RENATA ZACCARIA SIMONI

**MUTAÇÃO DO FATOR V DE LEIDEN E
OCORRÊNCIA DE PERDAS GESTACIONAIS**

**UNICAMP
2001**

RENATA ZACCARIA SIMONI

***MUTAÇÃO DO FATOR V DE LEIDEN E
OCORRÊNCIA DE PERDAS GESTACIONAIS***

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Tocoginecologia, área de Tocoginecologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Joyce Maria Annichino -Bizzacchi

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Barini

**UNICAMP
2001**

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

Si57m Simoni, Renata Zaccaria
 Mutação do fator V de leiden e ocorrência de perdas
gestacionais/ Renata Zaccaria Simoni. Campinas, SP : [s.n.],
2001.

 Orientadores : Joyce Maria Annichino Bizzacchi, Ricardo
Barini

 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Aborto. 2. Morte fetal. I. Joyce Maria Annichino
Bizzacchi. II. Ricardo Barini . III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: RENATA ZACCARIA SIMONI

Orientadora: Prof^a Dr^a JOYCE MARIA ANNICHINO-BIZZACCHI

Co-Orientador: Prof. Dr. RICARDO BARINI

Membros:

1.

2.

3.

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

Data:

Dedico este trabalho...

Ao meu marido Amaury, pela incansável
disponibilidade e seu constante incentivo.

Aos meus pais Ana Heloisa e José Leão, pelo apoio
incondicional e contínuo estímulo.

Agradecimentos

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, pela compreensão e pela confiança depositada em mim.

Prof. Dr. Ricardo Barini, pela co-orientação neste trabalho, paciência e inestimável ajuda no árduo trabalho de realização dessa tese.

Profa. Dra. Egle Cristina Couto Carvalho, pelos seus ensinamentos, regados de muita ternura e incentivo.

Prof. Dr. José Guilherme Cecatti

Prof. Dr. José Carlos Gama da Silva

Prof. Dr. Antonio Fernandes Moron

Profa. Dra. Rosiane Mattar

Prof. Dr. João Luiz Pinto e Silva

Prof. Dr. Belmiro Gonçalves Pereira

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

Dr. Marcelo Luís Nomura

Prof. Dr. Renato Passini Júnior

Prof. Dr. Luis Bahamondes

Dra. Fátima Lotuffo

Dra. Mariane Paredes Costa

Maurício Zaccaria

Marcela Araújo Zaccaria

Edeni Vinha

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

Sueli Regina

Margarete Amado de Souza Donadon

Devanira de Souza Paixão

Lúcia Helena de Siqueira

Andrea Maria Galizoni Quaiotti

Zoraide Fátima Pereira Gregório

A todas pacientes pela interminável contribuição à Medicina, meu reconhecimento e gratidão.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução	1
2. Objetivos	20
2.1. <i>Objetivo geral</i>	20
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	20
3. Sujeitos e Métodos	21
3.1. <i>Desenho do Estudo</i>	21
3.2. <i>Tamanho da Amostra</i>	21
3.3. <i>Critérios e procedimentos para seleção dos sujeitos</i>	22
3.4. <i>Técnica Laboratorial</i>	23
3.5. <i>Definição de Variáveis</i>	24
3.6. <i>Instrumento para a Coleta de Dados</i>	27
3.7. <i>Coleta de Dados</i>	27
3.8. <i>Processamento e Análise dos Dados</i>	28
3.9. <i>Aspectos Éticos</i>	29
4. Resultados	30
5. Discussão	39
6. Conclusões	50
6.1. <i>Conclusão Geral</i>	Erro! Indicador não definido.
6.2. <i>Conclusões Específicas</i>	Erro! Indicador não definido.
7. Referências Bibliográficas	52
8. Bibliografia de Normatizações	61
9. Anexos	62

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

%	Porcentagem
β	Beta
α	Alfa
AE	Aborto Espontâneo
ERA	Aborto Espontâneo de Repetição
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
DTG	Departamento de Tocoginecologia
Et al.	E outros (as)
HC	Hospital das Clínicas
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
LES	Lupus Eritematoso Sistêmico
N	Número de Casos
NK	<i>Natural Killer</i>
NS	Não significativo
OF	Óbito fetal
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	p-valor
SAF	Síndrome antifosfolípides
PCA	Proteína C ativada
SPSS/PC+	<i>Statistical Package of Social Sciences for Personal Computer</i>
TH	Trombofilia Hereditária
TVP	Trombose Venosa Profunda
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

Lista de Tabelas

		Pag
TABELA 1	Distribuição da idade atual das mulheres nos grupos estudados	31
TABELA 2	Distribuição das mulheres em cada grupo de acordo com a raça/cor	32
TABELA 3	Distribuição do número de gestações entre os grupos	32
TABELA 4	Distribuição da evolução das gestações nos grupos estudados	33
TABELA 5	Distribuição do resultado gestacional de acordo com a idade e grupo	34
TABELA 6	Distribuição do resultado gestacional de acordo com a raça/cor, considerando-se grupos estudados	34
TABELA 7	Distribuição da ocorrência de aborto nos grupos estudados	35
TABELA 8	Distribuição percentual dos antecedentes pessoais de fenômenos tromboembólicos no Grupo 1	36
TABELA 9	Distribuição percentual de antecedentes familiares de fenômenos tromboembólicos nos grupos estudados	37
TABELA 10	Distribuição dos antecedentes tromboembólicos nos familiares do Grupo 1, de acordo com o grau de parentesco.	38

Resumo

O objetivo deste estudo foi correlacionar a presença de trombofilia hereditária com perdas gestacionais. Para isso foram usados dois grupos de mulheres. O primeiro grupo constou de 42 mulheres do Ambulatório de Hemostasia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas com a presença do fator V de Leiden (Grupo 1), e o segundo grupo foi de 94 mulheres do Ambulatório de Planejamento Familiar, sem a presença desse fator de trombofilia hereditária (Grupo 2). Foi estudada a frequência de perdas gestacionais em cada grupo, na tentativa de estabelecer uma correlação entre a trombofilia e perdas gestacionais, e também com os antecedentes pessoais e familiares de fenômeno tromboembólico. A coleta de dados foi feita através de uma ficha clínica para dados do prontuário, e de um questionário, respondido por entrevista telefônica. Cerca de 88% das pacientes do Grupo 1 pertenciam à raça/cor branca e também 59% das mulheres do Grupo 2. O número de óbitos fetais não apresentou diferença estatisticamente significativa nos dois grupos. No Grupo 1 as mulheres tiveram 109 gestações e no Grupo 2, 223 gestações, evoluindo para abortamento 26% das mulheres do Grupo 1 e 9% das mulheres do Grupo 2, respectivamente. Nos antecedentes pessoais do Grupo 1

predominou a ocorrência de trombose venosa profunda. Já nos antecedentes familiares desse grupo houve maior número de fenômenos tromboembólicos, inclusive com a ocorrência de mais de um episódio na mesma pessoa. A mutação do fator V de Leiden foi diagnosticada apenas na forma heterozigota e também diagnosticaram-se três mulheres com a mutação do gene da protrombina no Grupo 1 na forma heterozigota. Concluímos que a frequência de abortamento foi significativamente maior nas mulheres portadoras de trombofilia hereditária, que essas mulheres apresentam número elevado de fenômenos tromboembólicos nos antecedentes pessoais e familiares de primeira geração.

Summary

The aim of this study was to correlate the presence of hereditary thrombophilia with gestational loss. Two groups of women were studied. First group: 42 women with the presence of the Leiden factor V, which were patients of the hematology out patient clinics of Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Group 1). Second group: 94 women without the presence of hereditary thrombophilia, which were patients of the Ambulatório de Planejamento Familiar (Group 2). The frequency of gestational loss was studied in each group to establish a correlation between thrombophilia and gestational loss. Personal and family history of thromboembolic phenomena were also studied in both groups. The data collection was performed by means of a clinic index card for handbook data, in addition to a questionnaire answered through a telephone interview. 88% of the women from Group 1 and 59% of the women from Group 2 were white. There was no statistical difference in the number of fetal deaths between the two groups. Group 1 presented 109 pregnancies, 26% of which were abortions. Group 2 presented 223 pregnancies, 9% of which were abortions. In the personal history of Group 1 the occurrence of deep venous thrombosis was more common than other problems, whereas in

the familiar history of Group 1 there was higher frequency of thromboembolic phenomena, with the occurrence of more than one episode in the same person in comparison with Group 2. The mutation on Leiden factor V was diagnosed in the heterozygous form exclusively. Three women of Group 1 were also diagnosed as carriers of prothrombin gene mutation in the heterozygous form. We conclude that the frequency of abortion and of recurrent abortion was significantly higher in women with hereditary thrombophilia. These women present higher number of thromboembolic phenomena in the personal and family history up to the first generation.

1. Introdução

A perda gestacional representa um problema na prática obstétrica atual, apesar das várias etiologias conhecidas e dos regimes terapêuticos propostos. A morte do produto da concepção na espécie humana é um evento biológico muito mais comum do que se acreditava tempos atrás (SOUZA, et al., 1999).

Didaticamente, pode-se dividir a perda gestacional em abortamento e óbito fetal, de acordo com a idade gestacional, peso e estatura fetal, mas há divergências entre os autores na delimitação desses parâmetros. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 1977) divide os abortamentos em precoce, quando ocorre abaixo de 12 semanas, e tardio entre 12 e 22 semanas de gestação. Sabe-se que cerca de 75% deles são precoces (ROONEY, 2000).

A OMS define como abortamento espontâneo (AE) o término da gravidez abaixo de vinte e duas semanas de gestação ou a expulsão de um produto de concepção menor que 500 gramas de peso. Aproximadamente 10% a 20% das gestações evoluem espontaneamente para abortamento (ROONEY, 2000).

Em um futuro não muito remoto, é provável que esse limite de 20-22 semanas seja modificado, pois o progresso da neonatologia moderna tem

permitido a sobrevivência de nascituros com idade gestacional cada vez mais precoces.

Dentro dos abortamentos, chama-se de abortamento espontâneo recorrente (AER) a história reprodutiva de três ou mais abortos sucessivos espontâneos. A situação é relativamente comum e representa desgaste emocional para a mulher em sua vida. Desde a Antigüidade, a ciência visa conhecer melhor a etiologia dessa entidade, buscando alternativas terapêuticas que possam produzir melhores resultados gestacionais. A literatura mostra uma incidência de AER entre 0,3% a 1% dos casais (RAI et al., 1996). Após um primeiro aborto espontâneo (AE), o risco de um segundo é de 18% a 24%, e o risco de ocorrer um terceiro AE aumenta para 30% a 40% (FARAH & JOFFE, 1999).

São reconhecidos diversos fatores envolvidos na etiopatogenia do aborto espontâneo. Podem ser classificados em fatores ambientais (idade materna, história prévia de AE, tabagismo, alcoolismo), fatores endócrinos (diabetes, tireoideopatias, insuficiência lútea), fatores genéticos (mosaicismo – 44%, translocações – 48%), fatores anatômicos (defeitos müllerianos, sinéquias uterinas, incompetência istmo-cervical, miomatose), fatores infecciosos e fatores imunológicos (marcadores antifosfolípidos, idiopáticos) (WITLIN et al., 1999). Porém, para alguns autores, a etiologia permanece desconhecida em aproximadamente metade dos casos de AE (COSTA & COSTA, 1995).

Na etiologia dos abortos, os fatores ambientais que influenciam na incidência de AE, sabe-se que à medida que avança a idade materna, as perdas aumentam. Entre as idades de 30 a 34 anos, é de 15%; entre 35 e 39 anos, é 18%; e atinge 25% em idades acima de 40 anos. O fumo também tem sido associado com aumento do risco de abortamento euplóide, sendo que para mulheres que fumam 14 cigarros ou mais, o risco aumenta duas vezes, independentemente da idade materna. A ingestão de bebida alcoólica também cursa com aumento do número de abortamento (ROONEY, 2001).

Por sua vez, o fator hormonal é tido como o mais freqüente entre as possíveis causas de aborto. Nesse grupo incluem-se a insuficiência lútea, a mais comum, o hipotireoidismo, o *diabetes melitus*, desordens androgênicas e da prolactina (ROONEY, 2000).

A insuficiência do corpo lúteo foi descrita em 1949 por Jones que identificou dois tipos de defeito nessa fase: a produção deficiente de progesterona e a resposta endometrial insatisfatória à adequada estimulação da progesterona. No Ambulatório de Aborto Espontâneo de Repetição (AER) do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), a incidência foi de 23% a 67% (BARINI et al., 2000).

A etiologia do abortamento compreende também o fator genético que incide em 3% a 5% dos casais. A alteração mais comum é a translocação balanceada, que representa uma aberração estrutural em um ou nos dois

parceiros. Pode ser classificada em recíproca ou robertsoniana. No primeiro caso, ocorre a troca de cromatina entre os dois cromossomos não homólogos sem perda de material genético. No segundo caso ocorre ruptura em dois cromossomos acêntricos, sendo um exatamente abaixo e o outro acima do centrômero, seguida pela união do mesmo. Esta translocação ocorre com perda pequena de material genético. Os cromossomos 13 e 14 estão envolvidos em 58% dos casos da translocação robertsoniana (HILL, 1994).

Por sua vez, os fatores anatômicos podem ser congênitos ou adquiridos. A forma congênita é representada pelas anomalias müllerianas, onde o septo uterino é a apresentação mais comum. A forma adquirida compreende as sinéquias, leiomiomas, a endometriose e a insuficiência istmo-cervical. Os primeiros distúrbios ocasionam alteração do fluxo sangüíneo, decidualização imprópria, implantação e placentação desordenadas e aumento da contratilidade uterina (HILL, 1994). Por sua vez, a insuficiência istmo-cervical, dentre os fatores anatômicos, tem como possível fator etiológico conhecido o trauma cervical. Este pode ter sido provocado por lacerações e deformações anatômicas, principalmente durante o parto, nascimento de fetos macrossômicos, uso de fórcepe ou partos muito rápidos. Outro evento freqüentemente presente na história dessas mulheres é a dilatação cervical mecânica com velas de Hegar para curetagem. Estima-se que a insuficiência cervical seja pouco diagnosticada, uma vez que é responsável por cerca de 16% a 20% dos abortamentos espontâneos do segundo trimestre (DUFOR et al.,

1995). No Ambulatório de AER da UNICAMP sua ocorrência é de 22% (BARINI et al., 2000).

De um modo geral, as infecções podem interromper precocemente a gestação, ainda que o conceito moderno não reconheça as infecções como causa de AER. As de maior destaque são a sífilis, rubéola, brucelose, listeriose, toxoplasmose, as determinadas pela *Chlamydia trachomatis* e *Ureaplasma urealyticum*, que têm sido implicadas como causa de perda gestacional (ROONEY, 2000). No material da UNICAMP, 11% das mulheres têm cultura cérvico uterina positiva para Micoplasma (BARINI et al., 2000).

É recente na literatura a identificação dos fatores imunológicos alo-imune e auto-imune como etiologia do aborto. Ambos têm sido muito estudados, mas o completo entendimento do processo de reconhecimento e inibição da rejeição, mediado por células do sistema imune na gravidez humana, ainda é um desafio. Do ponto de vista da alo imunidade, diversos fatores são responsáveis pela proteção do concepto contra a rejeição do organismo materno. A baixa imunogenicidade do trofoblasto conseqüente à sua propriedade de não expressar antígenos privados do sistema HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) parece desempenhar papel principal na proteção do concepto. Hoje é reconhecido um antígeno HLA placentário não clássico, o HLA-G (McMASTER et al, 1995). Este desempenha papel fundamental na processo de adaptação imunológica do organismo materno em relação aos produtos fetais. Recentemente, alguns anticorpos produzidos durante a gestação foram descritos com função protetora, entre eles o anticorpo

antilinfocitotóxico, fator bloqueador da reação linfocitária mista e anticorpo contra receptores para fração Fc das imunoglobulinas (BARINI et al., 2000). O fator alo-imune é descrito como uma anormalidade que impede a mãe de desenvolver respostas imunológicas para sobrevivência do conceito geneticamente estranho (OBER et al., 1999).

Em decorrência do fator alo-imune, algumas mulheres desenvolvem aumento da atividade das células NK (*natural killer*). Quando presente, há relação com um pior prognóstico gestacional e aumento da incidência de abortamento precoce. A terapia por imunização materna com linfócitos suprime a atividade dessas células (KWAK et al., 1998).

Entre os fatores de auto-imunidade, destaca-se o Lupus Eritematoso Sistêmico (LES). É a doença auto-imune mais prevalente nas mulheres no menacme e está fortemente associada com aumento de perdas gestacionais, principalmente de óbitos fetais. A principal característica desta doença é a produção de auto-anticorpos que atuam sistemicamente. Fisiopatologicamente, o LES provoca lesões por processos que evoluem em consequência de vasculites (FORASTIERO et al., 2001).

Foram descritos, na década de 80, alguns auto-anticorpos em mulheres portadoras de LES e que apresentavam óbito fetal (OF) recorrente e antecedente de tromboembolismo. Esses anticorpos, quando presentes e associados ao tromboembolismo em mulheres com OF, compõem um quadro clínico que se denomina Síndrome Antifosfolipídica (SAF) (HARRIS et al, 1986).

Mais tarde pôde ser verificado que a SAF não era exclusividade das pacientes lúpicas, o que impôs nova denominação, agora considerada SAF primária na ausência de doença auto-imune prévia e SAF secundária na presença de LES, síndrome da imunodeficiência adquirida e trauma (LOCKSHIN et al., 1987).

Os anticorpos presentes na SAF e com marcante associação com AER são o anticoagulante lúpico e o anticorpo anticardiolipina. Das pacientes com AER, cerca de 9% a 20% terão pelo menos um dos anticorpos antifosfolípides, e apresentam na histologia placentária, na maioria das vezes, vasculopatia decidual necrotizante cursando com menor aporte sangüíneo ao feto por uma insuficiência úteroplacentária. Tem sido preconizado tratar essas pacientes durante a gestação com ácido acetilsalicílico em baixas doses, associado a baixas doses de heparina (FORASTIERO et al., 2001).

A associação entre auto-anticorpos e perda gestacional está bastante documentada. Um estudo para avaliar a incidência de anticorpos anti-tireoideanos em mulheres com perdas gestacionais recorrentes ou pré-eclâmpsia, encontrou em 37,7% das primeiras e em 33,3% das mulheres com pré-eclâmpsia, contra 14,5% dos controles, mostrando a associação da auto-imunidade de tireóide e complicações obstétricas (MECACCI et al., 2000).

A perda gestacional tardia denomina-se óbito fetal quando ocorre acima de 20 semanas de amenorréia. Segundo classificação da OMS (WHO, 1977), a morte fetal é dividida, conforme idade gestacional, em três grupos: precoce, quando incide até 20 semanas; intermediário, de 20 a 28 semanas e tardio, a

partir de 28 semanas. Há divergências entre os autores, mas a tendência no Brasil é de se utilizar o critério acima de 20 semanas, ou peso maior que 500 gramas para o diagnóstico de óbito fetal (MARIANI NETO, 1994).

As causas determinadas de morte fetal anteparto são divididas em maternas e feto anexiais. Destacam-se os processos patológicos intercorrentes na mulher durante a gestação entre as causas maternas que determinam insuficiência placentária. A mais comum é representada pela síndrome hipertensiva (MARIANI NETO, 1994). Quanto às infecções bacterianas, destacam-se a sífilis, a corioamnionite severa e a listeriose. A sífilis é responsável pela maioria das ocorrências, justificando sua avaliação pré-natal rotineiramente (DUARTE et al., 1987).

Entre as infecções parasitárias, incluem-se ainda a doença de Chagas, a toxoplasmose e a malária. Entre as virais, a citomegalovirose, rubéola, influenza, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e a infecção pelo herpes vírus II fazem parte das causas descritas de OF (YANCEY et al., 1996).

Outros fatores maternos importantes são as endocrinopatias, principalmente as disfunções tireoidianas e diabetes (MARIANI NETO, 1994). O diabetes, em função de suas alterações metabólicas, é o que mais se relaciona com morte fetal, mas um descontrole na fase pré-gestacional e nas primeiras semanas de gestação está também associado a perdas fetais por malformações, onde se destacam anomalias esqueléticas (regressão caudal), cardíacas e renais (ANTSACLIS, 1997).

A isoimunização ao fator Rh também pode determinar morte fetal, assim como as hemorragias feto-maternas, independentemente do tipo sangüíneo. Estima-se que 75% dos casos podem corresponder à presença do anticorpo anti-D e 25% dos casos por outros antígenos eritrocitários (KLINGENFUSS, 2000).

As anemias em geral, desnutrição, quimioterápicos, antineoplásicos e anticoagulante oral e drogas ilícitas pela gestante, além das intoxicações por metais pesados, são causas menos freqüentes de morte fetal (ROONEY, 2000).

Ainda como determinante de insuficiência placentária, a gestação prolongada (FIGO, 1986) pode ser também causa de óbito fetal, cursando com desnutrição fetal, oligoâmnio, mecônio, macrossomia e áreas de maceração, caracterizando a Síndrome da pós-maturidade. Em um estudo realizado no Reino Unido, demonstrou-se que o coeficiente de mortalidade perinatal aumenta com 42 semanas de gestação, dobra quando atinge 43 semanas e é quatro a seis vezes maior após 44 semanas (BOYD et al., 1988).

As malformações uterinas como hipoplasia, útero bicorno ou septado, e/ou a presença de miomatose uterina, podem também se associar ao óbito fetal, geralmente por trabalho de parto prematuro ou inadequação de sítio placentário, com conseqüente insuficiência placentária (MARIANI NETO, 1994).

A associação entre a presença de anticorpos anticoagulante lúpico e anticardiolipina com óbito fetal já foi determinada, não somente em mulheres com doenças auto-imunes diagnosticadas, mas em pacientes aparentemente

sadias com a identificação desses anticorpos em sua circulação (BRANCH et al., 1985).

Vários estudos têm sugerido ainda a associação entre OF e idade materna e fumo, identificando-os como possíveis marcadores de risco. Enquanto a idade materna acima de 35 anos está mais exposta à cromossomopatia fetal, o fumo apresenta maior probabilidade de insuficiência placentária, descolamento prematuro de placenta e restrição de crescimento intra-uterino (RAYMOND, CNATTINGIUS, KIELY, 1994).

As causas fetais mais importantes são as malformações congênitas e as anormalidades cromossômicas, que correspondem a 25% e 40% dos OF. Para serem identificadas, dependem de protocolos que incluam estudo radiológico, necrópsia do recém-nascido e o estudo do patrimônio genético (RICHARD et al., 1994).

Quanto às causas anexiais, destacam-se as hemorragias do terceiro trimestre da gestação, as funiculopatias e a terceira circulação de Schantz na prenhez gemelar monozigótica, que pode acarretar na morte de um dos fetos, principalmente o transfusor (MARIANI NETO, 1994).

O estudo da etiologia das perdas gestacionais hoje revela interesse na associação com as trombofilias hereditárias, em decorrência do estabelecimento de relação causal entre a trombofilia adquirida e perdas gestacionais, na forma da Síndrome dos Anticorpos Antifosfolipídicos, e também por ter sido identificado o antecedente de trombose venosa materna

associado ao AER, fato amplamente documentado na literatura (FORASTIERO et al., 2001).

A manifestação clínica mais freqüentemente descrita e relacionada às várias formas de apresentação da trombofilia é a trombose venosa profunda (TVP). Esta patologia incide na população geral em um caso para cada mil habitantes. Uma tendência à TVP pode resultar da coagulação hiperativa de mecanismos anticoagulantes hipoativos ou hipofibrinólise (POORT et al., 1996). Os fatores de risco são bem conhecidos, como cirurgia recente, gestação e trabalho de parto, uso de anticoncepcional oral, doença maligna e imobilização por tempo prolongado (KOSTER et al., 1993; DALHBACH, 1995).

Trombofilia, por sua vez, é o termo aplicado à tendência para ocorrência de trombose de maneira geral, em paciente com idade precoce, geralmente abaixo dos 50 anos de vida, com recorrência freqüente, forte história familiar e/ou localizações não usuais.

Trombofilia hereditária (TH) é a tendência geneticamente determinada a tromboembolismo venoso e/ou arterial. Situações intermediárias, ou seja, tendências mais leves a quadros de trombose, com antecedentes e quadro clínico menos evidentes, podem ser descobertas por investigação laboratorial ou pela ocorrência de trombose na presença de fatores de risco. Todas as associações genéticas e suas interações não são ainda completamente entendidas (LANE et al., 1996).

Trombofilia adquirida é a tendência à trombose que se desenvolve ao longo da vida pela presença de alguns fatores trombofílicos sem características hereditárias, como o anticorpo anticardiolipina e anticoagulante lúpico (BRENNER et al., 1997).

Na trombofilia hereditária são descritas a deficiência das proteínas S, C e antitrombina III e as mutações do gene do fator V de Leiden, da mutação G20210A no gene da protrombina e C677T no gene da enzima metileno tetrahydrofolato redutase. Essas condições são todas relacionadas a uma tendência a fenômenos tromboembólicos (ARRUDA & FIGUEIREDO, 1997).

O fator V é uma glicoproteína plasmática de cadeia única sintetizada no fígado e megacariócitos. Na coagulação, ele é convertido em fator V ativado pela trombina e/ou fator X. Atua como cofator não enzimático da protrombinase, aumentando a eficiência catalítica em aproximadamente duas mil vezes (LANE et al., 1996).

Dentre os fatores trombogênicos hereditários destaca-se o fator V de Leiden. Essa mutação foi descrita por BERTINA, KOELEMAN, KOSTER (1994), como um novo mecanismo de hipercoagulabilidade determinado geneticamente, como resultante da resistência do plasma de pacientes à ação anticoagulante da proteína C ativa (PCA) (ARRUDA & FIGUEIREDO, 1997).

A mutação do fator V causa um estado de hipercoagulabilidade devido à lentificação da inativação do fator Va pela PCA (DE STEPHANO, FINAZZI, MANUCCI, 1996). O fator V mutante expressa atividade pró-coagulante normal,

porém, por ser menos sensível à degradação mediada pela PCA, leva à estabilização do complexo protrombinase, aumenta a geração da trombina e promove ativação retrógrada dos fatores V e VIII. A taxa aumentada de ativação da cascata de coagulação e o aumento do fator V ativado potencializam a resistência à PCA e isso resulta em um estado de hipercoagulabilidade (DALHBACH, 1995).

A mutação no gene do fator V (fator V de Leiden) é a mais comum das alterações hereditárias relacionadas à trombose. Essa mutação confere ao fator V resistência à inativação pela proteína C ativada (PCA). A PCA é um inibidor natural da coagulação que atua inativando os fatores Va e VIIIa. No fator V de Leiden ocorre a troca da arginina pela glutamina na posição 506, um dos sítios de clivagem da PCA. Disto decorre mudança da adenina pela guanina na posição 1691 no gene do fator V, ocasionando uma proteólise parcial e lenta do fator V (DALHBACH, 1995).

A mutação no gene do fator V, como base molecular para o fenótipo da resistência à PCA na maioria dos indivíduos afetados, foi encontrada em 50% das famílias selecionadas com trombofilia e em 20 % dos pacientes consecutivos com trombose. A cadeia leve do fator Va tem o sítio de ligação de fosfolípidos, enquanto a cadeia pesada é a responsável pela atividade de cofator. O fator Va é normalmente inativado pela degradação proteolítica de sua cadeia pesada pela PCA, e começa com a clivagem no códon 506 (LANE et al., 1996).

Famílias com deficiência da proteína C têm um risco aumentado para trombose de cinco a dez vezes, que pode ser maior na presença de uma mutação do fator V. Estudos em famílias portadoras de trombofilia hereditária sugerem que o fator V de Leiden é herdado como traço autossômico dominante (DALHBACH, 1995). A frequência do fator V de Leiden em populações caucasianas é de aproximadamente 6% (LANE et al., 1996). Na maioria das famílias com resistência hereditária à PCA, foi encontrada a mutação do fator V (DALHBACH, 1995).

A mutação do fator V está presente em 3% a 15% da população geral, em 5% a 15% da população caucasóide normal e em menos de 1% em negros e orientais. Nos caucasóides, 2% a 7% são heterozigotos e 0,1% são homozigotos. A mutação do fator V é encontrada em 20% a 40% dos casos de TVP. Estima-se que os portadores dessa mutação em homozigose e aproximadamente 10% dos heterozigotos apresentarão pelo menos um evento de TVP ao longo de suas vidas. Esta incidência é aproximadamente seis a oito vezes maior nos heterozigotos e 80 vezes maior nos homozigotos, quando comparados com indivíduos sem essa mutação. (ARRUDA & FIGUEIREDO, 1997; KUJOVICH & GOODNIGHT, 1999).

Na associação destas alterações com a gravidez, inicialmente RAI et al. (1996) verificaram que a prevalência da resistência à PCA foi significativamente mais alta entre as mulheres com perdas gestacionais de segundo trimestre, quando comparadas com mulheres com história de perdas no primeiro trimestre e com um grupo-controle de múltiparas sem história de abortos.

Em outro estudo avaliando mulheres com antecedente de AER em suas gestações atuais, concluiu-se que a resistência à PCA é causa potencial de insuficiência vascular placentária, tanto devido à presença da mutação do fator V de Leiden quanto às formas adquiridas de resistência à PCA, (BRENNER et al., 1997).

A mutação do fator V de Leiden foi encontrada também com maior frequência entre abortamento primário de segundo trimestre, com três ou mais perdas, e sua frequência não diferiu entre mulheres com ou sem patologia adicional (FOKA et al., 2000).

Assim, das gestantes ou puérperas que apresentam trombose durante a gestação, 60% são portadoras da mutação do fator V. Na população desse estudo foi também observada uma associação com a ocorrência de aborto de segundo trimestre. A prevalência da mutação foi de 8% entre 113 mulheres com AER; de 3,7% em 437 mulheres na menopausa que nunca abortaram e de 7,5% entre 387 mulheres na pós-menopausa com pelo menos um AE (RIDKER et al., 1998; TOSSETO et al., 1998).

A mutação do fator V de Leiden é um defeito genético bem definido e a manutenção de sua prevalência na população geral sugere que haja um mecanismo de seleção genética positiva envolvido, pois um discreto estado de hipercoagulabilidade oferece certa proteção em situações de traumas e gravidez (DALHBACH, 1995).

Os mecanismos descritos para a ação do fator V de Leiden não poupam o conceito. O desenvolvimento da circulação feto placentária tem início por volta de 18 a 20 dias da concepção e depende do balanço das células endoteliais com atividade pró-coagulante e anticoagulante. Na presença do fator V de Leiden, pode haver um estado de hipercoagulabilidade fetal, resultando em trombose placentária por grande quantidade de fibrina depositada nas vilosidades, cursando com oclusão arterial, necrose isquêmica dos vilos e conseqüente perda fetal (DIZON-TOWNSON et al., 1997). Em relação à mãe, acredita-se que a presença do estado de hipercoagulabilidade possa levar a formação de trombose nas arteríolas adjacentes ao sítio placentário, o que pode culminar em aborto ou óbito fetal.

Em estudos mais recentes é aventada a hipótese de que a trombofilia hereditária colabore para os estados hipertensivos gestacionais, como a pré-eclâmpsia precoce e severa, restrição de crescimento intra-útero e perdas gestacionais inexplicáveis (OZCAN et al., 2001).

A associação de trombofilia hereditária e complicações obstétricas está documentada em situações de insuficiência de perfusão placentária e aumento de deposição de fibrina. O fator V de Leiden é a principal mutação encontrada nessas mulheres (BOZZO et al., 2001).

Já em 1996 Poort descreveu outro fator de TH determinado geneticamente com mecanismo de hipercoagulabilidade provocado por uma mutação no gene da protrombina. A presença de um alelo variante com níveis

plasmáticos elevados de protrombina poderia aumentar o risco de TH (ARRUDA & FIGUEIREDO, 1997).

A protrombina é uma alfa₂-globulina, proteína plasmática com peso molecular de 68.700. No plasma normal, sua concentração é de cerca de 15mg/dL e após sua ativação, transforma-se em trombina. É produzida no fígado em presença da vitamina K (MEYER, HANSON, STRYER, 1992). A protrombina é precursor da protease trombina, enzima chave nos processos de hemostasia e trombose, que exibe atividade pró-coagulante e anticoagulante (POORT et al., 1996).

A forma mutante da protrombina (mutação G20210A) tem prevalência de 2% na população geral e de 1% a 6% nos caucasóides. Entre os não caucasóides é muito rara ou inexistente. Em pacientes com história de trombose venosa, a freqüência é de 6% a 8% e de 3% naqueles com infarto do miocárdio. Em uma população de recém-nascidos brasileiros, a freqüência de heterozigotos foi de 0,7% (ARRUDA et al.,1995; GRANDONE et al., 1998). Essa nova variação na seqüência do gene da protrombina é fator de risco moderado para trombose venosa. Nos pacientes portadores da mutação 20210A no gene da protrombina, em 60% deles esta foi a única anormalidade genética encontrada, enquanto que nos 40% restantes a mutação do fator V de Leiden também estava presente (POORT et al., 1996).

A mutação no gene da protrombina além de se associar clinicamente com o aumento do risco para tromboembolismo no ciclo grávido-puerperal, está

associada com aumento da incidência de descolamento prematuro de placenta, insuficiência placentária, restrição de crescimento intra-útero e perda gestacional (KUPFERMINC et al., 1999).

Nas últimas duas décadas, pesquisadores citam um novo grupo de fatores que podem estar relacionados com a etiopatogenia do aborto espontâneo recorrente, em especial os fatores que determinam trombofilia. A associação entre AER e o antecedente de trombose venosa materna foram descritos por vários estudos (HUGHES, 1983; TRIPLETT, 1992).

De acordo com a revisão da literatura médica, pode-se inferir que as causas descritas como associadas à perda gestacional são muitas, o que dificulta o diagnóstico exato de sua etiologia. Além disso, é necessário estudar a importância dos diferentes fatores associados para poder minimizar a ocorrência de nova perda gestacional.

Em indivíduos brasileiros com episódio de trombose venosa profunda, cerca de 20% a 40% dos casos apresentam o fator V de Leiden. Esta frequência é igual à descrita em populações européias, apesar da origem altamente heterogênea da população brasileira (ARRUDA et al., 1995).

Há poucos estudos realizados sobre este aspecto da vida reprodutiva na população brasileira, o que nos estimulou a realizar o presente estudo. A melhora dos conhecimentos sobre a influência e repercussões da trombofilia hereditária nos antecedentes pessoais e obstétricos em uma população pode facilitar as decisões em se implementar novas modalidades diagnósticas e em

se propor ou validar terapêuticas empíricas oferecidas para as mulheres com aborto recorrente, como o uso de medicação anticoagulante sem a demonstração clínica de doença tromboembólica (CADAVID et al., 1999). As conclusões deverão fornecer orientação aos programas de prevenção, diagnóstico e tratamento das perdas gestacionais recorrentes ou não, além de propor estratégias para eliminação ou atenuação das intercorrências obstétricas e clínicas que dependem, na maioria das vezes, de sua identificação para serem prevenidas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Estudar os antecedentes clínicos e reprodutivos em mulheres com trombofilia hereditária e compará-los aos de mulheres sem essas mutações.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar a frequência de aborto espontâneo nos dois grupos.
- Comparar a frequência de aborto espontâneo recorrente nos dois grupos.
- Comparar a frequência de óbito fetal nos dois grupos.
- Descrever a frequência de fenômenos tromboembólicos em mulheres portadoras de trombofilia hereditária.
- Comparar a frequência de fenômenos tromboembólicos em familiares de primeira e segunda geração nos dois grupos.

3. Sujeitos e Métodos

3.1. Desenho do Estudo

Estudo de coorte retrospectivo com controle externo. Esse tipo de estudo foi escolhido porque se tratava de uma exposição de baixa frequência em um evento particular, em que seria difícil identificar uma coorte que representasse com segurança os expostos e não expostos. Como o grupo de expostos já estava identificado usou-se então um grupo de controle externo, desde que os indivíduos pertencessem à mesma região geográfica e com características semelhantes aos da coorte de interesse no estudo (HANNEKENS & BURING, 1987).

3.2. Tamanho da Amostra

O tamanho amostral foi calculado considerando-se a proporção de perda gestacional em mulheres na população geral estimada em 12%, e na população com a presença de fatores trombogênicos estimada em 41% (DIZON-TOWSON et al., 1997). Foram fixados um erro alfa de 5% e um erro beta de 20%, resultando em 42 mulheres portadoras da mutação do fator V, classificadas

como Grupo 1; e 42 mulheres não portadoras da mutação do fator V no Grupo 2. O tamanho amostral foi calculado a partir do programa Amostra para estudos comparativos (FLEISS, 1981).

3.3. Critérios e procedimentos para seleção dos sujeitos

3.3.1. Critérios de Inclusão

No Grupo 1 foram incluídas 42 mulheres admitidas no Ambulatório de Hemostasia do Departamento de Hematologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade de Campinas, no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2000, com antecedente pessoal ou familiar de fenômenos tromboembólicos e a presença da mutação do fator V de Leiden e/ou da mutação G20210A no gene da protrombina. Esse grupo de mulheres teve confirmação diagnóstica na avaliação realizada no atendimento de rotina do Ambulatório de Hemostasia. Toda paciente com fenômeno tromboembólico que foi atendida pelo Ambulatório de Hemostasia teve pesquisado os fatores para trombofilia hereditária como rotina. Quando confirmados, foram também pesquisados nos familiares, independentemente do sexo e da idade, para confirmação diagnóstica da trombofilia familiar hereditária. Nesse Grupo 1, as pacientes incluídas apresentavam o fator V de Leiden por estarem em acompanhamento nesse ambulatório por antecedentes clínicos pessoais ou familiares.

No Grupo 2 foram incluídas 94 mulheres do Ambulatório de Planejamento Familiar do Departamento de Tocoginecologia da FCM-UNICAMP, sem a presença da mutação do fator V de Leiden, que já haviam sido investigadas por participarem de outra pesquisa no período de janeiro de 1999 a agosto de 2000. (CARVALHO, 2001). Essas mulheres participaram de uma pesquisa de um projeto de doutorado que comparou a frequência de fatores trombogênicos entre mulheres com AER e mulheres férteis, no período descrito acima. O número de mulheres incluídas na pesquisa de doutorado excedia o tamanho amostral calculado para o Grupo 2 dessa pesquisa, mas foi mantido nesse estudo para aumentar a sensibilidade e o poder estatístico.

3.3.2. Critérios de Exclusão

Foram usados como critérios de exclusão do Grupo 2 para a pesquisa original, antecedentes pessoais de fenômenos tromboembólicos. Esses critérios foram mantidos para a composição do Grupo 2, por ter sido usado o mesmo grupo de mulheres do estudo já referido.

3.4. Técnica Laboratorial

A técnica laboratorial utilizada para a pesquisa do fator V de Leiden e da mutação G20210A está descrita no Anexo 5.

3.5. Definição de Variáveis

3.5.1. Variáveis Dependentes:

Antecedentes pessoais de perda gestacional, episódios tromboembólicos, Infarto agudo do miocárdio (IAM), trombose venosa profunda (TVP), acidente vascular cerebral (AVC) - investigadas pelo questionário.

- Perda gestacional: gestação com produto conceptual inviável, não importando a idade gestacional no momento da perda.

Categorias: menor que 20 semanas de gestação (aborto), maior que 20 semanas de gestação (óbito fetal), ausente.

- Episódios tromboembólicos: ocorrência de qualquer episódio tromboembólico incluindo TVP, IAM, AVC e trombose de vasos superficiais.

Categorias: sim, não.

- Infarto agudo do miocárdio: foi perguntado para as mulheres na entrevistas se elas já tiveram algum episódio de IAM diagnosticado por eletrocardiograma, por um médico e se estiveram internadas.

Categorias: sim, não.

- Acidente vascular cerebral: foi perguntado durante a entrevista se já houve algum episódio de derrame com perda de função motora e se permaneceram internadas.

Categorias: sim, não.

- Trombose venosa profunda: perguntado às mulheres em entrevista se já tiveram algum episódio de TVP com diagnóstico médico em hospital e uso de heparina.

Categorias: sim, não.

Antecedentes familiares:

Episódios tromboembólicos, trombose venosa profunda, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral em familiares de primeira geração e segunda geração. Essas variáveis foram investigadas por questionário.

- primeira geração: presença de antecedente de fenômeno tromboembólico em familiares da primeira e/ou da mesma geração, incluindo pai, mãe, irmão, irmã, tias e/ou tios consangüíneos
- segunda geração: presença de antecedente de fenômeno tromboembólico em familiares, incluindo avós.

As demais variáveis dependentes dos antecedentes familiares já foram definidas anteriormente para antecedentes pessoais.

3.5.2. Variáveis Independentes:

- Fator V de Leiden: mutação G1691A no gene do fator V, base molecular para o fenótipo da resistência à proteína C ativada, associado ou não à mutação 20210A (mutação G20210A na região 3” do gene da protrombina, associada a um aumento dos níveis plasmáticos da mesma).

Categorias: ausente, presença do fator V de Leiden, com ou sem a mutação G20210A

3.5.3. Variáveis de controle:

Idade, raça/cor, número de gestações, números de partos (investigados por questionário).

- Idade: idade da mulher em anos completos no momento da entrevista.
- Raça/cor: a tonalidade da pele e seu grupo racial serão definidos pela mulher que se autoclassificará.

Categorias: branca, não branca.

- Número de gestações: número de gestações referidas pela paciente até a data de admissão ao estudo, independentemente da forma de término.

- Número de partos: número de partos por via vaginal ou cesariana, com idade gestacional superior a 22 semanas de gestação, com feto vivo ou não.

3.6. Instrumento para a Coleta de Dados

Foi usada uma ficha para coleta de dados de prontuário (Anexo 1) e um questionário (Anexo 2) para entrevista por telefone. Seguem modelos anexos.

3.7. Coleta de Dados

A seleção dos sujeitos foi realizada a partir de duas listas: uma do Ambulatório de Hemostasia–UNICAMP com mulheres com história pessoal e/ou familiar de fenômenos tromboembólicos e que apresentam as mutações do fator V de Leiden e/ou a G20210A no gene da protrombina; e outra de mulheres do Ambulatório de Planejamento Familiar que não apresentam estas mutações.

A partir dessas listas foi feita a coleta de dados do prontuário em uma ficha clínica individual pela pesquisadora (Anexo 1). As fichas clínicas foram complementadas posteriormente, nas mulheres que aceitaram participar da pesquisa, por um questionário (Anexo 2). O contato com essas mulheres foi realizado através de carta para o endereço encontrado no prontuário explicando a pesquisa, convidando-as a participar, após devolverem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 4) assinado para o endereço da

pesquisadora. Nessa correspondência constou envelope selado e endereçado à pesquisadora, para as pacientes enviarem o Termo e assim aceitarem participar do estudo.

As mulheres só foram admitidas após concordarem em participar da pesquisa, enviando o Termo de Consentimento assinado. A pesquisadora então entrou em contato telefônico com as mesmas, e a entrevista foi realizada por telefone, não havendo necessidade de comparecimento pessoal (pois não houve coleta de exames). Nos casos em que a mulher se recusou a participar do estudo, foi oferecida a participação à próxima em contato imediatamente depois dela e que preenchesse os quesitos citados anteriormente, até completar o número de sujeitos necessário. As fichas e os questionários foram preenchidos pela pesquisadora.

3.8. Processamento e Análise dos Dados

As fichas e os questionários foram arquivados em fichário próprio, em ordem numérica, após serem revisados, sendo posteriormente preparados para digitação. Os dados das fichas e questionários foram digitados, constituindo uma base de dados com digitação dupla, conforme as variáveis pré-definidas.

As informações coletadas foram armazenadas em banco de dados gerados pelo software EPI-INFO versão 6.04b, (1997).

A análise descritiva foi realizada através de tabelas de frequência e medidas de posição e dispersão. Para verificar associação ou comparar proporções foi utilizado o teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando necessário. Na comparação de variáveis numéricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

3.9. Aspectos Éticos

As mulheres selecionadas para o estudo foram informadas sobre os objetivos e método da pesquisa, sendo-lhes assegurado o direito de aceitar ou não participar da mesma, sem constrangimento ou modificação de sua assistência médica.

Ao aceitarem participar, foi aplicado um questionário por telefone, uma vez que o mesmo tem poucas perguntas, não necessitando de intervenção.. Assim, não houve necessidade de as mulheres locomoverem-se até a Instituição.

Foi enviada às pacientes uma carta esclarecendo os objetivos da pesquisa (Anexo 3) e um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 4) em um envelope endereçado e selado para a pesquisadora, para a mulher autorizar a sua entrada no estudo e então ser contatada por telefone.

O sigilo quanto à identidade das pacientes foi assegurado retirando-se a parte inferior da ficha clínica (Anexo 1) onde consta sua identificação, seguindo assim os preceitos preestabelecidos na DECLARACION DE HELSINKI (1990).

4. Resultados

No Grupo 1, de mulheres portadoras de fator V de Leiden, 42 foram entrevistadas por telefone pela pesquisadora, tendo-se o cuidado de confirmar os fenômenos tromboembólicos relatados, como por exemplo a ocorrência de TVP com o uso de heparina e anticoagulante oral. Essas entrevistas tiveram início em março de 2000 e finalizaram em maio de 2001, quando a última paciente entrou em contato enviando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Houve quatro casos que não retornaram o consentimento (extravio, não recebimento da carta da pesquisadora) e foram classificados como recusa em participar. Portanto, não foram incluídas no estudo.

No Grupo 2 foram entrevistadas 94 mulheres no período de junho de 1999 a junho de 2000, na busca de seus antecedentes clínicos pessoais e obstétricos, não havendo recusa em participar do estudo.

O fator V de Leiden foi encontrado na forma heterozigota em todas as mulheres do Grupo 1, onde três delas eram também portadoras da mutação G20210A, todas na forma heterozigota. Estas mulheres que apresentaram concomitantemente os fatores V de Leiden e da mutação G20210A, nunca engravidaram.

A média de idade das pacientes do Grupo 1 foi de 38,2 anos $\pm$ 16.4 (limites 15 a 87 anos) e do Grupo 2 foi de 25,5 anos $\pm$ 5,9 (limites 18 a 40 anos). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,0001$). A distribuição da idade nos dois grupos para o total de mulheres pode ser vista no Anexo 6.

Para a análise da influência da idade das mulheres e da classificação quanto à raça/cor nos resultados gestacionais, foram consideradas apenas as mulheres que apresentavam história de gestação anterior, o que reduz o número de mulheres no Grupo 1 para 28.

A distribuição da idade atual das mulheres que tiveram alguma gestação nos grupos estudados pode ser vista na Tabela 1, que mostra que cerca de um terço das mulheres do Grupo 1 tinham 50 anos ou mais e nenhuma no Grupo 2.

TABELA 1

DISTRIBUIÇÃO DA IDADE ATUAL DAS MULHERES NOS GRUPOS ESTUDADOS

Idade (anos)	Grupo 1	Grupo 2	Total
Idade < 20	1	13	14
≥ 20 e < 30	3	57	60
≥ 30 e < 40	14	23	37
≥ 40	10	1	11
Total	28	94	122

$p < 0,001$

A distribuição das mulheres em cada grupo mostrou diferença significativa, de acordo com classificação por raça/cor (Tabela 2)

TABELA 2

DISTRIBUIÇÃO DAS MULHERES EM CADA GRUPO DE ACORDO COM A RAÇA/COR

Raça/cor	Grupo1	Grupo2	Total
Branca	23	56	79
Não branca	5	38	43
Total de gestações	28	94	122

p=0,048

A distribuição percentual do número de gestações entre os grupos estudados pode ser vista na Tabela 3, mostrando que não houve diferença estatisticamente significativa.

TABELA 3

DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE GESTAÇÕES ENTRE OS GRUPOS

Número de gestações	Grupo 1 (%)		Grupo 2 (%)	
1	5	17,8	34	36,1
2	8	28,5	30	31,9
3	5	17,8	14	14,8
≥ 4	10	35,7	16	17,0
Total	28	100	94	100

p=0,112 NS

A distribuição da evolução das gestações nos grupos estudados pode ser vista na Tabela 4. Foi considerada a evolução de todas as gestações nas 28 mulheres do Grupo 1 e nas 94 mulheres do Grupo 2. No grupo 1, 28 mulheres cursaram com 109 gestações clínica/laboratorialmente detectáveis, evoluindo para aborto em 30,2% delas, enquanto no Grupo 2 as 94 mulheres tiveram 223 gestações, e 10,1% dessas gestações evoluíram para aborto. Houve uma proporção significativamente maior de aborto no Grupo 1.

TABELA 4

DISTRIBUIÇÃO DA EVOLUÇÃO DAS GESTAÇÕES NOS GRUPOS ESTUDADOS

	Grupo 1		Grupo 2	
	(n=109)	%	(n= 223)	%
Aborto	33	30,2	23	10,1
Óbito fetal	4	3,6	4	1,7
Parto	76	69,7	200	88,4
Total de gestações	109		223	

p<0,0001

A distribuição do resultado gestacional de acordo com a idade, considerando o grupo, mostra que nas mulheres com idade abaixo de 30 anos houve uma freqüência maior de perdas nas mulheres do Grupo 1. Esta diferença não foi observada ao se considerar as mulheres de idade maior ou igual a 30 anos de idade.

TABELA 5**DISTRIBUIÇÃO DO RESULTADO GESTACIONAL DE ACORDO
COM A IDADE E GRUPO**

Resultado Gestacional	< 30anos		≥ 30 anos	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Perda gestacional	5	7	32	20
Filho vivo	6	121	66	75
Total	11	128	98	95
	p=0,00003		p=0,9	

A distribuição do resultado gestacional de acordo com a raça/cor, de acordo com o grupo, considerando-se as mulheres de raça/cor branca, houve maior freqüência de perdas gestacionais no Grupo 1, o que não foi observado nas mulheres não brancas

TABELA 6**DISTRIBUIÇÃO DO RESULTADO GESTACIONAL DE ACORDO COM A
RAÇA/COR, CONSIDERANDO-SE GRUPOS ESTUDADOS**

Res. Gestacional	BRANCA		NÃO BRANCA	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Perda gestacional	32	14	5	13
Filho vivo	58	111	14	85
Total	90	125	19	98
	p= 0,00003		p=0,16	

A distribuição da ocorrência de aborto nos grupos estudados pode ser vista na Tabela 7. Foi considerada a evolução de todas as gestações nas 28 mulheres do Grupo 1 e nas 94 mulheres do Grupo 2. No Grupo 1, 28 mulheres com diagnóstico clínico e/ou laboratorial de gestação, e 13 (46%) delas tiveram para pelo menos um episódio de aborto espontâneo. No Grupo 2, das 94 mulheres, 16 (16%) tiveram pelo menos um episódio de aborto, e essa diferença foi estatisticamente significativa.

TABELA 7

DISTRIBUIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE ABORTO NOS GRUPOS ESTUDADOS

Aborto	Grupo 1	Grupo 2
Sem	15	78
1	7	13
2	3	1
≥3	3	2
Mulheres (n)	28	94

p<0,0001

Quando se estudou a proporção de abortos consecutivos nos dois grupos, observou-se que houve uma diferença estatisticamente significativa da ocorrência de aborto consecutivo no Grupo 1. Foi observado na Tabela 7 que três de 28 mulheres do Grupo 1 tiveram AER e No Grupo 2 duas de 94 mulheres tiveram AER.

A distribuição percentual dos antecedentes pessoais do Grupo 1 podem ser vistos na Tabela 8 que mostra que o antecedente de fenômenos tromboembólicos mais encontrado nas mulheres do Grupo 1 foi a TVP, identificada em dois terços das mulheres, a maioria em membros inferiores. A história de infarto agudo do miocárdio e de AVC esteve presente em apenas duas mulheres. O restante das mulheres desse Grupo 1 não apresentou antecedentes pessoais de fenômenos tromboembólicos, porém apresentava alguma das mutações e pertencia às famílias de portadora de trombofilia hereditária.

TABELA 8

DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS ANTECEDENTES PESSOAIS DE FENÔMENOS TROMBOEMBÓLICOS NO GRUPO 1

Fenômenos tromboembólicos	Grupo 1 (%)
TVP	64,2
IAM	4,7
AVC	4,7

A distribuição percentual dos antecedentes familiares nos grupos estudados pode ser vista na Tabela 9 que mostra um maior número de antecedentes familiares de fenômenos tromboembólicos no Grupo 1. Foram encontradas pacientes com história de mais de um episódio tromboembólico apenas no Grupo 1.

TABELA 9

DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE ANTECEDENTES FAMILIARES DE FENÔMENOS TROMBOEMBÓLICOS NOS GRUPOS ESTUDADOS

Fenômenos tromboembólicos	Grupo 1	Grupo 2
TVP	13	1
IAM	20	2
AVC	19	2
Sem	0	89
Total (n)	42	94

p<0,0001

A distribuição percentual dos antecedentes de fenômenos tromboembólicos nos familiares do Grupo 2 revelou uma baixa ocorrência. Observaram-se apenas cinco casos, um de TVP em primeira geração, dois de IAM um em cada geração, e dois casos de AVC na segunda geração. Entre esses casos, encontrou-se apenas uma ocorrência de TVP de origem materna e dois antecedentes de IAM encontrados em um avô paterno e um materno. Para AVC, foram encontrados dois antecedentes, sendo duas avós maternas.

A distribuição percentual dos antecedentes de fenômenos tromboembólicos nos familiares do Grupo 1 de acordo com o grau de parentesco, pode ser vista na Tabela 10 que mostra genericamente um predomínio destes antecedentes entre familiares de primeira geração.

TABELA 10
DISTRIBUIÇÃO DOS ANTECEDENTES TROMBOEMBÓLICOS NOS FAMILIARES
DO GRUPO 1, DE ACORDO COM O GRAU DE PARENTESCO

Fenômenos tromboembólicos (%)	Primeira geração	Segunda geração
TVP (n=13)	61,5	38,5
IAM (n= 20)	65,0	35,0
AVC (n= 19)	57,8	42,2

5. Discussão

Este estudo foi realizado para determinar a ocorrência de perdas gestacionais e antecedentes clínicos pessoais e familiares de tromboembolismo em mulheres portadoras de fatores trombogênicos, comparando com mulheres sem essas alterações. Foi investigada a participação dos fatores de trombose hereditária na determinação de perdas gestacionais.

A determinação de existência de associação entre fatores trombogênicos e perdas gestacionais poderia sugerir pesquisa sistemática do fator V de Leiden e da mutação G20210A no gene da protrombina em mulheres com história de perdas gestacionais. Dentro desta visão, a prevenção de perdas gestacionais e de fenômenos tromboembólicos pode ser encarada como um problema clínico a ser manejado nas clínicas de infertilidade. Admitindo-se como uma possível estratégia para se reduzir a mortalidade e morbidade perinatais, a identificação dos fatores trombogênicos, como condição reconhecida na gênese de perdas gestacionais, mesmo em mulheres sem antecedentes sugestivos, poderia contribuir na melhoria desses índices e, mais importante ainda, na modificação da história reprodutiva destas mulheres. A relativa ausência de padrões de diagnóstico, de identificação dos grupos de

risco e padronização do tratamento específico, evidenciam a importância de se aprimorar o diagnóstico para uma adequada prevenção e profilaxia.

Como todo estudo retrospectivo, de recuperação de dados da identificação do paciente pelo prontuário, surgiram grandes dificuldades para contactar as pacientes a serem entrevistadas. Partindo-se de uma tamanho amostral calculado de 42 mulheres em cada grupo, para compor o Grupo 1 foram localizadas 46 e entrevistadas 42 mulheres, pois houve quatro recusas em participar do estudo. Das 42 mulheres entrevistadas, apenas 28 apresentaram gestações clinicamente detectáveis e constituíram a base do grupo de expostos a ser estudado.

Das variáveis de controle, a análise da idade das mulheres neste estudo merece um destaque especial. Se dermos atenção apenas à análise simples da diferença de idades observadas entre os Grupos 1 e 2, poderíamos ter a impressão de que a idade poderia estar atuando como um fator confundidor. A observação mais detalhada desta tabela mostra que o Grupo 2 não inclui mulheres acima de 40 anos. Este grupo de pacientes foi selecionado entre aquelas que buscavam o serviço para orientação anticoncepcional e participaram como grupo-controle de outra investigação sobre o efeito da trombofilia e aborto recorrente. Este grupo, portanto, estava na fase do menacme como um todo. Em relação ao Grupo 1, tratava-se de mulheres identificadas como portadoras de uma mutação geradora de trombofilia e neste grupo, 10 mulheres tinham mais que 40 anos, o que gerou a diferença de idade notada entre os dois grupos. Isso correspondeu a um terço destas mulheres

que tiveram alguma gestação. Não pode ser excluída, portanto, a possibilidade de um efeito coorte de envelhecimento, com diferentes taxas de fecundidade assim determinadas.

A observação dos resultados gestacionais em função da idade levam a crer que o efeito da idade prepondera sobre os outros estudados neste trabalho, pois ao analisarmos a freqüência de perdas de acordo com a idade nos Grupos 1 e 2, a idade tem efeito importante apenas quando são isoladas as mulheres abaixo de 30 anos, onde a presença da trombofilia passa a ser marcadamente importante em determinar aumento na freqüência de perdas gestacionais.

Porém, deve ser lembrado que a idade utilizada é a atual na época da investigação e, portanto, o efeito da idade sobre o número de mulheres que relataram gestações e estavam acima dos 40 anos no Grupo 1 não significa obviamente que as gestações tenham ocorrido nas fases de idade avançada dessas mulheres. Também o próprio efeito da idade como determinante das perdas gestacionais neste grupo deve ser visto criticamente. Já no Grupo 2, o efeito da idade confirma a hipótese de que nas mulheres mais velhas há maior probabilidade de perdas (ROONEY, 2001).

O fato de a população ser mais idosa no Grupo 1, com mais tempo de vida e maior probabilidade de ocorrência de antecedentes pessoais, familiares e história obstétrica definida, no caso das climatéricas, exige consideração à parte. Este estudo concentra-se em uma alteração geneticamente determinada,

o que, em tese, faz com que a diferença de idade nos grupos seja minimizada pelo número semelhante de gestações entre eles. Pode ser argumentado que, mesmo para um fator de risco hereditário possa ter manifestações clínicas, como perda gestacional e/ou fenômeno tromboembólico, as manifestações ocorreriam mais provavelmente com o maior tempo de exposição, aqui considerado maior tempo de vida. Isto pode ser verdade nos casos estudados para os fenômenos tromboembólicos, o que não foi objeto de comparação neste estudo. Quanto ao número de gestação, eles se diluem em relação à idade, uma vez que numericamente são semelhantes nos dois grupos.

Ao avaliar a raça/cor das mulheres participantes do estudo, foi notada diferença entre os grupos. Quando avaliamos a raça/cor em função do grupo de estudo (Tabela 6), houve uma diferença significativa para maior número de perdas gestacionais na raça/cor branca no Grupo 1. A presença da mutação no gene do Fator V de Leiden é sabidamente mais freqüente na raça/cor branca. Neste caso ela teve efeito preponderante sobre o número de perdas neste grupo, determinando quase que um terço de perdas do total de gestações nas mulheres brancas do Grupo 1, uma proporção muito maior que quase um sexto de perdas nas não brancas. Este resultado demonstra que este grupo de mulheres portadoras da mutação tem mais perdas, mesmo sendo da raça/cor branca, o que é o contrário do observado para a população geral de que as não brancas têm mais perdas que as brancas (ROONEY, 2000). Porém, deve ser observado que entre as mulheres do Grupo 2 não portadoras das mutações, não houve diferença na freqüência de perdas entre as mulheres brancas e não

brancas. A miscigenação racial poderia levar a características genéticas não encontradas em populações predominantemente caucasianas, que são as principais populações analisadas na literatura (BRANCH et al., 1985). No caso do Grupo 2, a distribuição racial é bastante semelhante àquela observada na população brasileira. A origem étnica da população brasileira é altamente heterogênea, e deriva de imigrantes vindos de Portugal, Espanha, Itália, África, Ásia e Europa central, cuja porcentagem varia nas diferentes regiões do Brasil (ARRUDA et al., 1995).

Em relação ao número de gestações, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Essas mulheres não têm problemas de esterilidade por serem portadoras de trombofilia hereditária, mas sim provavelmente, alterações vasculares placentárias que podem estar associadas a perdas gestacionais. Este fato, mais uma vez, minimizou o efeito da diferença de idade entre as mulheres que compõem os dois grupos.

A avaliação do resultado das gestações entre os dois grupos revelou que houve uma maior frequência de abortos no grupo de mulheres portadoras de trombofilia, o que correspondia à hipótese fundamental deste estudo. Ainda que o número de óbitos fetais tenha sido semelhante nos dois grupos, é a frequência de abortos que mostrou predominância entre as mulheres com mutação do fator V. De certa maneira, isto corrobora alguns autores que enfatizam a perda gestacional precoce, isto é, aborto com associação à trombofilia hereditária (STIRLING, WOOLF, NORTH, 1984). Nesta amostra, não se convalidaram os dados de KUPFERMINEC et al., (1999) que encontraram

maior freqüência de óbitos fetais e não de abortos. Eventualmente, a busca sistemática deste tipo de alteração em mulheres com óbito fetal venha a esclarecer esta diferença de opiniões na literatura.

Nossos dados identificaram ainda que, entre a população de mulheres portadoras de trombofilia hereditária, houve maior ocorrência de aborto e de aborto de repetição, como ficou demonstrado na Tabela 7. Na literatura a associação da presença do fator V de Leiden e AER é controversa, com alguns autores demonstrando forte associação (GRANDONE et al., 1998; MURPHY et al., 2000; YOUNIS et al., 2000), mas outros não (DIZON-TOWSON et al., 1997; DULICEK et al., 1999).

Segundo Lindqvist, os abortamentos dessas mulheres portadoras de trombofilia não são seletivos, ou seja, não dependem do sexo ou do genótipo do concepto. Se não há perda preferencial de fetos com a mutação (seleção desfavorável), ou sem a mutação (seleção favorável), e não sendo esta seleção intra-uterina, um eventual efeito seletivo deve recair sobre a gestante. Então, como a freqüência de portadoras do fator V de Leiden é muito alta na forma heterozigota (embora variável em diversos estudos), deve estar atuando algum mecanismo homeostático de seleção favorável da forma heterozigota, por cursar essa forma clínica com menor gravidade (LINDQVIST et al., 1998).

A hipótese de que a fisiopatologia da trombofilia levaria ao aborto por formação de trombos no sítio de implantação, leva-nos também a crer que, se este grupo de mulheres tivesse o diagnóstico prévio à gestação, a instituição de

tratamento específico, da mesma maneira que é proposto para mulheres portadoras de trombofilia adquirida, por exemplo a SAF, deveríamos esperar melhores resultados gestacionais (SOUZA et al., 1999).

Tendo em vista que este estudo não incluiu mulheres com antecedente de fenômeno tromboembólico no Grupo 2, por este ter sido critério de exclusão na pesquisa original, não foi feita uma comparação destes antecedentes entre os dois grupos. Entretanto, analisando a ocorrência de fenômenos tromboembólicos nos antecedentes pessoais do Grupo 1, conforme visto na Tabela 8, observamos uma maior freqüência de trombose venosa profunda. É sabido que o uso de anticoncepcional oral eleva acentuadamente o risco para TVP nas mulheres portadoras da trombofilia hereditária (DE STEPHANO et al., 1996). Em mulheres heterozigotas para esta mutação, o risco eleva-se em oito vezes aproximadamente, enquanto nas homozigotas sobe para 80 vezes. O uso desse método contraceptivo é amplamente usado em nosso país e pode ter contribuído para a ocorrência desses fenômenos na maioria destas mulheres, ainda que esses dados não tenham sido avaliados no presente estudo. O fator V de Leiden é comum em pacientes brasileiros com trombose, estando presente em 20% a 40 % dos casos não selecionados com um episódio de trombose venosa profunda (ARRUDA et al., 1995). Portanto, questionamos se não seria interessante no futuro propor a realização de estudo de TH para todas as mulheres que desejassem iniciar o uso de contraceptivo hormonal, principalmente aquelas que apresentassem antecedentes familiares e pessoais de fenômeno tromboembólico ou passado reprodutivo de perdas gestacionais.

Ao estudarmos os antecedentes familiares de fenômenos tromboembólicos entre os dois grupos, encontramos no Grupo 1 maior número de ocorrências, inclusive com mais de um episódio tromboembólico (IAM, AVC e TVP) nos mesmos familiares, conforme observado na Tabela 9. Esses resultados reforçam a herança geneticamente pré-determinada dos fatores de TH.

Quando estratificamos os antecedentes do Grupo 1 em primeira e segunda geração, conforme realizado na Tabela 10, deparamo-nos com a predominância de fenômenos na primeira geração. Especulamos se esse achado poderia estar ocorrendo por falta de diagnóstico nesta segunda geração, ou mesmo por falta de informações das mulheres entrevistadas. Ao comparamos os antecedentes familiares de tromboembolismo entre os dois grupos, observamos a ocorrência familiar de fenômenos tromboembólicos em maior frequência no Grupo 1, com manifestações em gerações subsequentes. Isto pode sugerir que o fator V de Leiden seja herdado como um traço autossômico dominante (KOSTER et al., 1993; DALHBACH, 1995), justificando o estudo da família de portadores dessa mutação para melhor profilaxia e orientação terapêutica. A prevalência do fator V de Leiden na população geral sugere seleção genética positiva, se considerarmos que o discreto estado de hipercoagulabilidade pode ter conferido certa vantagem em situações como lesão traumática e gravidez (DALHBACH, 1995).

No Grupo 2, de mulheres não portadoras dos fatores de TH, a ocorrência de episódios familiares foi encontrada em menor número de ocorrências e sem predileção por geração.

A presença da mutação G20210A no Grupo 1 foi significativa quando comparada com o Grupo 2. Essas pacientes apresentaram um risco 2,8 vezes maior de trombose devido aos altos níveis plasmáticos de protrombina (POORT et al., 1996). Dados de uma população brasileira revelaram que a forma heterozigota foi identificada em 0,7% de uma amostra aleatória da população e em 4,3% em pacientes com trombose venosa (ARRUDA et al., 1997).

Os três casos de mutação no gene da protrombina associados à mutação do fator V de Leiden, encontrados no Grupo 1, apresentaram-se nas formas heterozigotas para ambas as mutações. Essas mulheres nunca engravidaram, apesar de não usarem métodos contraceptivos há pelo menos 20 meses. As três pacientes procuraram o Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro/UNICAMP por apresentarem episódios de trombose venosa (uma em membros inferiores, uma em subclávia e uma na íleo femural, evoluindo para ileostomia). Nos antecedentes familiares dessas pacientes, todas relataram episódios de trombose, IAM e AVC familiar.

Observa-se também que a associação dos dois fatores aumentou a gravidade clínica da trombofilia apresentada nos antecedentes dessas mulheres.

O estudo da trombose familiar e da sua associação com perdas gestacionais avançou muito nos últimos anos. O estudo das famílias com predisposição a fenômenos tromboembólicos sugeria um defeito genético e uma herança familiar foi confirmada. Porém, os mecanismos de transmissão

devem ter associações ainda não definidas. Por exemplo, se o fator V de Leiden é autossômico dominante, a frequência da mutação da resistência à proteína C ativada deve ser igual entre homens e mulheres (pelo menos eles nascem em proporção igual), mas não há dados disponíveis na literatura para confirmar essa hipótese.

Pergunta-se se essas famílias portadoras de trombofilia teriam o fator seletivo positivo (menor mortalidade por hemorragia) atuando com maior peso do que o efeito desfavorável (tendência a complicações tromboembólicas). Eventualmente, isso justificaria a manutenção da alta frequência de diagnóstico do traço genético, apesar da fecundidade comprometida por perdas gestacionais.

Os dados encontrados neste estudo sugerem importante relação entre causa genética de trombofilia e abortamento. Esta é uma das poucas investigações realizadas no Brasil sobre este assunto. Essas informações contribuem para o entendimento da etiologia multifatorial dos abortos e sugere que a presença desses fatores possa coexistir com outros fatores já identificados na literatura e favorecer a ocorrência de perda gestacional.

Este assunto ainda está mal explorado do ponto de vista genético dessas populações. Até que nossos dados sejam claramente estabelecidos, a abordagem dessas mulheres deve ser minuciosa e estender-se aos familiares, para que conseqüências clínicas e obstétricas maiores possam ser evitadas. Este estudo indica a necessidade de se ampliar a investigação do papel das

trombofilias hereditárias no aborto e, possivelmente, também nas perdas gestacionais tardias.

6. Conclusões

- 6.1.** As mulheres portadoras de trombofilia hereditária apresentaram maior ocorrência de fenômenos tromboembólicos nos antecedentes clínicos e maior ocorrência de perdas gestacionais quando comparadas com mulheres não portadoras.
- 6.2.** A frequência de aborto foi significativamente maior nas mulheres portadoras de trombofilia hereditária quando comparadas com as não portadoras.
- 6.3.** A frequência de aborto espontâneo recorrente foi significativamente maior nas mulheres portadoras de trombofilia hereditária quando comparadas com as não portadoras.
- 6.4.** A frequência de óbitos fetais não diferiu significativamente nos dois grupos estudados.
- 6.5.** A população de pacientes portadoras do fator V de Leiden apresentaram tendência elevada de fenômenos tromboembólicos, sendo principalmente de trombose venosa profunda.

6.6. A presença de fenômenos tromboembólicos em familiares de primeira geração foi significativamente maior nas pacientes portadoras das mutações quando comparadas com os familiares das não portadoras.

7. Referências Bibliográficas

- ANTSACLIS, A.J.- Hyperglycemia and embriopathy. - *DIAB. Nutr. Metab.*, **10(Suppl 6)**:3-7, 1997.
- 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. & FIGUEIREDO, M. S. - Biologia molecular para o hematologista clínico em temas de hematologia clínica. *Am. J. Hematol.*, **53**:187-99; 1997.
- BARINI, R.; COUTO, E.; MOTA, M. M.; SANTOS, C. T. M.; LIEBER, S. R.; BATISTA, S. C.- Fatores associados ao aborto espontâneo recorrente. *RBGO*, **199**:217-23, 2000.
- BERTINA, R. M.; KOELEMAN, B.P.C.; KOSTER, T. – Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, **369**:64-7, 1994.
- BOZZO, M.; CARPANI, G.; LEO, L.; MARCOZZI, S.; SACCHI, E.; MORONI, G.; PARDI, G. – HELLP syndrome and factor V Leiden. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **95**:55-8, 2001.

- BRANCH, D. W.; SCOTT, J. R.; KOCHENOUR, N. K.; HERSHGOLD, E.
Obstetrics complications associated with the lupus anticoagulant. **New Engl. J. Med.**, **313**:1322-6, 1985.
- BOYD, M. D.; USHER, R. H.; MC LEAN, F. H.; KRAMER, M.S. - Obstetric consequences of postmaturity. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **158**:334-8, 1988.
- BRENNER, B.; MANDEL, H.; LANIR, N.; YONIS, 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.
- CADAVID, A.; PENA, B.; GARCIA, G.; BOTERO, J.; SANCHES, F.; OSSA, J.; BEER, A. – Heparin plus aspirin as a single therapy for recurrent spontaneous abortion associated with both allo- and autoimmunity. **Am. J. Reprod. Immunol.**, **4**:271-8, 1999.
- CARVALHO, E.C.C. – **Estudo Comparativo de frequência de fatores trombogênicos entre mulheres com aborto espontâneo e mulheres férteis**. Campinas, 2001. [Tese - Doutorado – Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP].
- COSTA, F. F.; COSTA, S.C.B.; Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas. **Rev. Bras. Hematol.**, **32**:142-6, 1995.
- DALHBACH, B.- Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. **Blood**, **85**:607-14, 1995.
- DECLARACIÓN DE HELSINKI – Recomendaciones para guiar los médicos en la investigación biomédica en seres humanos. **Bol. Of. Sanit. Panam.**, **108**:626-37, 1990.

DE STEPHANO, V. D.; FINAZZI, G.; MANUCCI, P. M. – Inherited thrombophilia: pathogenesis clinical syndromes, and management. *Blood*, **87**:3531-44, 1996.

DIZON-TOWNSON, 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, 1997.

DUARTE, G.; CUNHA, S. P.; YAMADA, R.T.; BAILÃO, L. A.; PHILBERT, P.M.P.- Sífilis e gravidez: ainda um problema. *Rev. Bras. Ginec. Obstet.*, **97**:75-8, 1987.

DUFOUR, P.; BERARD, J.; ERNOULT, P., TORDJEMAN, N.; VINATIER, J. C.; MONNIER, J. C.- Y-a-t-il encore des indications de cerclage en 1995? *Rev. Fr. Gynécol. Obstét.*, **90**:423-30, 1995.

DULICEK, 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.

EPI INFO: version 6.04b. Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention, 1997.

FARAH, L. M. S. & JOFFE, R. - Genética em obstetrícia. In: **Atualização Terapêutica**. 19ed., São Paulo, Artes Médicas, 1999. p.869-70.

FIGO - Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Report of the FIGO Subcommittee on Perinatal Epidemiology and Health Statistics following a workshop in Cairo, 11-18. London International Federation of Gynecology and Obstetrics, 1986. p 54.

- FLEISS, J. L. – **Statistical methods for rates and proportions**. New York, John Wiley and Sons, 1981. 321p.
- 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 Vleiden na prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum. Reprod.*, **15**:458-62, 2000.
- FORASTIERO, R.; MARTINUZZO, M.; ADAMCZUK, Y.; IGLESIAS VARELA, M. L.; POMBO, G.; CARRERAS, L. O. – The combination of thrombophilic genotypes is associated with definite antiphospholipid syndromes. *Haematologica*, **86**:735-41, 2001.
- GRANDONE, E.; MARGAGLIONE, M.; COLAIZZO, D.; ANDREA, G.; BRANCACCIO, V.; DI MINNO, G. - Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism: roles of factor v de leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **179**:1324-8, 1998.
- HANNEKENS, C. H. & BURING, J. E. - Cohort Studies. In: HANNEKENS, C. H. & BURING, J. E. - **Epidemiology in medicine**. Little Brown and company, 1987.
- 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.

- HILL, J. A.- Sporadic and recurrent espontaneous abortion. **Curr. Probl. Obstet. Gynecol. Fert., 17:115-62, 1994.**
- HUGHES, G.R.V. - Thrombosis, abortion, cerebral disease and the lupus anticoagulant. **Br. Med. J., 287:1088-9, 1983.**
- KLINGENFUSS, P. J. - Doença hemolítica perinatal. In: KLINGENFUSS, P. J. - **Tratado de obstetrícia da FEBRASGO.** Rio de Janeiro. Revinter, 2000. p.851-8.
- KOSTER, T.; ROSENDAL, F. R.; RONDE, H. D.; BRIET, E.; VANDENBROUCKE, J. P.; BERTINA, R. M. – Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. **Lancet 342:** 1503-6, 1993.
- KUJOVICH, J. & GOODNIGHT, S. – Factor V de Leiden thrombophilia: hereditary resistance to activated protein C; factor V R506Q; University of Washington, Seattle, 1999.
- 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.**
- 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.**

JONES, G.S. Some newer aspects of the management of infertility. *J. Am. Med. Ass.*, **141**:1123-5, 1949.

LANE, D. A.; MANUCCI, P. M.; BAUER, K. A.; BERTINA, R. M.; BOCHKOV, N. P.; BOULYJENKOV, V.; CHANDY, M.; DALHBACH, B.; GINTER, E. K.; MILETICH, J. P.; ROSENDAAL, F. R.; FERENC, M. – Inherited thrombophilia: part 1. *Thromb. Haemost.*, **76**:651-62, 1996.

LINDQUIST, P. G.; SUENSON, P. J.; DAHLBACH, B.; MARSAL, K. – FACTOR V Q 506 Mutation associated with reduced intrapartum Blood Loss – a Possible Evolutionary selection Mechanism. *Thromb. Haemost.*, **79**:69-73, 1998.

LOCKSHIN, M.D.; QAMAR, T.; DRUZIN, M.L.; GOEI, S. – Antibody to cardiolipin, lupus anticoagulant and fetal death. *J. Rheumatol.*, **14**:259-62, 1987.

MARIANI NETO, C.- Óbito fetal. In: NEME, B. – **Obstetrícia básica**. São Paulo, Sarvier, 1994. p.382-6.

McMASTER, M.T.; LIBRACH, C.L.; ZHOU, Y.; LIM, K.H.; JANATPOUR, M.J.; DEMARS, R.; KOVATS, S.; DAMSKY, C.; FISHER, S.J. – Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J. Immunol.*, **154**:3771-6, 1995.

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.

- MEYER, T.; HANSON, P. I.; STRYER, L. – Calmodulin, Trapping by calcium – calmodulin – dependent protein kinase - **Science** **256**:1199-202, 1992.
- MURPHY, R. P.; DONOGUE, C.; NALLEN, R. J.; DMELLO, M.; REGAN, C.; EHTEHEAD, A. S.; FITZGERALD, D. J. – Prospective avalution of the risk conferred by factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in pregnancy. **Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.**, **20**:226-70,2000.
- 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 immunization in prevention of recurrent miscarriages: a randomised trial. **Lancet** **31**:365-9, 1999.
- OZCAN, T.; RINDER, H. M.; MURPHY, J.; KOHN, C.; COPEL, J. A.; MAGRIPLES, U. – Genetic thrombophilia and hypertensive complications of pregnancy. **Obstet. Gynecol.**, **97(Suppl 1)**:S40-S46, 2001.
- PINTO e SILVA, J. L. & SURITA, F. G. C.- Anomalias da evolução da gestação. In: NEME, B. - **Obstetrícia básica**. 2^a ed., São Paulo, Sarvier, 2000. 552-560p.
- POORT, F. E.; ROSENDAL, F. R.; REITSMA, P. H.; BERTINA, R. M. – A common genetic variation in the 3'-unstralated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increased in venous thrombosis. **Blood**, **88**:3698-703, 1996.
- RAI, R.; REGAN, L.; HADLEY, E.; DAVE, M.; COHEN, A. – Second trimester pregnancy loss is associated with activated protein C resistance. **Br. J. Haematol.**, **92**:489-90, 1996.

- RAYMOND, E. G.; CNATTINGIUS, S.; KIELY, J. L.- Effects of maternal age, parity and smoking on the risk of stillbirth. **Br. J. Obstet., Gynecol**,**101**:301-6, 1994.
- RICHARD, M. P.; REISER, C. A; LEBOVITZ, R. M.; KIRKPATRICK, S. J.
- Wisconsin Stillbirth service program: I. Establishment and Assessment of a Community- Based program for Etiologic Investigacion of Intrauterine Deaths. **Am. J. Med. Genet.**, **50**:116-34, 1994.
- RIDKER, P. M.; MILETICH, J. P.; 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.
- ROONEY, B.- Racism, proverty, abortion, and other reproductive outcome. **Epidemiology**,**11**:740-2, 2000.
- ROONEY, B. - Maternal age and fetal loss. Having an induced abortion increases risk in future pregnancies. **BMJ**, **322**:430-2, 2001.
- SOUZA. S. S.; FERRIANI, R. A.; PONTES, A. G.; ZAGO, M. A.; FRANCO, R. F.
– Factor V Leiden and Factor G20210A mutations in patients with recurrent abortion. **Hum. Reprod.**, **14**:2448-50, 1999.
- STIRLING, S. S.; WOOLF, L.; NORTH, W. R. – Homeostasis in normal pregnancy. **Tromb. Haemost.**, **52**:176-82, 1984.
- TOSSETO, A.; RODEGHIERO, F.; MARTINELLI, I.; DE STEFANO, V.; MISSIAGLIA, E.; CHIUSOLO, P.; MANUCCI, P. M. – Additional genetic risk factors for venous Thromboembolism in Carriers of the Factor V Leiden Mutation. **Br.J. Haematol.**, **103**:871-6, 1998.

- 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.
- WITLIN, A. G. MATTAR, F. M.; SAADE, G. R.; VANHOOK, J. V. V.; SIBAI, B. M. – ***Am. J. Obstet. Gynecol.***, **181**:1118-21, 1999.
- YANCEY, M. K., DUFF, P., KUBILIS, P., CLARK, P., FRENTZEN, B. H.- Risk factors for neonatal sepsis. ***Obstet. Gynecol.***, **87**:188-99, 1996.
- YOUNIS, J. S.; OHEL, G.; BRENNER, B.; HADDAD, S.; LANIR, N.; BEM-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.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – Recommended definitions terminology and format statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificated for cause of perinatal deaths. WHO/FIGO. ***Obstet. Gynecol. Scand.***, **56**:247-8, 1977.

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 – Deliberação CCPG-001/98.

9. Anexos

ANEXO 1 - FICHA CLINICA

ESTUDO DE FATORES TROMBOGÊNICOS E PERDA GESTACIONAL

Número: _____

1. Fator V de Leiden: _____ ausente
_____ homozigoto
_____ heterozigoto

2. Mutação G20210A: _____ ausente
_____ homozigoto
_____ heterozigoto

Nome: _____

HC: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Telefone: _____

Endereço: _____

ANEXO 2 - QUESTIONARIO

ESTUDO DE FATORES TROMBOGÊNICOS E PERDA GESTACIONAL

Identificação

Caso no: |__|__|__|

1. Qual é a sua idade hoje? |__|__|
2. A senhora definiria sua cor de pele em:
1-preta 2-parda 3-branca 4-amarela 5-indígena |__|

Antecedentes Obstétricos

3. Quantas vezes a senhora ficou grávida? |__|__|
4. Quantos partos ou cesáreas a senhora teve? |__|__|
5. A senhora já teve abortos? _____ Quantos? |__|
6. Quantos filhos vivos a senhora tem? |__|
7. A senhora teve filhos que nasceram mortos? |__| Quantos? |__|

Evolução das gestações (só para as que tiveram abortos e/ou natimortos)

8. Quantos meses de gravidez a Sra. estava quando teve o 1º |__|
Qual o peso? |__|__|__|__|
9. E a segunda foi de quantos meses? |__| Qual o peso? |__|__|__|__|
10. E a terceira foi de quantos meses? |__| Qual o peso? |__|__|__|__|
11. E a Quarta foi de quantos meses? |__| Qual o peso? |__|__|__|__|
12. A Quinta foi de quantos meses? |__| Qual o peso? |__|__|__|__|
13. A Sexta foi de quantos meses? |__| Qual o peso? |__|__|__|__|
14. A sétima foi de quantos meses? |__| Qual o peso? |__|__|__|__|
15. A oitava foi de quantos meses? |__| Qual o peso? |__|__|__|__|

Antecedentes Clínicos Pessoais

16. A senhora já teve algum episódio de inflamação das veias da perna/ trombose?

Sim |____|

Não |____|

Número_____

17. A senhora já teve alguma vez um Infarto Agudo do Miocárdio?

Sim |____|

Não |____|

18. A senhora já teve algum episódio de derrame ou AVC?

Sim |____|

Não |____|

Antecedentes familiares

19. Na sua família alguém teve trombose? |____| Quem?_____

20. Na sua família alguém teve infarto? |____| Quem?_____

21. Na sua família alguém já teve derrame ou AVC? |____| Quem_____

22. Na sua família alguém têm pressão alta? |____| Quem?_____

ANEXO 3 - CARTA ENVIADA A PACIENTE

Meu nome é Dra. Renata, sou médica da Pós-Graduação do Departamento de Tocoginecologia da UNICAMP e gostaria de convidá-la a participar de um estudo .

Esse estudo tem como objetivo identificar as causas de perdas gestacionais, como aborto espontâneo e óbito fetal, associados com fatores sanguíneos. O resultado poderá melhorar a assistência médica.

Gostaria de convidá-la para participar voluntariamente desse estudo respondendo um questionário curto pelo telefone. O seu nome será mantido em sigilo e os resultados não permitirão identificá-la. Caso não queira participar, isso não a prejudicará em seu atual e futuro atendimento nesse hospital.

Caso a senhora resolva participar, favor assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido anexo a essa Carta, e colocá-lo nesse envelope já selado endereçado a mim e colocar no correio ou caixa de coleta. Assim que receber a sua correspondência, entrarei em contato para entrevistá-la por telefone.

Obrigada pela atenção, Dra. Renata.

Em caso de dúvidas favor me ligar no telefone 19 – 3788 9336, às quartas feiras no período da tarde.

ANEXO 4 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, _____

_____ anos, telefone _____ - _____ aceito colaborar nesse estudo realizado pela Dra. Renata Zaccaria Simoni sobre os fatores sangüíneos que possam levar a perda de gestações. O objetivo desse estudo é ajudar a esclarecer as causas de perda da gestação antes não conhecidas e os resultados poderão ajudar a um melhor tratamento, reduzindo o número de perdas no futuro.

Para isso colaborarei como voluntária em responder uma entrevista por telefone, para responder a um questionário que levará cerca de 15 minutos. As informações reveladas por mim durante essa entrevista serão mantidas em sigilo, sendo de conhecimento apenas da pesquisadora.

Minha participação nesse estudo não irá me trazer nenhum benefício imediato, mas fui informada que posso não responder a qualquer pergunta e posso desistir durante a entrevista. Caso não queira participar, isso não prejudicará meu atendimento atual e futuro nesse hospital.

Assinatura da paciente

Dra. Renata Zaccaria Simoni

Campinas, _____ de _____ de 2001.

ANEXO 5 - TECNICA LABORATORIAL

As técnicas laboratoriais que serão descritas a seguir (fator V de Leiden e mutação G20210A) utilizaram métodos de biologia molecular. Por isso, antes da descrição das técnicas, faz-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 NH_4Cl 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, MgCl_2 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, MgCl_2 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.

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, 5.4μM 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^oC (40"), 57^oC (40") and 72^oC (2'). Um fragmento de 220 pares foi obtido e 5-10μl 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.

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'-ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC-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.

ANEXO 6

DISTRIBUIÇÃO DA IDADE EM ANOS DAS MULHERES DOS GRUPOS ESTUDADOS

Idade (anos)	Grupo1	Grupo 2	Total
<20	3	13	16
>=20<30	10	57	67
>=30<40	17	23	40
>=40<50	2	1	3
>=50<60	4	0	4
>=60<70	4	0	4
>=70<80	1	0	1
>=80	1	0	1
Total	42	94	136