-se abaixo dos valores normais (Anexo 2), as pacientes também foram reconvocadas para nova coleta.

As pacientes admitidas no estudo continuaram seu seguimento de rotina nos Ambulatórios de Aborto Recorrente ou Planejamento Familiar.

3.2. Técnica laboratorial

As técnicas laboratoriais utilizadas são descritas no Anexo 2.

3.3. Variáveis em estudo

3.3.1. Apresentação das variáveis

- ? Variável dependente: AER
- ? Variáveis independentes: ACL, ACGL, deficiência da proteína C, deficiência da proteína S, deficiência da ATIII, fator V de Leiden, mutação G20210A no gene da protrombina, mutação C677T no gene da MTHFR.
- ? Variáveis de controle: raça/cor, idade, número de gestações, número de partos, número de abortos espontâneos, número de filhos vivos, número de natimortos.

3.3.2. Definição das variáveis e conceitos

- ? ACL: imunoglobulina que reage contra a cardiolipina, um fosfolípide carregado negativamente. Sua presença será definida como identificação do anticorpo IgG ou IgM específico, pelo método ELISA. Categorias: positivo, negativo.
- ? ACGL: imunoglobulina que interfere com um ou mais testes de coagulação fosfolípide-dependentes, como o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) e o tempo de protrombina (TP). Categorias: positivo, negativo.

- ? Proteína C: glicoproteína sintetizada no fígado, dependente da vitamina K, que é considerada anticoagulante natural do plasma. Categorias: normal, deficiente.
- ? Proteína S: glicoproteína plasmática dependente da vitamina K. É sintetizada no fígado, células endoteliais, megacariócitos e células de Leydig, e é considerada anticoagulante natural do plasma e cofator da proteína C. Categorias: normal, deficiente.
- ? ATIII: glicoproteína plasmática de cadeia única, com função anticoagulante e que pertence à família das serpinas. Categorias: normal, deficiente.
- ? Fator V de Leiden: mutação G1691A no gene do fator V, base molecular para o fenótipo da resistência à proteína C ativada. Categorias: homozigoto, heterozigoto e ausente.
- ? Mutação G20210A: mutação no gene da protrombina, que leva ao aumento dos níveis plasmáticos da mesma. Categorias: homozigoto, heterozigoto e ausente.
- ? Mutação C677T no gene da MTHFR: mutação no gene que codifica a enzima MTHFR, cuja deficiência leva ao aumento da homocisteína e conseqüente hiperhomocisteinemia. Categorias: homozigoto, heterozigoto e ausente.
- ? AER: três ou mais abortos espontâneos consecutivos, ou seja, eliminação por via vaginal de feto com peso inferior a 500 gramas e/ou idade gestacional inferior a 20 semanas, com ou sem sinais de vitalidade, comprovados por curetagem uterina ou exame anatomopatológico do material. Categorias: presente, ausente.

- ? Raça/cor: foi definida através da pesquisa da raça/cor dos parentes até terceira geração ascendente, através de heredograma e da visualização da paciente. Categorias: branca, não branca.
- ? Idade: em anos completos.
- ? Número de gestações: número de gestações referidas pela paciente até a data de admissão no estudo, independente da forma de término.
- ? Número de partos: número de partos por via vaginal ou cesariana, com idade gestacional superior a 20 semanas, de feto vivo ou morto.
- ? Número de abortos espontâneos: número de vezes em que ocorreu a eliminação por via vaginal de feto com peso inferior a 500 gramas e/ou idade gestacional inferior a 20 semanas, com ou sem sinais de vitalidade, comprovados por curetagem uterina ou exame anatomopatológico do material até a data de admissão no estudo.
- ? Número de filhos vivos: número de filhos naturais vivos até a data do estudo.
- ? Número de natimortos: número de filhos nascidos sem sinais de vitalidade, com idade gestacional superior a 20 semanas.
- ? Gestação bem sucedida: gestação cujo parto tenha ocorrido após 37 semanas de idade gestacional, com nascido vivo com peso maior que 2500 g, e que não tenha obituado antes de 28 dias de vida.

3.4. Coleta de dados

Foi preenchida inicialmente uma ficha individual para cada paciente (Anexo 3), complementada posteriormente com os dados relativos a exames laboratoriais.

As fichas das pacientes foram identificadas por um anexo (Anexo 4) no qual constavam nome, HC, número no estudo e data. Após a coleta de todos os dados, estes anexos foram retirados, persistindo nas fichas apenas o número da paciente no trabalho, sem identificação da mesma. Os anexos de identificação foram guardados até que as pacientes com resultados positivos fossem notificadas e orientadas quanto a seu significado, sendo posteriormente destruídos.

3.5. Tamanho da amostra

Para o cálculo do tamanho da amostra, foram utilizadas as incidências do ACL, do ACGL, da deficiência das proteínas C, S e ATIII, do fator V de Leiden, da mutação G20210A no gene da protrombina e da mutação C677T no gene da MTHFR na população geral e nas pacientes com AER.

Para o cálculo da prevalência do ACL na população geral e nas pacientes com AER, foi feita a média das prevalências descritas em catorze trabalhos selecionados com um mesmo desenho de estudo (CLAUVEL et al., 1986; COWCHOCK, SMITH, GOCIAL, 1986; HARMON, LEE, PROVOST, 1986; LOCKWOOD et al., 1989; BRANCH, 1987; PETRI et al., 1987; SCOTT, ROTE, BRANCH, 1987; UNANDER et al., 1987; BARBUI et al., 1988; LOCKWOOD et al., 1989; McHUGH, KOMANN, BLAND, 1988; PATTISON, CHAMLEY, McKAY, 1988; TCHOBROUTSKY et al., 1988; HARRIS, HILL, SPINATTO, 1991). A média encontrada foi de 5,5% e 22,6%, respectivamente.

Para o cálculo da incidência do ACGL na população geral e nas pacientes com AER foi utilizada a mesma metodologia (MacLEAN et al., 1994; ESCHWÈGE et al., 1998; METZ et al., 1998). A média encontrada foi de 6% e 16%, respectivamente.

A mesma metodologia foi utilizada para o cálculo da incidência da deficiência da proteína C, da proteína S e da ATIII (PABINGER et al., 1992; AWIDI et al., 1993; WINKLER et al., 1996) na população geral e nas pacientes com AER. As médias encontradas foram 0,1% e 4,0%; 0,05% e 3,5% e 0,05% e 1,1% , respectivamente.

Para o cálculo da incidência do fator V de Leiden na população geral (incluindo a população brasileira) e nas pacientes com AER, foram utilizadas as incidências descritas por GRANDONE et al. (1997) e RIDKER et al. (1998). A média encontrada foi de 4,0% e 16,6%, respectivamente.

Para o cálculo da incidência da mutação G20210A no gene da protrombina na população geral e nas pacientes com AER, foram utilizadas as incidências descritas por ROSENDAAL et al. (1988) e FOKA et al. (2000). A média encontrada foi de 0,7% e 8%, respectivamente.

Para o cálculo da incidência da mutação C677T na população geral (incluindo a população brasileira) e nas pacientes com AER, foram utilizadas as incidências descritas por ARRUDA et al. (1997), QUERE et al. (1998) e COUMANS et al. (1999). A média encontrada foi de 4,0% e 20%, respectivamente.

Foram então utilizadas as médias encontradas para o cálculo do tamanho amostral através do programa EPI INFO versão 2000 para cada uma das variáveis estudadas, utilizando-se o maior “n”.

Para um Erro Tipo I de 0,05 e Erro Tipo II de 0,2 foi encontrado um $n = 170$. Estudamos um total de 176 mulheres, sendo 88 em cada grupo, pareadas segundo a raça/cor e idade.

3.6. Processamento e análise dos dados

As informações coletadas foram armazenadas em um banco de dados gerado pelo software EPI-INFO versão 2000. Para análise, este banco de dados foi exportado para o software SAS versão 8.0.

A associação entre o resultado de cada exame e os grupos estudados (1 ou 2) foi medida pelo seu respectivo *odds ratio* (OR). Para obter esta medida ajustada pela idade, utilizaram-se modelos de regressão logística. Testes exatos de Fisher foram utilizados para testar a relação entre fatores associados e o antecedente de AER. Em toda a análise estatística, consideraram-se significantes os resultados onde os p valores eram menores que 5%.

3.7. Aspectos éticos

As pacientes selecionadas para o estudo foram informadas sobre os objetivos e metodologia da pesquisa, podendo ou não aceitar participar da mesma, sem constrangimento ou modificação de sua assistência médica.

A coleta foi feita durante o atendimento ambulatorial, sendo retirada quantidade de sangue não prejudicial à saúde da paciente. Não houve necessidade de mudança da rotina de atendimento, e nem ônus para a paciente.

Foram obedecidos os princípios enunciados na Declaração de Helsinque, adotada pela 18ª Assembléia Médica Mundial Helsinque, Finlândia, em junho de 1964 e corrigida pelas:

- ? 29ª Assembléia Médica Mundial Tóquio, Japão, em outubro de 1975
- ? 35ª Assembléia Médica Mundial Veneza, Itália, em outubro de 1983
- ? 41ª Assembléia Médica Mundial Hong Kong, em setembro de 1989
(Anexo 5)

4. Resultados

A média de idade das pacientes do Grupo 1 foi de 30,4 anos (19 a 40 anos) e do Grupo 2 foi de 29,7 anos (18 a 38 anos). Não houve diferença estatística, dado que as pacientes foram pareadas de acordo com a idade, em grupos de 5 anos.

As pacientes do Grupo 1 tiveram, no total, 346 gestações. Destas, 26 evoluíram para parto e 320 evoluíram para aborto espontâneo. As pacientes do Grupo 2 tiveram, no total, 181 gestações, e todas evoluíram para parto. Na Tabela 1 podemos notar o pareamento feito por raça/cor e a distribuição do número de partos e abortos por grupo estudado.

Não houve diferença na distribuição da raça/cor entre os dois grupos estudados, dado que o pareamento foi feito para cada paciente que deu entrada no estudo. Eram brancas 61,4% das mulheres em cada grupo.

O número médio de gestações foi de 3,93 para as mulheres do Grupo 1 e 2,05 para as mulheres do Grupo 2.

Das pacientes do Grupo 1, 55,7% tinham três gestações, e 44,3% quatro ou mais. No Grupo 2, 36,4% tinham apenas uma gestação. Quanto aos abortos espontâneos, 64,8% das pacientes do Grupo 1 tinham três perdas, enquanto 35,2% tinham quatro ou mais perdas anteriores.

TABELA 1
DISTRIBUIÇÃO DE RAÇA/COR, NÚMERO DE GESTAÇÕES E NÚMERO DE ABORTOS
DAS PACIENTES SEGUNDO GRUPO DE ESTUDO

	Grupo 1		Grupo 2	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>Raça/cor</i>				
Branca	54	61,4	54	61,4
Não branca	34	38,6	34	38,6
<i>Gestações</i>				
1	0	0	32	36,4
2	0	0	31	35,2
3	49	55,7	19	21,6
4 ou mais	39	44,3	6	6,8
<i>Abortos</i>				
Nenhum	0	-	88	-
3	57	64,8	-	-
4	15	17,1	-	-
5	9	10,2	-	-
6	6	6,8	-	-
8	1	1,1	-	-
Total	88	100,0	88	100,0

O anticorpo anticardiolipina foi encontrado em onze mulheres do Grupo 1 e em uma do Grupo 2, diferença estatisticamente significativa [OR 12,4 (1,5 a 98,5)]. O ajuste por idade não mostrou diferenças quanto ao OR bruto.

O anticoagulante lúpico foi detectado em uma paciente do Grupo 1 e em nenhuma do Grupo 2, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A deficiência de proteína S foi encontrada em uma mulher do Grupo 1 e em nenhuma do Grupo 2, diferença estatisticamente não significativa. A deficiência de proteína C, da mesma forma, foi detectada em duas mulheres do Grupo 1 e em nenhuma mulher do Grupo 2, não havendo também diferença entre os grupos.

A deficiência de ATIII não mostrou diferença estatística entre os dois grupos, tendo sido encontrada em uma mulher do Grupo 1 e em nenhuma do Grupo 2.

O fator V de Leiden somente foi encontrado em sua forma heterozigota, em três pacientes do Grupo 1 e em nenhuma do Grupo 2. Esta diferença não foi estatisticamente significativa.

A mutação G20210A no gene da protrombina foi detectada em uma paciente de cada Grupo [OR 1,1 (0,06 a 16,20)], ambas heterozigotas.

A mutação C677T no gene da enzima MTHFR foi encontrada em 59 mulheres do Grupo 1 e em 35 do Grupo 2 [OR 3,1 (1,7 a 5,7)]. Todos estes resultados podem ser observados na Tabela 2.

TABELA 2
DISTRIBUIÇÃO DOS FATORES TROMBOGÊNICOS ENTRE OS DOIS GRUPOS ESTUDADOS

	Grupo 1 (n=88)		Grupo 2 (n=88)		OR bruto (IC 95%)	OR aj. Por idade ^{(1) (2)} (IC 95%)
Anticorpo anticardiolipina	11	12,5	1	1,1	12,4 (1,5 a 98,5)	12,9 (1,5 a 109,5)
Anticoagulante lúpico	1	1,1	0	0	(3)	(3)
Deficiência proteína S	1	1,1	0	0	(3)	(3)
Deficiência proteína C	2	2,3	0	0	(3)	(3)
Deficiência AT III	1	1,1	0	0	(3)	(3)
Fator V de Leiden	3	3,4	0	0	7,2 (0,3 a 142,4) ⁽⁴⁾	(5)
G20210A protrombina	1	1,1	1	1,1	1,0 (0,06 a 16,2)	1,0 (0,04 a 22,8)
C677T MTHFR	59	67,0	35	39,8	3,1 (1,7 a 5,7)	3,3 (1,6 a 6,6)

- a)** o ajuste por idade foi realizado conforme um modelo múltiplo de regressão logística
- b)** a idade, aqui considerada uma variável de controle, foi categorizada em sextis para contornar o pressuposto de associação linear exigido pelo modelo de regressão logística
- c)** não avaliado, pelo reduzido tamanho amostral. Realizado Teste Exato de Fisher.
- d)** OR aproximado, calculado somando 0,5 a cada freqüência absoluta da tabela de contingência (AGRESTI, 1990)
- e)** o OR ajustado por idade não pôde ser calculado por não haver casos heterozigotos de Leiden no grupo controle

A Tabela 3 mostra a distribuição da homozigoze e heterozigoze da mutação C677T no gene da MTHFR nos dois grupos. Notamos que a diferença foi estatisticamente significativa quando comparamos a presença da mutação

heterozigota e a ausência de mutação entre os dois grupos estudados. Quando comparamos a presença da mutação homozigota e a ausência da mutação entre os dois grupos, não foi notada diferença estatisticamente significativa.

A análise da distribuição da frequência de alelos mutantes entre os dois grupos mostra que também houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 4).

TABELA 3
DISTRIBUIÇÃO DE HOMOZIGOZE E HETEROZIGOZE NA MUTAÇÃO C677T NO GENE DA MTHFR ENTRE OS DOIS GRUPOS

Mutação C677T no gene da MTHFR	Grupo 1		Grupo 2		p
	(n)	%	(n)	%	
Homozigota [A]	12	13,6	9	10,2	A x C = 0,06
Heterozigota [B]	47	53,4	26	29,5	B x C = 0,0003
Ausente [C]	29	33,0	53	60,2	
Total	88	100,0	88	100,00	

TABELA 4
DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA NO GENE DA MTHFR ENTRE OS DOIS GRUPOS

Alelo	Grupo 1		Grupo 2		p
	(n)	%	(n)	%	
Mutante (T)	71	40,3	44	25,0	0,002
Normal (C)	105	59,7	132	75,0	
Total	176	100,0	176	100,00	

Quando avaliamos o total das pacientes estudadas segundo a raça/cor, dividindo-as em brancas e não brancas, pudemos notar que não houve diferença estatística na distribuição dos fatores estudados (Tabela 5).

TABELA 5
DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS FATORES TROMBOGÊNICOS ESTUDADOS
SEGUNDO RAÇA/COR

Fator trombogênico	Raça/cor		p
	Branca	Não branca	
Anticorpo anticardiolipina	9,3	2,9	NS
Anticoagulante lúpico	0,9	0	NS
Deficiência proteína C	1,8	0	NS
Deficiência proteína S	0,9	0	NS
Deficiência ATIII	0,9	0	NS
Fator V de Leiden	2,8	0	NS
Mutação G20210A protrombina	1,8	0	NS
Mutação C677T homozigota	40,7	42,6	NS
Mutação C677T heterozigota	9,3	16,2	NS
(n)	(108)	(68)	

NS – não significativo

A análise da associação de fatores e sua comparação entre os dois grupos estudados mostrou que o ACL e a mutação heterozigota C677T no gene da MTHFR estiveram simultaneamente presentes em oito mulheres do Grupo 1 e em nenhuma do Grupo 2, sendo esta diferença estatisticamente significativa. A associação do ACL com mutação homozigota C677T no gene da MTHFR e

com os outros fatores trombogênicos estudados não mostrou diferença significativa entre os dois grupos (Tabela 6).

Da mesma forma, a associação da mutação heterozigota C677T no gene da MTHFR com os outros fatores estudados não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, como pode ser visto na Tabela 7. A mutação homozigota C677T no gene da MTHFR não apresentou associação com qualquer dos fatores de trombofilia estudados.

TABELA 6
DISTRIBUIÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O ACL E OS OUTROS FATORES
TROMBOGÊNICOS ESTUDADOS ENTRE OS DOIS GRUPOS

Associação de fatores		Grupo 1		Grupo 2		p [*]
		(n)	%	(n)	%	
ACL	ACGL	0	0	0	0	1,00
	Deficiência proteína C	1	1,1	0	0	1,00
	Deficiência proteína S	0	0	0	0	1,00
	Deficiência ATIII	1	1,1	0	0	1,00
	Fator V de Leiden	0	0	0	0	1,00
	Mutação G20210A protrombina	0	0	0	0	1,00
	Mutação heterozigota C677T	8	9,1	0	0	<0,01
	Mutação homozigota C677T	0	0	0	0	1,00
Total		(88)		(88)		

* Teste exato de Fisher

TABELA 7**DISTRIBUIÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A MUTAÇÃO C677T NO GENE DA MTHFR E OS OUTROS FATORES TROMBOGÊNICOS ESTUDADOS ENTRE OS DOIS GRUPOS**

Associação de fatores		Grupo 1		Grupo 2		p [*]
		(n)	%	(n)	%	
Mutação C677T	ACGL	1	1,1	1	1,1	1,00
heterozigota	Deficiência proteína C	0	0	0	0	1,00
	Deficiência proteína S	1	1,1	0	0	1,00
	Deficiência ATIII	0	0	0	0	1,00
	Fator V de Leiden	2	2,3	0	0	0,50
	Mutação G20210A protrombina	1	1,1	0	0	1,00
Total		(88)		(88)		

* Teste exato de Fisher

5. Discussão

Este estudo foi realizado para avaliar a associação entre a presença de fatores trombogênicos e o antecedente de AER. Encontramos maior frequência do ACL e da mutação heterozigota C677T no gene da MTHFR nas mulheres com antecedente de AER, quando comparadas com aquelas que tinham pelo menos uma gestação bem sucedida.

As mulheres que compuseram o Grupo 1 foram selecionadas por terem como único critério três ou mais abortos espontâneos consecutivos. Não foram excluídas pacientes portadoras de outros fatores etiológicos rotineiramente pesquisados no Ambulatório de Aborto Recorrente – UNICAMP (genéticos, anatômicos, hormonais, infecciosos, auto e alo-ímmunes). Optou-se por não fazer esta seleção porque poderia estar sendo gerada certa tendência para os resultados. A opção de não selecioná-las por outros critérios permite-nos uma visão geral dos fatores de trombofilia nas pacientes com AER. Os fatores indicados na literatura como relacionados ao AER são questionados (STIRRAT, 1992), e este foi outro motivo pelo qual não se fizeram restrições à seleção dos casos.

Para participar do Grupo 2, além de ter pelo menos uma gestação bem sucedida, as pacientes foram submetidas a alguns critérios de exclusão: história de AER, óbito fetal de causa desconhecida, fenômenos tromboembólicos, hipertensão gestacional, má história obstétrica ou restrição de crescimento intra-uterino. Utilizamos estes itens como critérios de exclusão considerando que todos eles, em um ou outro momento, já foram relacionados a algum dos fatores trombogênicos estudados (COSGRIFF & MARTIN, 1981; CARRERAS & VERMYLEN, 1982; SANFELIPPO & DRAYNA, 1982; HARRIS, 1987; LOCKSHIN et al., 1987; BRANCH et al., 1989; KAJINO, 1991; STEEGERS-THEUNISSEN et al., 1992; TRIPLETT, 1992; MacLEAN et al., 1994; LANE et al., 1996; PRESTON et al., 1996; FOKA et al., 2000; GLUECK et al., 2000).

As pacientes dos dois grupos foram pareadas segundo a idade em grupos de cinco anos e segundo a raça/cor. O pareamento por idade foi realizado para tentar minimizar qualquer possível efeito desconhecido desta variável na ocorrência do AER. Além disso, pensou-se em evitar possível facilitação do efeito dos fatores adquiridos (ACL e ACGL) na ocorrência do AER em idades mais avançadas, apesar da descrição de ausência de diferença na frequência destes anticorpos entre grupos de mulheres com este antecedente em várias idades (RUIZ et al., 1996). O ajuste por idade do OR para o ACL não mostrou qualquer diferença em relação ao OR bruto nas mulheres por nós estudadas.

Sabe-se que a prevalência de doenças e/ou alterações genéticas é variável nas diversas raças/cores, e como a população brasileira é altamente miscigenada, realizamos o pareamento por raça/cor entre as pacientes dos dois grupos. É

descrita, por exemplo, prevalência mais alta do fator V de Leiden nos caucasóides (REES, COX, CLEGG, 1995) em até sete vezes. É possível que outras mutações possam também apresentar maior prevalência neste grupo racial (PEPE et al., 1997; RIDKER et al., 1998). Estudos realizados na população brasileira, particularmente nesta instituição, revelaram que o fator V de Leiden é mais freqüente nos caucasóides e rara em negros e índios (ARRUDA et al., 1996).

Dados do Censo de 1991 mostravam, na população brasileira, 52% de brancos e 48% de não-brancos (<http://www.sidra.ibge.gov.br>). Das mulheres por nós estudadas, 61,4% foram classificadas como brancas, o que poderia teoricamente influenciar os resultados obtidos para as mutações estudadas. No processo de classificação da raça/cor, como a paciente era questionada quanto à sua raça/cor, a resposta nem sempre era compatível com o que era visualizado pela investigadora. A classificação final assumida era aquela que a paciente informava, exceto nos casos em que havia discrepância significativa entre o observado pela investigadora e o informado pela paciente. Assim, é possível que um pequeno número de pacientes tenha recebido classificação diferente da real, o que poderia ser um viés na análise da freqüência das mutações estudadas.

O número médio de gestações foi maior nas pacientes do Grupo 1 do que nas do Grupo 2. Este resultado já era esperado, considerando que a definição de AER exige pelo menos três gestações anteriores com interrupção espontânea antes de 20 semanas. Dentre as pacientes do Grupo 2, eram primíparas 36,4%. Apesar de não sabermos como evoluirão as próximas gestações destas mulheres, este critério foi escolhido por considerar estas pacientes férteis e passíveis de

serem controles, à semelhança do que se faz em toda a literatura. A grande maioria utiliza como mulheres controles aquelas que têm pelo menos uma gestação bem sucedida (PARKE et al., 1991; RAI et al., 1996; BALASCH et al., 1997; COUMANS et al., 1999). O percentual de mulheres que evoluem com AER depois de uma gestação bem sucedida é de aproximadamente 3% (REAGAN, 1989). Se considerarmos esta referência percentual, apenas uma mulher do Grupo 2 evoluiria com AER, o que não seria suficiente para comprometer a interpretação dos resultados da pesquisa atual.

A presença do ACL diferiu significativamente entre os dois grupos estudados. Foi encontrado em 12,5% das mulheres com AER, resultado que coincide com os apresentados na literatura (BARBUI et al., 1988; TRIPLETT, 1992). Entre as mulheres férteis, o ACL foi encontrado em 1,1%, frequência pouco abaixo daquela encontrada na literatura (BRANCH, 1987; PATTISON et al., 1988), que em populações obstétricas normais varia de 2,9% a 3,6%.

A técnica escolhida para a pesquisa do ACL foi o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Há sugestões de que a detecção dos anticorpos antifosfolípidos por ELISA, utilizando o complexo cardiolipina- β 2-GPI, é mais sensível do que quando utilizada apenas a cardiolipina (YAMAMOTO et al., 1993). Entretanto, o estudo do ACL isolado e associado ao anti- β 2-GPI em mulheres com AER mostrou que a presença deste não identifica pacientes adicionais que eram anteriormente negativas para o ACL. A presença do anti- β 2-GPI apresentou forte associação com a síndrome antifosfolípide, mas não com perda fetal recorrente

(LEE et al., 1999). Assim, optamos pela utilização do ELISA sem o complexo β 2-GPI para a pesquisa do ACL, como é rotineiramente realizado no serviço.

Não houve diferença estatística na detecção do ACGL entre os dois grupos, que foi encontrado em apenas uma paciente do Grupo 1 e em nenhuma do Grupo 2. Há várias descrições na literatura de associação entre a presença do ACGL e o antecedente de AER (GLEICHER & FRIBERG, 1985; TRIPLETT, 1992; MACLEAN et al., 1994). Entretanto, os níveis do ACGL podem flutuar na gestação (LOCKSHIN et al., 1990), sendo que níveis persistentemente elevados apresentam forte relação com perda gestacional (TRIPLETT, 1992).

Em outras séries os resultados são conflitantes. Em um estudo com 147 mulheres com AER e 104 controles férteis, notou-se que não diferiam quanto à presença do ACGL (BRANCH et al., 1997).

Resultados similares aos nossos foram encontrados em um estudo com 81 mulheres com AER, 88 mulheres férteis e 64 mulheres que nunca estiveram grávidas. Os resultados mostraram que o ACL foi mais específico para perda fetal do que o ACGL (PARKE et al., 1991).

Utilizamos, para a pesquisa do ACGL, a técnica chamada dilute Russell Viper Venom Time (dRVVT). Esta técnica, descrita em 1986 por THIAGARAJAN, PNEGO, SHAPIRO, mostrou-se mais sensível que o TTPA e que o Teste de Inibição da Tromboplastina Tecidual para a detecção do ACGL.

O Kaolin Clotting Time (KCT) foi um teste muito popular para a pesquisa do ACGL no final da década de 80 e início de 90. Infelizmente, o cloreto de sódio utilizado na maioria das técnicas reduz a sensibilidade do KCT ao ACGL. Sugere-se que o uso de água ao invés do cloreto de sódio poderia melhorar sua sensibilidade (EXNER, PAPADOPOULOES, KOUTTS, 2000).

Optamos, inicialmente, por realizar o dRVVT e o KCT para a pesquisa do ACGL. Infelizmente, as dificuldades técnicas que ocorreram na separação das amostras e na realização do KCT não permitiram que os resultados fossem confiáveis. Como o dRVVT é um teste descrito como mais sensível na maioria das publicações (MACLEAN et al., 1994; TRIPLETT, 2000), optamos por manter apenas seus resultados na pesquisa do ACGL. Há de se destacar que a grande variação na metodologia dos estudos pode dificultar a conclusão quanto à verdadeira importância da presença do ACGL como fator etiológico para AER.

A detecção da deficiência da proteínas C e S não diferiu de maneira significativa entre os dois grupos estudados. Estudos envolvendo a deficiência da proteína S em mulheres com aborto espontâneo recorrente são muitos, consistindo a maioria em descrições de casos isolados de mulheres com AER e presença de outros fatores de trombofilia, incluindo a deficiência de proteína S (ESPANA et al., 1999). Um estudo realizado em 1996 indicou maior risco de aborto espontâneo quando há deficiência das proteínas C ou S (PRESTON et al, 1996).

Como a prevalência da deficiência de proteína C pode atingir 10% a 15% dos pacientes jovens com trombose venosa recorrente (DALHBACK, 1995) e a

deficiência de proteína S ocorre em 2,2% de pacientes com trombose venosa (DE STEPHANO et al., 1996), cogitamos a possibilidade de trombozes no leito de implantação placentária poderem levar à ocorrência de abortos de repetição em mulheres com deficiência destas proteínas. Esta hipótese, entretanto, não foi corroborada por nossos resultados. Temos encontrado duas pacientes com deficiência de proteína C no Grupo 1 e nenhuma no Grupo 2, poderia ser indício de uma possível diferença estatisticamente significativa se o número de sujeitos na amostra fosse aumentado, considerando-se a baixa incidência desta deficiência na população geral, que é de aproximadamente 1:33.000 indivíduos (DE STEPHANO et al., 1996).

Da mesma maneira, a deficiência da ATIII não foi observada com diferença estatística entre os dois grupos estudados, aparecendo em apenas uma paciente do Grupo 1, dado coincidente com os obtidos entre mulheres com história de trombose (LANE et al., 1993). Sua prevalência em mulheres com história pregressa ou atual de trombose foi estimada em 2% a 3% (THALER & LECHNER, 1981; LANE et al., 1993).

Novamente, devemos destacar que a população estudada apresenta algumas características que a tornam diferente de populações analisadas por outros autores. A miscigenação racial poderia induzir a características genéticas não encontradas em populações predominantemente caucasianas, que são as principais populações analisadas na literatura quanto à ATIII (THALER & LECHNER, 1981; LANE et al., 1993; DE STEPHANO et al., 1996).

Mulheres em idade reprodutiva com deficiência de proteína C, S ou ATIII apresentam risco relativo três vezes maior de ter um episódio tromboembólico do que homens na mesma faixa etária (BUCCIARELLI et al., 1999). Mulheres com seqüelas graves de acidente vascular cerebral ou infarto agudo do miocárdio podem ter maior dificuldade para ter filhos, tanto pela restrição de relacionamento social, quanto pelas próprias condições clínicas. Assim, o estudo de mulheres com AER portadoras de deficiências destas proteínas pode excluir involuntariamente os quadros mais graves, alterando os resultados.

Quanto às mutações estudadas, não foi encontrada diferença estatística nas freqüências do fator V de Leiden e G20210A no gene da protrombina. A literatura apresenta grandes variações quanto à importância destas mutações na gênese do AER. Parte dos estudos mostra associação entre a resistência à proteína C ativada e a ocorrência de abortos (RAI et al., 1996; HATZIS et al., 1999), mas esta associação não é tão clara quando se pesquisa a presença do fator V de Leiden como responsável por esta resistência (HATZIS et al., 1999; DULICEK et al., 1999).

GRANDONE et al. (1997) mostraram forte associação entre a presença do fator V de Leiden e a ocorrência de AER, que foi ratificada por alguns autores (MURPHY et al., 2000; YOUNIS et al., 2000), mas não por outros (DIZON-TOWNSON et al., 1997a; DULICEK et al., 1999) e nem por nossos resultados. Entretanto, o encontro de três mulheres com fator V de Leiden no Grupo 1 e nenhuma no Grupo 2 também poderia vir a refletir uma diferença significativa entre os dois grupos estudados com o aumento no número de

pacientes da amostra. As três mulheres que eram positivas para o fator V de Leiden tinham três abortos espontâneos como antecedente. No Grupo 1 havia mulheres com história de mais abortos (até oito), que não apresentaram positividade para o fator V de Leiden.

Portadores do alelo G20210A apresentam níveis plasmáticos de protrombina mais altos que os controles, e risco 2,8 vezes maior de trombose (POORT et al., 1996). São muito poucos os dados de literatura referentes à presença desta mutação em mulheres com AER, mas um estudo recente com oitenta pacientes com aborto espontâneo recorrente e cem controles saudáveis, conferiu maior risco para aborto primário quando a mutação foi encontrada (FOKA et al., 2000). Nossos resultados, com número similar de pacientes, não mostraram diferença significativa quanto à presença desta mutação. Infelizmente, são ainda raros os estudos disponíveis para que se chegue a uma conclusão definitiva quanto à importância da mutação G20210A no gene da protrombina para a ocorrência de AER.

Nossos resultados referentes à mutação C677T no gene da MTHFR são conflitantes. Encontramos associação entre a presença da mutação e o antecedente de AER. Esta associação, da mesma maneira que as outras mutações estudadas, não é completamente definida na literatura. Alguns mostram que ela, como causa de hiperhomocisteinemia, poderia ser responsável pela ocorrência de AER (KUPFERMINC et al., 1999; FOKA et al., 2000), contra a opinião de outros (KUTTEH et al., 1999; RAI & LASKIN, 1999; MURPHY et al., 2000).

A mutação C677T no gene da MTHFR, quando presente, foi homozigota em doze pacientes do Grupo 1 e em 9 pacientes do Grupo 2, diferença não estatisticamente significativa. Quando, entretanto, estudamos a heterozigose para esta mutação, vimos que esteve presente em 47 mulheres do Grupo 1 e em 26 mulheres do Grupo 2, o que caracterizou uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Estes dados são discordantes da literatura. Nos trabalhos que fazem a distinção entre mutação heterozigota e homozigota, a predominância da significância estatística é, nitidamente, da mutação homozigota (QUERE et al., 1998; KUPFERMINC et al., 1999; FOKA et al., 2000). LISSAK et al. (1999) descrevem a mutação heterozigota como importante nas pacientes com AER, mas ainda não há respaldo científico suficiente para confirmar este achado. Apesar da homozigose estar relacionada a níveis mais elevados de homocisteína plasmática, há um escalonamento progressivo desses níveis no indivíduo sem mutação em relação ao heterozigoto e o homozigoto mutante.

De qualquer forma, a frequência alélica da mutação C677T no gene da MTHFR foi maior no Grupo 1, mostrando significativa diferença estatística entre os dois grupos, o que pode direcionar novas pesquisas quanto à importância ou não da mutação heterozigota nas pacientes com AER.

As mutações estudadas conferem maior risco de trombose para os pacientes portadores. O risco de trombose durante a gravidez é um problema clinicamente importante, e pelo menos 15% das mortes maternas na Suécia são

atribuídas à embolia pulmonar (HOGBERG, 1986). Entretanto, para as mulheres, a presença de mutações que predispõem à trombofilia pode não representar apenas uma desvantagem. Sugere-se que estas mulheres apresentam menos sangramento durante o parto e puerpério, funcionando a trombofilia como fator protetor e de seleção da espécie. Apesar das conhecidas dificuldades em se quantificar o sangue perdido neste período, a comparação da hemoglobina pré e pós-parto mostrou diferença significativa entre mulheres portadoras destas mutações e mulheres não portadoras (LINDQVIST et al., 1998).

O conceito de que múltiplos fatores interagem para a ocorrência de trombose é bem estabelecido. Vários fatores congênitos e adquiridos devem agir sinergicamente para debelar os potentes mecanismos antitrombóticos. A interação destes fatores é ainda pouco estudada. Entretanto, foi demonstrado que a associação da presença do fator V de Leiden e hiperhomocisteinemia moderada aumentam exponencialmente o risco de trombose (PHILLIPS, 1997).

Em nosso estudo, o encontro de mais de um fator de trombofilia em pacientes com AER foi raro. O ACL foi encontrado em associação com a deficiência da proteína C em uma paciente e com a deficiência da ATIII em outra, ambas do Grupo 1. Entretanto, quando avaliamos sua associação com a mutação C677T heterozigota no gene da MTHFR, ela foi encontrada em nove mulheres do Grupo 1 e em nenhuma do Grupo 2, diferença esta estatisticamente significativa.

Qual seria o verdadeiro significado deste achado? Podemos cogitar que, da mesma forma que a associação de fatores mostrou relação com aumento

importante na incidência de trombose, poderia também estar associada ao aumento na incidência de AER. A ação dos fatores de trombofilia durante a formação do leito placentário poderia estar aumentada, determinando alterações na circulação útero-placentária que culminariam com abortos espontâneos e má adaptação circulatória placentária, com conseqüências deletérias para o concepto, como restrição de crescimento intra-uterino e óbito fetal.

Estes achados abrem novas possibilidades de pesquisa neste campo. Talvez novas descobertas quanto à responsabilidade da associação de fatores venham a surgir simultaneamente em pacientes com trombose e mulheres com AER.

Entre todos os fatores estudados, aquele que parece estar definitivamente implicado na gênese de trombose e também de AER, já consagrado pela literatura mundial, é o ACL. As técnicas utilizadas para a pesquisa deste anticorpo evoluem rapidamente e variam entre os laboratórios. Torna-se, assim, importante buscar a uniformização da técnica para que os resultados de várias pesquisas sejam comparáveis.

Os demais fatores, embora implicados em um momento ou outro na gênese do AER, ainda são objeto de questionamento. Pelo grande interesse que este assunto vem despertando no cenário mundial e pela importância de se apresentar novas possibilidades aos casais que não conseguem chegar ao final de uma gestação com bom resultado perinatal e sair da maternidade com um bebê saudável no colo, sentimo-nos estimulados a continuar pesquisando.

6. Conclusões

1. Dentre os fatores trombogênicos adquiridos estudados, o ACL foi encontrado com maior frequência nas mulheres com antecedente de AER do que nas mulheres férteis.
2. Dentre os fatores trombogênicos hereditários estudados, a mutação heterozigota C677T no gene da MTHFR foi encontrada com maior frequência nas mulheres com antecedente de AER do que nas mulheres férteis.
3. O estudo da associação de fatores mostrou que a presença do ACL e da mutação heterozigota C677T no gene da MTHFR foi estatisticamente associada ao antecedente de AER.

7. Referências Bibliográficas

AGRESTI, A. - **Categorical data analysis**. Atlanta, John Wiley, 1990. p.576.

AOKI, K.; KAJIURA, S.; MATSUMOTO, Y.; OGASAWARA, M.; OKADA, S.; YAGAMI, Y.; GLEICHER, N. - Preconceptional natural-killer cell activity as a predictor of miscarriage. **Lancet**, **27**:1340-2, 1995.

ARAKAWA, M.; TAKAKUWA, K.; HONDA, K.; TAMURA, M.; KURABAYASHI, T.; TANAKA, K. - Supressive effect of anticardiolipin antibody on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. **Fertil. Steril.**, **71**:1103-7, 1999.

ARRUDA, V.R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; COSTA, F.F.; REITSMA, P.H. - Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian population. **Am. J. Hematol.**, **49**:242-3, 1995.

ARRUDA, V.R.; VON ZUBEN, P.M.; SOARES, M.C.P.; MENEZES, R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. - Very low incidence of Arg506Gln mutation in the factor V gene among the amazonian indians and the brazilian black population. **Throm. Haemost.**, **75**:860-1, 1996. [Letter]

ARRUDA, V.R.; VON ZUBEN, P.M.; CHIAPARINI, L.C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; COSTA, F.F. - The mutation C677T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. **Thromb. Haemost.**, **77**:818-21, 1997.

- ARTHURS, M.; MORGAN, O.S.C.; DECEULAER, K.; BROWNE, B. - Primary antiphospholipid syndrome. A case report. *West Indian Med. J.*, **43**:27-9, 1994.
- AWIDI, A.S.; ABU-KHALAF, M.; HERZALLAH, U.; ABU-RAJAB, A.; SHANNAK, M.M., ABU-OBEID, T.; AL TAHER, I.; ANSHASI, B. - Hereditary thrombophilia among 217 consecutive patients with thromboembolic disease in Jordan. *Am. J. Hematol.*, **44**:95-100, 1993.
- BALASCH, J.; REVERTER, J.C.; FÁBREGUES, F.; TÀSSIES, D.; RAFEL, M.; CREUS, M.; VANRELL, J.A. - First-trimester repeated abortion is not associated with activated protein C resistance. *Hum. Reprod.*, **12**:1094-7, 1997.
- BARBUI, T.; RADICI, E.; CORTELAZZO, S.; ROSSI, E.; GALLI, M.; FINAZZI, G. - Antiphospholipid antibodies in early repeated abortions: a case-controlled study. *Fertil. Steril.*, **50**:589-92, 1988.
- BERTINA, R.M.; KOELEMAN, B.P.; KOSTER, T.; ROSENDAAL, F.R.; DRIVEN, R.J.; RONDE, H.; VAN DER VALDEN, P.A.; REITSMA, P.H. - Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, **369**:64-7, 1994.
- BOTELLA, L.J. - The endometrium in repeated abortion. *Int. J. Fertil.*, **7**:147-9, 1962.
- BOUÉ, A. - Spontaneous abortions and cytogenetic abnormalities. In: BEHRMAN, S.J.; KISTNER, R.W.; PATTON, G.W. (eds.) - **Progress in infertility**. 3^a ed., Little, Brown and Company, 1988. p.783-95.
- BOWIE, E.J.W.; THOMPSON, J.H.; PASCUZZI, C.A.; OWEN, C.A. - Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J. Lab. Clin. Med.*, **62**:416-30, 1963.
- BRANCH, D.W. - Immunologic disease and fetal death. *Clin. Obstet. Gynecol.*, **30**:295-311, 1987.

- BRANCH, D.W.; ANDRES, R.; DIGRE, K.B.; ROTE, N.S.; SCOTT, J.R. - The association of antiphospholipid antibodies with severe preeclampsia. ***Obstet. Gynecol.***, **73**:541-5, 1989.
- BRANCH, D.W.; SILVER, R.; PIERANGELI, S.; VAN LEEUWEN, I.; HARRIS, E.N. - Antiphospholipid antibodies other than lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with recurrent pregnancy loss, fertile controls, and antiphospholipid syndrome. ***Obstet. Gynecol.***, **89**:549-55, 1997.
- BRENNER B, MANDEL H, LANIR N, YOUNIS J, ROTHBART H, OHEL G, BLUMENFELD Z. Activated protein C resistance can be associated with recurrent fetal loss. ***Br. J. Haematol.***, **97**:551-4, 1997.
- BRENNER, B. - Inherited thrombophilia and pregnancy loss. ***Thromb. Haemost.*** **82**:634-40, 1999.
- BUCCIARELLI, P.; ROSENDAAL, F.R.; TRIPODI, A.; MANNUCCI, P.M.; STEFANO, V.D.; PALARETI, G.; FINAZZI, G.; BAUDO, F.; QUINTAVALLA, R. - Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antithrombin, protein C, protein S deficiency, or activated protein C resistance. ***Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.***, **19**:1026-33, 1999.
- CARP, H.J.A.; TODER, V.; MASHIACH, S.; NEBEL, L.; SERR, D.M. - Recurrent miscarriage: a review of current concepts, immune mechanisms, and results of treatment. ***Obstet. Gynecol. Surv.***, **45**:657-69, 1990.
- CARRERAS, L.O. & VERMYLEN, J.G. - "Lupus" anticoagulant and thrombosis: possible role of inhibition of prostacyclin formation. ***Thromb. Haemost.***, **48**:38-40, 1982.
- CLAUVEL, J.P.; TCHOBROUTSKY, C.; DANON, F.; SULTAN, Y.; INTRATOR, L.; BROUET, J.C. - Spontaneous recurrent fetal wastage and autoimmune abnormalities: a study of fourteen cases. ***Clin. Immunol. Immunopathol.*** **39**:523-30, 1986.

- CONLEY, C.L. & HARTMANN, R.C. - A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. **J. Clin. Invest.**, **31**:621-2, 1952.
- COSGRIFF, T.M. & MARTIN, B.A. - Low functional and high antigenic antithrombin III level in a patient with the lupus anticoagulant and recurrent thrombosis. **Arthritis Rheum.**, **24**:94-6, 1981.
- COSLOVSKY, S. & VAISSMAN, I. - As doenças intercorrentes no ciclo grávido-puerperal – Diabete. In: REZENDE J. (ed.) – **Obstetrícia**. 5^a ed., Guanabara 1987. p.313-9.
- COSTA, H.L.F.F. - **Autoimunidade e perda conceptual**. Ribeirão Preto, 1994. [Tese - Doutorado - Universidade de São Paulo].
- COSTA, H.L.F.F.; MOURA, M.D.; FERRIANI, R.A.; ANCESCHI, M.I.S.; BARBOSA, J.E. - Prevalence of anti-cardiolipin antibody in habitual aborters. **Gynecol. Obstet. Invest**, **36**:221-5, 1993.
- COUMANS, A.B.C.; HUIJGENS, P.C.; JAKOBS, C.; SCHATS, R.; VRIES, J.I.P.; VAN PAMPUS, M.G.; DDEKKER, G.A. - Haemostatic and metabolic abnormalities in women with unexplains recurrent abortion. **Hum. Reprod.** **14**:211-4, 1999.
- COUTO, E.; BARINI, R.; PINTO E SILVA, J.L.; DE MORAES, D.R.; DE CARVALHO, L.M. - Anticardiolipin antibody in recurrent spontaneous aborting and fertile women. **Rev. Paul. Med.**, **116**:1760-5, 1998.
- COWCHOCK, S.; DEHORATIUS, R.D.; WAPNER, R.J.; JACKSON, L.G. - Subclinical autoimmune disease an unexplained abortion. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **150**:367-71, 1984.

- COWCHOCK, S.; SMITH, J.B.; GOCIAL, B. - Antibodies to phospholipids and nuclear antigens in patients with repeated abortions. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **155**:1002-10, 1986.
- CSAPO, A.I.; PULKKINEN, M.O.; WIEST, W.G. - Effects of luteectomy and progesterone replacement therapy in early pregnancy patients. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **115**:759-65, 1973.
- DAHLBACK, B. - The protein C anticoagulant system: Inherited defects as basis for venous thrombosis. **Thromb. Res.**, **77**:1-5, 1995.
- DALY, D.C.; WALTERS, C.A.; SOTO-ALBORS, C.E.; RIDDICK, D.H. - Endometrial biopsy during treatment of luteal phase defects is predictive of therapeutic outcome. **Fertil. Steril.**, **40**:305-10, 1983.
- DE STEPHANO, V.D.; FINAZZI, G.; MANNUCCI, P.M. - Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. **Blood** **87**:3531-44, 1996.
- DIZON-TOWNSON, D.S.; KINNEY, S.; BRANCH, D.W.; WARD, K. - The factor V Leiden mutation is not a common cause of recurrent miscarriage. **J. Reprod. Immunol.**, **34**:217-23, 1997a.
- DIZON-TOWSON, D.S.; MELINE, L.; NELSON, L.M.; VARNER, M.; WARD, K. - Fetal carriers of the factor V Leiden mutation are prone to miscarriage and placental infarction. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **177**:402-5, 1997b.
- DUDLEY, D.J.; BRANCH, D.W. - New approaches to recurrent pregnancy loss. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **32**:520-32, 1989.
- DULÍČEK, P.; CHROBÁK, L.; KALOUSEK, I.; PESAVOVÁ, L.; PECKA, M.; STRÁNSKÝ, P. - Is factor V Leiden a risk factor for fetal loss? **Acta Med.** **42**:93-6, 1999.

EGEBERG, O. - Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. **Thromb. Diath Haemorrh.**, **13**:516-9, 1965.

ESCHWEGE, V.; PEYNAUD-DEBAYLE, E.; WOLF, M.; AMIRAL, J.; VISSAC, A.M.; BRIDEY, F.; DREYFUS, M.; BOYER-NEUMANN, C.; MEYER, C. - Prevalence of antiphospholipid-related antibodies in unselected patients with history of venous thrombosis. **Blood Coag. Fibrinol.**, **9**:429-34, 1998.

ESPANA, F.; VILLA, P.; MIRA, Y.; GRANCHA, S.; ROYO, M.; ESTELLES, A.; VAYA, A.; AZNAR, J. - Factor V Leiden and antibodies against phospholipids and protein S in a young woman with recurrent thromboses and abortion. **Haematologica**, **84**:80-4, 1999.

EXNER, T.; PAPADOPOULOES, G.; KOUTTS, J. - Use of a simplified dilute Russell's viper venom time (dRVVT) confirms heterogeneity among 'lupus anticoagulants'. **Blood Coag. Fibrinol.**, **1**:250-60, 1990.

FEINSTEIN, D.I.; RAPAPORT, S.I. - Acquired inhibitors of blood coagulation. In: SPART, T.H. (ed.) - **Progress in hemostasis and thrombosis**. Grune & Stratton, New York, 1972. p.75.

FEINSTEIN, D.I. - Lupus anticoagulant, thrombosis, and fetal loss. **New Engl. J. Med.**, **313**:1348-50, 1985. [Letter]

FOKA, Z.J.; LAMBROPOULOS, A.F.; SARAVELLOS, H.; KARAS, G.B.; KARAVIDA, A.; AGORASTOS, T.; ZOURNATZI, V.; MAKRIS, P.E.; BONTIS, J.; KOTSIS, A. - Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. **Hum. Reprod.**, **15**:458-62, 2000.

FRIEDMAN, S.; SHACHTER, A.; ECKERLING, B.; EICHHORN, F.; RUTENBERG, A. - Fromino-glutamic acid (Figlu) excretion and abortion. **Panminerva**, **34**:217-23, 1977.

- FRICK, P.G. - Acquired circulating anticoagulant in systemic "collagen disease": auto-immune thromboplastin deficiency. *Blood*, **10**:691-706, 1955.
- GALLI, M.; COMFURIUS, P.; MAASEN, C.; HEMKER, H.C.; DE BAETS, M.H.; VAN BREDA-WRIESMAN, P.J.C.; BARBUI, T.; ZWAAL, R.F.A.; BEVERS, E.M. - Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*, **335**:1544-7, 1990.
- GALSTIAN, A.; BEER, A.E.; ROBERTS, J.M.; COULAM, C.B.; FAULK, W.P. - Immunology of preeclampsia. In: COULAM, C.B.; FAULK, W.P.; McINTYRE, J.A. (eds.) - **Immunological obstetrics**. Norton Medical Books, London, 1992. p.503-15.
- GLEICHER, N. & FRIBERG, J. - IgM gammopathy and the lupus anticoagulant syndrome in habitual aborters. *JAMA*, **253**:3278-81, 1985.
- GLUECK, C.J.; AWADALLA, S.G.; PHILLIPS, H.; CAMERON, D.; WANG, P.; FONTAINE, R.N. - Polycystic ovary syndrome, infertility, familial thrombophilia, familial hypofibrinolysis, recurrent loss of in vitro fertilized embryos, and miscarriage. *Fertil. Steril.*, **74**:394-7, 2000.
- GRANDONE, E.; MARGAGLIONE, M.; COLAIZZO, D.; D'ADDEDDA, M.; CAPPUCCI, G.; VECCHIONE, G.; SCIANNAMÉ, N.; PAVONE, G.; DI MINNO, G. - Factor V Leiden is associated with repeated and recurrent unexplained fetal losses. *Thromb. Haemost.*, **77**:822-4, 1997.
- GRIS, J.C.; RIPART-NEVEU, S.; MAUGARD, C.; TAILLAND, M.L.; BRUN, S.; COURTIEU, C.; BIRON, C.; HOFFET, M.; HEDON, B.; MARES, P. - Respective evaluation of the prevalence of haemostasis abnormalities in unexplained primary early recurrent miscarriages. The Nimes Obstetricians and Haematologists (NOHA) Study. *Thromb. Haemost.*, **77**:1096-103, 1997.

HARGER, J.H.; ARCHER, D.F.; MARCHESE, S.G.; MURACCA-CLEMENTS, M.; GARVER, K.L. - Etiology of recurrent pregnancy losses and outcome of subsequent pregnancies. **Obstet. Gynecol.**, **62**:574-81, 1983.

HARMON, C.E.; LEE, L.A.; PROVOST, T.T. - Anticardiolipin antibodies in normal and lupus pregnancy. **Arthritis Rheum.**, **29**:S96-S99, 1986. [Abstract]

HARRIS, E.N.; PHIL, M.; CHAN, J.K.H.; ASHERSON, R.A.; ABER, V.R.; GHARAVI, A.E.; HUGHES, G.R.V. - Thrombosis, recurrent fetal loss and thrombocytopenia: predictive value of the anticardiolipin antibody test. **Arch. Intern. Med.**, **146**:2153-6, 1986.

HARRIS, E.N. - Syndrome of the black swan. **Br. J. Rheumatol.**, **26**:324-5, 1987. [Editorial]

HARRIS, E.N.; HILL, M.; SPINNATO, J.A. - Should anticardiolipin tests be performed in otherwise healthy pregnant women? **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **165**:1272-7, 1991.

HATZIS, T.; CARDAMAKIS, E.; DRIVALAS, E.; MAKATSORIS, K.; BEVAN, D.; PANTOS, C.; MALLIOPOULOU, V.; TSAGARIS, N.; KREATSA, O.; ANTONIADI, T.; PETERSEN, M.B.; KARAGEORGIU, H.; MANTOUVALO, H. - Increased resistance to activated protein C and factor V Leiden in recurrent abortions. Review of other hypercoagulability factors. **Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care**, **4**:35-44, 1999.

HOGBERG, U. - Maternal deaths in Sweden, 1971-1980. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, **65**:161-7, 1986.

HUGHES, G.R.V. - Thrombosis, abortion, cerebral disease and the lupus anticoagulant. **Br. Med. J.**, **287**:1088-9, 1983.

- JONES, G.S. - Some newer aspects of the management of infertility. *J. Am. Med. Ass.*, **141**:1123-6, 1949.
- KAIDER, A.S.; DAIDER, B.D.; JANOWICZ, P.B.; ROUSSEV, R.G. - Immunodiagnostic evaluation in women with reproductive failure. *Am. J. Reprod., Immunol.*, **42**:335-46, 1999.
- KAJINO, T. - Polyclonal activation of IgM antibodies to phospholipids in patients with idiopathic fetal growth retardation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **25**:28-34, 1991.
- KAMPE, C.E. - Clinical syndromes associated with lupus anticoagulants. *Semin. Thromb. Hemost.*, **20**:16-26, 1994.
- KANERIA, M.V.; VISHWANATHAN, C. - A preliminary study of antiphospholipid antibodies in 50 cases of bad obstetric history. *J. Assoc. Physicians India*, **47**:665-7, 1999.
- KOSTER, T.; ROSENDAAL, F.R.; DE RONDE, H.; BRIET, E.; VANDENBROUCKE, J.P.; BERTINA, R.M. - Venous thrombosis due to poor anti-coagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* **342**:1203-6, 1993.
- KUPFERMINC, M.J.; ELDOR, A.; STEINMAN N.; MANY, A.; BAR-AM, A.; JAFFA, A.; FAIT, G.; LESSING, J.B. - Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *New Engl. J. Med.*, **340**:9-13, 1999.
- KUTTEH, W.H.; PARK, V.M.; DEITCHER, S.R. - Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.* **71**:1048-53, 1999.
- KWAK, J.Y.H.; BARINI, R.; GILMAN-SACHS, A.; BEAMAN, K.D.; BEER, A.E. - Down regulation of maternal antiphospholipid antibodies during early pregnancy and pregnancy outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **171**:239-46, 1994.

- KWAK, J.Y.H.; GILMAN-SACHS, A.; MORETTI, M.; BEAMAN, K.D.; BEER, A.E. - Natural killer cell cytotoxicity and paternal lymphocyte immunization in women with recurrent spontaneous abortion. **Am. J. Reprod. Immunol.**, **40**:352-8, 1998.
- LANE, D.A.; OLDS, R.J.; BOISCLAIR, M.; CHOWDHURY, V.; THEIN, S.L.; COOPER, D.N.; BLAJCHMAN, M.; PERRY, D.; EMMERICH, J.; AIACH, M. - Antithrombin III mutation database: first update. **Thromb. Haemost.**, **70**:361-9, 1993.
- LANE, D.A.; MANNUCCI, P.M.; BAUER, K.A.; BERTINA, R.M.; BOCHKOV, N.P.; BOULYJENKOV, V.; CHANDY, M.; DAHLBÄCK, B.; GINTER, E.K.; MILETICH, J.P.; ROSENDAAL, F.R.; SELIGSOHN, U. - Inherited thrombophilia: Part 1. **Thromb. Haemost.**, **76**:651-62, 1996.
- LEE, R.M.; EMLLEN, W.; SCOTT, J.R.; BRANCH, D.W.; SILVER, R.M. - Anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in women with recurrent spontaneous abortion, unexplained fetal death, and antiphospholipid syndrome. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **181**:642-8, 1999.
- LENTON, E.A.; LANDGREN, B.; SEXTON, L. - Normal variation in the length of the luteal phase of the menstrual cycle: identification of the short luteal phase. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **91**:685-9, 1984.
- LINDQVIST, P.G.; SVENSSON, P.J.; DAHLBACK, B.; MARSAL, K. - Factor V Q506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced intrapartum blood loss – a possible evolutionary selection mechanism. **Thromb. Haemost.**, **79**:69-73, 1998.
- LISSAK, A.; SHARON, A.; FRUCHTER, O.; KASSEL, A.; SANDEROVITZ, J.; ABRAMOVICI, H. - Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methyletetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **181**:126-30, 1999.

- LOCKSHIN, M.D.; DRUZIN, M.L.; GOEI, S.; QAMAR, T.; MAGID, M.S.; JOVANOVIC, L.; FERENC, M. - Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. ***New Engl. J. Med.***, **313**:152-6, 1985.
- LOCKSHIN, M.D.; QAMAR, T.; DRUZIN, M.L.; GOEI, S. - Antibody to cardiolipin, lupus anticoagulant and fetal death. ***J. Rheumatol.***, **14**:259-62, 1987.
- LOCKSHIN, M.D.; QAMAR, T.; LEVY, R.A. - Anticardiolipin and related antibodies: thrombosis and fetal death. In: SCOTT, J.S. & BIRD, H.A. (eds.) - **Pregnancy, autoimmunity and connective tissue disorders**. 5.ed., Oxford, Oxford University Press, 1990. p.185-211.
- LOCKWOOD, C.J.; ROMERO, R.; FEINBERG, R.F.; CLYNE, L.P.; COSTER, B.; HOBBS, J.C. - The prevalence and biologic significance of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in a general obstetric population. ***Am. J. Obstet. Gynecol.***, **161**:369-73, 1989.
- LUBBE, W.F.; WALKOM, P.; ALEXANDER, C.J. - Hepatic and splenic haemorrhage as a complication of toxemia in a patient with circulating lupus anticoagulant. ***New Z. Med. J.***, **95**:842-4, 1982.
- LYNCH, A.; MARLAR, R.; MURPHY, J.; DAVILA, G.; SANTOS, M.; RUTLEDGE, J.; EMLIN, W. - Antiphospholipid antibodies in predicting adverse pregnancy outcome: a prospective study. ***Ann. Intern. Med.***, **120**:470-5, 1994.
- MACLEAN, M.A.; CUMMING, G.P.; MCCALL, F.; WALKER, I.D.; WALKER, J.J. - The prevalence of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with a history of first trimester miscarriages. ***Br. J. Obstet. Gynaecol.***, **101**:103-6, 1994.

McHUGH, N.J.; KOMANN, L.H.; BLAND, P.R. - Predictive value of anticardiolipin antibodies in antenatal screening of routine pregnancy. ***Clin. Exp. Rheumatol.***, **6**:208, 1988. [Abstract].

MECACCI, F.; PARRETTI, E.; CIONI, R.; LUCCHETTI, R.; MAGRINI, A.; LA TORRE, P.; MIGNOSA, M.; ACANFORA, L.; MELLO, G. - Thyroid autoimmunity and its association with non-organ-specific antibodies and subclinical alterations of thyroid function in women with a history of pregnancy loss or preeclampsia. ***J. Reprod. Immunol.***, **46**:39-50, 2000.

METZ, L.M.; EDWORTHY, S.; MYDLARSKI, R.; FRITZLER, M.J. - The frequency of phospholipid antibodies in an unselected stroke population. ***Can. J. Neurol. Sci.*** **25**:64-9, 1998.

MOLTA, C.; MEYER, .O.; DOSQUET, C.; OCA, M.M.; BABRON, M.C.; DANON, F.; KAPLAN, C.; CLÉMENCEAU, S.; CASTELLANO, F.; LEVY, M. - Childhood-onset systemic lupus erythematosus: antiphospholipid antibodies in 37 patients and their first-degree relatives. ***Pediatrics***, **92**:849-53, 1993.

MUNAKATA, Y.; SAITO, T.; MATSUDA, K.; SEINO, J.; SHIBATA, S.; SASAKI, T. - Detection of complement-fixing antiphospholipid antibodies in association with thrombosis. ***Thromb. Haemost.***, **83**:728-31, 2000.

MURPHY, R.P.; DONOGHUE, C.; NALLEN, R.J.; DMELLO, M.; REGAN, C.; EHTEHEAD, A.S.; FITZGERALD, D.J. - Prospective evaluation of the risk conferred by factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in pregnancy. ***Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.***, **20**:266-70, 2000.

NELEN, W.L.D.; BLOM, H.J.; STEEGERS, E.A.P.; HEIJER, M.D.; THOMAS, C.M.G.; ESKES, T.K.A.B. - Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. ***Obstet. Gynecol.***, **95**:519-24, 2000.

OBER, C.; KARRISON, T.; ODEM, R.R.; BARNES, R.B.; BRANCH, D.W.;
STEPHENSON, M.D.; BARON, B.; WALKER, M.A.; SCOTT, J.R.;
SCHREIBER, J.R. - Mononuclear-cell immunisation in prevention of
recurrent miscarriages: a randomised trial. **Lancet** **31**:365-9, 1999.

OGASAWARA, M.S.; AOKI, K.; KATANO, K.; OZAKI, Y.; SUZUMORI, K. - Factor
XII but not protein C, protein S, antithrombin III, or factor XIII is a predictor of
recurrent miscarriage. **Fertil. Steril.**, **75**:916-9, 2001.

PABINGER, I.; BRÜCKER, S.; KYRLE, P.A.; SCHNEIDER, B.; KORNINGER,
H.C.; NIESSNER, H.; LECHNER, K. - Hereditary deficiency of antithrombin
III, protein C and protein S: prevalence in patients with a history of venous
thrombosis and criteria for rational patient screening. **Blood Coagul.**
Fibrinol., **3**:547-53, 1992.

PARKE AL, WILSON D, MAIER D. The prevalence of antiphospholipid antibodies
in women with recurrent spontaneous abortion, women with successful
pregnancies, and women who have never been pregnant. **Arthritis Rheum**
34:1231-1235, 1991.

PATTISON, N.S.; CHAMLEY, L.W.; McKAY, E.J. - Prevalence of antiphospholipid
antibodies in a normal pregnant population. **Clin. Exp. Rheumatol.**, **6**:210,
1988. [Abstract].

PAUER, H.U.; NEESEN, J.; HINNEY, B. - Factor V Leiden and its relevance in
patients with recurrent abortions. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **178**:629-32, 1998.

PEPE, G.; RICKARDS, O.; VANEGAS, O.C.; BRUNELLI, T.; GORI, A.M.; GIUSTI,
B.; ATTANASIO, M.; PRISCO, D.; GENSINI, G.F.; ABBATE, R. - Prevalence
of factor V Leiden mutation in non-European populations. **Thromb.**
Haemost., **77**:329-31, 1997.

- PETRI, M.; GOLBUS, M.; ANDERSON, R.; WHITING-O'KEEFE, Q.; CORASH, L.; HELLMAN, D. - Antinuclear antibody, lupus anticoagulant, and anticardiolipin antibody in women with habitual abortion: a controlled, prospective study of 44 women. *Arthritis Rheum.*, **30**:601-4, 1987.
- PHILLIPS, M.D. - Interrelated risk factors for venous thromboembolism. *Circulation* **95**:1749-51, 1997.
- POORT, S.R.; ROSENDAAL, F.R.; REITSMA, P.H.; BERTINA, R.M. - 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*, **88**:3698-703, 1996.
- PRESTON, F.E.; ROSENDAAL, F.R.; WALKER, I.D.; BRIET, E.; BERNTORP, E.; CONARD, J.; FONTCUBERTA, J.; MAKRIS, M.; MARIANI, G.; NOTEBOOM, W.; PABINGER, I.; LEGNANI, C.; SCHARRER, I.; SCHULMAN, S.; VAN DER MEER, F.J. - Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet*, **348**:913-6, 1996.
- PRITCHARD, J.A.; McDONALD, P.C.; GANT, N.F. - Hypertensive disorders in pregnancy. In: PRITCHARD, J.Á.; McDONALD, P.C.; GANT, N.F. (eds.) - **Williams obstetrics**. 17^a ed., Appleton-Century-Crafts, 1985. p.525-60.
- QUERE, I.; BELLET, H.; HOFFET, M.; JANBON, C.; MARES, P.; GRIS, J.C. - A woman with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. *Fertil. Steril.*, **69**:152-4, 1998.
- QURESHI, F.; YANG, Y.; JAQUES, S.M.; JOHNSON, M.P.; NAPARSTEK, Y.; ULMANSKY, R.; SCHUGER, L. - Anti-DNA antibodies cross-reacting with laminin inhibit trophoblast attachment and migration: implications for recurrent pregnancy loss in SLE patients. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **44**:136-42, 2000.

- RAI, R.; REGAN, L.; HADLEY, E.; DAVE, M.; COHEN, H. - Second-trimester pregnancy loss is associated with activated protein C resistance. **Br. J. Haematol.**, **92**:489-90, 1996.
- RAI, J.G. & LASKIN, C.A. - Folic acid and homocysteine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: a systematic review. **Placenta** **20**:519-29, 1999.
- RAMHORST, R.; AGRIELLO, E.; ZITTERMANN, S.; PANDO, M.; LARRIBA, J.; IRIGOYEN, M.; CORTELEZZI, M.; AUGÉ, L.; LOMBARDI, E.; ETCHEPAREBORDA, J.J.; CONTRERAS, ORTIZ, C.; FAINBOIM, L. - Is the paternal mononuclear cells' immunization a successful treatment for recurrent spontaneous abortion? **Am. J. Reprod. Immunol.** **44**:129-35, 2000.
- REAGAN, L. - Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. **Br. Med. J.**, **320**:609-12, 1989.
- REES, D.C.; COX, M.; CLEGG, J.B. - World distribution of factor V Leiden. **Lancet**, **346**:1133-4, 1995.
- REGAN, C.L.; MCADAM, B.F.; MCPARLAND, P.; BOYLAN, P.C.; FITZGERALD, G.A.; FITZGERALD, D.J. - Reduced fetal exposure to aspirin using a novel controlled-release preparation in normotensive and hypertensive pregnancies. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **105**:732-8, 1998.
- REIN, M.S. - Luteal phase defect and recurrent pregnancy loss. **Infertil. Reprod. Clin. North Am.**, **2**:121-4, 1991.
- RIDKER, P.M.; MILETICH, J.P.; BURINGJE ARIYO, A.A.; PRICE, D.T.; MANSON, J.E.; HILL, J.A. - Factor V Leiden mutation as a risk factor for recurrent pregnancy loss. **Ann. Int. Med.**, **128**:1000-3, 1998.

- ROSENDAAL, F.R.; DOGGEN, C.J.; ZIVELIN, A.; ARRUDA, V.R.; AIACH, M.,
SISCOVICK DS, HILLARP A, WATZKE HH, BERNARDI F, CUMMING AM,
PRESTON FE, REITSMA PH. Geographic distribution of the 20210 G to A
prothrombin variant. **Thromb Haemost** **79**(4):706-8, 1998.
- RUIZ, A.M.; KWAK, J.Y.; KWAK, F.M.; BEER, A.E. - Impact of age on reproductive
outcome in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of
immune etiology. **Am. J. Reprod. Immunol.**, **35**:408-14, 1996.
- SACHS, E.S.; JOHODA, M.G.J.; VAN HEMEL, J.O. - Chromosome studies of 500
couples with two or more abortions. **Obstet. Gynecol.**, **65**:375-8, 1985.
- SANFELIPPO, M.J. & DRAYNA, C.J. - Prekallikrein inhibition associated with the
lupus anticoagulant: a mechanism of thrombosis. **Am. J. Clin. Pathol.**,
77:275-9, 1982.
- SEIXAS, C.A.; SIQUEIRA, I.; BARBOSA, H.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. -
Prevalence of the mutation Ala677Val in the methylene tetrahydrofolate
reductase gene in brazilian newborns and relationship with coronary events
in second-degree relatives. **Haemostasis** **30**(Suppl 1):137, 2000. [Abstract]
- SCOTT, J.R.; ROTE, N.S.; BRANCH, D.W. - Immunologic aspects of recurrent
abortion and fetal death. **Obstet. Gynecol.**, **70**:645-56, 1987.
- SOUZA, S.S.; FERRIANI, R.A.; PONTES, A.G.; ZAGO, M.A.; FRANCO, R.F. -
Factor V Leiden and factor II G20210A mutations in patients with recurrent
abortion. **Hum. Reprod.**, **14**:2448-50, 1999.
- STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M.; BOERS, G.H.J.; BLOM, H.J.; TRIJBELS,
F.J.M.; ESKES, T.K.A.B. - Hyperhomocysteinaemia and recurrent
spontaneous abortion or abruptio placentae. **Lancet**, **339**:1122-3, 1992.

- STIRRAT, G.M. - Recurrent spontaneous abortion. In: COULAM CB, FAULK WP, McINTYRE JA. eds. - **Immunological obstetrics**. London, Norton Medical Books, 1992. p.357-76.
- STRAY-PETERSEN, B. & STRAY-PETERSEN, S. - Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **148**:140-6, 1984.
- SUGI, T.; KATSUNUMA, J.; IZUMI, S.; McINTYRE, J.A.; MAKINO, T. - Prevalence and heterogeneity of antiphosphatidyletanolamine antibodies in patients with recurrent early pregnancy losses. **Fertil. Steril.**, **71**:1060-5, 1999.
- TCHOBROUTSKY, C.; CLAUVEL, J.P.; SULTAN, Y.; DAMON, F.; INTRATOR, L.; WEIL, B. - Successful pregnancies in the antiphospholipid syndrome without prednisone. **Clin. Exp. Rheumatol.**, **6**:213, 1988. [Abstract]
- THALER, E. & LECHNER, K. - Antithrombin III deficiency and thromboembolism. **Clin. Haematol.**, **10**:369-90, 1981.
- THIAGARAJAN, P.; PNEGO, V.; SHAPIRO, S.S. - The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. **Blood**, **68**:869-74, 1986.
- THIERSCH, J.B. - Therapeutic abortions with a folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (4-amino P. G. A) administered by the oral route. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **63**:1298-304, 1952.
- THO, P.T.; BYRD, J.R.; McDONOUGH, P.G. - Etiologies and subsequent reproductive performance of 100 couples with recurrent abortion. **Fertil. Steril.**, **32**:389-95, 1979.

- THOMAS, R. & REID, R.L. - Thyroid disease and reproductive dysfunction: a review. **Obstet. Gynecol.**, **70**:789-98, 1987.
- TOPPING, J.; QUENBY, S.; FARQUHARSON, R.; MALIA, R.; GREAVES, M. - Marked variation in antiphospholipid antibodies during pregnancy: relationship to pregnancy outcome. **Hum. Reprod.**, **14**:224-8, 1999.
- TRIPLETT, D.A. - Obstetrical complications associated with antiphospholipid antibodies. In: COULAM, C.B.; FAULK, W.P.; McINTYRE, J.A. (eds.) - **Immunological obstetrics**. London, Norton Medical Books, 1992. p.377-403.
- TRIPLETT, D.A.; BARNA, L.; UNGER, G. - Laboratory identifications of lupus anticoagulants. In: XIVth CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS. Indiana, 1993. New York, 1993, New York Hilton & Towers. p. 70-9.
- TRIPLETT, D.A. - Use of the dilute Russell Viper Venom Time (dRVVT): its importance and pitfalls. **J. Autoimm.**, **15**:173-8, 2000.
- UNANDER, A.M.; NORBERG, R.; HAHN, L.; ARFORS, L. - Anticardiolipin antibodies and complement in ninety-nine women with habitual abortion. **Am. J. Obstet Gynecol.**, **156**:114-9, 1987.
- WEBER, M.; HAYEM, G.; DEBANDT, M.; PALAZZO, E.; ROUX, S.; KAHN, M.F.; MEYER, O. - The family history of patients with primary or secondary antiphospholipid syndrome (APS). **Lupus**, **9**:258-63, 2000.
- WINKLER, U.H.; ZIERLEYN, J.P.; SCHULTE, H.; COLLET, W.; SCHINDLER, A.E. - Routine screening for coagulation inhibitors prior to prescribing the pill: prevalence data from a large cohort of German pill starters. **Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care**, **1**:47-52, 1996.

WRAMSBY, M.L.; STEN-LINDER, M.; BREMME, K. - Primary habitual abortions are associated with high frequency of factor V Leiden mutation. **Fertil Steril** **74**:987-91, 2000.

WOUTERS, M.G.A.J.; BOERS, G.H.J.; BLOM, H.J.; TRIJBELS, F.J.M.; THOMAS, C.M.G.; BORM, G.F.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M.; ESKES, T.K.A.B. -Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. **Fertil. Steril.**, **60**:820-5, 1993.

YAMAMOTO, T.; YOSHIMURA, S.; GESHI, Y.; SASAMORI, Y.; OKINAGA, S.; KOBAYASHI, T.; MORI, H. - Measurement of antiphospholipid antibody by ELISA using purified beta 2-glycoprotein I in preeclampsia. **Clin. Exp. Immunol.**, **94**:106-200, 1993.

YOUNIS, J.S.; OHEL, G.; BRENNER, B.; HADDAD, S.; LANIR, N.; BEN-AMI, M. - The effect of thrombophylaxis on pregnancy outcome in patients with recurrent pregnancy loss associated with factor V Leiden mutation. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **107**:415-9, 2000.

ZÖLLER, B.; BERNSTSDOTTER, A.; GARCIA DE FRUTOS, P.; DAHLBACK, B. - Resistance to activated protein C as na additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. **Blood**, **95**:3518-23, 1995.

8. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed.,
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses.
BIREME, São Paulo, 1991. 45p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade
de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD - OF. CIR/ PRPG/06/95 -
Normas ABNT. 1995. 8p.

9. Anexos

9.1. ANEXO 1

ESTUDO COMPARATIVO DA FREQUÊNCIA DE FATORES TROMBOGÊNICOS ENTRE MULHERES COM AER E MULHERES FÉRTEIS

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____, aceito colaborar com um trabalho que está sendo realizado na Divisão de Obstetrícia do CAISM. Para isso, sei que colherão 40 mL do meu sangue, que não vai prejudicar a minha saúde, nem o meu tratamento.

Fui informada de que não terei benefício imediato com este trabalho, mas que posso ajudar a esclarecer as causas dos abortos em mulheres que não conseguem levar uma gravidez até o final. Está claro para mim que poderei desistir de participar do trabalho a qualquer hora, e que isto não vai prejudicar o meu atendimento.

Sei que serei informada sobre os resultados dos exames quando eles estiverem prontos, e sobre o que eles significam.

Campinas, ____ de _____ de 1998.

Assinatura da paciente:

Nome legível e assinatura do médico:

9.2. ANEXO 2

ESTUDO COMPARATIVO DA FREQUÊNCIA DE FATORES TROMBOGÊNICOS ENTRE MULHERES COM AER E MULHERES FÉRTEIS

TÉCNICA LABORATORIAL

9.2.1. Coleta e preparo do material biológico

Foram coletados de cada paciente 40 mL de sangue de veia periférica, com tubos a vácuo e agulhas específicas para esses tubos, com as seguintes características:

- a) 4 tubos a vácuo, de 3,15 mL cada, com citrato de sódio, para exames de proteína C, proteína S, ATIII e ACGL, e 4 alíquotas de reserva
- b) 1 tubo a vácuo, de 5 mL, seco: para exame de ACL

Outros 20 mL foram colocados em tubos a vácuo contendo EDTA para pesquisa do fator V de Leiden, da mutação G20210A no gene da protrombina e da mutação C677T no gene da MTHFR.

Os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório de Hemostasia de Rotina e Pesquisa e Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da UNICAMP, e no Laboratório de Hemostasia do Departamento de Patologia Clínica / FCM / UNICAMP.

9.2.2. Anticorpo anticardiolipina

O ACL foi detectado por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), conforme descrito por TRIPLETT, BARNA & UNGER em 1993. O sangue (5 mL) foi retirado das pacientes, sem anticoagulante, e centrifugado por 10 minutos a 1600 rpm. O soro foi estocado a menos 80°C e descongelado à temperatura ambiente imediatamente antes da realização do ensaio. O antígeno (cardiolipina de coração de boi) foi diluído em etanol (45 µg/mL). Trinta µg desta solução foram aplicados às quatro primeiras fileiras de poços da placa de ELISA (96 poços - 8 fileiras e 12 colunas). O antígeno não foi adicionado à primeira coluna, que permaneceu como “neutra”. Outras quatro fileiras foram cobertas com etanol sem o antígeno para estabelecer os valores de ligação não específica. Estes valores foram subtraídos das placas cobertas com cardiolipina para dar especificidade ao método. As placas permaneceram secando durante a noite. Cem µl de PBS (tampão fosfato salina) foram adicionados aos poços no dia seguinte, exceto na coluna “neutra”. Após um minuto, o PBS foi entornado e a placa exaustivamente batida em papel toalha até estar completamente seca. 200 µl de tampão fosfato salina com soro fetal bovino a 10% foram adicionados a todos os poços como bloqueador e incubados por uma hora e meia. O reagente bloqueador foi entornado das placas, e uma vez mais elas foram batidas em papel toalha até secar. Este último passo foi repetido mais uma vez com um minuto de incubação do PBS. 50µl de soro das pacientes foram adicionados aos poços, exceto à coluna “neutra”, e secados à temperatura ambiente por duas horas. As placas foram lavadas três vezes com 200µl de

PBS. Foram então secas e 50µl do conjugado indireto foram adicionados aos poços, exceto à coluna “neutra”. As fileiras um a quatro receberam o conjugado IgM, e as fileiras cinco a oito receberam o conjugado IgG. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente as placas foram lavadas com 200µl de PBS e batidas para secar. 50µl de substrato dietanolamina foram adicionados a todos os poços e incubados a 37°C no escuro. A reação foi suspensa pela adição de 50µl de NaOH 3M. A densidade óptica foi medida a 405nm em um densitômetro Tibertek.

Controles positivos foram usados como amostras altamente positivas - padrões do Dr. E N HARRIS (Anexo 5), com concentrações conhecidas de IgM e IgG. Um doador normal foi usado como controle negativo. As amostras de soro dos pacientes foram feitas em duplicatas. A média de cada paciente foi considerada o resultado final. Os coeficientes de variação inter-ensaio e o intra-ensaio foram medidos.

9.2.3. Anticoagulante lúpico

Dilute Russell Viper Venom Time (dRVVT)

O veneno de víbora “Russell” diluído ativa diretamente o fator X e por esta razão, é um teste mais específico para o ACGL do que o TTPA, já que não é afetado por deficiência ou inibidores direcionados contra os fatores da via intrínseca.

? Material:

- ? Tubos de ensaio (12 x 75 mm)
- ? Banho-maria a 37°C
- ? Cronômetro
- ? Micropipetas automáticas de 200µl.

? Reagentes:

O kit utilizado para a realização do teste de ACGL foi fornecido pela Organon Teknika.

? *Viperquik™ LA-Test*: reagente diluído, utilizado para o teste do dRVVT, para detectar a presença do ACGL.

? *Viperquik™ LA-Check*: reagente diluído, utilizado para confirmar a presença do ACGL em determinada amostra do plasma sangüíneo.

? Procedimento do teste:

Todas as amostras foram recentrifugadas, para reduzir a quantidade de plaquetas. O reagente Viperquik™ LA-Test foi pré-aquecido (acima de 200 µL) a 37°C. Foram pipetados 200 µL do plasma em um tubo de ensaio e incubados a 37°C por um minuto. Foram adicionados 200 µL do Viperquik™ LA-Test ao plasma e simultaneamente acionado o cronômetro, marcando o tempo de coagulação. O teste foi feito em duplicata.

? Resultados:

Quando o tempo de coagulação com o *Viperquik™ LA-Test* esteve dentro da faixa de normalidade, não foi necessária a realização de um outro teste (confirmação).

Quando o resultado do tempo de coagulação com o *Viperquik™ LA-Test* foi superior a aproximadamente 20% da faixa normal (pool), o resultado foi considerado anormal e uma outra investigação foi feita adicionalmente (confirmação: *Viperquik™ LA-Check*).

Inicialmente realizou-se um novo tempo de coagulação com o *Viperquik™ LA-Test* numa mistura a 50% entre o plasma em estudo e um pool de plasmas normais. Quando o R se normalizou (R até 1,20), foi descartada a presença de um ACGL. Quando o R obtido foi superior a 1,20, realizou-se o teste *Viperquik™ LA-Check* para confirmar que se tratava da presença de um ACGL.

O resultado final foi expresso com um índice [R] entre os valores de tempo obtidos com o "Test" e com o "Check":

$$R = \frac{\frac{Viperquik^{TM} LA-Test \text{ (paciente + pool)}}{Viperquik^{TM} LA-Test \text{ (pool)}}}{\frac{Viperquik^{TM} LA-Check \text{ (paciente + pool)}}{Viperquik^{TM} LA-Check \text{ (pool)}}}$$

No teste realizado com as misturas, o tempo de coagulação se “normalizou” dividindo-se o resultado obtido por um tempo de coagulação normal já conhecido (tempo do pool), realizado para *Viperquik™ LA-Test*.

Repetiu-se o procedimento para o *Viperquik™ LA-Check* e estes valores foram utilizados para calcular o índice [R], como a seguir:

Se o R “*Test*” / “*Check*” foi maior do que 2,0, o ACGL estava fortemente presente.

Se o R foi de 1,5 a 2,0, o ACGL estava moderadamente presente.

Se o R foi de 1,2 a 1,5, o ACGL estava fracamente presente.

Veja o esquema a seguir:

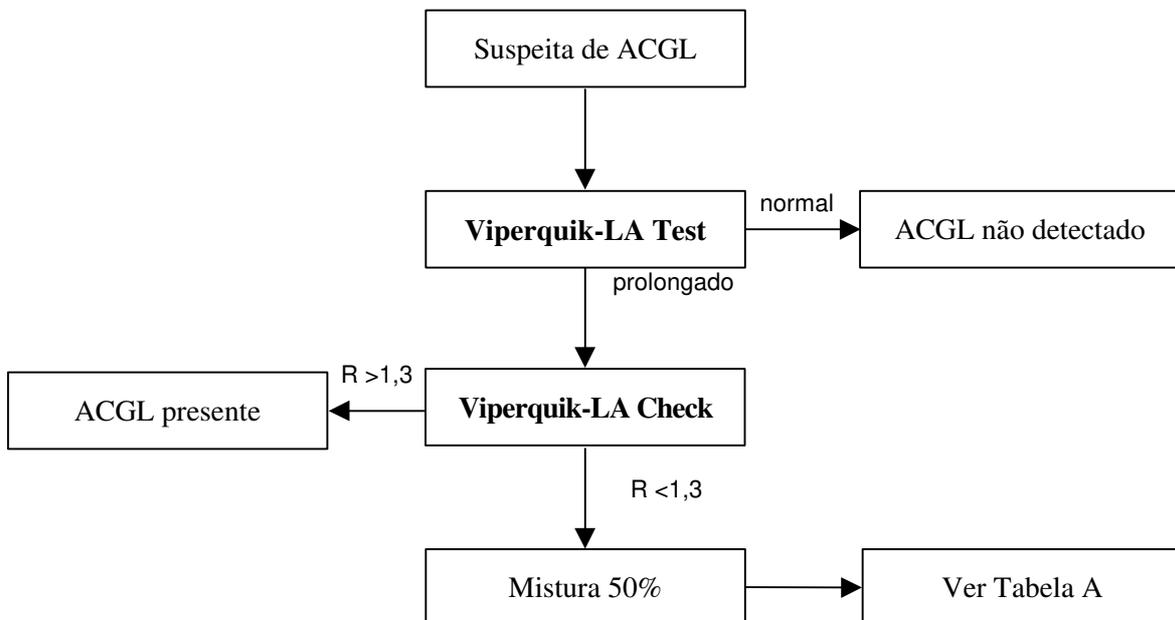


TABELA A

COMBINAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DAS MISTURAS E DOS TESTES CONFIRMATÓRIOS

LA-Test		LA-Check		Diagnóstico
Plasma paciente	Mistura 50%	Plasma paciente	Mistura 50%	
NL	NL	NL	NL	ACGL não detectado
ALT	ALT	NL	NL	ACGL presente
ALT	NL	ALT	NL	Deficiência de fator
ALT	ALT	ALT	NL	ACGL + def. de fator
ALT	ALT	ALT	ALT	Outro inibidor

(NL = normal; ALT = alterado)

? Valores esperados:

A faixa de normalidade para o teste apresenta um índice [R] entre *Viperquik™ LA-Test* e o *Viperquik™ LA-Check* no intervalo de 0,8 a 1,2.

? Controle de qualidade:

Um controle normal foi avaliado todas as vezes em que se pesquisou o ACGL.

9.2.4. Proteína S

A atividade de proteína S foi determinada por método coagulométrico, utilizando-se o Kit BIOCLLOT Proteína S.

Diluições de plasma normal foram misturadas com plasma deficiente em proteína S. O plasma misturado foi então ativado por um reagente que continha fator Xa, proteína C ativada e fosfolípidos. Depois de cinco minutos de ativação, a formação do coágulo foi iniciada pela adição de cloreto de cálcio. Sob estas condições, o prolongamento do tempo de coagulação foi diretamente proporcional à concentração de proteína S no plasma do paciente. O uso de fator Xa como ativador minimizou a interferência potencial por altos níveis de fator VIII, como encontrados em alguns pacientes.

? Material:

- ? Tubos de vidro (12 x 75 mm)
- ? Micropipetas automáticas
- ? Cronômetro
- ? Banho-maria a 37°C

? Reagentes:

- ? Kit BIOCLLOT Proteína S: ativador, plasma deficiente em proteína S, tampão para diluição das amostras (10x concentrado)

? Procedimento do teste:

Os reagentes foram reconstituídos com água destilada. As diluições do pool e dos plasmas dos pacientes foram reconstituídas a 1:10. Foram pipetados, em um tubo, 0,1 mL de plasma deficiente de proteína S e 0,1 mL da

amostra que seria testada. A mistura foi incubada por dois minutos a 37°C. Foi então adicionado o ativador (pré-aquecido a 37°C). A mistura foi incubada por exatamente cinco minutos a 37°C. Foi adicionado 0,1 mL de cloreto de cálcio 0,025 M (pré-aquecido a 37°C). O cronômetro foi acionado para marcar o tempo de formação do coágulo. O teste foi feito em duplicata.

? **Calibração:**

Foi preparada uma curva de calibração padrão, com o plasma controle (pool), como na tabela abaixo:

Porcentagem	Plasma	Tampão
100	100 µl de pool	900 µl
50	500 µl (de 100%)	500 µl
0	-	1000 µl

As amostras dos pacientes foram preparadas diluindo-se 50µl do plasma com 450 µl de tampão. Armazenaram-se as diluições a 2-8°C e elas foram testadas em até trinta minutos.

? **Valores esperados:**

O valor da proteína S foi expresso em porcentagem, comparado ao plasma normal (100%). A faixa de normalidade considerada foi de 55% a 160%.

9.2.5. Proteína C

O método se baseou no prolongamento do TTPA pelo uso de um ativador da proteína C, isolado de um veneno de cobra (“Southern Copperhead Snake”). Após a ativação, a proteína C ativada inativa os fatores Va e VIIIa.

Esta dosagem utilizou um plasma deficiente em proteína C como diluente, minimizando o efeito de níveis alterados de outros fatores de coagulação.

? Material:

- ? Pipetas automáticas de 50 µl, 100 µl e 500 µl
- ? Tubos plásticos (12 x 75 mm)
- ? Estante para tubos
- ? Cronômetro
- ? Banho-maria a 37°C

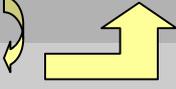
? Reagentes:

Para a realização do ensaio de proteína C foi utilizado o kit DADE da Baxter Diagnostics Inc.

- ? Tampão da proteína C
- ? Ativador da proteína C
- ? Controle padrão da proteína C
- ? Plasma deficiente em proteína C
- ? Cefalina ativada – ACTIN
- ? Cloreto de cálcio 0,02 M (preparado em laboratório)

? Procedimento do teste:

Uma nova curva de calibração foi preparada a cada vez que a dosagem de proteína C foi realizada. Foi feita a curva de calibração utilizando o controle padrão da proteína C e o plasma deficiente em proteína C, conforme mostra a tabela:

Amostra	1:4	1:8	-
Plasma deficiente	0,45 mL	0,25 mL	0,25 mL
Controle padrão	0,15 mL		-
Misturar e transferir	0,25 mL		

Foram pipetados 50 µl da amostra que seria testada (padrão ou paciente). Foram adicionados 50 µl do ativador da proteína C e 50 µl da cefalina (ACTIN). Tudo foi misturado e incubado a 37°C por quatro minutos. Foram adicionados 50 µl de cloreto de cálcio 0,02 M, pré-aquecidos a 37°C. O cronômetro foi acionado para marcar o tempo de formação do coágulo.

? Notas:

- ? Cada kit de reagente veio com um lote específico e um valor de dosagem (%) expresso no lado superior direito da bula. Este valor serviu de dosagem de referência para a curva de calibração.
- ? A diluição 1:4 foi o dobro do valor de dosagem indicado na bula
- ? A diluição 1:8 teve o mesmo valor daquele indicado na bula (%)
- ? A terceira diluição, que continha apenas plasma deficiente em proteína C, correspondeu a 0%

? Preparação das amostras:

Utilizou-se o plasma deficiente em proteína C como diluente, para preparar uma diluição 1:8 de cada amostra que seria testada (um volume da amostra + sete volumes de plasma deficiente).

? Amostras:

? Paciente ou plasma controle.....20 µl

? Plasma deficiente em proteína C.....140 µl

? Valores esperados:

A leitura da atividade da proteína C foi feita através da curva de calibração (em papel milimetrado). O intervalo estabelecido como normal para a dosagem de proteína C apresentou como diretriz: atividade de proteína C entre 72 e 142%.

9.2.6. Antitrombina III

O teste da ATIII mediu os níveis funcionais de ATIII no plasma. O plasma que continha ATIII foi diluído na presença de heparina e incubado com trombina; formou-se então um complexo de ATIII – trombina – heparina. A trombina restante catalisou a liberação de p-nitroanilina no substrato cromogênico. A liberação de p-nitroanilina foi medida por um parâmetro-alvo ou pelo método cinético a 405 nm. A absorbância obtida foi inversamente proporcional à concentração de ATIII na amostra e pode ser quantificada por interpolação em uma curva de calibração.

? Material:

- ? Cronômetro
- ? Tubos plásticos
- ? Banho-maria a 37°C
- ? Espectrofotômetro a 405 nm
- ? Centrífuga

? Reagentes:

Utilizou-se no laboratório de Hemostasia o kit *Chromostrate* da Organon Teknika.

- ? Reagente de substrato: continha 5 moles/frasco de H-D-Ciclohexil Tirosil-L-alfa amino Butiril-L-arginina-paranitroanilida (2 AcOH.H-D-CHT-L-Abut-pNA)
- ? Reagente de trombina: continha trombina humana (aproximadamente 65 nKat/frasco)
- ? Tampão concentrado: continha tampão específico para substrato, pH 8,7
- ? Ácido acético a 50% (não fornecido no kit) – preparado em laboratório

? Procedimento do teste:

- ? Preparação da curva de calibração

A curva de calibração da ATIII foi preparada a partir de diluições do plasma de referência de *Chromostrate?*. As diluições do plasma de referência em solução tampão a 1:40, 1:80 e 1:160 corresponderam a uma atividade teórica de 100%, 50%% e 25%. A curva de calibração foi constituída a partir do valor de referência real (atividade percentual) citado na bula que acompanhava a embalagem em cada lote de plasma de referência do *Chromostrate?*. Cada diluição do plasma de referência foi testada de acordo com o procedimento do teste.

? Análise do parâmetro-alvo

Foi determinada a média dos valores de absorbância a 405 nm de cada diluição do plasma de referência e subtraída a absorbância do valor do branco. Foi então determinado o nível de ATIII (real) de cada diluição de plasma de referência, usando o valor designado da ATIII do lote específico de plasma referência de *Chromostrate?* na seguinte equação: Atividade percentual real = Atividade percentual teórica (25%, 50%, 100%) x valor designado ATIII / 100. Relacionou-se, em gráfico linear, a atividade percentual real com a absorbância a 405 nm para cada diluição do plasma de referência. Traçou-se a linha reta que melhor se ajustasse aos três pontos de referência.

? Análise cinética

Foi determinada a média da mudança na absorbância por minuto a 405 nm para cada diluição do plasma de referência. Determinou-se o nível de ATIII real de cada diluição do plasma de referência, usando o valor designado de

ATIII do lote específico de plasma de referência do *Chromostrate* na seguinte equação: Atividade percentual real = Atividade percentual teórica (25%, 50%, 100%) x valor designado ATIII / 100. Relacionou-se, em gráfico linear, a atividade percentual real com a mudança na absorbância por minuto de cada diluição do plasma de referência. Foi traçada a linha reta que melhor se ajustou aos três pontos de referência.

? Realização do teste:

Foram preparadas as diluições das amostras de pacientes, controles e plasmas de referência em solução tampão, como segue:

Paciente	1:40	0,05 mL (50 ?L) de plasma + 1,95 mL de tampão
Controle	1:40	0,05 mL (50 ?L) de plasma + 1,95 mL de tampão
	100% - 1:40	0,05 mL (50 ?L) de plasma + 1,95 mL de tampão
Referência	50% - 1:80	1,0 mL (1:40) diluição + 1,0 mL de tampão
	25% - 1:160	1,0 mL (1:80) diluição + 1,0 mL de tampão

A temperatura da reação foi controlada: 37°C mais ou menos 0,2°C.

? Análise de parâmetros-alvo

Realizou-se o teste com amostra em duplicata. O branco pode ser omitido, exceto quando as amostras apresentavam níveis elevados de bilirrubina (maiores que 107 ?moles/l – 6,3 mg/dl – e/ou níveis de hemoglobina superiores a 1,4 g/l).

Rotularam-se três tubos plásticos (12 x 75 mm), dois como teste e um como branco, um para cada diluição de plasma testada.

Nos tubos rotulados para teste foram acrescentados 200 μ L de plasma diluído e foram incubados a 37°C de três a cinco minutos. Acrescentaram-se 200 μ L do reagente trombina à temperatura ambiente (20 a 25°C). A mistura foi incubada por exatamente sessenta segundos. Foram acrescentados 200 μ L do reagente de substrato a 37°C. A mistura foi incubada por exatamente trinta segundos. Acrescentaram-se 200 μ L de ácido acético a 50%, e a mistura foi feita imediatamente.

No tubo rotulado de branco foram acrescentados 200 μ L de plasma diluído, 400 μ L de água destilada e 200 μ L de ácido acético a 50%. Misturou-se bem, tendo a cor permanecido estável por várias horas. Foi transferido para uma cubeta semi micro de 1 cm e medidas as absorvâncias dos tubos teste e branco a 405 nm, em relação à água destilada. Foi determinada a média dos valores de absorvância de cada amostra e subtraída a absorvância de branco correspondente. Leu-se a atividade percentual (ATIII) de cada amostra diretamente na curva de calibração.

? Análise cinética:

A maioria dos analisadores cinéticos com um controle de temperatura a 37°C pode ser adaptado facilmente para o teste de ATIII. Foram acrescentados 200 μ L de plasma diluído e incubados a 37°C de três a cinco minutos. Foram

acrescentados 200 µL do reagente trombina à temperatura ambiente (20 a 25°C), misturados e incubados por exatamente sessenta segundos. Acrescentaram-se 200 µL do reagente de substrato a 37°C, e a mistura foi transferida imediatamente para uma cubeta semi micro de 1 cm, e medida a mudança na absorbância por minuto 405 nm e a 37°C.

Foi determinada a média das mudanças nos valores de absorbância por minuto de cada amostra. Leu-se a atividade percentual (ATIII) de cada amostra diretamente na curva de calibração. As velocidades de reação em certos níveis de atividade foram rápidas. Conseqüentemente, as medidas foram limitadas ao tempo de hidrólise que correspondeu à parte linear da reação.

? Valores esperados:

O intervalo conhecido como normal para a dosagem de ATIII apresentou como diretriz: atividade de 85% a 125%.

9.2.7. Métodos de biologia molecular

As técnicas laboratoriais que serão descritas a seguir (fator V de Leiden, mutação G20210A e mutação C677T) utilizaram métodos de biologia molecular. Por isso, antes da descrição das técnicas fez-se necessário descrever a extração do DNA de sangue periférico:

O DNA foi isolado de células nucleadas a partir de 10 mL de sangue venoso coletado. O plasma foi descartado, após centrifugação do sangue a

3000 rpm a 4°C, por 10 minutos. Para a lise das hemácias adicionou-se NH₄Cl 0,144M na proporção de 0,5 vezes o volume de células. Após 15 minutos à temperatura ambiente, a solução foi centrifugada a 2000 rpm, a 4°C, por 20 minutos. Esta etapa foi repetida até a obtenção de um precipitado nuclear de leucócitos livre de hemácias.

Os leucócitos foram dissolvidos em 10 mL de tampão TKM-1 (KCl 1M, EDTA 0,2M, Tris/HCl 2M pH 7,6, MgCl₂ 1M). A seguir acrescentaram-se 125 µL de Triton X-100 e após a homogeneização por inversão, o material foi novamente centrifugado a 2200 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em 5 mL de TKM1 e centrifugado novamente. Desta vez, o sedimento obtido foi ressuspensão em 0,8 mL de tampão TKM2 (KCl 1M, EDTA 0,2M, Tris/HCl 2M pH 7,6, MgCl₂ 1M, NaCl 5M).

Após a adição de 50 µL de SDS (Dodecil sulfato de sódio) a 10%, a suspensão foi homogeneizada e incubada em banho-maria a 55°C, por 30 minutos. Acrescentaram-se então 300 µL de NaCl 5M e, após mistura por inversão, centrifugou-se a 12000 rpm por 10 minutos.

Ao final, a camada superior contendo o DNA foi transferida para um tubo estéril de 15 mL. Procedeu-se à extração de DNA, adicionando-se 10 mL de fenol (redesilado e saturado em Tris/HCl 0,2mM, pH8,0, contendo 0,1% de hidroxiquinolina), clorofórmio e álcool-isoamílico, na proporção 25:24:1. Após mistura por inversão, centrifugou-se a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante

foi transferido e novamente adicionou-se 1 mL de clorofórmio/álcool-isoamílico (24:1). Misturou-se por inversão e centrifugou-se a 12000 rpm por 10 minutos.

Para a precipitação do DNA foi utilizado etanol absoluto gelado na proporção de 2 vezes o volume da fase aquosa, à temperatura ambiente. A mistura foi invertida diversas vezes até a obtenção do precipitado de DNA.

O DNA precipitado foi lavado em etanol gelado a 70%, para eliminar resíduos de sal. O DNA obtido foi ressuspensão em quantidade apropriada de TE (Tris pH 8,0 10mM, EDTA 0,1mM pH 7,4) e sua concentração e pureza foram determinadas em espectrofotômetro, pela leitura das densidades ópticas nos comprimentos de onda de 260 a 280 nm, em luz ultravioleta.

9.2.7.1 Pesquisa do fator V de Leiden

O codon para Arg506 está posicionado no exon 10 do gene do fator V. A determinação da mutação G para A envolveu a amplificação desta região, seguida pela digestão com a enzima MnlI.

Após a extração do DNA genômico o exon 10 foi amplificado através da reação em cadeia pela polimerase (RCP), utilizando-se uma mistura de 54mM de tris-HCl, pH 8.8, 5.4mM MgCl₂ 5.4mM EDTA, 13.3mM (NH₄)₂SO₄, 10% DMSO, 8mM β-mercaptoetanol, 0.4mg/mL BSA, 0.8mM de cada nucleosídeo trifosfato, 400 ng de cada iniciador (sense: 5'-CTTGAAGGAAATGCCCCATTA-3' e antisense: 5'-TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA-3'), 500ng de DNA e 2 U de Taq polimerase. A reação envolveu 30 ciclos de incubação a 94°C (40"), 57°C (40")

and 72°C (2'). Um fragmento de 220 pares foi obtido e 5-10 µL do material amplificado foi digerido com 0.5U da enzima Mnl I. Esta região do exon 10 continha 2 sítios de restrição nas posições 1637 e 1694. Após a digestão do gene normal (alelo 1691G), fragmentos de 116, 67 e 37 pares de base foram observados através de uma corrida em gel de agarose a 2%. Quando o alelo mutante estava presente (1691A), não ocorreu mais a clivagem na posição 1694, e observaram-se fragmentos de 153 e 67 pares de base.

9.2.7.2 Detecção da mutação G20210A no gene da protrombina

Após a extração do DNA genômico o fragmento não transcrito da região 3' do gene da protrombina foi amplificado pela RCP, numa mistura de 54 mM Tris-HCl, pH 8.8, 5.4 mM MgCl₂, 5.4 µM EDTA, 0.8 mM de cada nucleosídeo trifosfato, 400 NG de cada iniciador: sense (5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3') e antisense (5'-ATAGCACTGGGAGCATT GAAGC-3'), 500 ng do DNA genômico e 2 U da enzima Taq polimerase. A reação envolveu 35 ciclos de incubação a 94°C (1 minuto), 58°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto) e resultou na obtenção de um fragmento de 345 pares de base. 10 a 15 µL do material amplificado foram digeridos com 2.5 U da enzima Hid III, fornecendo um fragmento de 322 pares de base, na presença do alelo mutante (G20210A). Quando o alelo normal (20210G) estava presente o sítio de restrição foi ausente e o fragmento de 345 pares de base permaneceu intacto.

9.2.7.3 Detecção da mutação C677T no gene da MTHFR

Após a extração do DNA genômico, amplificou-se a região do gene da MTHFR onde poderia ocorrer a mutação através da RCP. O fragmento do gene da MTHFR foi amplificado numa mistura de 54mM Tris-HCl, pH 8.8, 5.4 mM MgCl₂, 5.4 mM EDTA, 13.3 mM (NH₄)₂SO₄, 8% DMSO, 8 mM β-mercaptoetanol, 0.4 mg BSA/mL, 0.8 mM de cada nucleosídeo trifosfato, 400 ng de cada iniciador: sense (5'- TGAAGGAGAAGGTGTCTGCG GGA-3') e antisense (5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'), 500 ng do DNA genômico e 2 U da enzima Taq polimerase. A reação envolveu 30 ciclos de incubação a 94°C (1 minuto), 55°C (1 minuto) e 72 °C (2 minutos). Um fragmento de 198 pares de base foi obtido e 10-15µL deste material amplificado foram digeridos com 0.5U da enzima Hinf I. Após a digestão o alelo mutante (alelo 677T) forneceu 2 fragmentos de 175 e 23 pares de base, observados num gel de agarose. Quando o alelo normal (677C) estava presente, não havia o sítio de restrição para a enzima, e somente o fragmento de 198 pares de base foi observado.

9.2.8. Interpretação dos resultados

ACL: os resultados foram expressos em unidades MPL (IgM) e GPL (IgG). Valores entre 10 e 20 unidades foram considerados fracamente positivos; entre 20 e 40 moderadamente positivos e, acima de 40 unidades, fortemente positivos.

ACGL: os resultados foram expressos segundo a relação entre o tempo obtido para o paciente e o tempo de um pool de controles. Se a relação foi menor ou igual a 1,20, o resultado foi considerado normal. Se foi maior que 1,20, foi considerado positivo e o paciente foi submetido a um teste confirmatório.

Proteína C: os resultados foram expressos em porcentagem de atividade. Foi considerada deficiente atividade abaixo de 72%.

Proteína S: os resultados foram expressos em porcentagem de atividade. Foi considerada deficiente atividade abaixo de 55%.

ATIII: os resultados foram expressos em porcentagem de atividade. Foi considerada deficiente atividade abaixo de 85%.

Fator V de Leiden: foi considerado presente ou ausente. Quando presente, foi classificado em heterozigoto ou homozigoto.

Mutação G20210A no gene da protrombina: foi considerada presente ou ausente. Quando presente, foi classificada em heterozigota ou homozigota.

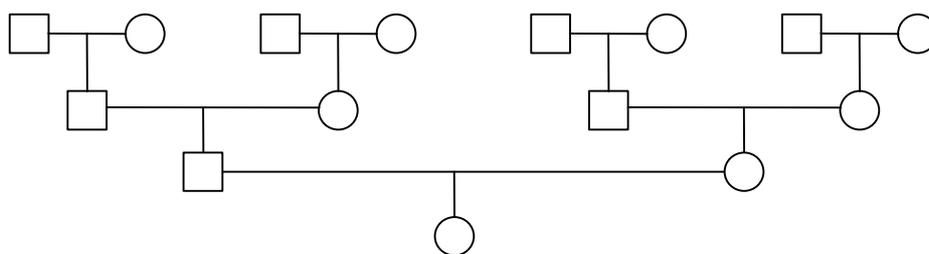
Mutação C677T no gene da MTHFR: foi considerada presente ou ausente. Quando presente, foi classificada em heterozigota ou homozigota.

9.3. ANEXO 3

ESTUDO COMPARATIVO DA FREQUÊNCIA DE FATORES TROMBOGÊNICOS ENTRE MULHERES COM AER E MULHERES FÉRTEIS

FICHA PARA COLETA DE DADOS

1. Grupo
2. Número no estudo
3. Data de admissão
4. Idade
5. Raça/cor branca não branca



6. Número de gestações
7. Número de partos
8. Número de abortos espontâneos
9. Número de filhos vivos
10. Número de natimortos

11. ACL Positivo Negativo
12. Classe do ACL IgG IgM
13. ACGL Positivo Negativo
14. Atividade da proteína C %
15. Deficiência da proteína C Normal Deficiente
16. Atividade da proteína S %
17. Deficiência da proteína S Normal Deficiente
18. Atividade da ATIII %
19. Deficiência da ATIII Normal Deficiente
20. Fator V de Leiden Ausente Hetero Homo
21. Mutação G20210A no gene da protrombina
 Ausente Hetero Homo
22. Mutação C677T no gene da MTHFR: Ausente Hetero Homo

9.4. ANEXO 4

ESTUDO COMPARATIVO DA FREQUÊNCIA DE FATORES TROMBOGÊNICOS ENTRE MULHERES COM AER E MULHERES FÉRTEIS

IDENTIFICAÇÃO

Nome _____

H C _____ / _____

N no estudo _____

9.5. ANEXO 5

SOROS DE CALIBRAÇÃO DE HARRIS

Amostra positiva: LAPL – MP – 005

Lote # 1245LPH

LAPL – GP – 005

Lote # 3866BKH

Antiphospholipid Standardization Laboratory

University of Louisville

Medical Dental Research Building

511 South Floyd St.

Louisville, KY 40202

9.6. ANEXO 6

DECLARAÇÃO DE HELSINQUE – ASSOCIAÇÃO MÉDICA MUNDIAL

Recomendações para a orientação de médicos quanto a pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos.

Adotada pela 18ª Assembléia Médica Mundial Helsinque, Finlândia, em junho de 1964 e corrigida pelas:

- ? 29ª Assembléia Médica Mundial Tóquio, Japão, em outubro de 1975 e
- ? 35ª Assembléia Médica Mundial Veneza, Itália, em outubro de 1983 e pela
- ? 41ª Assembléia Médica Mundial Hong Kong, em setembro de 1989

INTRODUÇÃO

A missão do médico é salvaguardar a saúde das pessoas. Seu conhecimento e sua consciência são dedicados ao cumprimento desta missão.

A Declaração de Genebra, da Associação Médica Mundial, impõe uma obrigação ao médico, por intermédio da frase "a saúde do meu paciente será minha primeira consideração", e o Código Internacional de Ética Médica declara que "quando estiver prestando cuidados médicos que possam ter o efeito de

enfraquecer a condição física e mental do paciente, um médico agirá somente no interesse do paciente".

Os propósitos da pesquisa biomédica envolvendo seres humanos devem ser melhorar os procedimentos diagnósticos, terapêuticos e profiláticos e a compreensão da etiologia e patogênese da doença.

Na atual prática médica, muitos procedimentos diagnósticos, terapêuticos ou profiláticos envolvem perigos. Isto aplica-se de modo especial à pesquisa biomédica.

O progresso médico é lastreado por pesquisas que, em última análise, devem basear-se parcialmente em experiências envolvendo seres humanos.

Na área da pesquisa biomédica, deve-se reconhecer uma distinção fundamental entre a pesquisa médica cuja meta é essencialmente diagnóstica ou terapêutica para um paciente, e a pesquisa médica cujo objeto essencial é puramente científico e não implica um valor diagnóstico ou terapêutico direto para a pessoa submetida à pesquisa.

Deve-se ter cuidados especiais na condução de pesquisas que possam afetar o meio ambiente, e o bem-estar de animais utilizados em pesquisas deve ser respeitado.

Como é essencial que os resultados de experiências de laboratório sejam aplicados a seres humanos para avançar o conhecimento científico e para ajudar as pessoas que sofrem, a Associação Médica Mundial preparou as

recomendações a seguir, como uma orientação para todos os médicos trabalhando em pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos. Essas recomendações deverão ser revisadas no futuro. Deve-se enfatizar que os padrões enunciados são apenas uma orientação para médicos em todo o mundo, e não os liberam de suas responsabilidades éticas, civis e criminais à luz das leis de seus próprios países.

I. PRINCÍPIOS BÁSICOS

1. A pesquisa biomédica envolvendo seres humanos deve obedecer princípios científicos geralmente aceitos e ser baseada em experiências laboratoriais, *in vitro* e em animais, adequadamente realizadas e em um conhecimento profundo da literatura científica.
2. O desenho e a realização de cada procedimento experimental envolvendo seres humanos devem ser enunciados claramente em um protocolo de experiência que deve ser transmitido, para consideração, comentários e orientação, a um comitê, especialmente nomeado, independente do investigador e do patrocinador, desde que este comitê independente esteja de acordo com as leis e regulamentos do país onde se realiza a pesquisa.
3. Pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos só devem ser conduzidas por pessoas cientificamente qualificadas, e sob a supervisão de um profissional médico clinicamente competente. A responsabilidade pelo participante deve sempre ser de uma pessoa medicamente qualificada, e nunca do participante da pesquisa, mesmo que este tenha dado seu consentimento.

4. Pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos não podem ser legitimamente realizadas a não ser que a importância do objetivo seja proporcional ao risco inerente para o participante.
5. Cada projeto de pesquisa biomédica envolvendo seres humanos deve ser antecedido por uma avaliação cuidadosa dos riscos previsíveis, em comparação com os benefícios previstos, para o participante ou para terceiros. A preocupação com os interesses do participante deve sempre prevalecer sobre os interesses da ciência e da sociedade.
6. O direito do participante de pesquisas de salvaguardar sua integridade deve sempre ser respeitado. Devem-se tomar todas as precauções para respeitar a privacidade do participante e minimizar o impacto do estudo sobre sua integridade física e mental e sobre sua personalidade.
7. Médicos não devem engajar-se em projetos de pesquisa envolvendo seres humanos, a não ser que estejam satisfeitos de que acredita-se que os perigos envolvidos podem ser previstos. Os médicos devem interromper qualquer investigação caso se descubra que os perigos ultrapassam os benefícios potenciais.
8. Ao publicar os resultados de sua pesquisa, o médico é obrigado a preservar a exatidão dos resultados. Relatórios de experiências que não estejam de acordo com os princípios estabelecidos nesta Declaração não devem ser aceitos para publicação.
9. Em qualquer pesquisa em seres humanos, cada participante em potencial deve ser adequadamente informado sobre os objetivos, métodos, benefícios previstos e potenciais perigos do estudo, e o incômodo que este possa acarretar. Deve ser informado de que é livre para retirar seu consentimento em participar, a qualquer momento. O médico deve então obter o consentimento pós-informação do participante, dado livremente, de preferência por escrito.

10. Ao obter o consentimento pós-informação para o projeto de pesquisa, o médico deve ser particularmente cuidadoso caso o participante tiver uma relação de dependência em relação a ele e possa consentir sob pressão. Nesse caso, o consentimento pós-informação deve ser obtido por um médico que não esteja engajado na investigação e que seja completamente independente dessa relação oficial.
11. Em caso de incompetência legal, deve-se obter o consentimento pós-informação do guardião legal, em conformidade com a legislação nacional. Quando uma incapacidade física ou mental impossibilita a obtenção do consentimento pós-informação, ou quando o participante for menor de idade, a permissão do familiar responsável substitui a do participante, obedecendo-se a legislação nacional. Sempre que o menor for na realidade capaz de dar consentimento, o consentimento do menor deve ser obtido, além do consentimento de seu guardião legal.
12. O protocolo de pesquisa deve sempre conter uma declaração das considerações éticas envolvidas, e deve indicar que os princípios enunciados nesta Declaração serão obedecidos.

II. PESQUISAS MÉDICAS COMBINADAS COM CUIDADOS PROFISSIONAIS (Pesquisa clínica)

1. No tratamento da pessoa doente, o médico deve ter liberdade para usar uma nova medida diagnóstica ou terapêutica se, em seu julgamento, esta oferecer esperança de salvar a vida, restabelecer a saúde ou aliviar o sofrimento.
2. Os benefícios, perigos e desconforto potenciais de um novo método devem ser pesados em relação às vantagens dos melhores métodos diagnósticos e terapêuticos atuais.

3. Em qualquer estudo médico, todos os pacientes - incluindo os de um grupo controle, se houver - devem ter assegurados os melhores métodos diagnósticos e terapêuticos comprovados.
4. A recusa do paciente em participar de um estudo nunca deve interferir com a relação médico-paciente.
5. Se o médico considera essencial não obter o consentimento pós-informação, as razões específicas para esta proposta devem ser declaradas no protocolo experimental a ser transmitido ao comitê independente (1,2).
6. O médico pode combinar a pesquisa médica com cuidados profissionais, com o objetivo de adquirir novos conhecimentos médicos, somente até onde a pesquisa médica seja justificada por seu potencial valor diagnóstico ou terapêutico para o paciente.

III. PESQUISAS BIOMÉDICAS NÃO-TERAPÊUTICAS ENVOLVENDO SERES HUMANOS (Pesquisa biomédica não-clínica)

1. Na aplicação puramente científica de pesquisas médicas realizadas em um ser humano, o médico tem o dever de continuar sendo o protetor da vida e da saúde daquela pessoa na qual a pesquisa biomédica é realizada.
2. Os participantes devem ser voluntários— pessoas saudáveis ou pacientes para os quais o desenho do estudo não tem relação com a sua própria doença.
3. O investigador ou equipe de investigadores deve interromper a pesquisa se, em seu julgamento, esta possa ser nociva ao indivíduo, se continuada.

Em pesquisas sobre o homem, o interesse da ciência e da sociedade nunca devem ter precedência sobre considerações relativas ao bem-estar do participante.