

ADRIANA DE GÓES E SILVA SOLIGO

**PREVALÊNCIA DOS FATORES TROMBOFÍLICOS
EM MULHERES COM INFERTILIDADE**

Dissertação de Mestrado

**ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO BARINI
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. EGLE CRISTINA C. DE CARVALHO**

**Unicamp
2007**

ADRIANA DE GÓES E SILVA SOLIGO

**PREVALÊNCIA DOS FATORES TROMBOFÍLICOS
EM MULHERES COM INFERTILIDADE**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO BARINI
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. EGLE CRISTINA C. DE CARVALHO

Unicamp
2007

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

So44p

Soligo, Adriana de Góes e Silva
Prevalência dos fatores trombofílicos em mulheres com
infertilidade / Adriana de Góes e Silva Soligo. Campinas, SP:
[s.n.], 2007.

Orientadores: Ricardo Barini, Egle Cristina Couto de
Carvalho

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

1. Infertilidade. 2. Trombofilia. 3. Methylenetetrahydrofolate
Reductase (NADPH2). 4. Síndrome antifosfolípide. 5. Fator V
Leiden. I. Barini, Ricardo. II. Carvalho, Egle Cristina Couto de.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. IV. Título.

Título em ingles: Prevalence of thrombophilic factors in infertile women

Keywords:

- Infertility
- Thrombophilia
- Methylenetetrahydrofolate Reductase (NADPH2)
- Antiphospholipid Syndrome
- Factor V Leiden

Titulação: Mestre em Tocoginecologia
Área de concentração: Tocoginecologia

Banca examinadora: Prof Dr Ricardo Barini
Prof Dr Caio Parente Junior
Prof Dr José Guilherme Cecatti

Data da defesa: 30 - 08 -2007

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: ADRIANA DE GÓES E SILVA SOLIGO

Orientador: Prof. Dr. RICARDO BARINI

Co-Orientadora: Profª. Drª. EGLE CRISTINA C. DE CARVALHO

Membros:

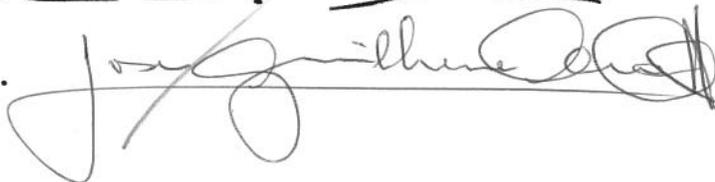
1.



2.



3.



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

Data: 30/08/2007

Dedico este trabalho...

*Ao meu marido, Rafael,
pelo seu companheirismo e cumplicidade.*

*Aos meus pais, Carlinda e Claudio,
pelo amor incondicional,
incentivo e devoção ao longo de minha vida.*

Agradecimentos

A Deus, por guiar sempre meus passos.

Ao meu esposo, pela compreensão e amor.

À minha família, meus maiores incentivadores e meu alicerce para chegar até aqui, em especial, minhas irmãs, Érika e Giselle, e sobrinhos.

À Vovoquinha, por ser um exemplo de vida e sabedoria.

Ao meu vô Edson, de saudosa lembrança.

À minha família Mogiana, pela confiança e compreensão.

Ao Professor Dr. Ricardo Barini, por quem tenho profunda admiração e respeito. Além de um grande mestre, um ser humano fascinante que me ensina, além da pesquisa, a ser uma pessoa cada vez melhor. Obrigada pela oportunidade desta convivência, inclusive com sua família.

À Massaco, minha eterna confidente e incentivadora.

À Professora Egle, pelo apoio e conhecimento.

À Professora Joyce, pela oportunidade de conhecer um pouco mais da Hematologia e contato com sua equipe, especialmente Cristina.

Aos professores da Pós-Graduação do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM- Unicamp).

Em especial, ao Professor José Guilherme Cecatti pelo seu empenho e capacidade didática brilhantes.

Aos queridos colegas de Pós-Graduação, pela oportunidade de uma convivência tão enriquecedora.

À Margarete por sua solicitude em todos os momentos.

À Sirlei, pela simpatia e conhecimento da área de estatística.

À Andrea, Walquíria e Leonice pelo incentivo e contribuição no levantamento de dados.

Aos colegas de trabalho e amigos, pela confiança e disponibilidade para ajudar sempre.

"O professor se liga à eternidade; ele nunca sabe onde cessa sua influência".

HENRY ADAMS

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Summary	xiii
1. Introdução	15
1.1. Associação entre Trombofilia e Infertilidade	15
1.2. Coagulação Sanguínea	21
1.3. Trombofilias	27
1.4. Trombofilias Adquiridas: Anticorpos antifosfolípides.....	28
1.5. Trombofilias Hereditárias	31
2. Objetivos	41
2.1. Objetivo	41
3. Sujeitos e Método	42
4. Publicação.....	44
5. Conclusões	64
6. Referências Bibliográficas.....	65
7. Anexos	71
7.1. Anexo 1 – Ficha para Coleta de Dados.....	71
7.2. Anexo 2 – Identificação.....	72
7.3. Anexo 3 – Técnica Laboratorial.....	73

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AT	Antitrombina
CBS	Cistationina beta - sintetase
CVD	Coagulação vascular disseminada
DPP	Descolamento prematuro da placenta
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FVL	Fator V de Leiden
HMWK	Cininogênio de alto peso molecular
ICSI	Injeção intracitoplasmática do espermatozóide
MTHFR	Metileno tetrahydrofolato redutase
PAI	Plasminogênio ativado
PC	Proteína C
PFR	Perda fetal recorrente
PS	Proteína S
RCIU	Restrição de crescimento intra-uterino

SHO	Síndrome de hiperestímulo ovariano
TF	Fator tecidual
TP	Tempo de protrombina
tPA	Ativador do plasminogênio tecidual
TPP	Trabalho de parto prematuro
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativado
TVP	Trombose Venosa Profunda
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
uPA	Uroquinase ou ativador do plasminogênio tipo urinário
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>

Resumo

Objetivo: determinar a prevalência dos fatores trombofílicos em mulheres inférteis.

Método: estudo de corte transversal, no qual foram admitidas mulheres inférteis (atendidas em clínica privada) e submetidas à investigação de trombofilia, conforme protocolo da referida clínica, no período de março de 2003 a março de 2005. Foram incluídas mulheres em idade fértil com história de infertilidade, definida como um ano de coito sem método contraceptivo e sem concepção. Foram excluídas mulheres com hepatopatia e dados incompletos em prontuário, obtendo-se a amostra de 144 mulheres. Os fatores trombofílicos avaliados foram: o anticorpo anticardiolipina (ACL) e o anticoagulante lúpico (ACGL); a deficiência de proteína C (DPC), a deficiência de proteína S (DPS), a deficiência de antitrombina III (DAT), a presença do fator V de Leiden, uma mutação no gene da protrombina e a mutação da metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR).

Resultados: os valores de prevalência obtidos para ACL e ACGL foram de 2%. A prevalência dos fatores trombofílicos hereditários foram: DPC 4%, DPS 6%, DAT 5%, fator V de Leiden 3%, mutação da protrombina 3%, mutação MTHFR 57%. **Conclusões:** das 144 pacientes selecionadas, 105 mulheres, ou seja,

72,9% apresentavam pelo menos um fator trombofílico presente. Isto reforça a importância e justifica a necessidade da investigação neste grupo.

Palavras- chave: infertilidade, síndrome antifosfolípide, trombofilia, metileno tetraidrofolato redutase

Summary

Purpose: to establish the prevalence of thrombophilic factors in infertile women.

Methods: a cross-sectional study was performed, in which infertile women were included, seen in a private clinic with investigation for thrombophilia, according to the protocol of the clinic, between March 2003 and March 2005, after the approval of the Research Ethics Committee of UNICAMP. One hundred and forty four infertile women without any liver disease were evaluated. Infertility is defined as one year of unprotected sexual intercourse without contraception and with no conception. The acquired and/or inherited thrombophilic factors are: anticardiolipin antibody (aCL) and lupus anticoagulant (LA); protein C deficiency (PCD), protein S deficiency (PSD), antithrombin III deficiency (ATD), presence of the factor V Leiden, mutation in the prothrombin gene, and mutation of Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Results:** the prevalence values obtained for aCL and LA were 2%. The prevalence of hereditary thrombophilic factors were: PCD 4%, PSD 6%, ATD 5%, factor V Leiden 3%, prothrombin mutation 3%, MTHFR mutation 57%. Out of the selected 144 patients, 105 women (72,

9%) presented at least one thrombophilic factor. This reinforces the importance and justifies the need of investigation in this group.

Key-words: infertility, anticardiolipin antibody, thrombophilic factor, prevalence, Methylene tetrahydrofolate reductase.

1. Introdução

1.1. Associação entre Trombofilia e Infertilidade

A infertilidade persiste como um problema de saúde pública, que acomete entre 10% e 15% dos casais em idade reprodutiva, cujo diagnóstico e tratamento ainda é falho e ineficiente para parte da população infértil. Até um terço dos casais não tem identificação dos possíveis fenômenos que possam alterar seu prognóstico em relação ao ciclo gestacional (Grandone, 2005).

Mesmo sem uma causa determinada, muitos casais passam a buscar, através da reprodução assistida, formas para se tornarem pais. Nesta busca, eles se deparam com taxas de sucesso de tratamento que não ultrapassam 35% na maioria das estatísticas (Qublan et al., 2006).

Assim, a perspectiva de melhora nas taxas de gravidez em ciclos de reprodução assistida mantém-se como um dos principais objetivos do estudo da reprodução humana. Para isso, inúmeros estudos têm buscado a melhora dos fatores embrionários, como a qualidade e número de embriões, e nos fatores

femininos. Dentre estes, devem ser consideradas a melhoria da receptividade do endométrio, a identificação de fatores intervenientes na resposta imunológica e nas características genéticas da mulher, que incluem seu potencial de coagulação frente à gravidez e à implantação embrionária (Glueck et al., 2000).

Devido a essa taxa de sucesso de 34%, as clínicas de reprodução assistida tentam melhorar a taxa de gravidez através da transferência de mais de um embrião. Esta conduta tem como conseqüência, outro problema de grande relevância e impacto social, que é a gestação múltipla (Haggarty et al., 2006).

As possíveis causas de falha de implantação embrionária têm sido amplamente investigadas, mas não há consenso na literatura sobre este assunto. Acredita-se que a qualidade embrionária e a receptividade endometrial constituam fatores relevantes no insucesso da FIV. As alterações sanguíneas que levam à hipercoagulabilidade, com conseqüente aumento da ocorrência de trombose, são citadas como fatores que comprometem o processo de implantação embrionária (Grandone et al., 2001).

As trombofilias são doenças relacionadas com o risco de trombose e, por isso, associadas como fatores de risco para falha de implantação embrionária. O interesse em melhorar as taxas de implantação embrionária levou ao estudo da angiogênese no sítio de implantação e, conseqüentemente, das doenças relacionadas a alterações no sistema de coagulação sanguínea. Os estados pró-trombóticos podem ser hereditários, adquiridos ou mistos, quando resultam também de fatores ambientais (uso de estrógeno, obesidade) (D'Amico, 2006).

Cerca de 40% dos casos de trombose que se apresentam com oclusão arterial ou venosa são hereditários. O tromboembolismo venoso ocorre, freqüentemente, como resultado de fatores mistos. Em geral, a trombofilia deve ser vista como uma desordem multifatorial e não como expressão de uma única alteração genética (Buchholz e Thaler, 2003).

A relação entre os fatores trombofílicos e a infertilidade deve ser considerada pela possibilidade de perda precoce espontânea, abortamento pré-clínico, ocasionada pela alteração da hemostasia de caráter trombofílico no sítio de implantação. Esta alteração vascular afeta a invasão trofoblástica e a vasculatura placentária. O abortamento pré-clínico é definido como aquele que ocorre quando o teste quantitativo de β -HCG, de baixa sensibilidade, apresenta resultado negativo mesmo em ocasiões onde foi iniciado o processo de implantação, mas o mesmo não foi concluído. Esta situação pode inclusive levar à classificação errônea de mulheres como portadoras de infertilidade sem causa aparente e não como casos de perdas gestacionais muito precoces (Sarto et al., 2001).

Recentemente, as trombofilias têm sido identificadas com maior freqüência em mulheres com falha de implantação submetidas a repetidos ciclos de FIV, quando comparadas com mulheres férteis. Azem et al. (2004) realizaram um estudo tipo caso-controle através da análise de 45 mulheres com falha de implantação, 44 mulheres férteis e 15 mulheres com infertilidade, mas que engravidaram na primeira tentativa de FIV. As mulheres avaliadas foram submetidas a exames para investigação das seguintes trombofilias: mutação do gene da protrombina e do gene da MTHFR, presença do FV de Leiden, deficiência de antitrombina,

proteínas C e S. Esse estudo revelou uma alta freqüência de trombofilia no subgrupo de mulheres com falha de implantação (17,8%) em relação aos grupos de mulheres férteis e de mulheres que engravidaram na primeira tentativa de FIV (ambos os grupos com freqüência de 8,9%). Este fato reforça a associação dessa patologia com o comprometimento vascular e conseqüente dificuldade para o desenvolvimento da implantação embrionária (Azem et al., 2004).

Grandone et al., 2001, também encontraram resultados similares em um estudo tipo caso-controle, com avaliação de uma amostragem menor de mulheres (18 mulheres com falha de implantação e 216 controles férteis). Esses dois estudos citados, ainda que despertem para a possível associação entre a trombofilia e a falha de implantação, não afirmam como certa esta relação.

A relação entre a mutação da MTHFR com a qualidade embrionária e conseqüente implantação foi sugerida por Haggarty et al., 2006, em estudo de coorte prospectivo. Essa pesquisa demonstrou que o genótipo do MTHFR normal está relacionado com a capacidade de produzir embriões de boa qualidade (Haggarty et al., 2006).

A ocorrência de trombose em mulheres com trombofilia e submetidas à terapia hormonal com contraceptivos orais combinados de estrógeno e progesterona está aumentada e o risco é diretamente proporcional à dosagem de estrógeno (Bockenstedt, 2006). Isto leva a uma maior preocupação com a ocorrência de trombose em mulheres inférteis com trombofilia que realizam indução de ovulação com altas doses de estradiol em procedimentos de reprodução assistida.

A trombofilia também tem sido associada com a Síndrome de Hiperestímulo Ovariano (SHO), que ocorre quando há uma resposta ovariana exacerbada após uso de indutores de ovulação. A forma severa da SHO ocorre em 0,8% a 2,0% dos casos, com depleção do fluido intravascular e aumento da viscosidade sanguínea. Têm sido observadas formas severas de trombose em pacientes que desenvolvem SHO. Alguns casos de mulheres com trombofilia e eventos trombóticos com SHO já foram descritos, sugerindo uma maior prevalência de trombofilia em mulheres com SHO (Dulitzky et al., 2002).

Deve ser considerado ainda o risco obstétrico em mulheres com trombofilia submetidas a tratamentos de reprodução assistida que engravidam. A ocorrência de complicações vasculares na gestação pode levar à doença hipertensiva, restrição de crescimento intra-uterino (RCIU) e perda fetal recorrente (PFR). No início da gestação ocorre o desenvolvimento dos vilos e lagos venosos, comunicando o tecido embrionário com o endométrio materno. Há a invasão trofoblástica no endométrio e a presença de alterações vasculares nas artérias espiraladas pode levar tanto à falha de implantação quanto a complicações mais tardias na gravidez, dentre elas a hipertensão. Na hipertensão ocorre depósito de fibrina e lesão do endotélio vascular, sugerindo a ativação do sistema de cascata da coagulação (Grandone e Margaglione, 2003).

A hipertensão associada à gravidez é uma ocorrência relativamente freqüente e afeta cerca de 5% a 7% das gestantes. A pré-eclâmpsia é definida como hipertensão associada à proteinúria e traduz uma complicação clínica com acometimento de múltiplos órgãos. A pré-eclâmpsia, como uma doença

hipertensiva, pode ser secundária à trombofilia e consiste em importante causa de morte materna na gestação. Outras causas relevantes de morte materna são: o descolamento prematuro da placenta (DPP) e a coagulação vascular disseminada (CVD), patologias relacionadas com hipertensão (Grandone e Margaglione, 2003).

A associação entre trombofilia e perda fetal recorrente - uma outra complicação obstétrica - está bem estabelecida atualmente (Weintraub et al., 2006). Em estudo de meta-análise de 2003, realizou-se uma avaliação criteriosa de 31 estudos de corte transversal, coorte e caso-controle que investigaram a presença de trombofilia em casos de perda fetal recorrente. Nesta pesquisa foi demonstrada a associação da PFR com FV Leiden, mutação da protrombina e deficiência de proteína S, não tendo sido constatada relação com outros fatores investigados, como deficiência de AT, proteína C e mutação MTHFR (Rey et al., 2003). Todavia, em um amplo estudo de meta-análise, realizado em 2006, foi encontrada a relação da mutação do MTHFR com perda fetal recorrente (Ren e Wang, 2006).

Em recente estudo israelense, tipo caso-controle, foram investigados os fatores trombofílicos hereditários como FV Leiden, mutação da protrombina e mutação do MTHFR em 70 neonatos e gestantes com pré-eclâmpsia severa, RCIU ou DPP. Nessa pesquisa foi evidenciada a associação de fetos com FV de Leiden e mutação da protrombina com a severidade das doenças avaliadas nas gestantes (Anteby et al., 2004). Estes dados são concordantes com o estudo de Tranquilli e Emanuelli, 2006.

A prevalência dos fatores trombofílicos em mulheres com infertilidade, não somente no subgrupo com falha de implantação, ainda não está bem estabelecida na literatura até o momento. Todavia, a possível relação entre a presença destes fatores e a obstrução vascular no sítio de implantação deve ser considerada nos casos de infertilidade. Além disso, a presença de trombofilia em mulheres que desejam engravidar e atingem este objetivo pode aumentar o risco de complicações durante a gravidez, tais como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intra-uterino, descolamento prematuro de placenta, parto prematuro, abortamento recorrente, sofrimento fetal crônico, além de eventos isquêmicos durante a gravidez (Kupfermanc et al., 2000; Brenner e Kupfermanc, 2003; Couto et al., 2005; Ren e Wang, 2006).

Portanto, a investigação da prevalência de fatores trombofílicos em mulheres com infertilidade poderá ajudar a esclarecer sua importância, tanto nestes quadros quanto na prevenção de complicações obstétricas. Este estudo avalia a prevalência dos fatores trombofílicos em mulheres com infertilidade.

Para melhor compreensão dos fatores trombofílicos será realizada uma explanação dos fenômenos descritos na cascata de coagulação e das trombofilias hereditárias e adquiridas.

1.2. Coagulação Sanguínea

A coagulação sanguínea é um mecanismo fisiológico de defesa do organismo. Contudo, este processo pode transcorrer de forma anormal e levar à

formação de trombo na parede vascular e conseqüente obstrução da circulação sanguínea local.

O início da coagulação ocorre como resposta a um dano na parede vascular, com depósito de plaquetas e ativação do sistema de coagulação que culmina com a formação de uma rede protéica de fibrina que é o coágulo. A hipótese da cascata ou queda-d'água foi apresentada separadamente, em 1964, por MacFarlane e por Davie e Ratnoff. Considera que a coagulação sanguínea ocorre de forma seqüencial através da ativação de zimogênios que, na presença de cofatores como cálcio e/ou fosfolipídeos da membrana celular, tornam-se serino-proteases ativadas. O processo é controlado por mecanismo de retroalimentação. Este inclui fatores não enzimáticos (fatores V e VIII, que funcionam como proteínas regulatórias da velocidade de ativação), a ligação de receptores plaquetários específicos que revelam a atividade coagulante dos fosfolipídeos plaquetários, o início da ativação seqüencial dos fatores dependentes da vitamina K (fatores IX, X, VII, proteína C e proteína S), com conseqüente agregação plaquetária e a formação da rede de fibrina (Bithell, 1998). Tradicionalmente a coagulação sanguínea é descrita, didaticamente, como duas vias - uma intrínseca e outra extrínseca - convergindo para uma via final comum, ilustrada na Figura 1 (Norris, 2003).

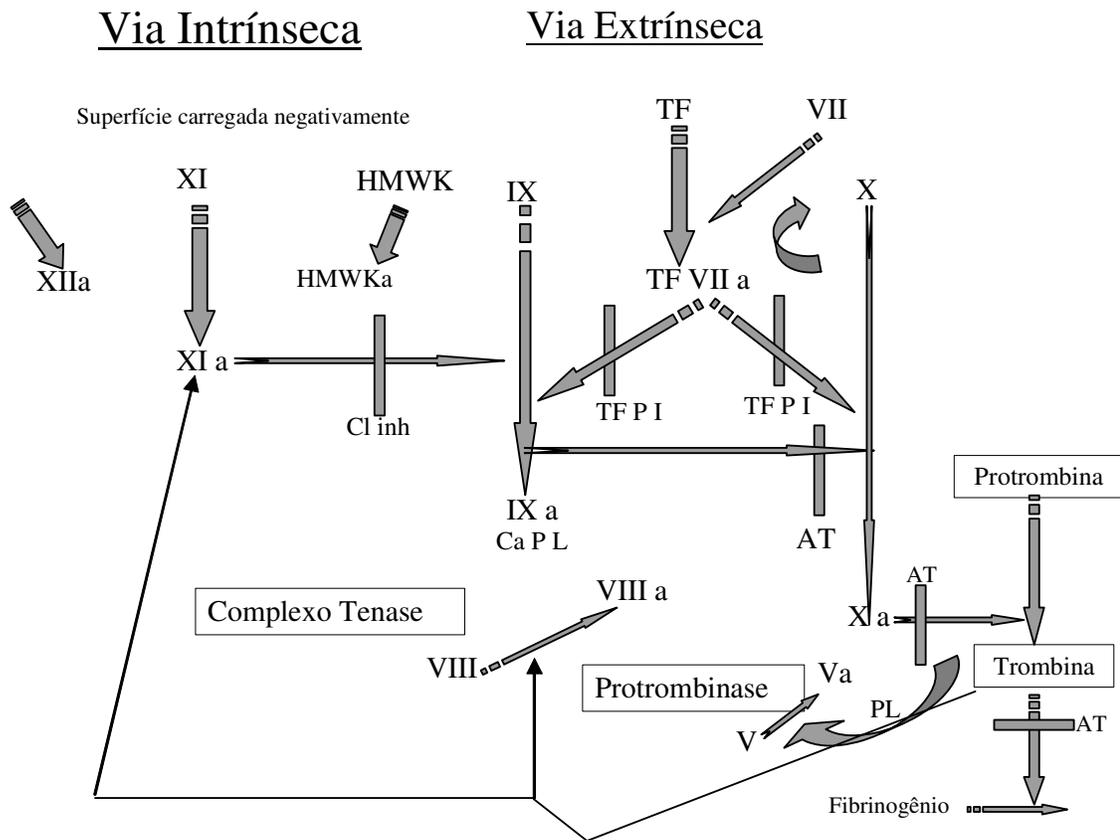


Figura 1- Cascata de coagulação mostrando as vias intrínseca e extrínseca, ativação, inibição e feedback. Esquema elaborado por Lucy Norris, 2003. (HMWK: cininogênio de alto peso molecular, CI-inibidor.TF =fator tecidual. TFPI = fator tecidual de inibição. PL =fosfolípides.Ca: cálcio.AT : antitrombina.)

A via extrínseca descreve o mecanismo no qual a coagulação se inicia em resposta a um trauma. Os fatores envolvidos na via extrínseca são o fator tecidual (TF) e o fator VII. O fator tecidual não é normalmente expresso nas células que estão em contato com o plasma. Contudo, frente a uma lesão tecidual, este fator é expresso na superfície celular e se liga ao fator VII, que

leva à formação do complexo TF-VII, um potente agente desencadeante da cascata de coagulação. A importância do fator tecidual na manutenção da integridade vascular e desenvolvimento embrionário foram sugeridos há cerca de dez anos (Bugge et al., 1996).

O fator VII é uma proteína dependente de vitamina K. É produzido no fígado e 99% desse fator encontram-se na forma inativa e 1% está presente na forma ativa. Uma vez formado o complexo FT-VII, ele atua sobre dois substratos - os fatores IX e X -, ativando-os (Norris, 2003).

A via intrínseca é ativada quando o sangue entra em contato com uma superfície carregada negativamente. Este contato desencadeia uma série de reações envolvendo os fatores XII, XI, IX e VIII. A principal função da via intrínseca é ampliar a ativação da coagulação deflagrada pela via do fator tecidual. A via intrínseca também pode ativar o fator IX. A ligação do fator XII a uma superfície estranha ou carregada negativamente leva ao aumento e auto-ativação do fator XII em XIIa (Mitropoulos et al., 1995).

O fator XII ativado promove a conversão da pré-caliceína em caliceína e a ativação do fator XI. Nesse momento ocorre ainda a clivagem do cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e a consequente formação do fator fator IXa (Broze, 1995).

Quando o fator IX é ativado, tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca, ele forma um complexo com o fator VIIIa, cálcio e fosfolípidos. Este complexo, denominado complexo tenase, pode converter o fator X em Xa e tem um papel relevante no processo de hemostasia (Norris, 2003).

Em seguida ocorre a produção da enzima trombina ativa e a formação do complexo protrombinase na cascata de coagulação. Este complexo é decorrente da ação do fator Xa no fator Va. Na presença de fosfolípide aniônico, o fator V é ativado. O fator Va leva à formação de trombina a partir da protrombina (Norris, 2003).

O fator X ativado também pode catalisar a conversão de protrombina em trombina, mas a velocidade é lenta.

Finalmente, ocorre a formação da rede protéica de fibrina no processo da cascata de coagulação. A fibrina recém-formada é estabilizada por ligação cruzada e catalisada pela trombina ativada (O’Riordan e Higgins, 2003).

O processo de hemostasia é um equilíbrio dinâmico entre a coagulação e a fibrinólise. A fibrinólise age como um mecanismo reparador, onde ocorre uma proliferação de células endoteliais para recanalização do vaso (O’Riordan e Higgins, 2003).

O controle da via de coagulação ocorre em todas as etapas da via, através da inibição e modulação dos cofatores.

O principal inibidor do fator XIIa é o C1 inibidor e tem sua atividade diminuída em baixas temperaturas (Broze, 1995; Mitropoulos et al., 1995).

O papel fisiológico da antitrombina é limitar o processo de coagulação através da inibição da trombina livre e do fator Xa, sendo mais eficaz quando associada à heparina presente na superfície das células (O’Riordan e Higgins, 2003).

A proteína C é o principal mecanismo para prevenir a trombose na microcirculação, por regular a formação de trombina. A proteína C é uma proteína plasmática dependente da vitamina K que circula como um zimogênio inativo. A ligação da trombina à trombomodulina cliva e ativa a proteína C, aumentando em aproximadamente 1000 vezes a taxa de formação da protease denominada proteína C ativada, e bloqueando, simultaneamente, a capacidade da trombina catalisar a formação de fibrina, ativar plaquetas, bem como promover a ativação retro-alimentar dos cofatores envolvidos na coagulação. A trombomodulina funciona assim como um comutador molecular, alterando a especificidade da trombina por seu substrato e, conseqüentemente, a sua função fisiológica. A fase rápida de inativação do fator Va é devido à clivagem na Arg506. A clivagem do fator V resulta na redução de 50 vezes da afinidade pelo fator X ativado e uma drástica redução na atividade da protrombina. A segunda fase, mais lenta, corresponde à clivagem na posição Arg306. A inativação proteolítica dos fatores V e VIII ativados é efetuada pelo complexo formado entre a proteína C ativada e a proteína S, que age como cofator da proteína C ativada (O'Riordan e Higgins, 2003).

A alfa 1 antitripsina pode inibir o fator XIa e age de forma similar à antitrombina, formando um complexo estável com sua serino-protease. A alfa 2 macroglobulina age de forma secundária, inibindo várias proteínas envolvidas na cascata de coagulação, como a calicreína, a trombina e a plasmina.

A plasmina é a enzima responsável pela lise da fibrina em produtos de degradação de fibrina. Na sua forma inativa é denominada plasminogênio. A

ativação do plasminogênio pode ser desencadeada por vários fatores, dentre eles destacam-se os fatores XIIa e XIa, a calicreína, ativador do plasminogênio tecidual (tPA), e a uroquinase ou ativador do plasminogênio tipo urinário (uPA) (List et al., 2000).

A inibição da fibrinólise também é necessária para o equilíbrio da hemostasia. A inibição da plasmina ativa pela alfa₂ antiplasmina deve ser considerada um passo importante na cascata de coagulação, pois estabiliza a formação de fibrina. A alfa₂ macroglobulina tem um papel limitado na inibição da plasmina e sua importância aparece na falta de alfa₂ antiplasmina (Norris, 2003).

Os inibidores do plasminogênio ativado, denominados PAI, exercem um importante papel no equilíbrio do processo de fibrinólise. Há quatro tipos distintos de PAI descritos, mas o que é reconhecido com papel fisiológico é o PAI 1, que é sintetizado nas células endoteliais e estimulado por trombina e endotoxinas (Doggen et al., 1999).

1.3. Trombofilias

A anormalidade no processo de hemostasia, resultando em trombose, pode ser decorrente de condições patológicas denominadas trombofilias. Os fatores adquiridos e/ou herdados citados como possíveis responsáveis por essa tendência à trombose são, entre os adquiridos, o anticorpo anticardiolipina e o anticoagulante lúpico e, entre os herdados, a deficiência de proteína C, a deficiência de proteína S, a deficiência de antitrombina, a presença do fator V de Leiden, uma mutação

no alelo 20210^A do gene da protrombina e uma mutação no gene da enzima metileno tetrahidrofolato redutase (D'Amico, 2006).

O termo trombofilia foi usado originalmente por Edberg, em 1965, para descrever a tendência à trombose venosa de uma família norueguesa. Atualmente ele é empregado para qualquer condição, adquirida ou congênita, que se associa a maior propensão para tromboembolismo (D'Amico, 2006).

O conhecimento de fatores adquiridos e hereditários envolvidos nas desordens da hemostasia pode elucidar os mecanismos envolvidos no processo de coagulação e possíveis interferências dos mesmos em diversas doenças de tratamento ainda insatisfatório, dentre elas a infertilidade.

1.4. Trombofilias Adquiridas: Anticorpos antifosfolípides

Os anticorpos antifosfolípides são um grupo de imunoglobulinas que reage contra fosfolípides de membrana carregados negativamente. O anticorpo anticardiolipina e o anticoagulante lúpico são os mais comumente encontrados dentre os anticorpos antifosfolípides. Há outros testes aplicados para outros anticorpos antifosfolípides como o fosfatidilserina, fosfatidilinositol, anticorpo anti β 2 glicoproteína I, mas em estudos recentes estes têm sido encontrados em 9% de mulheres normais e férteis (Stern et al., 2003).

Em 2004, no Congresso Internacional de Anticorpo Antifosfolípides, realizado em Sydney - Austrália, o papel do anticorpo anti β 2 glicoproteína I foi amplamente debatido e foi recomendada a sua dosagem juntamente com os

outros anticorpos antifosfolípidos, como o anticoagulante lúpico e anticorpo anticardiolipina. Contudo, não foi estabelecida a relação do mesmo com eventos de trombose e considerado seu papel tanto na função pró-coagulante quanto anticoagulante. Em camundongos “knock-out” (animais de experimentação desprovidos de capacidade de produzir esses anticorpos) não foi observada relação entre o anticorpo anti β 2 glicoproteína I e a gestação. Todavia, foi aventada a hipótese de sua relação no desenvolvimento do trofoblasto (Branch, 2005).

O anticorpo anticardiolipina foi descoberto por acaso, quando se realizava pesquisa de VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) para investigação de sífilis. Este teste inespecífico para sífilis emprega um antígeno lipídico composto primariamente de cardiolipina. Testes de VDRL falso-positivos também são freqüentemente encontrados em pacientes com positividade para anticoagulante lúpico.

O anticoagulante lúpico é uma “imunoglobulina que interfere com um ou mais testes de coagulação, dependentes de fosfolípidos, como o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) e o tempo de protrombina (TP)” (Feinsten e Rapaport, 1972). Inicialmente, este anticorpo foi descrito como inibidor do sistema de coagulação, mas em 1963 foi definida sua relação com episódios de trombose. Os primeiros grupos de pacientes seguidos com essas características eram portadores de lúpus eritematoso sistêmico, o que deu origem ao termo “fator anticoagulante lúpico”. Mesmo depois que se observou que esses pacientes apresentavam maior tendência para trombose e não para sangramento anormal e que o quadro clínico não era exclusivo de pacientes lúpicos, o termo

“anticoagulante lúpico”, que já se consagrara na literatura, não foi mais modificado (Feinsten e Rapaport, 1972).

A investigação do anticoagulante lúpico pode apresentar um resultado positivo em pacientes que estão fazendo uso de algumas medicações como clorpromazina, procainamida, hidralazina, quinidina, antibióticos, fenitoína. Além dessas situações, pode ainda ser identificado em pacientes com infecções bacterianas, por protozoários (*P. carinii*) e virais (AIDS), e em pacientes portadores de doenças linfoproliferativas (leucemia, linfoma, macroglobulinemia).

Os anticorpos antifosfolípidos são associados à trombose de estruturas venosas e arteriais. Há vários mecanismos sugeridos para a ocorrência da trombose na presença destes anticorpos. Dentre eles, destacam-se:

- a) Ação sobre as plaquetas, estimulando a agregação plaquetária;
- b) Efeito sobre as células endoteliais vasculares, resultando em lesão celular e expressão do fator tecidual;
- c) Interferência com os componentes do sistema da proteína C, inibindo a ativação da proteína C e interferindo com a proteólise dos fatores Va e VIIIa, ou reconhecendo diretamente as proteínas S e C;
- d) Inibição da antitrombina, ao reagir com a heparina e substâncias heparinóides e, assim, reduzindo sua atividade;
- e) Apresentação de reação cruzada com a LDL oxidada e aumentando o risco de aterosclerose;
- f) Bloqueio do sistema fibrinolítico;
- g) Ruptura da barreira protetora de anexina V. (D’Amico, 2006).

O anticorpo anticardiolipina e o anticoagulante lúpico são fatores trombofílicos adquiridos, sendo consideradas as categorias de positivo e negativo como resultado.

1.5. Trombofilias Hereditárias

Atualmente, é possível identificar a trombofilia hereditária em cerca de 60% a 70% dos pacientes acometidos por trombose (Buchanan et al., 2003).

1.5.1. Deficiência das proteínas C e S

A proteína C foi descrita, pela primeira vez, por Seegers et al., 1966. É um anticoagulante natural e sua biossíntese é dependente de vitamina K e sintetizada pelo fígado.

A proteína C ativada degrada o FV ativado (FVa) e o FVIII ativado (FVIIIa), além de reduzir a atividade de protrombinase das plaquetas ao degradar o FVa ligado na membrana plaquetária. Os efeitos da proteína C (PC) são acelerados pela atividade do cofator da proteína S (PS), com conseqüente inibição da produção de trombina e fibrina. A proteína C é ativada quando submetida à ação do complexo trombomodulina-trombina. Essa deficiência hereditária é uma herança autossômica dominante (O'Riordan e Higgins, 2003; D'Amico, 2006).

Desde a descoberta da deficiência de proteína C, cerca de 160 pontos de mutações acometendo a síntese e produção da PC foram descritos (Buchanan et al., 2003).

Os pacientes com deficiência PC apresentam episódios recorrentes de trombose freqüentemente com idade inferior a 45 anos. Os indivíduos homozigotos apresentam doença mais severa e não raramente ocorre a púrpura neonatal fulminante, caracterizada por microtrombose generalizada, sangramento e necrose tecidual. Uma apresentação similar pode acontecer em indivíduos heterozigotos submetidos à terapia com warfarin sem uma terapia prévia com heparina. Os indivíduos heterozigotos apresentam risco dez vezes maior para trombose (Buchanan et al., 2003).

A ocorrência das deficiências de proteínas S e C é relativamente rara, com a prevalência de cerca de 5% em pacientes com doença tromboembólica (Buchholz e Thaler, 2003; Norris, 2003).

A deficiência da proteína C ocorre de 0,2% a 0,4 % em indivíduos normais e de 3% a 5% em pacientes com trombose (Buchanan et al., 2003).

O diagnóstico laboratorial da deficiência hereditária de proteína C é dificultado pela presença de fatores que levam à redução na dosagem da mesma. Dentre eles, podem-se citar a gestação, o uso de contraceptivo oral, a trombose aguda, a doença hepática, o tabagismo, o uso de cumarínicos e a coagulação intravascular disseminada. A dosagem de PC deve considerar os fatores acima citados e ser realizada com pelo menos duas semanas sem uso de anticoagulante oral e depois de descartar a deficiência de vitamina K. Os métodos recomendados para a dosagem de PC são funcionais, preferencialmente em relação aos

métodos imunológicos. Devido ao grande número de mutações, o exame genético não é prático e nem viável (Buchanan et al., 2003).

Um ano após a descoberta da proteína C, outra vitamina dependente de vitamina K foi identificada na cidade de Seattle e então denominada proteína S, ainda sem função conhecida na ocasião. Nos anos oitenta, foi estabelecida a relação entre a deficiência de PS e a ocorrência de trombose.

A proteína S é dependente de vitamina K, sintetizada pelo fígado, células endoteliais, megacariócitos. A PS circula em duas formas, em equilíbrio no plasma: na forma livre ativa (35% a 40%) e formando um complexo não covalente com a proteína que transporta a fração C4b do complemento (60% a 65%). Somente a forma livre tem atividade de cofator da PCa (Bithel, 1998).

A proteína S é o cofator necessário para a ativação da proteína C e atua melhorando a afinidade da proteína C ativada por fosfolípidos carregados negativamente. O complexo proteína C ativada + proteína S torna os fatores Va e VIIIa mais facilmente acessíveis para a clivagem mediada pela proteína C ativada (Bithel, 1998).

A deficiência de proteína S é uma patologia de herança autossômica dominante e muito similar à da PC. Os indivíduos heterozigotos podem apresentar episódios recorrentes de trombose e também têm necrose cutânea induzida por warfarin. A homozigose é rara e está relacionada com púrpura fulminante neonatal (Buchanan et al., 2003).

A frequência de deficiência de PS está presente em cerca de 1% a 5% de pacientes com trombose. A sua frequência na população em geral é estimada em 0,3% (Buchanan et al., 2003).

Os níveis plasmáticos da PS no sexo masculino são discretamente elevados em relação ao sexo feminino. Em algumas situações há redução dos valores de OS, como gestação, uso de contraceptivo hormonal e terapia hormonal no climatério, doença hepática, coagulação intravascular disseminada, presença de anticorpos antifosfolípidos e uso de drogas cumarínicas (D'Amico, 2006).

Há 131 diferentes mutações descritas relacionadas com a diminuição dos níveis plasmáticos de PC e/ou de sua função. Logo, a pesquisa genética como método diagnóstico é inviável. A dosagem de PS livre é realizada através de métodos funcionais e imunológicos, e sua anormalidade funcional pode ser confirmada com imunoensaio. A dosagem deve ser realizada pelo menos depois de duas semanas sem terapia anticoagulante oral (Buchanan et al., 2003).

1.5.2. Deficiência de antitrombina

A antitrombina (AT) é uma glicoproteína sintetizada no fígado e considerada um anticoagulante natural, pois inativa o fator Xa, o fator IXa, a calicreína e várias outras enzimas que possuem serina no sítio de ligação. A ação da AT é inibida pelo fator 2 plaquetário (Bithell, 1998).

A freqüência da deficiência da antitrombina na população geral é de 1:2.000 e em indivíduos com antecedente de trombose é de 1% a 3% (Buchanan et al., 2003).

Trata-se de uma desordem genética transmitida por herança autossômica dominante e a maioria é de heterozigotos. Os indivíduos homozigotos são extremamente raros (Buchanan et al., 2003).

Os níveis plasmáticos da AT são discretamente menores nas mulheres na pré-menopausa e naquelas em uso de contraceptivos orais combinados, em relação aos homens e às mulheres na pós-menopausa. As concentrações plasmáticas de AT são reduzidas nos pacientes em uso de heparina, na vigência de processo trombótico, hepatopatia e síndrome nefrótica (D'Amico, 2006).

A deficiência da antitrombina é rara e ocorre em 1/2000 na população geral e de 1% a 3% em pacientes com eventos tromboembólicos (Buchanan et al., 2003).

Na deficiência da antitrombina os pacientes heterozigotos apresentam tromboembolismo recorrente na segunda e terceira décadas de vida. Provavelmente, a deficiência de AT é a trombofilia hereditária mais severa e a homozigose tende a ser incompatível com a vida. Há descrição de 127 mutações relacionadas com a deficiência de AT, o que torna a pesquisa genética impraticável. O diagnóstico laboratorial da deficiência da antitrombina é mais preciso através de uma avaliação funcional do que com teste imunológico, usando, preferencialmente, um método capaz de detectar problemas com ligação no sítio de heparina e no

sítio ativo da proteína. Os níveis de AT não são influenciados pela terapia com warfarin, ou durante anticoagulação com heparina. Por isso, a avaliação de AT deve ser realizada pelo menos cinco dias após a interrupção de terapia com heparina (Buchanan et al., 2003).

1.5.3. Fator V de Leiden

Antes de 1993, a avaliação laboratorial para causa hereditária de trombose era geralmente improdutiva. Contudo, após a identificação da resistência da proteína C como traço hereditário, elevando o risco de trombose em duas a três vezes, houve maior interesse no estudo das trombofilias. Foi encontrada uma mutação no fator V que causava resistência à proteína C na cidade de Leiden, Holanda, daí a denominação fator V de Leiden, por Bertina et al., 1994.

O fator V está envolvido na ativação da protrombina na via final comum da coagulação. O FV tem sua atividade grandemente aumentada pela ação de enzimas proteolíticas; entre elas a trombina, o fator Xa, o veneno de cobra de Russell e a papaína, sendo inativado pelo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), oxalato e proteína C ativada. O FV é sintetizado pelo fígado, megacariócitos e, possivelmente, pelos macrófagos alveolares (Bithell, 1998).

A presença de uma mutação pontual ocorre pela substituição de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 1691 (1691→ A) no gene do fator V, o que acarreta a substituição da arginina na posição 506 por glutamina na molécula do fator V. Esta mutação faz com que o FVa torne-se resistente à inativação

produzida pela PCa, aumentando o risco para episódios vaso-oclusivos. Esta alteração genética é uma das principais causas de trombofilia hereditária e está presente em 20% a 60% dos pacientes com história pessoal ou familiar de trombose venosa profunda (TVP), tratando-se de uma herança autossômica dominante (Ehrenforth et al., 2004). Esta estatística de 20% referente à população européia coincide com os dados encontrados na população brasileira por Arruda et al., 1995. Já a incidência na população negra e descendente de índios, avaliada na Amazônia no Brasil, é bem inferior e comparável à incidência desta mutação na população africana (Arruda et al. 1996).

A prevalência do FV de Leiden na população geral varia de 1% a 5%, dependendo da etnia (Buchanan, 2003). Ocorre em 1,5% dos hispânicos e negros da América do Norte e em 9% dos húngaros. Outras populações, com prevalência igualmente elevada, foram encontradas na Grécia, Turquia e sul da Suécia (Baré, 2000). A frequência desta mutação em caucasianos em geral é de 4,8% (Bauder, 2004) e a frequência dessa mutação na população brasileira sem antecedente de trombose é de 3% a 5% (Arruda et al., 1995).

O risco de TVP está aumentado de 5 a 10 vezes em indivíduos heterozigotos para o FVL. Portadoras do FVL e usuárias de contraceptivo oral têm o risco aumentado em 30 a 50 vezes (Baré et al., 2000). Em casos de homozigose, a ocorrência de doença tromboembólica está elevada cerca de 80 vezes (Buchanan et al., 2003; Imbert, 2003).

Durante a evolução, um discreto estado de hipercoagulabilidade pode ter oferecido uma vantagem em ocasiões como lesão traumática e gravidez, sendo sugerido um possível efeito benéfico desta mutação no processo de implantação embrionária (Gopel, 2001).

O diagnóstico é feito através de teste genético com a análise de DNA específico para o FV Leiden.

1.5.4. Mutação G20210A no gene da protrombina

A protrobina, precursora da trombina, é uma pró-enzima que funciona na via comum da coagulação (Bithell, 1998).

A mutação do gene da protrombina é caracterizada pela transição no gene da protrombina G→A na posição 20210. Esta mutação resulta no aumento da protrombina circulante de aproximadamente 25% (D'Amico, 2006). Esta mutação está presente em cerca de 6% dos pacientes acometidos por TVP e em aproximadamente 20% das famílias com doença tromboembólica. Assim como o fator V, a mutação da protrombina é mais freqüente em caucasianos (Buchanan et al., 2003).

Os indivíduos heterozigotos têm o risco para trombose aumentado em três vezes. Os homozigotos são extremamente raros e possuem este risco ainda mais elevado (Buchanan et al., 2003).

A combinação da mutação do FVL e da protrombina parece multiplicar o risco de trombose e estes indivíduos normalmente são acometidos em idade mais jovem e de forma repetitiva (Buchholz, 2003).

A avaliação laboratorial desta mutação é feita através da pesquisa genética.

1.5.5. Mutação Ala677→Val no gene da enzima metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR)

A homocisteína é um aminoácido sulfatado derivado do metabolismo da metionina. O metabolismo da homocisteína envolve duas vias de remetilação. A primeira via, onde a homocisteína é convertida em metionina, envolve a enzima metionona sintetase, vitamina B12 e N-metiltetrahydrofolato, um metabólito do ácido fólico produzido pela enzima metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR). A outra via, onde a homocisteína é convertida em cistationina, envolve a enzima cistationina beta-sintetase (CBS) e vitamina B6. No plasma, a homocisteína é oxidada em dissulfetos de homocisteína-homocistina e homocisteína-cisteína. A homocisteína e os dois dissulfetos circulam nas formas livre e ligada à proteína e são designadas em conjunto como homocisteína total (D'Amico, 2006).

A mutação Ala677→Val no gene da enzima metileno tetrahydrofolato redutase leva à formação da enzima metileno tetrahydrofolato redutase termolábil, que apresenta apenas 50% de atividade, e sua deficiência leva ao aumento da homocisteína plasmática. A hiper-homocisteinemia plasmática pode ser decorrente de condições herdadas ou adquiridas. Os níveis considerados como

valor plasmático normal são de 5 a 16 μ Mol/L. Ela é considerada severa quando atinge níveis superiores a 100 μ Mol/L, moderada entre 25 e 100 μ Mol/L e leve entre 16 e 24 μ Mol/L (D'Amico,2006).

A frequência da hiper-homocisteinemia secundária à mutação da MTHFR, uma herança autossômica recessiva, ocorre em 5% da população geral (Buchanan et al., 2003). A frequência de homozigose para MTHFR é de 5% a 15% na população geral. Em estudo na população brasileira foi encontrada maior incidência de homozigose em indivíduos caucasianos (10%) do que em negros (1,45%) e índios (1,2%) (Arruda et al., 1998).

As causas mais comuns de hiper-homocisteinemia adquirida incluem as deficiências de cobalamina, folato ou piridoxina, insuficiência renal, lúpus eritematoso sistêmico e uso de drogas como metrotexato, anticonvulsivantes e óxido nítrico (Buchanan et al., 2003; D'Amico, 2006).

A hiper-homocisteinemia é considerada fator de risco para doença cerebrovascular, vascular periférica e coronariopatia, provavelmente por comprometimento do tecido endotelial. Um aspecto relevante da mutação MTHFR na reprodução humana é sua interferência em gestações gemelares dizigóticas. Os indivíduos homozigóticos C677T possuem 2,3 vezes menos chance de ter uma gestação gemelar (Buchholz, 2003).

2. Objetivos

2.1. Objetivo

Determinar a prevalência de fatores trombofílicos (anticorpo anticardiolipina (IgG e IgM), do anticoagulante lúpico, da deficiência das proteínas C e S, da deficiência da antitrombina, do fator V de Leiden, da mutação 20210A no gene da protrombina e da mutação Ala→Val no gene da metileno tetrahidrofolato redutase) em mulheres com antecedente de infertilidade.

3. Sujeitos e Método

A metodologia está descrita no capítulo de Pacientes e Método do artigo. A fim de complementar os dados apresentados no artigo, julgou-se necessária a apresentação do cálculo amostral para este estudo de prevalência.

O tamanho da amostra foi baseado na prevalência de fatores trombofílicos em mulheres inférteis, estimado por mulheres inférteis com falha de implantação.

A Tabela 1 mostra o tamanho da amostra para cada fator, considerando-se um nível de significância de 5%.

Tabela 1 Cálculo do tamanho amostral, segundo Medronho, 2002.

	Prevalência (%)	Erro Amostral (%)	Tamanho da Amostra
Fator V de Leiden	5,9	4	133
Mutação MTHR	17,8	8	115
Proteína S deficiente	8,9	5	125
Mutação da Protrombina	8,9	5	125

Será assumido o maior tamanho da amostra $n = 133$.

$\alpha = 0,05$ (5%) (nível de significância)

P = prevalência do fator

e = erro amostral

$Z_{1-\alpha/2} = 1,96$ (distribuição normal)

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 P (1 - P)}{e^2}$$

(Medronho, 2002).

4. Publicação

Federação Brasileira das
Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia

FEBRASGO

Editoria Executiva - RBGO
Av. Bandeirantes, 3900 - 8º andar
Ribeirão Preto - SP - CEP: 14049-900
Tel.: (16) 602-2803 Fax.: (16) 633-0946

Secretaria Executiva
Av. das Américas, 8445 sala 711
Rio de Janeiro - RJ - CEP: 22793-081
Tel.: (21) 2487-6336 Fax.: (21) 2429-5133



Ribeirão Preto, 12 de junho de 2007

Ilmo. Sr. Prof. Dr.

Ricardo Barini

Prezado Professor,

Recebemos a versão revisada do trabalho “**Prevalência dos fatores trombofílicos em mulheres com infertilidade**”, protocolado sob nº 2964.

Informamos que o mesmo foi aceito para publicação, devendo ser impresso no Fascículo 5 do Volume 29 da Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia.

Atenciosamente,

Jurandyr Moreira de Andrade

Editor Científico da RBGO

Prevalência dos fatores trombofílicos em mulheres com infertilidade

The prevalence of thrombophilic factors in infertile women

Autores:

- Adriana de Góes e Silva Soligo - Médica ginecologista- obstetra, mestranda do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
- Ricardo Barini - Professor Associado do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - Divisão de Obstetrícia.
- Egle Cristina Couto de Carvalho – Médica do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
- Joyce Annichino-Bizzacchi - Professora Associada da Disciplina de hematologia do Departamento de Clínica Médica Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
- Instituição onde foi realizada a coleta de dados: Clínica de Imunologia da Reprodução Dr. Ricardo Barini. Rua Antônio Lapa, 280 conjunto 305. Campinas-SP.

Correspondência:

Dr. Ricardo Barini

Rua Alexander Fleming, 101 Cidade Universitária Zeferino Vaz

CEP: 13083-902

Campinas – SP

Email: contato@adrianadego.es.com.br

Resumo

Objetivo: determinar a prevalência dos fatores trombofílicos em mulheres inférteis.

Métodos: estudo de corte transversal, no qual foram admitidas mulheres inférteis atendidas em clínica privada e submetidas à investigação de trombofilia, conforme protocolo da referida clínica, no período de março de 2003 a março de 2005, após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da UNICAMP. Foram incluídas mulheres com história de infertilidade, definida como um ano de coito desprotegido sem concepção. Foram excluídas mulheres com hepatopatia e dados incompletos em prontuário, obtendo-se uma amostra de 144 mulheres. Os fatores trombofílicos avaliados foram: o anticorpo anticardiolipina (ACL) e o anticoagulante lúpico (ACGL); a deficiência de proteína C (DPC), a deficiência de proteína S (DPS), a deficiência de antitrombina III (DAT), a presença do fator V de Leiden, uma mutação no gene da protrombina e a mutação da metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR). **Resultados:** os valores de prevalência obtidos para ACL e ACGL foram de 2%. A prevalência dos fatores trombofílicos hereditários foram: DPC 4%, DPS 6%, DAT 5%, fator V de Leiden 3%, mutação da protrombina 3%, mutação MTHFR 57%. **Conclusões:** das 144 pacientes selecionadas, 105 mulheres, ou seja, 72,9% apresentavam pelo menos um fator trombofílico presente. Isto reforça a importância e justifica a necessidade da investigação neste grupo.

Palavras-chave: infertilidade, síndrome antifosfolípide, trombofilia, prevalência, metileno tetrahydrofolato redutase.

Abstract

Purpose: to establish the prevalence of thrombophilic factors in infertile women.

Methods: a cross-sectional study was performed, in which infertile women were included, seen in a private clinic with investigation for thrombophilia, according to the protocol of the clinic, between March 2003 and March 2005, after the approval of the Research Ethics Committee of UNICAMP. One hundred and forty four infertile women without any liver disease were evaluated. Infertility is defined as one year of unprotected sexual intercourse without contraception. The acquired and/or inherited thrombophilic factors are: anticardiolipin antibody (aCL) and lupus anticoagulant (LA); protein C deficiency (PCD), protein S deficiency (PSD), antithrombin III deficiency (ATD), presence of the factor V Leiden, mutation G20 210A in the prothrombin gene, and C677T mutation of Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Results:** the prevalence values obtained for aCL and LA were 2%. The prevalence of hereditary thrombophilic factors were: PCD 4%, PSD 6%, ATD 5%, factor V Leiden 3%, prothrombin mutation 3%, MTHFR mutation 57%. Out of the selected 144 patients, 105 women (72, 9%) presented at least one thrombophilic factor. This reinforces the importance and justifies the need of investigation in this group.

Key-words: infertility, anticardiolipin antibody, thrombophilic factor, prevalence, Methylene tetrahydrofolate reductase.

Introdução

A infertilidade é definida como um ano de coito desprotegido com atividade sexual regular e sem concepção. Ela afeta de 10 a 15% dos casais, o que a torna um dos componentes importantes da prática médica. As possíveis causas de infertilidade são: fatores masculinos em 30-40% dos casos, 5 a 25% dos casos de causa feminina e 10 a 15% são de causa desconhecida ¹. Apesar dos avanços científicos na área de reprodução assistida, a gestação ocorre, em média, em 34% dos casais submetidos aos tratamentos hoje disponíveis ². A falha de implantação embrionária é considerada uma causa relevante de insucesso nos procedimentos de fertilização in vitro (FIV) ³.

As possíveis causas de falha de implantação embrionária têm sido amplamente investigadas, mas não há consenso na literatura. Acredita-se que a qualidade embrionária e a receptividade endometrial constituam fatores relevantes no insucesso da FIV. Sugere-se que as alterações sanguíneas que levam à hipercoagulabilidade, ou seja, as trombofilias possam comprometer o processo de implantação embrionária ⁴. Assim, o interesse em melhorar as taxas de implantação embrionária levou ao estudo da angiogênese no sítio de implantação e, conseqüentemente, das doenças relacionadas a alterações no sistema de coagulação sanguínea.

Os fatores biológicos de trombofilia são definidos pela presença de uma ou mais anomalias permanentes da hemostasia, hereditária ou adquirida, que originam um estado de hipercoagulabilidade. Dentre os fatores citados como possíveis responsáveis por essa tendência à trombose, destacam-se o anticorpo anticardiolipina, o anticoagulante lúpico, a deficiência de proteína C, a deficiência de proteína S, a deficiência de antitrombina III, a presença do fator V de Leiden, uma mutação alelo G20210A do gene da protrombina e uma mutação no gene da enzima metileno tetrahydrofolato redutase ⁵.

A relação entre os fatores trombofílicos e a infertilidade deve ser considerada pela possibilidade de perda precoce espontânea, abortamento pré-clínico, ocasionada pela alteração da hemostasia de caráter trombofílico no sítio de implantação, que afeta a invasão trofoblástica e a vasculatura placentária ⁶. O abortamento pré-clínico é definido como aquele que ocorre quando o teste quantitativo de β -HCG, de baixa sensibilidade, apresenta resultado negativo, mesmo em ocasiões onde foi iniciado o processo de implantação, mas o mesmo não foi concluído. Esta situação pode inclusive levar à classificação errônea de mulheres como portadoras de infertilidade sem causa aparente e não como casos de perdas gestacionais muito precoces ⁶.

Recentemente, as trombofilias têm sido identificadas com maior frequência em mulheres com falha de implantação submetidas a repetidos ciclos de FIV, quando comparadas com mulheres férteis ⁷.

A trombofilia também tem sido associada com a Síndrome de hiperestímulo ovariano (SHO), que ocorre quando há uma resposta ovariana exacerbada após uso de indutores de ovulação. A forma severa da SHO ocorre em 0,8 a 2,0% dos casos, com depleção do fluido intravascular e aumento da viscosidade sanguínea. Têm sido observadas severas formas de trombose em pacientes que desenvolvem SHO. Alguns casos de mulheres com trombofilia e eventos trombóticos com SHO já foram descritos, sugerindo uma maior prevalência de trombofilia em mulheres com SHO ⁸.

A prevalência dos fatores trombofílicos em mulheres com infertilidade, não somente no subgrupo com falha de implantação, ainda não está bem estabelecida na literatura até o momento. Todavia, a possível relação entre a presença destes fatores e a obstrução vascular no sítio de implantação deve ser considerada nos casos de infertilidade. Além disso, a presença de trombofilia em mulheres que desejam engravidar e atingem

este objetivo, pode aumentar o risco de complicações durante a gravidez tais como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intra-uterino, descolamento de placenta, parto prematuro, abortamento recorrente, sofrimento fetal crônico, além de eventos isquêmicos durante a gravidez^{9,10,11}. Logo, a investigação da prevalência de fatores trombofílicos em mulheres com infertilidade poderá ajudar a esclarecer sua importância tanto nestes quadros, quanto na prevenção de complicações obstétricas. Este estudo avalia a prevalência dos fatores trombofílicos em mulheres com infertilidade.

Pacientes e método

Foi realizado um estudo de corte transversal retrospectivo, através de levantamento de 144 prontuários selecionados em clínica privada de infertilidade, no período de março de 2003 a março de 2005, na cidade de Campinas-SP.

O critério de inclusão adotado foi história de infertilidade, definida como um ano de coito desprotegido com atividade sexual regular sem concepção. Foram excluídas as mulheres com hepatopatia e com dados incompletos em prontuário.

Após avaliação de 156 prontuários de pacientes com infertilidade foram selecionados 144 prontuários. Foram excluídos 12 prontuários por não apresentarem os resultados de todos os fatores trombofílicos em investigação neste estudo.

Conforme protocolo da clínica onde foi realizado este estudo, todas as pacientes com quadro de infertilidade foram submetidas à pesquisa de fatores trombofílicos descritos a seguir.

Os fatores adquiridos avaliados foram os anticorpos anticardiolipina e o anticoagulante lúpico, sendo consideradas as categorias de positivo e negativo como resultado. O anticorpo anticardiolipina é uma imunoglobulina que reage contra a

cardiolipina, um fosfolípide carregado negativamente. Sua presença é definida como identificação do anticorpo da classe IgG ou IgM específico no sangue periférico, pelo método ELISA, utilizando controles fortemente positivos, com concentrações de IgG e IgM conhecidas (soro de calibração LAPL-MP-005 e LAPL-GP-005 de Louisville, Kentucky), e doadores normais como controles negativos. Os valores de corte de densidade óptica (OD) para o ACL IgG e IgM foram determinados a partir de 40 doadores normais. Os valores de densidade óptica foram obtidos para cada doador, sendo a média e o desvio-padrão (SD) foram calculados para o grupo. Os valores de OD das pacientes foram comparados com o valor de corte. Valores entre 2 e 3 SD foram considerados intermediários, positivos acima de 3 SD e altamente positivos acima de 7 SD. Os resultados foram considerados negativos quando o valor da OD for inferior a 2 SD.

O anticoagulante lúpico é uma imunoglobulina que interfere com um ou mais testes de coagulação, dependentes de fosfolípidos. Para a pesquisa, foi utilizada a técnica de dilute Russel Viper Venom Time (dRVVT) . O anticoagulante lúpico é inicialmente identificado por um prolongamento inexplicável do TTPA, mesmo após adição de plasma normal. Em seguida é realizado o teste confirmatório (dRVVT) . Resultados e interpretação: o plasma normal tem um dRVVT entre 23 e 30 segundos. Estes pacientes são negativos para anticoagulante lúpico. Valores acima de 30 segundos são considerados anormais. Pacientes são considerados positivos quando têm RVVT maior que 30 segundos.

Os fatores trombofílicos hereditários avaliados foram as deficiências das proteínas C e S e de antitrombina III, presença do fator V de Leiden e mutação do gene da protrombina e da MTHFR.

Para avaliação de deficiência das proteínas C, S e da antitrombina III como fatores hereditários, nas pacientes que apresentaram, inicialmente, o resultado como deficiente, foi

repetido o exame após a reposição de vitamina K, a fim de excluir a deficiência vitamínica como causa dessa anormalidade. A reposição de vitamina K foi realizada através da administração de 10mg de fitomenadiona via oral, uma vez ao dia por cinco dias consecutivos. Foi realizada nova dosagem das proteínas C, S e da antitrombina III após três dias do término desta medicação. As proteínas S e C são glicoproteínas consideradas como anticoagulantes naturais do plasma, dependentes de vitamina K e sintetizadas no fígado. A proteína S também é sintetizada nas células endoteliais, megacariócitos e células de Leydig. Os valores considerados como normais para avaliação da proteína C no plasma foram entre 78 e 134% e deficientes menores que 78%. A atividade de Proteína C é determinada por método coagulométrico, utilizando-se kit da Biopool. A atividade anticoagulante da proteína C plasmática é determinada pelo método de coagulação, utilizando-se o Kit da Dade® (Baxter Diagnostics Inc.). A atividade da proteína C “standard” vem definida pelo fabricante.

Para avaliação da proteína S, foram considerados normais os valores de proteína S total entre 65 e 125% e livre entre 58 a 118%, sendo considerados como deficientes resultados de proteína S total menor que 65% e livre menor que 58%. A atividade de proteína S é determinada por método coagulométrico, utilizando-se o Kit da Biopool.

A antitrombina III é uma glicoproteína plasmática de cadeia única, com função anticoagulante e pertence à família das serpinas. São considerados como valores de normalidade os resultados entre 80 e 120%, sendo deficientes os valores inferiores a 80% ¹¹. A atividade de antitrombina foi determinada por método cromogênico, utilizando-se o Kit Biopool.

Foram também pesquisadas três mutações genéticas: o fator V de Leiden, mutação da protrombina e da MTHFR, cujos resultados obtidos revelam a presença ou a

ausência de cada uma destas mutações. O fator V de Leiden é uma mutação no gene do fator V, base molecular para o fenótipo da resistência à proteína C ativada. Já a mutação do gene da protrombina (G20210A) leva ao aumento dos níveis plasmáticos da protrombina. Enfim, foi também avaliada a mutação Ala677→Val no gene da metileno tetrahydrofolato redutase que é uma mutação no gene que codifica uma enzima cuja deficiência leva ao aumento da homocisteína com consequente hiperhomocisteinemia ¹¹. Para detecção destas mutações foram utilizadas técnicas de biologia molecular, sendo necessária a extração do Dna de sangue periférico, a partir das células nucleadas (leucócitos).

Na 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 envolve a amplificação desta região, seguida pela digestão com a enzima Mnl I. Quando o alelo mutante está presente (1691A), não ocorre mais a clivagem na posição 1694 e são observados fragmentos de 153 e 67 pares de base, o que indica a presença dos alelos mutantes.

A detecção da transição 202021 G→A no gene da protrombina foi realizada após a extração do DNA genômico. O fragmento não transcrito da região 3”do gene da protrombina é amplificado pela RCP e consequente obtenção de um fragmento de 345 pares de base. 10 a 15µl do material amplificado é digerido com 2,5 U da enzima Hid III, fornecendo um fragmento de 322 pares de base, na presença do alelo mutante (20210A). Quando o alelo normal (20210G) está presente, o sítio de restrição é ausente e o fragmento de 345 pares de base permanece intacto.

A detecção da mutação 677C→T no gene da enzima metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR) foi realizada após a extração do DNA genômico. Amplifica-se a região do gene da MTHFR onde pode ocorrer a mutação através da RCP. Um fragmento de

198 pares de base é obtido e 10-15µl deste material amplificado é digerido com 0,5U da enzima Hinf I. Após a digestão o alelo mutante (alelo 677T) fornece 2 fragmentos de 175 e 23 pares de base. Quando o alelo normal (677C) está presente, não há o sítio de restrição para a enzima e somente o fragmento de 198 pares de base é observado.

As mulheres consideradas inférteis e incluídas neste estudo foram aquelas com um ano de coito desprotegido, com atividade sexual regular, sem concepção, sendo considerada primária quando não apresentava gestação anterior e, quando presente, denominada secundária.

Outra variável avaliada foi a idade das mulheres, sendo esta definida em número de anos completos de vida desde o nascimento.

Também avaliamos a raça, sendo esta definida como cor da pele da mulher, autotclassificada pelo sujeito, segundo as categorias utilizadas no censo demográfico de 2000, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE): branca, preta, parda, amarela, indígena ou outra.

Não há conflito de interesse neste estudo.

Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNICAMP.

Resultados

Após análise de 156 prontuários de mulheres com infertilidade atendidas em clínica privada no período de março de 2003 a março de 2005, selecionamos 144 prontuários que preencheram os critérios de inclusão (presença de infertilidade) e excluídas aquelas com hepatopatia e com dados incompletos em prontuário, que corresponderam a 12 prontuários.

Observamos que a média de idade da população estudada foi de 36 anos (dp +/- 4,38) e todas as mulheres eram da raça branca. Avaliamos também o tempo de infertilidade em anos e encontramos como tempo médio o valor de 5 anos (dp +/- 3,22). Em relação ao tipo de infertilidade, primária ou secundária, observamos que a maioria das mulheres avaliadas apresentava infertilidade primária, ou seja, não tinham engravidado anteriormente. Estas corresponderam a oitenta e três mulheres que representaram 58% da amostra.

Para avaliação da prevalência dos fatores trombofílicos, foi realizado o cálculo individual da percentagem dos mesmos e aplicada a fórmula de cálculo de intervalo de confiança para estudo de prevalência.

Em relação à análise dos fatores trombofílicos, observamos que 104 mulheres, ou seja, 72,2% da amostra apresentava pelo menos um fator trombofílico presente. O fator trombofílico mais prevalente foi a mutação do gene da MTHFR que estava presente em 82 mulheres, ou seja, 57% da amostra. Os demais fatores avaliados como o anticorpo anticardiolipina, anticoagulante lúpico, deficiência de proteína C e S, deficiência de antitrombina III, Fator V de Leiden e mutação da protrombina foram encontrados em percentagem que variou de 2 a 6%, conforme detalhado na tabela 1.

Discussão

Neste estudo, observamos que 72,2% das mulheres com infertilidade avaliadas apresentavam pelo menos um fator trombofílico presente. Este dado foi também avaliado por Qublan ², que evidenciou a presença de pelo menos um fator trombofílico em 68,9% de mulheres com falha de implantação. Este autor realizou um estudo de caso controle com 90 mulheres com falha de implantação, outro grupo com noventa mulheres

submetidas à FIV e que engravidaram na primeira tentativa e um grupo controle de 100 mulheres férteis. Nestes dois últimos grupos, a percentagem de positividade para pelo menos um fator trombofílico foi de 25,6% e de 25%; ou seja, no grupo sem falha de implantação o fator trombofílico não foi muito evidente. Este contraste com o nosso estudo pode ser devido à presença de mulheres com falha de implantação no grupo por nós classificado apenas como inférteis e não termos feito esta subdivisão previamente. Estes dados são concordantes com estudo de Coulan ¹² que evidenciou 74% de mulheres com pelo menos três mutações de genes trombofílicos num grupo de 42 mulheres com falha de implantação. Os valores obtidos tanto no nosso trabalho com mulheres inférteis, quanto no de Qublan ² no grupo de falha de implantação são superiores aos de outros estudos como de Azem ⁷ que revelou 44,4% positividade de pelo menos um fator trombofílico no grupo de 45 mulheres com falha de implantação. Estas discordâncias podem estar relacionadas com os diferentes tamanhos de amostra, diferenças étnicas entre os grupos avaliados em diferentes países, uma vez que as trombofilias são mais prevalentes em indivíduos de raça branca e também pelos diferentes critérios de seleção adotados. Contudo, estes estudos, inclusive o nosso em questão, sugerem uma maior frequência de trombofilia em mulheres com falha de implantação em relação às mulheres férteis, fato este também ratificado por Grandone ⁴.

Dentre os fatores trombofílicos por nós avaliados, encontramos uma maior prevalência da mutação da MTHFR nas mulheres inférteis avaliadas, ou seja de 57%. Este valor é bem superior aos obtidos por outros autores, sendo de 17,8% no estudo de Azem ⁷ que avaliou mulheres com falha de implantação e de 19% no de Martinelli ¹³ que avaliou mulheres inférteis, mas nestes estudos foi avaliado apenas a homozigose e no nosso considerado tanto hetero, como homozigose. Contudo, em outro estudo ² que também

avaliou esta mutação sem diferenciar entre hetero e homozigose, encontrou valores inferiores desta mutação no grupo com falha de implantação, sendo de 22,2% no estudo de Qublan ². É válido ressaltar que na avaliação de Martinelli ¹³ a frequência de homozigose de MTHFR foi similar entre o grupo de mulheres inférteis e grupo controle de mulheres férteis com gestação espontânea. A frequência desta mutação em mulheres férteis em um estudo brasileiro na população de Campinas realizado por Couto ¹¹ foi observado valor de 39,7. Esta divergência de dados no que se refere à mutação MTHFR pode estar relacionada com a não segregação de grupo com falha de implantação no nosso estudo, diferentes tamanhos amostrais e características étnicas entre as populações avaliadas.

O Fator V Leiden na população caucasiana normal varia de 3-7% ^{14,15}. O fator V de Leiden pode elevar até oito vezes o risco de trombose para indivíduos heterozigotos ². Foi identificada em 3% das mulheres em nosso estudo, da mesma forma que fizeram Azem e Martinelli ^{7,13}. Estes autores avaliaram mulheres inférteis e não encontraram diferenças significativas em relação à população fértil. Por outro lado, Grandone ⁴ e Qublan ² encontraram esta mutação em 11,1% e 14,4% na população com falha de implantação e esta relação entre falha de implantação e presença do Fator V Leiden foi confirmada por Barre ¹⁶. Este autor descreveu um risco aumentado de perdas gestacionais precoces e de problemas de infertilidade em portadoras desta mutação. Por outro lado, Gopel ¹⁷ investigou 102 mulheres submetidas a FIV com sucesso e relatou melhor taxa de implantação nas portadoras do FVL.

Em relação à mutação do gene da protrombina, a prevalência de 3% encontrada em nosso estudo está condizente com os achados em mulheres com falha de implantação investigadas por Qublan ², Azem ⁷ e de mulheres inférteis avaliadas por Martinelli ¹³.

Por outro lado, difere dos dados obtidos por Grandone ⁴ que relata valores superiores, mas seu estudo inclui uma amostra de 18 mulheres.

As deficiências dos anticoagulantes naturais como proteínas C e S e antitrombina III são mais raras e a casuística da maioria dos estudos é insuficiente para demonstrar a associação destas deficiências com a infertilidade. Nós encontramos as frequências de proteína C, S e ATIII de 6, 8, 7% respectivamente. Estes dados são similares aos encontrados nos estudos que avaliaram a falha de implantação ^{2,4,7}. Todavia, nos estudos de caso controle, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos investigados de mulheres com falha de implantação, que engravidaram na primeira tentativa de FIV e de mulheres férteis.

Os anticorpos antifosfolípidos, anticardiolipina e anticoagulante lúpico, são considerados na literatura como fatores etiológicos da falha de implantação e de perda gestacional precoce ². Estes anticorpos são responsáveis pela redução de anexina V, um potente anticoagulante, levando à trombose e possivelmente à falha de implantação e perda gestacional precoce. Em nosso estudo, a prevalência destes anticorpos foi de 3%, o que não diferenciou de forma significativa das incidências relatadas na população fértil. Mas em outros relatos onde foi avaliada a falha de implantação foram encontrados valores de até 18,9% ², sugerindo a associação destes anticorpos com a infertilidade.

A frequência dos fatores trombofílicos na população em geral é rara, excetuando a mutação do MTHFR. A frequência dos mesmos parece ser maior na população de mulheres inférteis, sugerindo a associação destes fatores com a dificuldade para engravidar. A associação entre fetos com Síndrome de Down e a mutação do gene da MTHFR foi sugerida em estudo de Acassio ¹⁸. Logo, a maior prevalência da mutação MTHFR em mulheres inférteis identificada na pesquisa de infertilidade pode, eventualmente,

segregar pacientes com uma associação de fatores adversos: a idade elevada e a presença de uma alteração genética que pode determinar alterações cromossômicas na prole. A consequência pode ser a infertilidade por abortamento pré-clínico.

No momento, há uma tendência de associação entre os fatores trombofílicos e a falha de implantação e dificuldade para engravidar. Apesar de não ser possível concluir que a presença dos fatores trombofílicos se comporta como causa de esterilidade, neste estudo de prevalência podemos sugerir esta associação embasados nos nossos resultados e também nos dados observados na literatura. Além disso, dado ao risco potencial da associação dos fatores trombofílicos com complicações obstétricas, tais como RCIU, TPP e DPP^{7,11} e SHO^{8, 19}, reafirmamos a necessidade de que esses fatores sejam sistematicamente investigados em mulheres com infertilidade.

Referências bibliográficas

1. Grandone E. Infertility and thrombophilia. *Thromb Res.* 2005; 115(1):24-7.
2. Qublan HS, Eid SS, ababneh HÁ, Amarin ZO, Smadi AZ, Al- Khafaji FF, Khader YS. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Hum Reprod.* 2006; 21(10): 2694-8.
3. Glueck CJ, Awadalla SG, Philips H, Cameron D, Wang P, Fontaine RN. Polycystic ovary síndrome, infertility, familial thrombophilia, recurrent loss of in vitro fertilized embryos, and miscarriage. *Fertility and Sterility* 2000; 74(2): 394-7.
4. Grandone E, Colaizzo D, Lo Bue A, Checola MG, Cittadini E, Margaglione M. Inherited thrombophilia and in vitro fertilization implantation failure. *Fertility and Sterility* 2001; 76 (1): 201-02.
5. Imbert B. Quelles sont les patients à risqué de pathologies vasculaires gravidiques en fonctions de leur statut biologique? *Ann. Med. Interne (Paris)* 2003;154 (5-6): 414-421.
6. Sarto A, Rocha M, Geller M, Capmany C, Martinez M, Quintans, Donaldson M, Pasqualini RS. Tratamiento con enoxaparina adaptado a los programas de fertilidad en mujeres con aborto recorrente y trombofilia. *Medicina (Buenos Aires)* 2001; 61: 406-12.
7. Azem F, Many A, Yovel I, Amit A, Lessing JB, Kupferminc MJ . Increased rates of thrombophilia in women with repeated FIV failures. *Human Reproduction* 2004; 19 (2): 368-70.

8. Dulitzky M, Cohen SB, Inbal A, Seidman DS, Soriano D, Lidor A, Mashiach S, Rabinovici J. Increased prevalence of thrombophilia among women with severe ovarian hiperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility* 2002; 77(3): 463-7.
9. Koleva R, Dimitrova V, Chernev T, Savov A, Karagozova ZH, Mazneukova V, Kremenski I. Impact of inherited thrombophilia on the development of some pregnancy complications. *Akush ginekol (Sofiia)* 2005; 44(5): 18-26.
10. Kupfermanc Mj, Yair D, Bornstein NM, Lessing JB, Eldor A. Transient focal neurological deficits during pregnancy in carriers of inherited thrombophilia. *Stroke* 2000; 31(4):892-5.
11. Couto E, Nomura ML, Barini R, Silva JL. Pregnancy- associated venous thromboembolism in combined heterozygous factor V Leiden and prothrombin G2022110A mutations. *São Paulo Med J.* 2005; 123(6): 286-88.
12. Coulan CB, jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. multiple thrombotic gene mutations are risk factors for implantation failure. *Reprod Biomed online* 2006; 12(3):322-7.
13. Martinelli I, Taioli E, Ragni G, Levi-Setti P, Passamonti SM, Battagliolo T, Lodigiani C, Mannucci PM. Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia. *Haematologica* 2003; 88(7):789-93.
14. Ehrenforth S, Nemes L, Mannhalter C, Rosendaal FR, koder S, Zoghiami- Rintelen C, Scharrer I, Pabingers I. Impacto of enviromental and hereditary risk factors on the clinical manifestation of thrombophilia in homozygous carriers of factor V: G1691A. *J Thromb Haemost.* 2004; 2(3): 430-6.

15. Bauder F, zivelin A, Ducout L, Shpringer E, Seligsohn U. The prevalence of factor v g1691A but noto f prothombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T is remarkably low in french basques. *J Thromb Haemost.* 2004; 2(2): 361-2.
16. Baré SN, Póka R, Balogh I, Ajzner E. Fator V Leiden as a risk factor for miscarriage and reduced fertility. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2000; 40 (2): 186-190.
17. Gopel W, ludwig M, Junge AK, kohlmann T, Diedrich K, Moller J. Selection pressure for the factor V Leiden mutation and embryo implantation. *Lancet* 2001; 358 (9289): 1238-9.
18. Acassio GL, Barini R, Bertuzzo CS, Couto EC, Annichino- Bizzacchi JM, Junior WP. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21. *Prenatal Diagnosis* 2005; 25: 1196-99.
19. Machac S, Prochazka M, Lubusky M. Prevalence of thombophilia in patients with severe ovarian hiperstimulation syndrome. *Ceska Gynecol* 2005; 70 (4): 254-7.

Tabela1 – Prevalência dos fatores trombofílicos analisados em mulheres com infertilidade.

Fatores trombofílicos	Número absoluto	Prevalência (%)	IC 95 (%)
Anticorpo Anticardiolipina	3	2	0- 4,4
Anticoagulante lúpico	3	2	0- 4,4
Deficiência proteína C	6	4	0,8- 7,4
Deficiência de proteína S	8	6	1,7- 9,3
Deficiência de antitrombina III	7	5	1,3%- 8,4
Fator V Leiden	4	3	0-5,5
Mutação Protrombina	4	3	0- 5,5
Mutação MTHFR	82	57	44,6-65
Total	117*	82*	

*Há mais de uma paciente que apresenta mais de um fator positivo para trombofilia.

5. Conclusões

Foi identificada a prevalência de trombofilias em uma população de mulheres com infertilidade.

- A prevalência do anticorpo anticardiolipina foi de 2%.
- A prevalência do anticoagulante lúpico foi de 2%.
- A prevalência da deficiência de proteína C foi de 4%.
- A prevalência da deficiência de proteína S foi de 6%.
- A prevalência da deficiência de antitrombina foi de 5%.
- A prevalência do Fator V de Leiden foi de 3%.
- A prevalência da mutação da protrombina foi de 3%.
- A prevalência da mutação MTHFR foi de 57%.

6. Referências Bibliográficas

Acassio GL, Barini R, Bertuzzo CS, Couto EC, Annichino- Bizzacchi JM, Junior WP. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21. *Prenatal Diagnosis* 2005; 25: 1196-99.

Anteby EY, Musalam B, Milwidsky A, Blumenfeld SG, Valsky et al. Fetal inherited thrombophilias influence the severity of preeclampsia, IUGR and placental abruption. *Europeana Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2004; 113: 31-5.

Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Reitsma PH. Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a brazilian population. *Am J Hematol* 1995; 49: 242-3.

Arruda VR, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. Very low incidence of Arg 506→ Gln Mutation in the Factor v Gene among the Amazonian Indians and the Brazilian Black Population. *Thromb Haemost* 1996; 75 (5): 860-1.

Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R et al. Prevalence of the mutation C677→ T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Méd Genet* 1998; 78: 332-5.

Azem F, Many A, Yovel I, Amit A, Lessing JB, Kupfermanc MJ . Increased rates of thrombophilia in women with repeated FIV failures. *Human Reproduction* 2004; 19 (2): 368-70.

Baré SN, Póka R, Balogh I, Ajzner E. Fator V Leiden as a risk factor for miscarriage and reduced fertility. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* .2000; 40 (2): 186-190.

Bauder F, zivelin A, Ducout L, Shpringer E, Seligsohn U. The prevalence of factor v g1691A but noto f prothombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T is remarkably low in french basques. *J Thromb Haemost*. 2004; 2(2): 361-2.

Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369 (6475): 64-7.

Bithell TC. Coagulação sanguínea. In: Wintrobe. *Hematologia Clínica*. São Paulo: Manole; 1998. p.615-54.

Bockenstedt PL. Management of hereditary hypercoagulable disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 444-9.

Branch W. Summary of the 11th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Syney Austrália November 2004. *Journal of Reproductive Immunology* 2005; 66: 85-90.

Brenner B, Kupfermanc MJ. Inherited thrombophilia and poor pregnancy outcome. *Best Practice & Reseach clinical Obstetrics & Gynaecology* 2003; 17(3):427-39.

Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6 (1): 7-13.

Buchanan GS, Rodgers GM, Branch DW. The Inherited thrombophilias: genetics, epidemiology, and laboratory evaluation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2003; 17(3): 397-411.

Buchholz T, Thaler CJ. Inherited Thrombophilia: Impact on Human Reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50 (1): 20-32.

Bugge TH, Xiao Q, Kombrinch KW, Flick MJ, Holmback K, Danton MJ et al. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93 (13): 6258-63.

Coulan CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2006; 12(3):322-7.

Couto E, Nomura ML, Barini R, Silva JL. Pregnancy-associated venous thromboembolism in combined heterozygous factor V Leiden and prothrombin G2022110A mutations. *São Paulo Med J.* 2005; 123(6): 286-88.

D'Amico EA. Trombofilia. In: Lorenzi TF. *Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica.* Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 2006.p. 657-71.

Doggen CJ, Bertina RM, Cats VM, Reitsma PH, Rosendaal FR. The 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is not associated with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1999; 82(1):115-20.

Dulitzky M, Cohen SB, Inbal A, Seidman DS, Soriano D, Lidor A, Mashiach S, Rabinovici J. Increased prevalence of thrombophilia among women with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility* 2002; 77(3): 463-7.

Ehrenforth S, Nemes L, Mannhalter C, Rosendaal FR, Koster S, Zoghalmi-Rintelen C, Scharrer I, Pabingers I. Impact of environmental and hereditary risk factors on the clinical manifestation of thrombophilia in homozygous carriers of factor V: G1691A. *J Thromb Haemost.* 2004; 2(3): 430-6.

Feinstein DI, Rapaport SI. Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog Hemost Thromb* 1972; 1:75-95.

Glueck CJ, Awadalla SG, Philips H, Cameron D, Wang P, Fontaine RN. Polycystic ovary syndrome, infertility, familial thrombophilia, recurrent loss of in vitro fertilized embryos, and miscarriage. *Fertility and Sterility* 2000; 74(2): 394-7.

Gopel W, Ludwig M, Junge AK, Kohlmann T, Diedrich K, Moller J. Selection pressure for the factor V Leiden mutation and embryo implantation. *Lancet* 2001; 358 (9289): 1238-9.

Grandone E, Colaizzo D, Lo Bue A, Checola MG, Cittadini E, Margaglione M. Inherited thrombophilia and in vitro fertilization implantation failure. *Fertility and Sterility* 2001; 76 (1): 201-02.

Grandone E, Margaglione M. Inherited thrombophilia and gestational vascular complications. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2003; 10(2): 321-32.

Grandone E. Infertility and thrombophilia. *Thromb Res.* 2005; 115(1):24-7.

Haggarty P, Mc Callum H, McBain H, Andrews K, Duthie S, Mc Neil G et al. Effect of B vitamins and genetics on success of in vitro fertilisation: prospective cohort study. *Lancet* 2006; 367: 1513-19.

Imbert B. Quelles sont les patientes à risque de pathologies vasculaires gravidiques en fonction de leur statut biologique? *Ann. Med. Interne (Paris)* 2003;154 (5-6): 414-421.

Kupfermanc Mj, Yair D, Bornstein NM, Lessing JB, Eldor A. Transient focal neurological deficits during pregnancy in carriers of inherited thrombophilia. *Stroke* 2000; 31(4):892-5.

List K, Jensen ON, Bugge TH, Lund LR, Ploug M, Dano K et al. plasminogen-independent initiation of the pro-urokinase activation cascade in vivo. Activation of pro-urokinase by glandular kallikrein (mGK-6) in plasminogen-deficient mice. *Biochemistry* 2000; 39(3): 508-15.

Martinelli I, Taioli E, Ragni G, Levi-Setti P, Passamonti SM, Battagliolo T, Lodigiani C, Mannucci PM. Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia. *Haematologica* 2003; 88(7):789-93.

Medronho RA, Carvalho DM., Block KV, Luiz RR, Werneck GL. *Epidemiologia*. São Paulo: Atheneu, 2002. Capítulo 21.

Mitropoulos KA, Martin JC, Stirling Y, Morrissey JH, Cooper JA. Activation of factors XII and VII induced in citrated plasma in the presence of contact surface. *Thromb Res.* 1995; 78 (1): 67-75.

Norris LA. Blood coagulation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2003; 17(3): 369-83.

O'Riordan MN, Higgins JR. Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2003; 17(3): 385-96.

Qublan HS, Eid SS, ababneh HÁ, Amarin ZO, Smadi AZ, Al- Khafaji FF, Khader YS. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Hum Reprod.* 2006; 21(10): 2694-8.

Ren A, Wang J. Methylenehydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertility and Sterility* 2006; 86(6): 1716-22

Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003; 361: 901-8.

Sarto A, Rocha M, Geller M, Capmany C, Martinez M, Quintans, Donaldson M, Pasqualini RS. Tratamiento con enoxaparina adaptado a los programas de fertilidad en mujeres con aborto recurrente y trombofilia. *Medicina (Buenos Aires)* 2001; 61: 406-12.

Stern C, Chamley L. Symposium: Embryo implantation failure and recurrent miscarriage. Antiphospholipid antibodies and coagulation defects in women with implantation failure after IVF and recurrent miscarriage. *Reproductive Biomedicine* 2006; 13(1): 29- Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology 2003; 17(3): 369-83.37.

Tranquilli AL, Emanuelli M. The thrombophilic fetus. *Medical hypotheses* 2006; 67: 1226-9.

Weintraub AY, Sheiner E, Levy A, Yerushalmi R, Mazor M. Pregnancy complications in women with inherited thrombophilia. *Arch Gynecol Obstet* 2006; 274: 125-9.

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Ficha para Coleta de Dados

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE FATORES TROMBOFÍLICOS EM MULHERES COM INFERTILIDADE

Número no estudo	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Data de atendimento	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Idade	<input type="text"/>	<input type="text"/>		
Raça	<input type="checkbox"/> branca		<input type="checkbox"/> não branca	
Tempo de infertilidade	<input type="text"/>	<input type="text"/>	anos.	
Infertilidade primária	<input type="checkbox"/> sim		<input type="checkbox"/> não	
Infertilidade secundária	<input type="checkbox"/> sim		<input type="checkbox"/> não	
FIV	<input type="checkbox"/> sim		<input type="checkbox"/> não	
Inseminação intrauterina (IIU)	<input type="checkbox"/> sim		<input type="checkbox"/> não	
Anticorpo anticardiolipina	<input type="checkbox"/> Positivo	<input type="checkbox"/> Intermediário	<input type="checkbox"/> Negativo	
Classe do anticorpo anticardiolipina	<input type="checkbox"/> IgG		<input type="checkbox"/> IgM	
Anticoagulante lúpico	<input type="checkbox"/> Positivo		<input type="checkbox"/> Negativo	
Deficiência da proteína C	<input type="checkbox"/> Normal		<input type="checkbox"/> Deficiente	
Deficiência da proteína S	<input type="checkbox"/> Normal		<input type="checkbox"/> Deficiente	
Deficiência da antitrombina	<input type="checkbox"/> Normal		<input type="checkbox"/> Deficiente	
Fator V de Leiden	<input type="checkbox"/> Presente		<input type="checkbox"/> Ausente	
Mutação 20210 ^A no gene da protrombina	<input type="checkbox"/> Presente		<input type="checkbox"/> Ausente	
Mutação Ala677→Val no gene da metileno tetrahydrofolato redutase:	<input type="checkbox"/> Presente		<input type="checkbox"/> Ausente	

7.2. Anexo 2 – Identificação

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE FATORES TROMBOFÍLICOS EM MULHERES COM INFERTILIDADE

Nome _____

N no estudo _____

7.3. Anexo 3 – Técnica Laboratorial

7.3.1. Anticorpo anticardiolipina

O ACL se foi detectado por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), conforme descrito (TRIPLETT, BARNA, UNGER, 1993). O sangue (5 ml) foi retirado das pacientes, sem anticoagulante, e centrifugado por 10 minutos a 1600 rpm. O soro foi estocado a menos 80⁰C e descongelado à temperatura ambiente imediatamente antes da realização do ensaio. O antígeno (cardiolipina de coração de boi) foi diluído em etanol (45 µg/ml). Trinta µg desta solução foram aplicados às quatro primeiras fileiras de poços da placa de ELISA (96 poços - 8 fileiras e 12 colunas). O antígeno não foi adicionado à primeira coluna, que permaneceu como “neutra”. Outra quatro fileiras foram cobertas com etanol sem o antígeno para estabelecer os valores de ligação não específica. Estes valores foram subtraídos das placas cobertas com cardiolipina para dar especificidade ao método. As placas permaneceram secando durante a noite. Cem µl de PBS (tampão fosfato salina) foram adicionados aos poços no dia seguinte, exceto na coluna “neutra”. Após um minuto, o PBS foi entornado e a placa exaustivamente batida em papel toalha até estar completamente seca. 200 µl de tampão fosfato salina com soro fetal bovino a 10% foram adicionados a todos os poços como bloqueador e incubados por uma hora e meia. O reagente bloqueador foi entornado das placas, e uma vez mais elas foram batidas em papel toalha até secar. Este último passo foi repetido mais uma vez com um minuto de incubação do PBS. 50µl de soro das pacientes foram

adicionados aos poços, exceto à coluna “neutra”, e secados à temperatura ambiente por duas horas. As placas foram lavadas três vezes com 200µl de PBS. Foram então secadas e 50µl do conjugado indireto foram adicionados aos poços, exceto à coluna “neutra”. As fileiras um a quatro receberam o conjugado IgM, e as fileiras cinco a oito receberam o conjugado IgG. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente as placas foram lavadas com 200µl de PBS e batidas para secar. 50µl de substrato dietanolamina foram adicionados a todos os poços e incubados a 37⁰C no escuro. A reação foi suspensa pela adição de 50µl de NaOH 3M. A densidade óptica foi medida a 405nm em um densitômetro Tibertek. Controles positivos foram usados como amostras altamente positivas - padrões do Dr. E N Harris, com concentrações conhecidas de IgM e IgG. Um doador normal foi usado como controle negativo. As amostras de soro dos pacientes foram feitas em duplicatas. A média de cada paciente foi considerada o resultado final. O coeficiente de variação inter-ensaio e o intra-ensaio foram medidos. Os resultados foram considerados negativo, intermediário, positivo e altamente positivo, de acordo com o valor de corte estabelecido. Os valores de corte de densidade óptica (OD) para o ACL IgG e IgM foram determinados a partir de 40 doadores normais. Os valores de densidade óptica foram obtidos para cada doador, e a média e o desvio-padrão (SD) foram calculados para o grupo. Os valores de OD das pacientes foram comparados com o valor de corte. Valores entre 2 e 3 SD foram considerados intermediários; positivos acima de 3 SD e altamente positivos acima de 7 SD. Os resultados foram considerados negativos quando o valor da OD for inferior a 2 SD.

7.3.2. Anticoagulante lúpico

A - Dilute Russel Viper Venom Time (dRVVT)

O anticoagulante lúpico é inicialmente identificado por um prolongamento inexplicável do TTPA. Este teste pode estar minimamente prolongado ou não estar prolongado em alguns pacientes suspeitos de ter o anticoagulante lúpico. O dRVVT é mais sensível do que o TTPA e pode detectar o anticoagulante lúpico nestes casos.

Reagentes:

a - Russell's Viper Venom (Burroughs Welcome, Raleigh, NC)

b - Thrombofax (Ortho Diagnostics, Raritan, NJ)

c - 0,02M CaCl₂ (Ortho Diagnostics)

d - Reagente de extrato de plaquetas (Biodata Corp.)

e - Tris tampão salina (PBS)

f - Salina isotônica 0,85%

g - Controle de coagulação nível I (Ortho Diagnostics)

Procedimento:

Pipetar e misturar: 0,1ml de plasma controle ou de paciente, 0,1ml dRVV (1:200), 0,1ml Thrombosil diluído. Incubar a 37°C por 30 segundos.

Adicionar 0,1ml de CaCl₂ pré-aquecido e iniciar imediatamente a contagem para a detecção do coágulo. Relatar o tempo em segundos. Fazer leitura em duplicata. Se os resultados forem normais, considerar anticoagulante lúpico negativo. Se anormais: diluir o plasma prolongado (4 partes do plasma de paciente e 1 parte de plasma normal). Registrar resultados. Pipetar e

misturar: 0,1ml do plasma prolongado de paciente, 0,1ml dRVV, 0,1ml de reagente de extrato de plaquetas. Repetir os passos b até e.

Resultados e interpretação: o plasma normal tem um dRVVT entre 23 e 30 segundos. Estes pacientes são negativos para anticoagulante lúpico. Valores acima de 30 segundos são considerados anormais. Pacientes são considerados positivos quando têm RVVT maior que 30 segundos e RVVT prolongado na mistura 4:1.

Controle de qualidade: um controle normal deve ser feito uma vez por dia. Se os controles não estiverem na faixa esperada, preparar novos controles e/ou reagentes, checar duas vezes a temperatura de incubação e tempos, e refazer o ensaio.

B - Tempo de coagulação com kaolin (KCT)

Pipetar e misturar: 0,1ml de plasma, 0,1ml de kaolin (aquecido a 37°C por dois minutos), 0,1ml de CaCl₂.

Diluição (%)	Plasma normal (ml)	Plasma de paciente (ml)
0	Pool	-
10	0,1	0,9
20	0,2	0,8
50	0,5	0,5
80	0,8	0,2
100	1,0	0,9

Plotar os dados no gráfico e analisar (positivo ou negativo).

C - Neutralização de plaquetas

O mecanismo preciso da neutralização de plaquetas é desconhecido. Especula-se, entretanto, que o fosfolípide da suspensão de plaquetas que é adicionada ao plasma de paciente é sensível ao anticoagulante lúpico. Se a adição de plaquetas ao plasma com TTPA prolongado corrige este TTPA, então o fosfolípide deve ter revelado o anticoagulante e isto é evidência do anticoagulante lúpico. Se a adição de plaquetas não corrige o TTPA, suspeita-se que o prolongamento seja resultado de outra coagulopatia.

Coleta-se o sangue em citrato de sódio 0,129M na proporção de nove partes de sangue para uma de anticoagulante. Centrifugar imediatamente a 2.000 RPM por 10 minutos a 4°C. Remover o plasma das células. É essencial que ele esteja livre de plaquetas e, se necessário, deve ser centrifugado mais uma vez.

Reagentes: água destilada, Thrombofax - fosfolípide reagente (Ortho Diagnostics), salina normal 0,84% (0,15M), CaCl₂ 0,02M (Ortho Diagnostics), reagente extrato plaquetário (Bio/Data Corp.), pool de plasma normal (10 doadores), controle de coagulação normal.

Procedimento: em um tubo, pipetar 0,1ml do plasma controle normal, 0,1ml de Thrombofax e 0,1ml de salina. Incubar esta mistura por 3 minutos a 37°C. Pipetar 0,1ml de CaCl₂ pré-aquecido e iniciar o timer. Registrar o tempo. Repetir os passos para amostra em duplicata. Em outro tubo, pipetar: 0,1ml do plasma controle normal, 0,1ml de Thrombofax e 0,1ml do reagente extrato de plaquetas reconstituído. Incubar por 3 minutos a 37°C. Pipetar

0,1ml de CaCl_2 pré-aquecido e iniciar o timer. Registrar o tempo. Repetir os passos para amostra em duplicata. Repetir os passos para cada plasma a ser testado, substituindo o plasma teste pelo plasma controle normal.

Cálculos:

$a = \text{TTPA base} - \text{TTPA "plaquetas/plasma"}$

$b = \text{TTPA base} - \text{TTPA "salina/plasma"}$

$c = a - b = \text{tempo de neutralização de plaquetas}$

Resultados e interpretação: um teste é positivo para o anticoagulante lúpus-like quando o resultado de "c" é maior que 4 segundos. Um teste é suspeito quando "c" = 4 segundos, e negativo se menor que 4 segundos.

7.3.3. Deficiência da proteína S

A atividade de proteína S é determinada por método coagulométrico, utilizando-se o Kit da Biopool.

Os resultados são expressos em porcentagem.

Os níveis de proteína S total são determinados por radioimunoensaio (RIE).

O ensaio inclui a incubação prolongada do plasma diluído para promover a dissociação do complexo proteína S - proteína de ligação C4b. Os reagentes utilizados no ensaio são: proteína S monoclonal anti-humana (Hproteína S-2) ligada a Immunobeads (Bio-Rad) e ^{125}I policlonal anti-proteína S purificada (Pierce Chemical, Rockford, Ill.).

O RIE é realizado em dois passos. O pool de plasma padrão é diluído de 1:100 a 1:800 em um Tris tampão de 20mmol/L, pH7,4, contendo 0,15 mol/L de NaCl e 10 mg/mL de albumina sérica bovina. As amostras de pacientes

são diluídas a 1:200 e incubadas a 25°C por 18 horas para promover a dissociação entre a proteína S e a proteína de ligação C4b. São pipetados 50µL da suspensão Hproteína S₂-Immunobead em tubos de 1,5 mL. 50µL de plasma diluído são adicionados e os tubos são agitados e incubados a 25°C por duas horas. 50µL de I¹²⁵ policlonal anti-proteína S purificada são adicionados, as amostras são misturadas e incubadas por quatro horas a 25°C. Adicionar 1,3mL de Tris tampão a cada tubo e misturar por dez segundos. Os Immunobeads são removidos por centrifugação por dois minutos. O anticorpo não ligado é removido por aspiração e os passos de lavar são repetidos duas vezes. No final, o I¹²⁵ policlonal anti-proteína S purificada é quantificado em um contador (Nuclear Enterprises, Edinburgh, Scotland). O conteúdo de proteína S das amostras dos pacientes é calculado pela curva padrão. Todas as amostras são feitas em duplicata. O nível de proteína S dos pacientes é expresso em porcentagem do nível do pool de plasma normal.

7.3.4. Deficiência da proteína C

A atividade de Proteína C é determinada por método coagulométrico, utilizando-se kit da Biopool.

Os resultados são expressos em porcentagem.

Para determinação da atividade anticoagulante da proteína C, após a coleta do sangue, o plasma pobre em plaquetas é separado por centrifugação a 4000 rpm, por 10 minutos, à temperatura de 4°C. O plasma deve ser então aliquotado e conservado a -80°C.

A atividade anticoagulante da proteína C plasmática é determinada pelo método de coagulação, utilizando-se o kit da Dade® (BAXTER Diagnostics Inc.).

O kit é composto por:

plasma deficiente em proteína C. liofilizado, que após a ressuspensão em 2 ml de H₂O estéril, é utilizado nas diluições das amostras de plasma dos doadores;

proteína C “standard”, liofilizada, que após a ressuspensão em 1 ml de H₂O estéril, é utilizada na realização da curva padrão;

ativador da proteína C, que é reconstituído com 5 ml do Tampão da Proteína C (veneno de serpente: Agkistrodon Contortrix, Contortrix);

Actin, fosfolipídeo.

Realização da curva padrão

A curva padrão é preparada através de três pontos, determinados pelo tempo de coagulação em segundos, de diluições com atividade de proteína C conhecida, obtidas pela mistura da proteína C “standard” e do plasma deficiente em proteína C.

As diluições utilizadas são 1:4, 1:8 e zero (somente o plasma deficiente em proteína C e, portanto, com atividade de 0%).

A atividade da proteína C “standard” vem definida pelo fabricante.

Os resultados são plotados em papel milimetrado com % de atividade da proteína C na axial X e o tempo em segundos na axial Y.

A amostra de plasma de cada doador é descongelada em banho-maria a 37°C por alguns minutos, e posteriormente diluída na proporção de 1:8, com o plasma deficiente em proteína C.

Ensaio:

50 µl da amostra diluída

50 µl do ativador da proteína C

50 µl de Actin

Após incubação por 4 minutos em banho-maria a 37°C, adicionam-se 50 µl de cloreto de cálcio, acionando-se o cronômetro. Após homogeneização lenta dentro do banho-maria, observa-se a formação do coágulo. Neste exato momento o tempo em segundos é anotado. A concentração de proteína C é encontrada pela localização na axial X correspondente ao tempo obtido com aquela amostra, na axial Y.

7.3.5. Deficiência de antitrombina III

A atividade de antitrombina foi determinada por método cromogênico, utilizando-se o Kit

Plasma teste: o plasma pode ser colhido com citrato, oxalato ou ACD. Não usar heparina. Usar plasma pobre em plaquetas (bastante centrifugado) a 3500 rpm. Pode ser estocado a -20°C.

Plasma controle: plasma citratado de no mínimo 25 indivíduos normais.

Mistura-los bem. Guardar a -20°C em alíquotas de 1 ml.

Trombina: usar 30NIH U/ml e, se necessário para obter essa concentração, dissolver a trombina em NaCl 0,15M. Guardar a -20°C em tubos plásticos e usar até um máximo de seis meses. Após o descongelamento, a trombina é guardada no gelo e usada até um máximo de uma hora.

Substrato: plasma bovino diluído com pH entre 7,1 e 7,3. Um volume de plasma deverá ser misturado com dois volumes de tampão veronal com pH de 7,35 e dois volumes de tampão fosfato 0,03M e pH de 7,0. Estocar a -20°C.

Método para dosagem da antitrombina III:

A - Desfibrinação e diluição do plasma a ser testado

Dois tubos (vidro) com rolhas, cada um contendo 1ml de plasma teste são imersos num BM 56°C por exatamente cinco minutos, inclinndo-os ocasionalmente. Colocar os tubos em banho de gelo por cinco minutos. Centrifugar a 2000g por sete minutos. O plasma desfibrinado deverá ser pipetado numa diluição 1:10 com FB8. 0,4ml de cada diluição deverão ser pipetados em cada um de dois tubos plásticos (ou siliconizados) e guardados no gelo.

B - Determinação do tempo de coagulação do tampão

0,3ml do substrato devem ser pipetados em cada um dos quatro tubos pequenos de vidro. 0,4ml do FB8 são pipetados em cada um dos quatro tubos plásticos. A solução da trombina é descongelada e guardada no gelo. Um tubo plástico contendo FB8 é pré-aquecido a 37°C em BM por três

minutos. Um pequeno tubo de vidro (substrato) é colocado em BM. 0,1ml de trombina é pipetado num tubo plástico (com tampão FB8) e o tempo é cronometrado, sendo o conteúdo do frasco misturado por vibração. Após exatamente três minutos de incubação a 37°C, 0,1ml do conteúdo acima é transferido para o tubo de vidro (substrato pré-aquecido). O tempo de coagulação (TC) é então anotado e deverá estar entre 18 e 23". Se estiver abaixo de 18", a trombina deverá ser diluída com NaCl 0,15M.

C - Determinação do tempo de coagulação da antitrombina

Isto é realizado como o que foi descrito para o tampão (TC do tampão), mas com a diluição 1:10 do plasma desfibrinado em quadruplicata. Em virtude de detectar uma eventual deterioração da trombina durante o teste, o TC do tampão deverá ser repetido em cerca de trinta minutos.

D - Curva padrão

Cinco ml de plasma referência "standard" são desfibrinados como descrito acima. O plasma desfibrinado é diluído em FB8, a:

1:8	1:10	1:13	1:20	1:40
0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
2,8	3,6	4,8	7,6	15,6

0,4ml de cada diluição são pipetados em quatro tubos plásticos que são guardados em gelo. Os TC da antitrombina dessas diluições são determinados e uma curva padrão preparada com os resultados médios do plasma bovino diluído como substrato; uma relação linear entre a concentração do plasma e o log do TC da antitrombina deverá ser obtida.

O TC do tampão representa 0% de atividade. A atividade da curva de referência padrão é definida como 100%.

E - Cálculo da atividade da antitrombina

$K = \log \text{ clothing (normal) with 1:10 standard} - \log \text{ buffer clothing time}$

100

$\text{At activity \%} = \log \text{ At (paciente) clothing time} - \log \text{ buffer clothing time}$

K

7.3.6. Métodos de biologia molecular

As técnicas laboratoriais que serão descritas a seguir (fator V de Leiden, mutação 20210^A e mutação Ala677→Val) utilizam métodos de biologia molecular. Por isso, antes da descrição das técnicas faz-se necessário descrever a extração do DNA de sangue periférico:

O DNA é isolado de células nucleadas a partir de 10 ml de sangue venoso coletado. O plasma é descartado, após centrifugação do sangue a 3000 rpm a 4°C, por 10 minutos. Para a lise das hemácias adiciona-se NH₄Cl 0,144M na proporção de 0,5 vezes o volume de células. Após 15 minutos à temperatura ambiente, a solução é contrifugada a 2000 rpm, a 4°C, por 20 minutos. Esta etapa é repetida até a obtenção de um precipitado nuclear de leucócitos livre de hemácias.

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

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

Ao final, a camada superior contendo o DNA é transferida para um tubo estéril de 15 ml. Procede-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, centrifuga-se a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante é transferido e novamente adiciona-se 1 ml de clorofórmio/álcool-isoamílico (24:1). Mistura-se por inversão e centrifuga-se a 12000 rpm por 10 minutos.

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

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

7.3.7. 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 envolve a amplificação desta região, seguida pela digestão com a enzima MnlI.

Após a extração do DNA genômico o exon 10 é 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 nucleostídio 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 envolve 30 ciclos de incubação a 94⁰C (40"), 57⁰C (40") and 72⁰C (2'). Um fragmento de 220 pares é obtido e 5-10μl do material amplificado é digerido com 0.5U da enzima Mnl I. Esta região do exon 10 contém 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 são observados através de uma corrida em gel de agarose a 2%. Quando o alelo

mutante está presente (1691A), não ocorre mais a clivagem na posição 1694, e observam-se fragmentos de 153 e 67 pares de base.

7.3.8. Detecção da transição 202021 G→A no gene da protrombina

Após a extração do DNA genômico o fragmento não transcrito da região 3' do gene da protrombina é 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 envolve 35 ciclos de incubação a 94°C (1 minuto), 58°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto) e resulta na obtenção de um fragmento de 345 pares de base. 10 a 15 μl do material amplificado é digerido com 2.5 U da enzima Hind III, fornecendo um fragmento de 322 pares de base, na presença do alelo mutante (20210A). Quando o alelo normal (20210G) estava presente o sítio de restrição é ausente e o fragmento de 345 pares de base permanece intacto.

7.3.9. Detecção da mutação 677C→T no gene da metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR)

Após a extração do DNA genômico, amplifica-se a região do gene da MTHFR onde pode ocorrer a mutação através da RCP. O fragmento do gene da MTHFR é amplificado numa mistura de 54mM Tris-HCl, pH 8.8, 5.4 mM MgCl₂, 5.4 μM EDTA, 13.3 mM (NH₄)₂SO₄, 8% DMSO, 8 mM β-mercaptoetanol, 0.4 mg BSA/ml,

0.8 mM de cada nucleosídeo trifosfato, 400 ng de cada iniciador: sense (5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3') e antisense (5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'), 500 ng do DNA genômico e 2 U da enzima Taq polimerase. A reação envolve 30 ciclos de incubação a 94°C (1 minuto), 55°C (1 minuto) e 72 °C (2 minutos). Um fragmento de 198 pares de base é obtido e 10-15µl deste material amplificado é digerido com 0.5U da enzima Hinf I. Após a digestão o alelo mutante (alelo 677T) fornece 2 fragmentos de 175 e 23 pares de base, observados num gel de agarose. Quando o alelo normal (677C) está presente, não há o sítio de restrição para a enzima, e somente o fragmento de 198 pares de base é observado.