

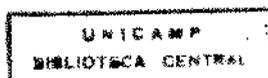
**EGLE CRISTINA COUTO DE CARVALHO**

**ESTUDO COMPARATIVO DA FREQUÊNCIA DO  
ANTICORPO ANTICARDIOLIPINA ENTRE  
MULHERES COM ABORTO RECORRENTE E  
MULHERES FÉRTEIS**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE  
DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE MESTRE EM TOCGINECOLOGIA

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO BARINI

UNICAMP  
1995



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	2532
V.	Es.
TOMBO BC	667196
PROC.	667196
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	08/02/96
N.º CPF	

CM-00083582-8

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

Carvalho, Egle Cristina Couto de  
C253e      Estudo comparativo da freqüência do anticorpo anticardiolipina  
entre mulheres com aborto recorrente e mulheres férteis / Egle  
Cristina Couto de Carvalho.      Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador: Ricardo Barini  
Tese (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Auto-anticorpos.    2. Cardiolipinas.    3. Aborto.    I.  
Barini, Ricardo.    II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.    III. Título

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

**Aluno:** Egle Cristina Couto de Carvalho

---

**Orientador:** Ricardo Barini

---

### Membros:

1.

2.

3.

4.

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

**Data:** 12/12/95

**DEDICO ESTE TRABALHO**

A meus pais, Neide e Paulo,  
pelo amor e pelo exemplo de dignidade

A meu marido Ataliba,  
pelo amor, compreensão e incentivo

A Evelyn, minha alma gêmea

Às mulheres que têm aborto recorrente  
e lutam para ser mães

## AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Ricardo Barini, pela orientação neste trabalho e por compartilhar sua mente brilhante

Prof. Dr. João Luiz de Carvalho Pinto e Silva

Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

Prof. Dr. José Guilherme Cecatti

Prof. Dr. Antonio Fernandes Moron

Dra. Magda Loureiro Motta Chinaglia

Dr. Renato Passini Júnior

Paulo Couto

Denise Rocha Lima

Lúcia Maria Fagian de Carvalho

Prof. Dr. Aníbal Faúndes

Prof. Dra. Ellen Elizabeth Hardy

Prof. Dr. José Carlos Gama da Silva

Prof. Dr. Hugo Sabatino

Dra. Eliana Martorano do Amaral Freitas da Silva

Dra. Mary Angela Parpinelli

Dra. Fernanda Garanhani de Castro Surita

Dr. Belmiro Gonçalves Pereira

Dra. Helaine Maria Bestetti Pires

Dra. Ângela Maria Bacha

Klésio Divino Palhares

Sueli Chaves

Fernanda Atibaia

Isabel Gardenal de Arruda Amaral

Neder Piagentini do Prado

Sara Xavier Lima Castro

Márcia Ramos

Conceição Aparecida Silva Santos

William Alexandre de Oliveira

Luzia Gonçalves de Aguiar

Fátima Juliana Calegari Marsula

Silmara Inês Ferraz dos Santos Silva

Zoraide Fátima Pereira Gregório

Sílvia Pereira Teixeira

PLACIRH - Programa Latinoamericano de Capacitación e Investigación en  
Reproducción Humana

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

# SUMÁRIO

## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

## RESUMO

<b>1. ANTECEDENTES NA LITERATURA.....</b>	<b>1</b>
1.1. Anticorpos antifosfolípides .....	2
1.2. O anticorpo anticardiolipina.....	7
1.3. O anticoagulante lúpico.....	10
1.4. A síndrome antifosfolípide.....	12
1.5. AAF e abortos recorrentes .....	16
1.6. AAF e terapêutica .....	19
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
2.1. Objetivo Geral .....	22
2.2. Objetivos Específicos .....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Seleção dos sujeitos .....	23
3.2. Técnica laboratorial.....	24
3.3. Variáveis em estudo.....	32
3.4. Definição de conceitos .....	32
3.5. Coleta de dados .....	33
3.6. Tamanho da amostra .....	33
3.7. Processamento e análise dos dados .....	34
3.8. Aspectos éticos .....	35
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>60</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>66</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>

## **ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>AAF</b>	Anticorpos Antifosfolípides
<b>ACGL</b>	Anticoagulante Lúpico
<b>ACL</b>	Anticorpo Anticardiolipina
<b>AE</b>	Número de Abortos Espontâneos
<b>AER</b>	Aborto Espontâneo Recorrente
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>AP</b>	Número de Abortos Provocados
<b>Beta 2-GPI</b>	Beta 2-Glicoproteína I
<b>C</b>	Carbono
<b>CAISM</b>	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
<b>Cs</b>	Número de Cesáreas
<b>DHA</b>	Ácido Docosaexaenóico
<b>DO</b>	Densidade Óptica
<b>DP</b>	Desvio-Padrão
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>EPA</b>	Ácido Eicosapentaenóico
<b>EPI-INFO</b>	Epidemiological Information
<b>et al.</b>	e outros (as)
<b>FA</b>	Ácido Graxo
<b>FCM</b>	Faculdade de Ciências Médicas
<b>FIV</b>	Fertilização <i>in vitro</i>
<b>FTA-Abs</b>	Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test
<b>FV</b>	Número de Filhos Vivos
<b>G</b>	Número de Gestações
<b>g</b>	grama (s)
<b>HC</b>	Número de Registro no Hospital de Clínicas da UNICAMP
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HLA</b>	Antígeno de Histocompatibilidade Humano
<b>HO</b>	Hidróxido de Carbono
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M

<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>kD</b>	Quilodáltons
<b>l</b>	litro (s)
<b>LES</b>	Lúpus Eritematoso Sistêmico
<b>mg</b>	miligrama (s)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>ml</b>	mililitro (s)
<b>mmHg</b>	Milímetro (s) de Mercúrio
<b>N.S.</b>	Não-Significativo
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NaN<sub>3</sub></b>	Azida Sódica
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b>NM</b>	Número de Natimortos
<b>O</b>	Oxigênio
<b>P</b>	Número de Partos
<b>p</b>	Valor de Significância Estatística
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PLACIRH</b>	Programa Latinoamericano de Capacitación e Investigación en Reproducción Humana
<b>RCIU</b>	Retardo de Crescimento Intra-Uterino
<b>RIE</b>	Radioimunensaio
<b>RPM</b>	Rotações por Minuto
<b>SAF</b>	Síndrome Antifosfolípide
<b>TC</b>	Tempo de Coagulação
<b>TE</b>	Transferência de Embrião
<b>TP</b>	Tempo de Protrombina
<b>TTPA</b>	Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativado
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>VDRL</b>	Venereal Disease Research Laboratory
<b>µg</b>	micrograma (s)
<b>µl</b>	microlitro (s)
<b>%</b>	Porcentagem
<b>&amp;</b>	"e" comercial

## **RESUMO**

---

## RESUMO

---

A literatura indica que algumas mulheres com antecedente de aborto espontâneo recorrente (AER) são portadoras do anticorpo anticardiolipina (ACL). Sugere-se que este anticorpo esteja envolvido na etiologia do AER. Realizou-se, no Departamento de Tocoginecologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, um estudo clínico-controlado, envolvendo 52 mulheres com antecedente de AER e 104 mulheres que tinham pelo menos um filho vivo, para determinar a associação entre a presença do ACL e o antecedente de AER. O método utilizado para identificar o ACL sérico foi o "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA), determinando-se o tipo de imunoglobina presente: IgM ou IgG. Os resultados obtidos foram analisados através dos testes Qui-Quadrado, Teste Exato de Fisher e Teste t de Student para comparação de médias. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a frequência de ACL nas mulheres que tinham aborto recorrente e nas mulheres férteis, tanto para IgG quanto para IgM.

## **ANTECEDENTES NA LITERATURA**

## **1. ANTECEDENTES NA LITERATURA**

---

Dá-se o nome de aborto espontâneo recorrente (AER) à história reprodutiva de três ou mais abortos sucessivos espontâneos, situação relativamente comum e que representa um desgaste emocional na vida de uma mulher. Vários têm sido os fatores associados à ocorrência de AER. Desde a Antiguidade, a ciência procura conhecer melhor a etiologia desta entidade, buscando alternativas terapêuticas que possam produzir melhores resultados gestacionais. Entretanto, em aproximadamente metade dos casos de AER, a etiologia permanece desconhecida (COSTA et al., 1993), sugerindo a necessidade de novos caminhos para sua elucidação.

A Imunologia moderna tem apresentado novos recursos, com possibilidade de esclarecimento de casos em que a investigação habitual não chega a qualquer conclusão. A busca da identificação de anticorpos que podem estar relacionados com perdas recorrentes tem gerado esperanças de que muitas destas mulheres possam ser adequadamente investigadas, diagnosticadas e tratadas. Dentre estes anticorpos, os chamados antifosfolípides (AAF) parecem ser os mais relacionados, destacando-se o anticorpo anticardiolipina (ACL).

A associação entre os AAF e os AER é amplamente reconhecida (LOCKSHIN, QAMAR, LEVY, 1990; BRANCH et al., 1992; OUT et al., 1992; TRIPLETT, 1992; KWAK et al., 1994). Mulheres portadoras destes anticorpos e abortadoras recorrentes podem apresentar bons resultados gestacionais quando

é feita a supressão dos mesmos (ROSOVE et al., 1990; TRIPLETT, 1992). Sugere-se que mulheres com história de AER ou óbito fetal podem se beneficiar com a pesquisa dos AAF circulantes (BRANCH et al., 1985).

Deste modo, o reconhecimento de pacientes com AER e que são portadoras de AAF é fundamental para que se melhore o prognóstico de suas futuras gestações. No Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), o Ambulatório de Aborto Recorrente tem procurado identificar com especial destaque mulheres com AAF, particularmente o ACL.

### **1.1. Anticorpos antifosfolípidos**

Anticorpos antifosfolípidos (AAF) são imunoglobulinas que reagem contra fosfolípidos de membrana carregados negativamente (TRIPLETT, 1992). O início de sua identificação laboratorial data de 1906, quando WASSERMAN, NEISSER, BRUCK<sup>1</sup> realizaram a primeira fixação de complemento, utilizando extratos de fígado de fetos sífilíticos como antígeno. A partir daí, surgiu uma segunda geração de testes, com as técnicas de fixação de complemento e floculação, como o Venereal Disease Research Laboratory (VDRL), que usava como antígeno uma combinação de cardiolipina, lecitina e colesterol. Foram identificados, na época, indivíduos com resultados positivos e sem qualquer evidência de sífilis. Foi notada também associação entre o VDRL cronicamente positivo e doenças auto-imunes subjacentes, como o lúpus eritematoso sistêmico (HASERICK & LONG, 1952). Com o desenvolvimento do teste específico,

---

<sup>1</sup> WASSERMAN, A.; NEISSER, A.; BRUCK, C. apud TRIPLETT, D.A. Obstetrical complications associated with antiphospholipid antibodies. In: COULAM, C.B.; FAULK, W.P.; McINTYRE, J.A., eds. - **Immunological obstetrics**. 1. ed. London: Norton Medical Books, 1992. p. 378.

Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test (FTA-Abs), tais indivíduos foram classificados como falso-positivos (DEACON, LUCAS, PRICE, 1966). Iniciou-se, então, extensa pesquisa em busca dos fatores responsáveis por esta associação.

A investigação da presença de auto-anticorpos maternos associados ao aborto recorrente tem adquirido importância crescente na avaliação destas pacientes, principalmente no que se refere aos AAF (COSTA et al., 1993). Eles podem ser de qualquer classe e reagir contra qualquer fosfolípide, mas, para uso clínico, são consideradas as imunoglobulinas G, M, A e suas combinações (HOCHFELD et al., 1994). A IgG é a imunoglobulina que mais apresenta importância clínica, sendo relacionada a várias entidades deletérias à mãe e ao feto (HARRIS et al., 1986). Os principais fosfolípidos que atuam como antígenos são a cardiolipina, o fosfatidilinositol, a fosfatidilserina, o fosfatidilglicerol, a fosfatidiletanolamina e o ácido fosfatídico (LOCKSHIN et al., 1990). Além destes, o anticoagulante lúpico também foi relacionado com perdas fetais recorrentes (TRIPLETT et al., 1988), o que será posteriormente detalhado.

Em 1983 foi descrito um teste mais sensível para os AAF, o radioimunensaio (RIE). Isto permitiu um rastreamento sistemático das populações, aumentando em 200 a 400 vezes a sensibilidade da pesquisa (HARRIS et al., 1983). Em 1985, foi introduzida a pesquisa do anticorpo anticardiolipina (ACL) e outros anticorpos carregados negativamente, utilizando-se a técnica Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), que substituiu em larga escala a utilização do RIE (LOIZOU et al., 1985).

A identificação laboratorial dos AAF foi assim facilitada pelos testes não-treponêmicos para sífilis, o RIE e o ELISA para o ACL ou outros fosfolípidos carregados negativamente (LOCKSHIN et al., 1985; TRIPLETT, 1992). Grupos de

estudo internacionais foram realizados para uniformizar o ELISA para o ACL, surgindo então soros de referência tanto para IgG quanto para IgM (HARRIS & PHIL, 1990a).

A interpretação dos testes para AAF persiste como um problema para os laboratórios. Apenas resultados fortemente positivos devem ser usados em decisões de conduta. O uso de soros de referência para cada grupo de pacientes permite que os laboratórios expressem os resultados em unidades de ligação (HARRIS, GHARAVI, HUGHES, 1985). Cada laboratório deve estabelecer seu valor-limite para identificar resultados fortemente positivos, como por exemplo cinco desvios-padrões acima da média dos soros de referência (TRIPLETT, 1992).

Com a evolução da pesquisa quanto às técnicas laboratoriais para a identificação dos AAF, observou-se que a ligação do ACL a lipossomas que continham fosfolípidos só se fazia na presença de plasma ou soro, indicando a necessidade de um componente plasmático. Este componente, chamado inicialmente de "ACL-cofator", foi identificado como um polipeptídeo de cadeia única, com peso molecular aparente de 50kD e propriedades muito parecidas com a beta 2-glicoproteína I (GALLI et al., 1990). YAMAMOTO et al. (1993), estudando gestantes com pré-eclâmpsia, mostraram que a detecção dos AAF por ELISA, utilizando o complexo cardiolipina-beta 2-glicoproteína I (beta 2-GPI), foi maior do que quando utilizada apenas a cardiolipina. Posteriormente, confirmou-se a necessidade da ligação da cardiolipina à beta 2-GPI para que ela funcionasse como antígeno. A beta 2-GPI tem efeitos conhecidos sobre a agregação plaquetária, a atividade da protrombinase plaquetária e a via intrínseca da coagulação. Isto fortalece a hipótese de que ela esteja implicada na patogênese dos efeitos trombóticos (KAMPE, 1994).

As teorias sobre a formação dos AAF são várias. Alguns autores sugerem que um dano na estrutura lipídica da membrana expõe os fosfolípidos ao sistema imune, originando a formação de anticorpos (CANOSO, ZON, GROOPMAN, 1987; VISCARELLO et al., 1992); outros sugerem que a ativação policlonal dos linfócitos B e uma origem multifatorial seriam os principais responsáveis pela formação destes anticorpos (GLEICHER, 1990; KAJINO, 1991; MOLTA et al., 1993).

Em apoio a essas teorias, nota-se a presença de AAF associada a doenças auto-imunes (LUBBE et al., 1983; HARRIS et al., 1983; LOCKSHIN et al., 1985; GLEICHER & FRIBERG, 1985; DRUZIN et al., 1987; CRONIN et al., 1988; LOVE & SANTORO, 1990; OUT et al., 1992). Foi também encontrada maior incidência de AAF em gestantes infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CANOSO et al., 1987). Questiona-se se a destruição viral da membrana celular pode expor ou modificar os fosfolípidos, de maneira que eles se tornem mais antigênicos (VISCARELLO et al., 1992).

A especificidade dos auto-anticorpos parece interferir com o sucesso reprodutivo em um nível celular básico, em situações como fertilização *in vitro*, infertilidade inexplicada, perdas gestacionais recorrentes, endometriose, crescimento intra-uterino retardado e doenças hipertensivas da gestação (GLEICHER, HARLOW, ZILBERSTEIN, 1992). As moléculas de fosfolípidos são componentes de todas as membranas celulares e têm função nos mecanismos de transdução que regulam a divisão e a secreção celular. Os amniófosfolípidos, como fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, são lípidos fusogênicos envolvidos no mecanismo de fusão celular. O fosfatidilinositol tem sua principal função na proliferação das células amnióticas. Durante a gestação inicial, anticorpos contra estes fosfolípidos fusogênicos podem interferir com os mecanismos de fusão

durante o desenvolvimento do citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto e do âmnion, resultando na perda da gestação. Logo, os AAF podem interferir muito precocemente no desenvolvimento feto-placentário (McCRAE et al., 1993; KWAK et al., 1994).

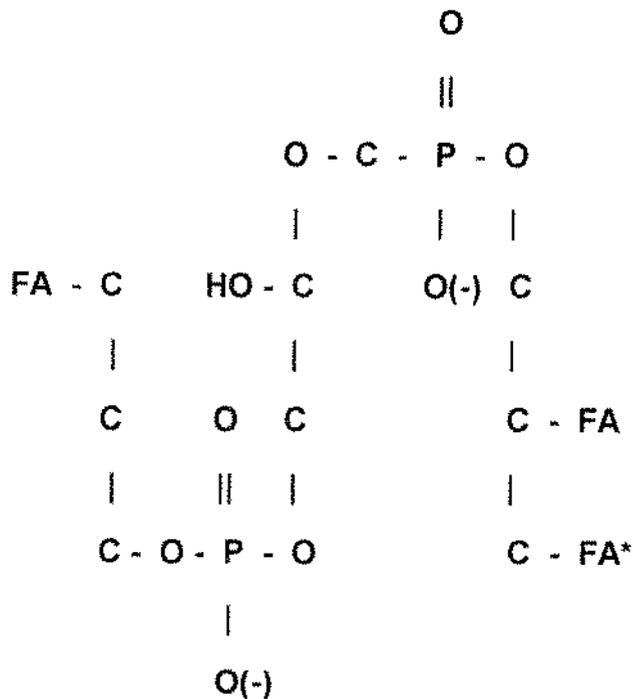
A transdução é um processo complexo. Após a ligação de um efector extracelular a um receptor específico da membrana celular, a hidrólise de fosfolípidos de membrana pelas fosfolipases A2 e C gera segundos mensageiros, os quais participam na regulação da secreção e divisão celulares. Assim, os AAF podem, teoricamente, interferir no processo de transdução em sítios nos quais os fosfolípidos representam papel essencial, neutralizando os fosfolípidos de membrana. Além disso, podem penetrar no citoplasma e afetar diretamente os segundos mensageiros compostos por fosfolípidos, como a fosfatidilserina (GLEICHER et al., 1992).

A presença dos AAF dirigidos contra vários segundos mensageiros em indivíduos normais sugere uma possível regulação fisiológica destes anticorpos em condições normais, ou seja, inibição de alguns passos do processo de transdução. Quando os níveis dos anticorpos são excepcionalmente altos, a inibição resultante pode exceder o nível fisiológico e alguns passos do mecanismo de transdução podem ser interrompidos (GLEICHER et al., 1992).

Dentre os AAF, o ACL e o anticoagulante lúpico (ACGL) destacam-se na literatura por suas associações com eventos clínicos e obstétricos deletérios, como será visto a seguir.

## 1.2. O anticorpo anticardiolipina

A cardiolipina é um fosfolípide carregado negativamente com duas cadeias unidas por uma ligação glicerol (BROWN, 1991):



\*FA - ácido graxo

O ACL foi inicialmente estudado em pacientes lúpicas. O RIE para sua detecção mostrou ser um teste com bom valor preditivo para eventos trombóticos no lúpus eritematoso sistêmico (LES) e doenças relacionadas. Foram identificadas a IgG, IgM e IgA, mas a importância destas classes de imunoglobulinas era desconhecida (HARRIS et al., 1983). Além dos eventos trombóticos, a ocorrência de sofrimento fetal também foi associada ao ACL em pacientes lúpicas, com sugestão de que ele reagiria com antígenos placentários, inibindo o crescimento da placenta e o transporte de nutrientes (LOCKSHIN et al.,

1985).

Quando pacientes com positividade para ACL foram agrupadas segundo os títulos em altamente positivos, fracamente positivos e normais, foi encontrada forte correlação estatística entre trombose, perda fetal recorrente e trombocitopenia e títulos altamente positivos (HARRIS et al., 1986). Este estudo mostrou também que o ACL pode ser importante no rastreamento de grandes populações de pacientes com doenças auto-imunes quanto ao risco para aquelas condições patológicas.

Há descrições da síndrome antifosfolípide primária (em pacientes sem critérios diagnósticos para LES), cujas principais manifestações clínicas foram trombose venosa e/ou arterial, trombocitopenia, aborto recorrente e complicações neurológicas (ARTHURS et al., 1994).

Os níveis de ACL em pacientes sem evidência clínica de LES ou outras doenças auto-imunes que evoluíram com óbito fetal foram significativamente mais altos do que em pacientes que tiveram pelo menos um filho nascido vivo saudável e a termo (BOCCIOLONE et al., 1994).

A incidência dos AAF em gestações normais varia de 0% a 22% (TRIPLETT, 1992). Séries retrospectivas e prospectivas de gestantes com AAF demonstraram claramente que a frequência de morte fetal é mais alta em mulheres com positividade para estes anticorpos (LOCKSHIN et al., 1990), principalmente com o ACL do tipo IgG (LYNCH et al., 1994). Dentre os estudos prospectivos usando os mesmos critérios para dosar AAF, HARRIS et al. (1986) mostraram relação direta entre a quantidade do anticorpo e a ocorrência de morte fetal.

Entre os testes utilizados para a detecção dos AAF, o ACL é geralmente aceito como o mais sensível e fácil de se realizar (LOCKSHIN, 1987; HARRIS, PHIL, SPINNATO, 1991). Estudando 737 mulheres saudáveis, LOCKWOOD et al. (1989) encontraram associação entre resultados positivos para ACL e recém-nascidos com baixo peso ou abortos espontâneos. Entretanto, em 1.449 gestantes saudáveis, HARRIS et al. (1991) encontraram prevalência de 1,79% para ACL-IgG e 4,3% para ACL-IgM, sem associação com resultados gestacionais adversos. Eles não recomendaram que o teste fosse feito em mulheres saudáveis, mas apenas quando havia alto índice de suspeita clínica.

Os títulos do ACL podem variar durante a gestação (COWCHOCK et al., 1984), e sua ascensão parece estar relacionada a pior prognóstico gestacional (KWAK et al., 1994). Resultados positivos durante a gravidez devem ser confirmados após intervalo de seis a oito semanas (HARRIS, 1987).

O isótipo do anticorpo tem importância clínica e deve ser avaliado. A presença de altos títulos de IgG parece ser mais significativa do que os títulos de IgM na identificação de mulheres com risco para aborto (HARRIS, 1987; PARKE, WILSON, MAIER, 1991). Quanto mais alto o nível de ACL-IgG, maior o valor preditivo e a especificidade do teste (HARRIS et al., 1986). Em um estudo de 243 mulheres com antecedente de dois ou três abortos espontâneos, o ACL-IgG foi o antifosfolípide mais freqüente (MacLEAN et al., 1994). Altos títulos do anticorpo IgM não conferem mau prognóstico isoladamente. LOCKSHIN et al. (1990) relataram pacientes que apresentaram IgM sem IgG e que tiveram nascidos vivos. Já LOCKWOOD et al. (1986), estudando pequeno número de mulheres, demonstraram a produção exclusiva de ACL-IgM associada a retardo de crescimento intra-uterino (RCIU), o que foi confirmado por SILVEIRA & ESPINOZA (1993). Os anticorpos IgM podem estar envolvidos na patogênese do

RCIU idiopático através da inibição do complexo endotelial trombomodulina-proteína C (FREYSSINET et al., 1986).

Através desses achados, não é inconveniente considerar que o ACL parece estar, de alguma forma, relacionado com resultados gestacionais adversos. A maneira pela qual esta relação se faz ainda não está esclarecida, sendo fundamental a elaboração de estudos nesta direção.

### 1.3. O anticoagulante lúpico

CONLEY & HARTMANN (1952) detectaram um prolongamento inexplicável dos testes de coagulação em alguns pacientes. Realizando uma mistura de quatro partes de soro de paciente pobre em plaquetas e uma parte de soro normal, foi notada a presença de um anticoagulante ou inibidor específico circulante. Em 1954, BEAUMONT<sup>2</sup> descreveu a primeira associação entre perda fetal recorrente e a presença de um anticoagulante. Em 1955 também foi descrito tal anticoagulante em uma paciente com resultados cronicamente falso-positivos para sífilis (FRICK, 1955). Mais tarde, foi encontrada associação entre anticorpos circulantes e episódios de trombose (BOWIE et al., 1963). Em 1972, foi proposto o termo "anticoagulante lúpico", pois o anticorpo havia sido descrito inicialmente em pacientes portadoras de lúpus eritematoso sistêmico. Ele foi definido como "imunoglobulina que interfere com um ou mais testes de coagulação lipíde-dependentes, como o tempo de tromboplastina parcialmente ativado (TTPA) e o tempo de protrombina (TP)" (FEINSTEIN & RAPAPORT, 1972). O ACGL liga-se a epitopos na porção fosfolipídica da protrombinase (um complexo

---

<sup>2</sup> BEAUMONT, J.L. apud TRIPLETT, D.A. Obstetrical complications associated with antiphospholipid antibodies. In: COULAM, C.B.; FAULK, W.P.; McINTYRE, J.A., eds. - *Immunological obstetrics*. 1. ed. London: Norton Medical Books, 1992. p. 379.

dos fatores X ativado, V ativado, fosfolípidos e cálcio) (FEINSTEIN, 1985). Notou-se que pacientes com o ACGL não apresentavam maiores sangramentos do que pacientes sem ele, mas sim uma predisposição a fenômenos tromboembólicos (LOCKSHIN et al., 1990). Entretanto, o termo "anticoagulante lúpico" já estava difundido na literatura e persistiu.

A demonstração da presença do ACGL depende do tipo de reagente utilizado na pesquisa (MANUCCI et al., 1979). Em termos práticos, o ACGL faz com que testes rastreadores, como o TTPA e o tempo de coagulação (TC), sejam anormais (LOCKSHIN et al., 1990). Por isso, vários produtores de reagentes para TTPA tornaram seus produtos insensíveis ao ACGL. Atualmente, devido à importância que estes anticorpos vêm adquirindo, os laboratórios voltaram a permitir que seus reagentes os identifiquem (TRIPLETT, 1992).

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

Sugere-se também que uma gamopatia monoclonal benigna por IgM possa representar parte de uma síndrome envolvendo o ACGL e AER (GLEICHER & FRIBERG, 1985). A relevância destas gamopatias monoclonais nas perdas gestacionais ainda não está bem estabelecida. Entretanto, são sugeridas a eletroforese sérica e a imunoeletroforese como parte da avaliação de casais com AER, nos quais há suspeita de etiologia auto-imune (GLEICHER & FRIBERG, 1985).

Os AAF, o ACGL e os testes biológicos para sífilis freqüentemente são positivos na mesma paciente, variando a concordância entre 0% e 50%. Os níveis de ACGL podem flutuar durante a gestação (LOCKSHIN et al., 1990). Pacientes com ACGL persistentemente elevado têm alto risco para eventos trombóticos venosos e/ou arteriais e perda gestacional (TRIPLETT, 1992). Nas gestações em que o ACGL está presente, não são raras as complicações que levam à prematuridade ou RCIU (TRIPLETT, 1992). LUBBE, WALKOM, ALEXANDER (1982) descreveram o caso de uma paciente toxêmica portadora do ACGL que evoluiu com óbito fetal, trombozes em membros inferiores e hemorragia hepática e esplênica como complicações.

Alguns investigadores sustentam que o ACGL e o ACL são manifestações do mesmo anticorpo, apesar da maioria concordar que eles diferem entre si (TRIPLETT et al., 1988), a despeito de poderem apresentar as mesmas complicações clínicas (PATTISON et al., 1993; KAMPE, 1994).

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

#### **1.4. A síndrome antifosfolípide**

A síndrome antifosfolípide (SAF) foi descrita pela primeira vez por HUGHES, em 1983, e consistia em: trombose arterial e/ou venosa, Coombs direto positivo, trombocitopenia, livedo reticular e complicações obstétricas, principalmente o óbito fetal de segundo trimestre. Esta síndrome foi dividida em primária ou secundária, conforme sua combinação ou não com outras entidades

clínicas, principalmente o lúpus eritematoso sistêmico (ASHERSON & CERVERA, 1994).

Os eventos trombóticos costumam surgir em pacientes jovens, muitas vezes saudáveis, mais freqüentemente como acidente vascular cerebral trombótico ou trombose periférica arterial ou venosa. As trombozes aparecem em intervalos de tempo imprevisíveis, mesmo anos, em pacientes com níveis constantemente elevados de AAF. Altos níveis do ACL da classe IgG são considerados fator de risco para trombose (MOLTA et al., 1993).

Uma grande variedade de eventos neurológicos, além do acidente vascular cerebral, ocorre em pacientes com SAF: coréia, neuropatias focais e uma mielopatia desmielinizante incomum, conhecida como "esclerose lupóide" ou "neuropatia jamaicana". A combinação de acidente vascular cerebral e livedo reticular é conhecida como síndrome de Sneddon. Biópsias mostraram capilares e pequenas veias ocluídas por trombos de fibrina, fornecendo forte indício de que uma coagulação microvascular anormal seria o centro da patogênese (LOCKSHIN et al., 1990). Na coréia gravídica, a fisiopatologia é desconhecida, embora haja alguma evidência sugerindo que os AAF reagem com lípidos do sistema nervoso central (LUBBE & WALKER, 1983; BRANCH et al., 1985).

A trombocitopenia também ocorre comumente em pacientes com SAF. Geralmente é leve, com plaquetas variando de 75.000 a 150.000, não necessitando de tratamento (LOCKSHIN et al., 1990). Questiona-se o envolvimento de uma glicoproteína de membrana das plaquetas na antigenicidade para os AAF (MOISE, 1991).

A pré-eclâmpsia de instalação precoce também foi associada à SAF: em 43 pacientes com pré-eclâmpsia grave, previamente às 34 semanas de gestação, 16% tinham elevação significativa de AAF. Destas pacientes, três

sofreram complicações periparto importantes: infarto cerebral, embolia pulmonar e trombose venosa profunda, cegueira monocular transitória e amnésia pós-parto (BRANCH et al., 1985).

A vasculite é uma manifestação rara da SAF, geralmente descrita em artérias periféricas. A vasculite renal, entretanto, foi observada pela primeira vez em 1994, em uma paciente com história de AER e positividade para ACL-IgG. Ela apresentou falência renal aguda e pré-eclâmpsia grave no segundo trimestre da gestação. A vasculite renal foi autolimitada (ALMESHARI, ALFURAYH, AKHTARM, 1994).

Recentemente, foram citadas manifestações audiovestibulares da SAF com falência aguda do órgão, em uma paciente com AAF e com LES, e em outra paciente com a SAF primária (VYSE, LUXON, WALPORT, 1994), mostrando que os AAF podem servir como marcadores para várias condições patológicas.

Descreveu-se também uma síndrome pós-parto associada aos AAF, consistindo em doença pleuro-respiratória, febre, manifestações cardíacas e renais. Uma das pacientes descritas desenvolveu miocardiopatia e outras duas apresentaram trombose quatro semanas após o parto (KOUCHENOUR et al., 1987). Sugere-se que a síndrome seja a exacerbação de um processo auto-imune subclínico preexistente, funcionando os AAF como seus marcadores (KOUCHENOUR et al., 1987; KUPFERMINC et al., 1994).

As complicações da SAF no ciclo grávido-puerperal podem ser graves. HOCHFELD et al. (1994) relataram um óbito materno no período pós-parto por trombozes múltiplas em uma paciente portadora de ACL da classe IgG.

Quanto às complicações neonatais, FRICK relatou, em 1955, a passagem transplacentária de fatores anticoagulantes passivamente adquiridos.

Como os AAF geralmente são da classe IgG, a passagem placentária pode ser antecipada (LECHNER, 1974). SHERIDAN-PEREIRA et al. (1988) descreveram um caso de trombose aórtica no recém-nascido de uma paciente portadora de ACGL. Há outros relatos de trombooses neonatais em crianças nascidas de mães com AAF. Em um dos casos, o recém-nascido apresentou trombooses na aorta, artéria renal esquerda, artéria cerebral média e seio sagital superior, a despeito do tratamento materno com prednisona e aspirina (TABUTT, 1994). A trombose clínica é um risco para recém-nascidos de mulheres com AAF durante a gestação. Assim, estas crianças deveriam ser submetidas à pesquisa de AAF, principalmente o ACL e o ACGL (SHERIDAN-PEREIRA et al., 1988).

A melhor maneira para monitorizar a vitalidade fetal em gestações de mulheres com SAF ainda não foi estabelecida, mas CARUSO et al. (1993) sugeriram a avaliação dopplerfluxométrica das artérias uterinas para prever o risco de complicações obstétricas.

Foram relatados trombose, necrose extensa e infarto em placentas de pacientes com AAF (DE WOLF et al., 1982; OUT et al., 1992; INBAR et al., 1993; SILVER et al., 1994). Biópsias realizadas em placentas de mulheres com LES e AAF mostraram vasculite das artérias espiraladas, infiltrado inflamatório perivascular, decíduite (ERLENDSSON et al., 1993) e hipertrofia da camada média (BARROS, 1994).

Na fisiopatologia da insuficiência ou infarto placentário vistos com AAF, é proposta a produção diminuída de prostaciclina (TRIPLETT, 1992) ou resposta diminuída da liberação de prostaciclina pela estimulação da trombina (SILVEIRA et al., 1992). As células endoteliais metabolizam o ácido aracdônico via cicloxigenase para prostaciclina. As plaquetas, ao contrário, metabolizam o ácido aracdônico em tromboxano A<sub>2</sub>. A prostaciclina é um potente vasodilatador e

inibidor da agregação plaquetária, enquanto o tromboxano tem efeitos opostos. Portanto, a diminuição da prostaciclina predisporia à trombose via agregação plaquetária e vasoconstrição (TRIPLETT, 1992).

O estudo anatomopatológico de placentas de gestantes que haviam abortado mostrou que a necrose e o infarto placentários associavam-se significativamente com a presença de AAF, se comparado com o estudo de placentas de mulheres que não tinham positividade para estes anticorpos (OUT et al., 1992).

Foram sugeridos vários outros mecanismos para as alterações placentárias encontradas, como fibrinólise diminuída e diminuição da antitrombina III (INBAR et al., 1993), mas o mais consistente entre eles é a diminuição da ativação da proteína C (TRIPLETT, 1992). A proteína C é ativada na membrana endotelial pela formação de um complexo entre a trombina e uma glicoproteína de membrana chamada trombomodulina. Esta reação é dependente de fosfolípidos e cálcio, sendo que os AAF podem impedi-la. A placenta é particularmente rica em trombomodulina (TRIPLETT, 1992). A deposição de imunocomplexos ou a ligação direta dos anticorpos pode iniciar as alterações inflamatórias nos vasos decíduais, mas um mecanismo mediado por células T também pode ser importante, sendo os anticorpos do soro marcadores de tal atividade (ENLERDSSON et al., 1993).

## **1.5. AAF e abortos recorrentes**

A incidência dos AAF em pacientes com história de AER varia de 7,7% a 42,4% (TRIPLETT, 1992). O que distingue pacientes que têm complicações daquelas que não as têm é geralmente desconhecido; não é o isótipo, a

especificidade fina do anticorpo ou a coexistência de outros anticorpos (LOCKSHIN et al., 1990). O antecedente de três ou mais abortos e a presença do ACGL são importantes para prever a perda fetal (OUT et al., 1992). O risco de novo aborto em mulheres com AAF e perda fetal prévia é desconhecido, entretanto provavelmente excede os 60% (BRANCH et al., 1992).

Foram citadas várias possíveis associações entre AER e a presença de AAF, principalmente do ACL (HARRIS et al., 1986; BARBUI et al., 1988; LOCKSHIN et al., 1990). Existe evidência de que o ACL é diretamente responsável por resultados gestacionais adversos, incluindo os abortos espontâneos (TRIPLETT, 1992). Parece haver um desarranjo imune nas abortadoras recorrentes, e o marcador mais representativo desta alteração é o ACL (KONIDARIS et al., 1994).

A literatura sugere fortes indícios da associação entre AAF e AER, mas persistem dúvidas quanto ao real valor preditivo dos anticorpos para perda gestacional. Os AAF podem estar presentes em gestações normais, e mulheres com estes anticorpos podem ter gestações bem-sucedidas, mesmo com sua persistência (LOCKSHIN et al., 1990).

Entretanto, mulheres com três ou mais abortos espontâneos mostraram incidência significativamente mais alta de AAF do que multiparas saudáveis. Há um aumento de 15% na incidência destes anticorpos a cada perda gestacional sucessiva. Isto sugere que a falência da unidade feto-placentária pode liberar fosfolípidos que são auto-antigênicos para a paciente (KWAK et al., 1994).

Os níveis dos AAF podem variar com o decorrer da gestação. Algumas pacientes têm níveis persistentemente elevados e, em outras, eles flutuam durante a gravidez (LYNCH et al., 1994). Pacientes com níveis persistentemente

elevados têm maiores riscos de complicações (OUT et al., 1992). KWAK et al. (1994) mostraram que mulheres que abortaram espontaneamente tiveram aumentos dramáticos nos títulos dos AAF, se comparadas com mulheres que tiveram nascidos vivos. No último grupo, os títulos permaneceram estáveis ou decresceram logo no início da gestação.

Aparentemente não há justificativa para realizar a pesquisa de AAF em todas as gestantes. Não foi encontrada diferença significativa em dosagem isolada no início da gestação nos níveis de ACL entre mulheres que evoluíram para aborto espontâneo pela primeira vez e mulheres que tiveram nascidos vivos (INFANTE-RIVARD et al., 1991).

O desenvolvimento da tolerância imunológica materna em relação ao feto é controverso, uma vez que ele é portador de carga antigênica de origem paterna estranha ao organismo da mãe. A literatura evidencia que alterações na tolerância imunológica materna podem ter relação com a ocorrência de AER, descritas como de causa aloimune (BEER et al., 1981). Há também evidências de auto-anticorpos envolvidos neste processo (FIRKIN, HOWARD, RADFORD, 1980; LUBBE et al., 1984; BRANCH et al., 1985; FEINSTEIN, 1985; LUBBE, PATTISON, LIGGINS, 1985).

O mecanismo imunológico implicado no aborto depende do tempo de gestação em que o processo acontece. Do período de pré-implantação até o seu final (13<sup>o</sup> dia), o mecanismo mediado por células (potencial etiologia aloimune) é responsável. Após a implantação, quando já ocorreu a penetração do blastocisto no estroma e a reação decidual, o aborto pode ser mediado por células ou por mecanismo humoral. Neste, há produção de anticorpos contra os antígenos de histocompatibilidade ou mesmo uma alteração auto-imune levando à produção de

anticorpos (GIACOMUCCI et al., 1994).

Tanto a aloimunidade quanto a auto-imunidade maternas podem estar envolvidas neste processo. A tentativa de tratamento por imunização com células paternas ou de doador mostrou resultados favoráveis (MOWBRAY et al., 1985; BARINI, KWAK-KIM, BEER, 1994).

GEVA et al. (1994), estudando pacientes inférteis submetidas à fertilização *in vitro* (FIV) e posterior transferência de embrião (TE), encontraram uma porcentagem significativamente maior de positividade para ACL e ACGL em mulheres nas quais ocorreu falha de implantação do que naquelas que obtiveram sucesso. Eles sugeriram a pesquisa rotineira dos AAF em pacientes submetidas à FIV e TE.

## **1.6. AAF e terapêutica**

A necessidade de tratamento para mulheres portadoras de AAF permanece como dúvida (OUT et al., 1992). Questiona-se o uso profilático de corticosteróides ou outras formas de terapia para prevenir a perda fetal (TRIPLETT, 1992). Todavia, em relatos de pacientes com AAF e AER, a terapia foi aparentemente benéfica em alguns casos cuidadosamente selecionados (ROSOVE et al., 1990; TRIPLETT, 1992), mas não em outros (LOCKSHIN, DRUZIN, QAMAR, 1989; OUT et al., 1992). A terapia imunossupressora para tratamento de AER associado aos AAF foi sugerida pela primeira vez por NILSSON et al. (1975). LUBBE et al. (1983) notaram a possível eficácia da aspirina em baixas doses, juntamente com a prednisona. Por outro lado, foi mostrada incidência aumentada de baixo peso ao nascer em mulheres com AAF tratadas com prednisona em altas doses durante a gestação (OUT et al., 1992).

Se é verdade que o ACL realmente tem relação com a ocorrência de trombose e perda fetal recorrente, a redução de seus níveis com esteróides ou imunossupressores poderia teoricamente diminuir o risco destes eventos. Contudo, a resposta dos níveis de ACL à terapia com esteróides ou imunossupressores não é previsível (HARRIS et al., 1986).

A primeira série de pacientes portadoras de ACGL tratadas com 40 a 60mg de prednisona e 75mg de aspirina por dia foi relatada em 1983. Cinco em seis pacientes tiveram supressão do anticorpo e deram à luz nascidos vivos (LUBBE et al., 1983). A aspirina promove inibição seletiva da síntese de tromboxano A<sub>2</sub>, prevenindo a trombose de pequenas veias (TRIPLETT, 1992). Foi sugerido o início do uso da prednisona e aspirina no fim do primeiro trimestre, com aumento da prednisona a cada duas semanas, enquanto os parâmetros de coagulação não voltassem ao normal (LUBBE et al., 1983). Em uma série de oito pacientes tratadas com prednisona, cinco desenvolveram pré-eclâmpsia, levantando a questão sobre o desenvolvimento de complicações relacionadas ao uso de corticosteróides (BRANCH et al., 1985). Em outra série de 11 casos de SAF tratados com prednisona, em doses progressivamente menores, associadas à aspirina, foram notados: alta taxa de gestações bem-sucedidas; baixa frequência de complicações; e melhores resultados perinatais. Os títulos de anticorpos decresceram marcadamente durante o tratamento (SILVEIRA et al., 1992).

HARRIS et al. (1986) sugeriram que pacientes com trombose e positividade para ACL devem receber anticoagulantes orais ou antiagregantes plaquetários por longo tempo, e a terapia com esteróides deve ser reservada para aquelas que apresentam trombose recorrente apesar da anticoagulação adequada. Outras drogas imunossupressoras foram usadas, como a azatioprina,

com pequeno risco de teratogenicidade (TRIPLETT, 1992).

Em 1984, utilizou-se, pela primeira vez, heparina com aspirina (LUBBE et al., 1984). A heparina não cruza a placenta e, provavelmente, não atinge o feto. O uso prolongado é associado à osteoporose materna (TRIPLETT, 1992). Estudos em cobaias sugerem melhores resultados com o uso de heparina de baixo peso molecular (INBAR et al., 1993). A heparina inibe a ligação dos AAF aos fosfolípidos no ELISA. Isto aparentemente envolve uma interação entre a heparina e os AAF (McINTYRE et al., 1993).

Recentemente, foi sugerido o tratamento de pacientes que têm AER e são positivas para AAF com os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA), que são componentes do óleo de peixe, com resultados encorajadores (ROSSI & COSTA, 1993). Além disso, o uso de dipiridamol ou imunoglobulina humana intravenosa também já foi relatado como tentativa terapêutica (ENLERDSSON et al., 1993), assim como a plasmaférese (DIEZ-EWALD, 1993).

Em resumo, a frequência de positividade dos AAF em mulheres com AER é suficientemente alta para justificar a realização dos testes em qualquer mulher com estes antecedentes. Assim, a pesquisa dos AAF em mulheres com AER de causa inexplicada é essencial na abordagem atual do problema.

No Brasil, ainda são raros os estudos que envolvem fatores imunológicos em relação a aborto recorrente. É importante conhecer a frequência do ACL em pacientes que têm AER e nas que não o tem. Para isto foi realizado este estudo.

## **OBJETIVOS**

---

## **2. OBJETIVOS**

---

### **2.1. Objetivo Geral**

Determinar a associação entre a presença do anticorpo anticardiolipina (ACL) e o antecedente de aborto espontâneo recorrente (AER).

### **2.2. Objetivos Específicos**

- 2.2.1.** Pesquisar, pelo método ELISA, a presença de ACL em pacientes com antecedente de AER e em pacientes que tiveram pelo menos uma gestação bem-sucedida.
- 2.2.2.** Comparar a frequência do ACL entre pacientes com antecedente de AER e pacientes que tiveram pelo menos uma gestação bem-sucedida.
- 2.2.3.** Comparar a frequência do ACL-IgM entre pacientes com antecedente de AER e pacientes que tiveram pelo menos uma gestação bem-sucedida.
- 2.2.4.** Comparar a frequência do ACL-IgG entre pacientes com antecedente de AER e pacientes que tiveram pelo menos uma gestação bem-sucedida.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3.1. Seleção dos sujeitos**

Desenvolveu-se um estudo clínico controlado no período de novembro de 1993 a novembro de 1994, envolvendo, no Grupo 1, 52 pacientes do Ambulatório de Aborto Recorrente do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, que apresentavam antecedente de AER, ou seja, três ou mais abortos espontâneos consecutivos.

No Grupo 2, foram incluídas no estudo 104 pacientes do Ambulatório de Planejamento Familiar do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP no mesmo período. Para compor este grupo, as pacientes deveriam ter o antecedente de pelo menos uma gestação bem-sucedida. Os critérios de exclusão para o Grupo 2 foram: história de AER, óbito fetal de causa desconhecida, fenômenos tromboembólicos, hipertensão gestacional, má história obstétrica ou baixo peso ao nascer. O prazo máximo entre o último parto e a data da coleta de sangue foi de dois anos; o prazo mínimo foi de seis meses.

As pacientes foram informadas sobre os objetivos e metodologia do estudo, e só foram admitidas quando concordaram, assinando um "Consentimento Pós-Informação" (ANEXO 3). Quando a paciente recusou-se a participar do

estudo, foi oferecida participação à paciente que deu entrada imediatamente depois dela, nas mesmas condições.

Essas pacientes foram submetidas à coleta de 5 a 10ml de sangue de veia periférica em frasco sem anticoagulante, com seringa e agulha descartáveis, para pesquisa de ACL, utilizando-se a técnica descrita por TRIPLETT, BARNA, UNGER (1993). Para a compra do material de laboratório e reagentes, foi obtido um financiamento do Programa Latino-Americano de Capacitación e Investigación en Reproducción Humana (PLACIRH - Ref.: CLAVE PLI - 134/93).

As pacientes admitidas no estudo continuaram seu seguimento nos Ambulatórios de Aborto Recorrente ou Planejamento Familiar, sem alteração da rotina de atendimento.

### **3.2. Técnica laboratorial**

Teste: pesquisa de ACL no soro através do Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

#### **3.2.1. Coleta e preparo do material biológico**

Foram coletados 5 a 10ml de sangue através de técnica-padrão de punção de veia periférica em tubos com tampa, sem aditivos. Após centrifugação do sangue a 1600rpm por dez minutos, o soro foi separado e, se não utilizado em menos de 24 horas, congelado a -80°C ou abaixo. Evitou-se o uso de freezer autodescongelante e a operação congela-descongela. O volume mínimo para congelação foi de 200µl, sendo o volume ótimo de 0,5ml.

### **3.2.2. Reagentes**

- \* Antígeno: Cardioplipina de coração de bovino em etanol: Sigma C-1649
- \* Fosfatase alcalina conjugada anti-IgG humana: Sigma
- \* Fosfatase alcalina conjugada anti-IgM humana: Sigma
- \* P-nitrofenil fosfato Sigma substrato 104: Sigma 104-0
- \* Soro fetal bovino: Cultilab
- \* Dietanolamina: Sigma
- \* Cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ): Sigma
- \* Azida sódica ( $NaN_3$ ): Riedel-de Haen
- \* Hidróxido de sódio ( $NaOH$ ): Qeel
- \* Etanol PA: Grupo Química
- \* Cloreto de sódio ( $NaCl$ ): Reagen
- \* Cloreto de potássio ( $KCl$ ): Baker Analyzed Reagents
- \* Fosfato de sódio dibásico: Qeel
- \* Fosfato de potássio monobásico: Ecibra Reagentes Analíticos

### **3.2.3. Reagentes de trabalho**

- \* Tampões:

PBS - PH 7,2: fosfato de potássio monobásico - 0,20g/l

fosfato de sódio dibásico - 1,15g/l

cloreto de sódio - 8,00g/l

cloreto de potássio - 0,20g/l

De bloqueio: PBS contendo 10% de soro fetal bovino

Dietanolamina: dietanolamina - 100ml/l

azida sódica - 100mg/l

cloreto de magnésio - 50mg/l

Ajustar o PH para 9,8 com HCl

\* Antígeno cardioplipina:

Solução-mãe: 5,0mg/ml

Solução-trabalho: 45µg/ml em etanol absoluto

\* Soro de pacientes e controle: diluído 1:50 em tampão bloqueador

\* Reagente conjugado indireto: anti-IgG e anti-IgM diluídos em tampão bloqueador 1:1000.

\* Substrato de reação:

1mg de substrato: 1ml de tampão dietanolamina

\* Solução Stop: NaOH 3M

### **3.2.4. Procedimento**

O revestimento das placas com o antígeno foi realizado um dia antes da corrida do ensaio, pois o revestimento em período muito anterior poderia causar quebra dos antígenos sobre a placa, com resultados menos fidedignos.

Após a diluição do antígeno em etanol, foi imediatamente realizado o plaqueamento. Foram colocados 30µl da diluição nos poços em cada fileira, de A a D, nas placas de ELISA. O antígeno não foi adicionado na coluna 1, permanecendo a mesma como coluna neutra ("blank"). Foram então adicionados 30µl de etanol aos poços das fileiras E a H da placa (Figura 1).

**Amostras**

**Neutro**

Revestidas  
com CL

Revestidas  
com etanol

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	} IgM
<b>B</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<b>C</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	} IgG
<b>D</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<b>E</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	} IgM
<b>F</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<b>G</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	} IgG
<b>H</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

**Figura 1 - Placa para pesquisa do ACL**

As placas permaneceram secando por uma noite na geladeira, não empilhadas, não cobertas. No dia seguinte, foram adicionados 100µl de PBS em todos os poços, exceto os da coluna 1. Após um minuto, o PBS foi entornado e a placa virada e batida sobre papel-toalha, até que os poços estivessem secos. Foram adicionados, então, 200µl de tampão bloqueador em todos os poços. Foram incubados à temperatura ambiente por uma hora e meia. Este passo foi realizado para bloquear sítios da placa de poliestireno, prevenindo ligações não-específicas da imunoglobulina.

Após o tempo de incubação, o reagente bloqueador foi entornado, e a placa foi exaustivamente batida sobre o papel-toalha. Foram então colocados 200µl de PBS em todos os poços e, após um minuto, o PBS foi entornado. As placas foram novamente batidas, para que os poços ficassem secos.

Depois disso, foram colocados 50µl da diluição dos soros das pacientes e controle nos poços apropriados, ensaiando-se dez pacientes por placa. As placas foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente e empilhadas para evitar a evaporação.

As placas foram então entornadas e lavadas três vezes com PBS (200µl por poço). Foram novamente batidas para secar completamente. Depois de secas as placas, foram adicionados 50µl por poço do reagente conjugado indireto do anticorpo diluído em todas as placas, deixando a coluna neutra vazia: IgM nas fileiras A, B, E e F, e IgG nas fileiras C, D, G e H. Após incubação por uma hora em temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas por três vezes com PBS, 200µl por poço, e batidas para secar completamente. Foram colocados 50µl de substrato em todos os poços, incluindo os poços da coluna neutra. As placas foram então incubadas a 37°C por 30 minutos no escuro, e a reação foi interrompida pela adição de 50µl da solução stop em todos os poços. A leitura foi realizada no leitor de placa de marca Tibertek na densidade óptica de 405nm.

### **3.2.5. Controle de qualidade**

Utilizou-se soro de paciente com densidade óptica alta como controle positivo, com concentrações pré-determinadas de IgM e IgG, adquiridos de HARRIS (ANEXO 5).

Um doador saudável normal foi usado como controle negativo. Várias amostras diferentes do soro de pacientes foram usadas para assegurar a validade do ensaio.

O soro-controle foi pesquisado tanto para IgM quanto para IgG, com o objetivo de avaliar: a técnica de revestimento do antígeno sobre cada placa; os anticorpos conjugados; a técnica de pipetagem; o método de lavagem; o substrato e o tempo de incubação e temperatura.

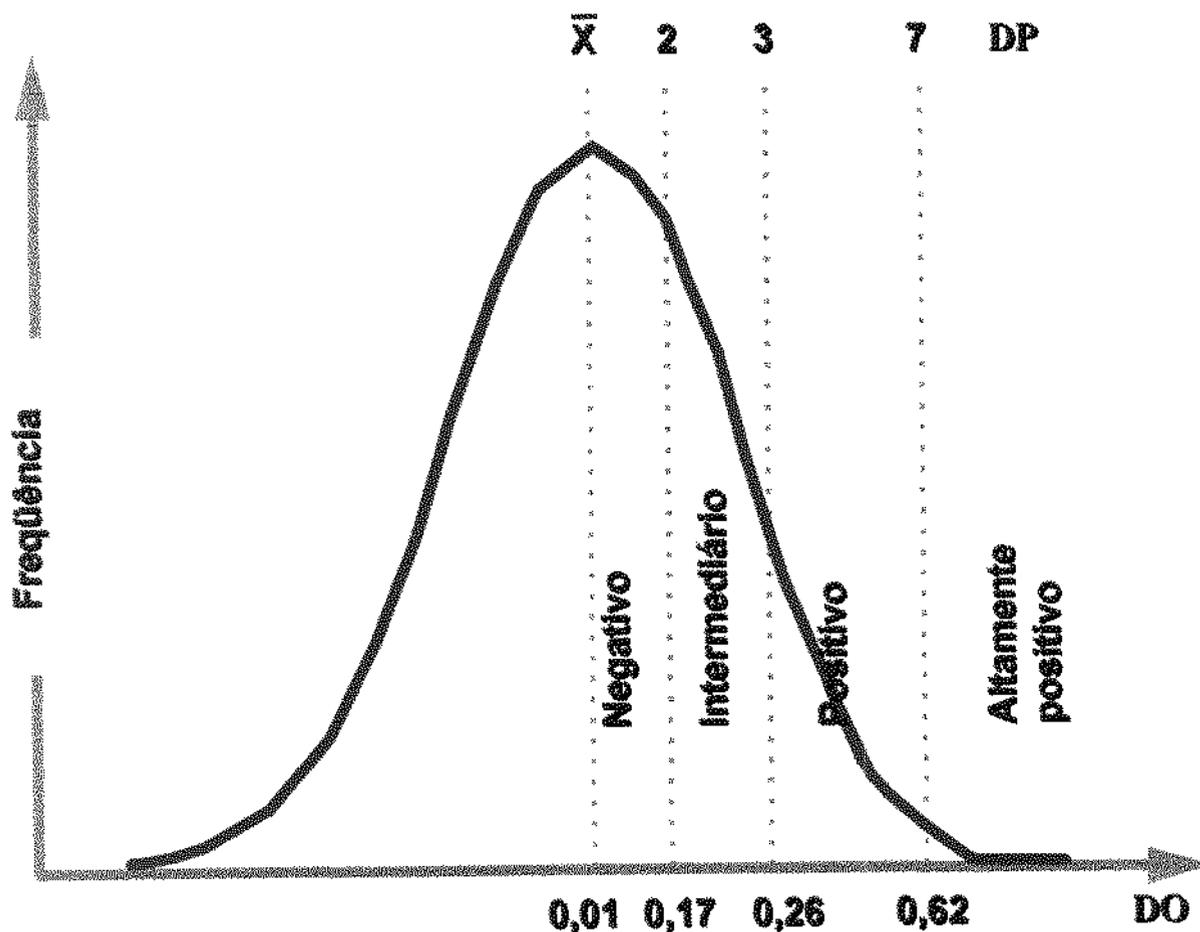
### **3.2.6. Interpretação dos resultados**

Foram encontrados quatro tipos de resultados: negativo, intermediário, positivo e altamente positivo, de acordo com o valor do ponto de corte estabelecido. Para a determinação do valor do ponto de corte (IgG e IgM), fez-se um ensaio com 40 doadoras normais, saudáveis e não-grávidas. Foi obtida a densidade óptica (DO) para cada doador, calculando-se a média e o desvio-padrão (DP) do grupo.

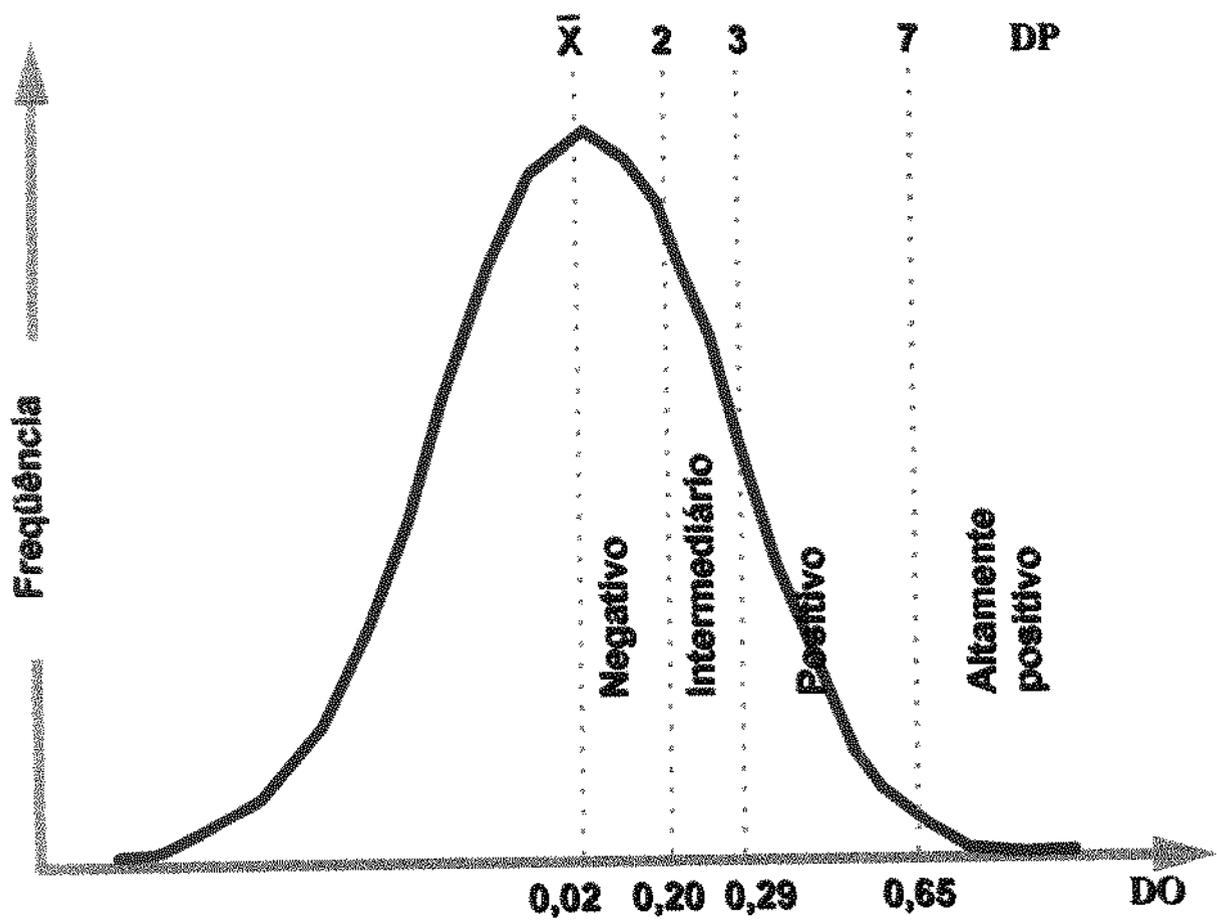
O valor de densidade óptica de cada paciente foi comparado com os valores dos pontos de corte estabelecidos com o ensaio de doadores normais. O resultado foi considerado intermediário quando a DO da paciente estava entre 2 e 3 DP do valor do ponto de corte parâmetro. Quando o valor da DO da paciente foi maior do que 3 DP, o resultado foi considerado positivo. Valores maiores que 7 DP foram considerados altamente positivos e valores abaixo de 2 DP, acima do

valor do ponto de corte, foram dados como negativos.

O valor de densidade óptica a partir do qual o ACL-IgM foi considerado presente foi de 0,17nm (Figura 2). Para o ACL-IgG, o valor de corte foi de 0,20nm (Figura 3).



**Figura 2 - Interpretação dos resultados - ACL-IgM**



**Figura 3 - Interpretação dos resultados - ACL-IgG**

### **3.3. Variáveis em estudo**

#### **3.3.1. Variável independente**

Anticorpo anticardiolipina: imunoglobulina que reage contra a cardiolipina, um fosfolípide carregado negativamente. Sua presença foi definida como identificação do anticorpo IgG ou IgM específico, pelo método ELISA.

#### **3.3.2. Variável dependente**

Aborto espontâneo recorrente: antecedente de três ou mais abortos espontâneos consecutivos, ou seja, eliminação por via vaginal de feto com peso inferior a 500g e/ou idade gestacional inferior a 20 semanas, com ou sem sinais de vitalidade, comprovados por curetagem uterina ou exame anatomopatológico do material.

### **3.4. Definição de conceitos**

Gestação bem-sucedida: gestação cujo parto de um nascido vivo tenha ocorrido após 37 semanas de idade gestacional ou com peso maior que 2500g e que não tenha evoluído para óbito antes de 28 dias de vida.

Óbito fetal: desaparecimento de qualquer sinal de vitalidade fetal anteriormente existente, após 20 semanas de idade gestacional e/ou peso maior que 500g.

Fenômeno tromboembólico: obstrução total ou parcial de veia ou artéria por trombo com comprometimento circulatório loco-regional, com ou sem a liberação de êmbolos para a circulação.

Hipertensão gestacional: hipertensão desenvolvida na gestação em paciente anteriormente normotensa, cujos níveis ultrapassem os valores de 130/90mmHg.

Má história obstétrica: antecedente de três ou mais perdas de fetos com mais de 20 semanas de idade gestacional e/ou peso maior que 500g.

Baixo peso ao nascer: peso inferior a 2500g, imediatamente após o nascimento.

### **3.5. Coleta de dados**

Na admissão ao estudo, foi preenchida, pela pesquisadora, uma ficha individual para cada paciente (ANEXO 1 para o Grupo 1 e ANEXO 2 para o Grupo 2), a qual foi complementada posteriormente com os dados relativos a exames laboratoriais.

As fichas foram arquivadas segundo o número da paciente no estudo, tendo as pacientes do Grupo 2 o mesmo número da paciente do Grupo 1, acrescido de 1000 para o primeiro e 2000 para o segundo. Assim, a paciente número 1 teve como correspondentes no Grupo 2 os números 1001 e 2001.

### **3.6. Tamanho da amostra**

Para o cálculo do tamanho da amostra, foram utilizadas as incidências do ACL na população geral e nas pacientes com AER descritas na literatura.

Para o cálculo da incidência do ACL na população geral, foi feita a média das incidências descritas em sete trabalhos selecionados segundo a

metodologia utilizada (HARMON, LEE, PROVOST, 1986; BRANCH, 1987; SCOTT, ROTE, BRANCH, 1987; McHUGH, KOMANN, BLAND, 1988; PATTISON, CHAMLEY, McKAY, 1988; LOCKWOOD et al., 1989; HARRIS et al., 1991). A média encontrada foi de 5,5%.

Para o cálculo da incidência do ACL nas pacientes com AER, foi usada a mesma metodologia (CLAUVEL et al., 1986; COWCHOCK, SMITH, GOCIAL, 1986; LOCKWOOD et al., 1986; PETRI et al., 1987; UNANDER et al., 1987; BARBUI et al., 1988; TCHOBROUTSKY, 1988). A média encontrada foi de 22,6%.

Foram então utilizadas as duas médias para o cálculo do tamanho amostral através do programa EPI INFO versão 5.00.

Utilizando o Erro Tipo I de 0,05 e Erro Tipo II de 0,20, foi encontrado um  $n=156$ . Considerando uma paciente do Grupo 1 para duas do Grupo 2, estudaram-se respectivamente 52 e 104 pacientes, com um total de 156 mulheres.

### **3.7. Processamento e análise dos dados**

Foi criado um banco de dados para armazenar as informações coletadas e os resultados de exames no programa "Data Entry" do software EPI-INFO versão 5.00.

A análise estatística foi feita através dos testes de Qui-Quadrado e Teste Exato de Fisher para o estudo da associação entre a presença do anticorpo anticardiolipina e o antecedente de aborto recorrente. Além disso, foi utilizado o teste t de Student para comparação de médias de variáveis contínuas.

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando os programas "Statcalc" e "Analysis" do software EPI-INFO versão 5.00.

As diferenças entre as variáveis foram consideradas estatisticamente significativas quando o p foi menor que 0,05.

### **3.8. Aspectos éticos**

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

Após a informação, através da qual as pacientes souberam que seria colhido sangue para um exame que não faz parte da rotina atual do Serviço, aquelas que aceitaram participar assinaram um "Consentimento Pós-Infirmação".

A coleta foi feita durante o atendimento ambulatorial, sendo retirada quantidade de sangue (5 a 10ml) não prejudicial à saúde da paciente. Não houve necessidade de mudança da rotina de atendimento e nem ônus para a paciente.

As fichas das pacientes foram identificadas por um anexo (ANEXO 4), no qual constavam nome, HC, número no estudo e data. Após a coleta de todos os dados, estes anexos foram eliminados, persistindo nas fichas apenas o número da paciente no trabalho, sem a sua identificação.

Como estava sendo instalado o laboratório e implantada a técnica para a dosagem dos anticorpos antifosfolípides, os resultados foram liberados lentamente. Foi solicitado às pacientes do Ambulatório de Aborto Recorrente que realizassem o exame em outros laboratórios qualificados para tal, para que a

assistência pudesse ser realizada mais prontamente, com maior segurança nos resultados.

Foram guardados os princípios enunciados na Declaração de Helsinkí, emendada pela 35<sup>a</sup> Assembléia Médica Mundial, em Veneza, Itália, em 1983.

## **RESULTADOS**

---

## 4. RESULTADOS

---

A média de idade e número de gestações das pacientes estudadas pode ser vista na TABELA 1. Pôde-se notar que as pacientes do Grupo 1 eram mais velhas do que as do Grupo 2, e esta diferença foi estatisticamente significativa. As pacientes do Grupo 1, que tinham pelo menos três abortos anteriores, apresentaram um número de gestações significativamente maior do que as pacientes do Grupo 2.

**TABELA 1**

**Média de idade e número de gestações das pacientes, segundo o grupo de estudo**

Característica	Grupo 1	Grupo 2	t
Idade	29,0	25,7	0,000732
Gestações	4,21	2,34	<0,0000001

Quanto à distribuição percentual das pacientes segundo a idade (TABELA 2), notou-se que a maioria delas encontrava-se na faixa de 21 a 30 anos. Das pacientes do Grupo 1, 44,2% tinham mais de 30 anos, enquanto apenas 19,2% das pacientes do Grupo 2 estavam nesta faixa etária.

**TABELA 2**  
**Distribuição percentual das pacientes estudadas por idade, segundo grupo de estudo**

Idade (anos)	Grupo 1	Grupo 2	p
16-20	3,9	16,4	0,00009
21-30	51,9	64,4	
31-42	44,2	19,2	
(n)	(52)	(104)	

A média de abortos anteriores das pacientes do Grupo 1 foi de 3,75, variando de 3 a 8. No Grupo 2, 81,7% das pacientes não tinham tido abortos. A distribuição percentual do número de abortos, segundo o grupo estudado, pode ser vista na TABELA 3.

**TABELA 3**  
**Distribuição percentual das pacientes por número de abortos anteriores,**  
**segundo grupo de estudo**

Abortos	Grupo 1	Grupo 2
0	-	81,7
1	-	15,4
2	-	2,9
3	61,6	-
4	19,2	-
5-8	19,2	-
(n)	(52)	(104)

Na TABELA 4, 78,9% das pacientes do Grupo 1 eram abortadoras primárias, ou seja, não tinham filhos vivos. Nas pacientes do Grupo 2, o número de nascidos vivos variou de 1 a 6, com média de 2. Nenhuma das pacientes deste grupo apresentava antecedente de aborto recorrente, óbito fetal de causa não esclarecida, hipertensão gestacional, episódios tromboembólicos, má história obstétrica ou filhos nascidos com menos de 2500g.

**TABELA 4**

**Distribuição percentual do número de filhos vivos das pacientes, segundo grupo de estudo**

Filhos vivos	Grupo 1	Grupo 2
0	78,9	-
1	15,4	39,4
2	3,8	31,7
3 ou mais	1,9	28,9
(n)	(52)	(104)

O anticorpo anticardiolipina esteve presente em 7,7% das pacientes do Grupo 1 e 8,7% das pacientes do Grupo 2, conforme mostrado na TABELA 5. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto à presença deste anticorpo.

**TABELA 5**  
**Distribuição percentual da presença do anticorpo anticardiolipina, segundo grupo de estudo**

ACL	Grupo 1	Grupo 2	p
Presente	7,7	8,7	N.S.*
Ausente	92,3	91,3	
(n)	(52)	(104)	

\* N.S. - Não-Significativo

Quando foi qualificada a presença do anticorpo anticardiolipina, dividindo-se os resultados em positivo e intermediário, verificou-se que houve mais pacientes com resultados intermediários no Grupo 2, mas esta diferença não alcançou significância estatística (TABELA 6).

**TABELA 6**  
**Distribuição percentual do anticorpo anticardiolipina, segundo grupo de estudo**

ACL	Grupo 1	Grupo 2	p
Positivo	50,0	22,2	N.S.*
Intermediário	50,0	78,8	
(n)	(04)	(09)	

\* N.S. - Não-Significativo

Estudando o isótipo do anticorpo anticardiolipina, observou-se, na TABELA 7, que a classe IgM esteve presente em três pacientes do Grupo 2 e em nenhuma paciente do Grupo 1. Não houve diferença estatística entre os dois grupos quando analisado o anticorpo anticardiolipina da classe IgM.

**TABELA 7**

**Distribuição percentual da presença do anticorpo anticardiolipina da classe IgM, segundo grupo de estudo**

ACL-IgM	Grupo 1	Grupo 2	p
Presente	-	2,9	N.S.*
Ausente	100,0	97,1	
(n)	(52)	(104)	

\* N.S. - Não-Significativo

A distribuição percentual do anticorpo anticardiolipina da classe IgM em resultados positivo, intermediário e negativo, segundo o grupo de estudo, pode ser vista na TABELA 8.

**TABELA 8**  
**Distribuição percentual do anticorpo anticardiolipina da classe IgM segundo grupo de estudo**

ACL-IgM	Grupo 1	Grupo 2	p
Positivo	-	1,0	N.S.*
Intermediário	-	2,0	
Negativo	100,0	97,0	
(n)	(52)	(101)	

\* N.S. - Não-Significativo

Da mesma forma, quando estudada a classe IgG, também não se encontrou diferença quanto à sua presença no Grupo 1 ou 2 (TABELA 9).

**TABELA 9**

**Distribuição percentual da presença do anticorpo anticardiolipina da classe IgG, segundo grupo de estudo**

ACL-IgG	Grupo 1	Grupo 2	p
Presente	7,7	5,8	N.S.*
Ausente	92,3	94,2	
(n)	(52)	(104)	

\* N.S. - Não-Significativo

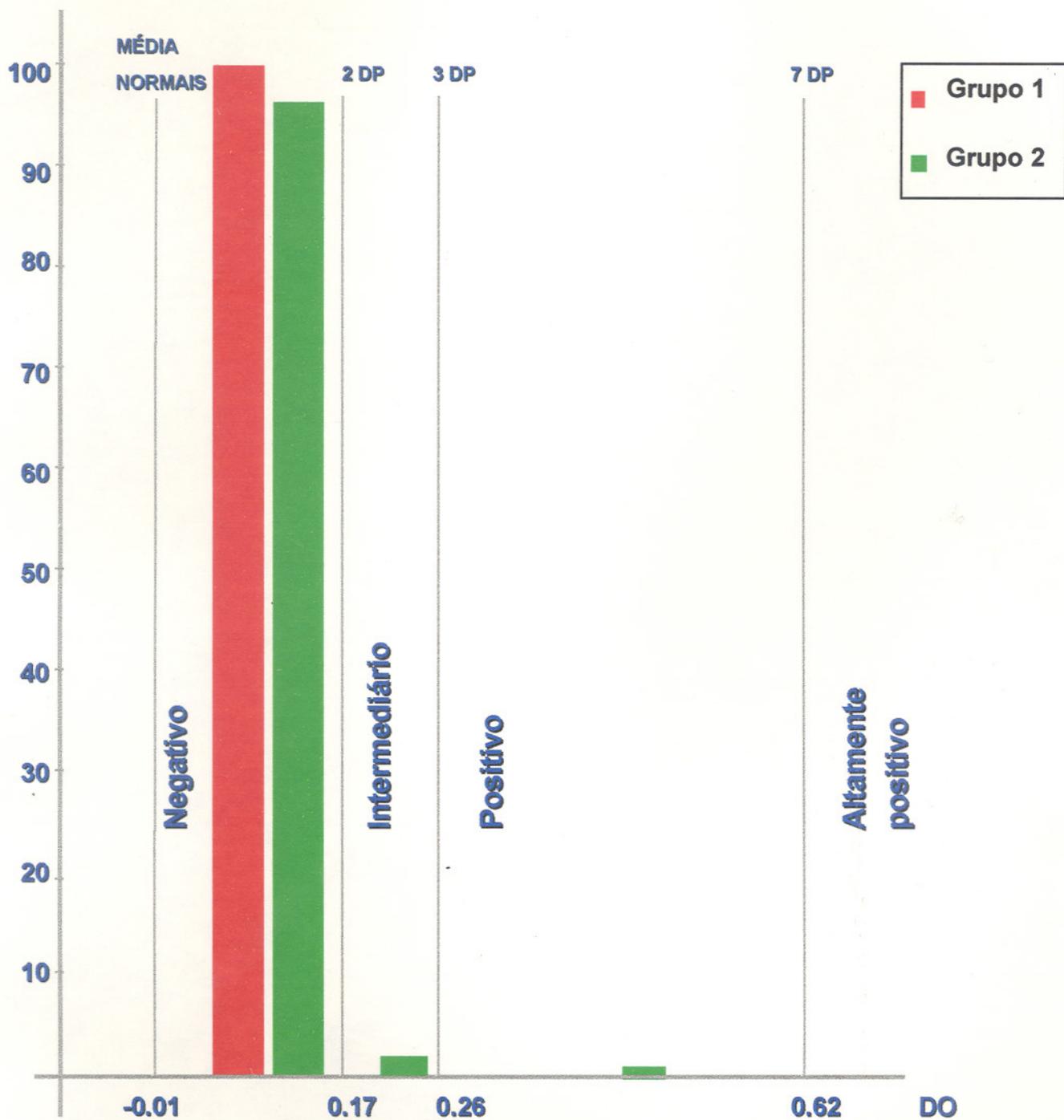
A distribuição percentual do anticorpo anticardiolipina da classe IgG em resultados positivo, intermediário e negativo, segundo o grupo de estudo, pode ser vista na TABELA 10.

**TABELA 10**  
**Distribuição percentual do anticorpo anticardiolipina da classe IgG, segundo grupo de estudo**

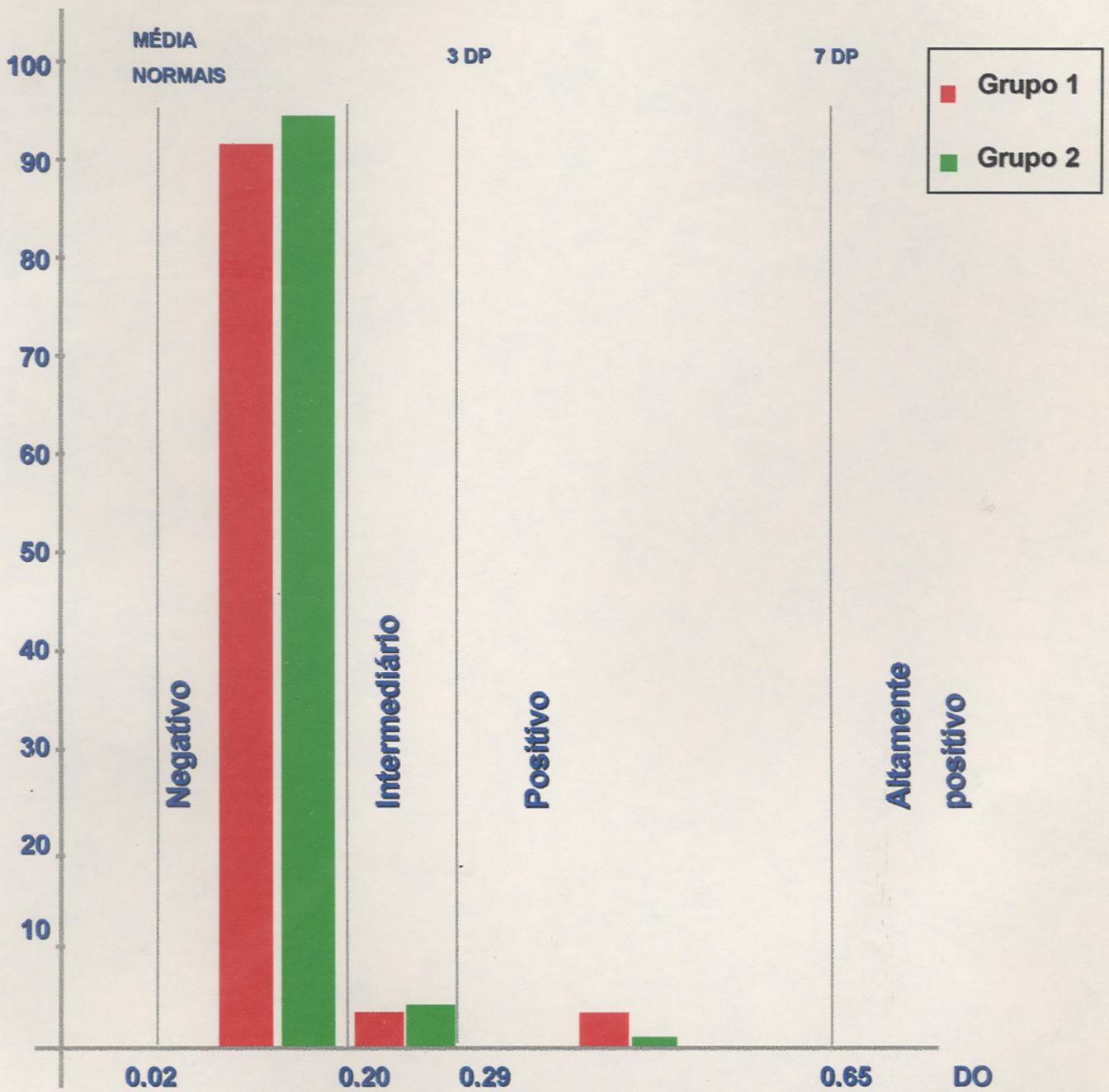
ACL-IgG	Grupo 1	Grupo 2	p
Positivo	3,8	1,0	N.S.*
Intrmediário	3,8	4,8	
Negativo	92,4	94,2	
(n)	(52)	(104)	

\* N.S. - Não-Significativo

Nas Figuras 4 e 5, pode ser vista a distribuição das pacientes segundo o valor da densidade óptica nos dois grupos, tanto para IgM quanto para IgG.



**Figura 4 - Distribuição percentual das pacientes segundo valor de D.O. para ACL-IgM.**



**Figura 5 - Distribuição percentual das pacientes pelo valor de D.O. para ACL-IgG.**

Quando comparadas as duas classes do anticorpo anticardiolipina (TABELA 11), vê-se que a totalidade de anticorpos presentes no Grupo 1 foi da classe IgG, enquanto 66,7% dos anticorpos presentes no Grupo 2 eram desta mesma classe. Entretanto, esta diferença também não foi estatisticamente significativa.

**TABELA 11**  
**Distribuição percentual da classe dos anticorpos anticardiolipina, segundo grupo de estudo**

Classe ACL	Grupo 1	Grupo 2	p
IgM	-	33,3	N.S.*
IgG	100,0	66,7	

\* N.S. - Não-Significativo

## **DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

---

Este estudo foi realizado para determinar a associação entre a presença do anticorpo anticardiolipina no sangue materno e o antecedente de aborto espontâneo recorrente.

O número médio de gestações foi maior nas pacientes do Grupo 1 do que nas do Grupo 2. Este resultado já era esperado, considerando que a definição de AER exige pelo menos três gestações anteriores com interrupção espontânea antes de 20 semanas. Por outro lado, o critério de seleção das pacientes do Grupo 2 era ter pelo menos uma gestação bem-sucedida prévia, permitindo a inclusão de 39,4% de primíparas no estudo.

Ao avaliar a idade das pacientes estudadas, pudemos notar que, no Grupo 1, 44% tinham mais de 30 anos e apenas duas pacientes tinham 20 anos ou menos. Isto é compreensível se considerarmos que, anteriormente aos 20 anos, a probabilidade de uma mulher já ter passado pela experiência de três abortos espontâneos é pequena.

As pacientes que compuseram o Grupo 1 foram selecionadas por terem como único critério três ou mais abortos espontâneos consecutivos. Não foram excluídas pacientes portadoras de outros fatores etiológicos rotineiramente pesquisados no Ambulatório de Aborto Recorrente - UNICAMP (genéticos, anatômicos, hormonais e infecciosos). Optou-se por não fazer esta seleção

porque poderia estar sendo gerada certa tendência para os resultados. A opção de não selecioná-las por outros critérios permite-nos uma visão geral do ACL nas pacientes com aborto espontâneo recorrente. Os fatores indicados na literatura como relacionados ao aborto recorrente são questionados (STIRRAT, 1992), e este foi outro motivo pelo qual não se fizeram restrições à seleção dos casos.

Para participar do Grupo 2, além de ter pelo menos uma gestação bem-sucedida, as pacientes foram submetidas a alguns critérios de exclusão: história de aborto espontâneo recorrente, óbito fetal de causa desconhecida, fenômenos tromboembólicos, hipertensão gestacional, má história obstétrica ou retardo de crescimento intra-uterino. Utilizamos estes itens para a exclusão porque todos eles, em um ou outro momento, já foram relacionados aos anticorpos antifosfolípidos (COSGRIFF & MARTIN, 1981; CARRERAS & VERMYLEN, 1982; SANFELIPPO & DRAYNA, 1982; HARRIS, 1987; LOCKSHIN et al., 1987; BRANCH et al., 1989; KAJINO, 1991).

O ACL foi encontrado em 7,7% das pacientes do Grupo 1. Este resultado coincide com aqueles apresentados na literatura (BARBUI et al., 1988; TRIPLETT, 1992). Entretanto, o ACL foi encontrado em 8,7% das pacientes do Grupo 2, o que não foi concordante com os dados de BRANCH (1987) e de PATTISON et al. (1988). Nestas séries, a incidência de AAF em populações obstétricas normais variou de 2,9% a 3,6%.

Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de ACL entre as mulheres que tinham como antecedente três ou mais abortos espontâneos (Grupo 1) e as que tinham pelo menos uma gestação bem-sucedida (Grupo 2).

Entre as pacientes do Grupo 1, 78,9% eram abortadoras primárias. Segundo COWCHOCK et al. (1986), mulheres com ACL são principalmente

abortadoras secundárias. Das quatro pacientes do Grupo 1 que apresentavam positividade para o ACL, apenas duas eram abortadoras secundárias.

Questionamos por que, nas pacientes por nós estudadas, não houve correlação entre o antecedente de aborto recorrente e a positividade para o anticorpo anticardiolipina. A população estudada parece apresentar algumas características imunológicas que a tornam diferente das populações analisadas por outros autores, quanto à capacidade de gerar anticorpos contra este fosfolípide. A miscigenação racial poderia levar a características genéticas não encontradas em populações predominantemente caucasianas, que são as principais populações analisadas na literatura (BRANCH et al., 1985; CLAUVEL et al., 1986; BARBUI et al., 1988; BOCCIOLONE et al., 1994). Além disso, a alimentação poderia contribuir para a ativação policlonal dos linfócitos B, assim como a flora intestinal, agressão externa e efeito de drogas (EL-ROEIY & GLEICHER, 1988).

Sabe-se que infecções podem levar à elevação dos AAF, principalmente da classe IgM. Isto decorre provavelmente de ativação policlonal dos linfócitos (GLEICHER, 1992; TRIPLETT, 1992). Conjecturamos que, como diferentes populações recebem diferentes estímulos imunológicos, desde imunizações até estímulos ambientais, a ativação linfocítica com produção de anticorpos poderia levar ao desenvolvimento de algum fator imunossupressor, o qual estaria presente mais tarde, quando a mãe entrasse em contato com tecidos fetais, levando a menor produção de AAF.

Outra hipótese considerada para explicar a não correlação entre aborto recorrente e o anticorpo anticardiolipina foi a questão técnica. Utilizamos a técnica descrita por TRIPLETT et al. (1993), no XIV Congresso da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia, e os soros de calibração de HARRIS (ANEXO 5).

Para a realização do ELISA, utilizaram-se poços neutros, nos quais eram colocados todos os componentes, exceto a cardiolipina. A ligação destes poços era subtraída da ligação total, o que conferia especificidade ao método.

Resultados falso-positivos podem ocorrer quando não se subtrai a inespecificidade dos poços neutros. Isto é freqüente em pacientes com hipergamaglobulinemia, nas quais os resultados falso-positivos podem surgir quando utilizamos um método com alta sensibilidade, como o ELISA. Para evitar que isto aconteça, é necessário subtrair a absorbância de poços sem cardiolipina, para retirar a ligação inespecífica das imunoglobulinas (LENZI, RAND, SPIERA, 1986).

A escolha do tampão para diluir as amostras e bloquear ligações inespecíficas permanece em discussão (RUPIN et al., 1991). Utilizamos soro fetal bovino como bloqueador de ligação inespecífica, conforme recomendação de uma reunião de trabalho de laboratórios europeus e americanos (HARRIS, 1987). A albumina sérica bovina a 1% parece reagir mais efetivamente, mas, por razões não esclarecidas, o soro bovino fetal a 10% e o soro bovino adulto a 10% fornecem melhor discriminação entre os resultados positivos e negativos (HARRIS & PHIL, 1990b).

O tempo de incubação também é importante. Segundo HARRIS & PHIL (1990b), tempos de incubação inferiores a uma hora não são suficientes para que seja atingido o equilíbrio entre o antígeno e o anticorpo. Por outro lado, períodos muito longos podem levar ao aumento da ligação inespecífica. Utilizamos o período de incubação de uma hora e meia.

A interpretação dos resultados obtidos também é fator de discussão na literatura. TRIPLETT et al. (1993) sugeriram que os resultados fossem expressos em unidades MPL e GPL. Estas são unidades de medida: GPL para ACL-IgG e

MPL para ACL-IgM. Uma unidade GPL equivale a 1µg/ml de uma amostra-padrão purificada de IgG - o mesmo é válido para IgM (HARRIS & PHIL, 1990b). Além disso, na técnica por nós utilizada (TRIPLETT et al., 1993), a média de doadores normais deve ser calculada e, a partir dela, os resultados são expressos em função do desvio-padrão. Utilizamos a média da densidade óptica obtida de 40 doadoras normais e, a partir dela, calculamos o desvio-padrão para obter resultados qualitativos, já que tínhamos como objetivo estabelecer uma relação entre a presença ou ausência dos ACL e os antecedentes gestacionais, e não estabelecer faixas de positividade, o que ocorreria se utilizássemos unidades MPL e GPL.

Existem limitações para a comparação de resultados do ACL na literatura, como frisado por COSTA (1994): os métodos utilizados para a detecção dos anticorpos antifosfolípidos variam nos diferentes estudos; muitos estudos abordam pacientes com apenas um ou dois abortos anteriores (BARBUI et al., 1988; SANCHEZ-GUERRERO & ALARCÓN-SEGOVIA, 1992); outros fatores etiológicos entram, às vezes, como critérios de inclusão (LUBBE et al., 1984); outras vezes como critérios de exclusão (BARBUI et al., 1988). A definição "liberal" dos resultados positivos e a falta de uniformização dos testes para o anticorpo anticardiolipina e o anticoagulante lúpico tornam difícil uma real comparação dos resultados (HARRIS, 1990).

A implantação da técnica laboratorial foi realizada em função deste projeto de estudo. A importação dos reagentes e material, instalação do laboratório e outras dificuldades técnicas fizeram com que a liberação dos resultados fosse gradual. Para que a assistência pudesse ser realizada mais segura e prontamente, as pacientes foram orientadas a realizar a pesquisa do anticorpo anticardiolipina em outros laboratórios. Assim, ainda que não

tivéssemos como objetivo este tipo de comparação, pudemos notar coincidência entre os nossos resultados e aqueles obtidos em outros laboratórios para as pacientes do Grupo 1 (ANEXO 6), o que também serviu para corroborar a técnica por nós utilizada.

HARRIS (1990) referiu que complicações como perdas gestacionais não parecem estar relacionadas com o nível dos anticorpos. Entretanto, KWAK et al. (1994), estudando o nível de AAF em mulheres com antecedente de AER antes e depois da gestação, notaram aumento importante no nível dos anticorpos à época dos abortos, o que não ocorreu em mulheres que tinham filhos nascidos vivos.

A flutuação dos níveis dos AAF durante a gestação e fora dela ainda não está bem estabelecida. Pode ser que uma amostra isolada não reflita o real estado imunológico da paciente que tem antecedente de AER, ou que os níveis dos anticorpos, que ascendem durante o processo de abortamento, atinjam níveis próximos da normalidade durante o período intergestacional. Neste trabalho, controlou-se apenas o tempo decorrido entre o parto e a coleta de sangue das pacientes do Grupo 2, mas não o tempo decorrido entre o último aborto e a coleta do sangue das pacientes do Grupo 1. Este fator talvez possa ter influenciado os resultados obtidos, e nova pesquisa controlando o tempo após o aborto pode ser sugerida.

A alteração de função do linfócito B, que culmina com a produção anormal de auto-anticorpos, é resultado de um evento policlonal (GLEICHER, 1994). A investigação seletiva do ACGL ou de um único auto-anticorpo pode detectar apenas um espectro limitado da anormalidade da célula B (GLEICHER, 1990).

Pacientes com níveis alterados de ACGL ou auto-anticorpos, que abortam, podem não demonstrar estas anormalidades antes da concepção. Para GLEICHER (1990), aproximadamente 20% de todas as mulheres com anormalidades de auto-anticorpos não as demonstram até a concepção.

KONIDARIS et al. (1994), comparando resultados de auto-anticorpos entre mulheres que tinham três ou mais abortos recorrentes e controles, não encontraram diferença estatística na frequência dos anticorpos, quando estudados separadamente. O ACL da classe IgM foi, para estes pesquisadores, o melhor método para prever a perda fetal. Quando avaliado o ACL da classe IgG, não foram encontradas diferenças entre os dois grupos.

A variabilidade dos resultados pode também ser produto dos valores de corte estabelecidos (MOLTA et al., 1993). Assim, em 1990, LOVE & SANTORO revisaram 29 séries publicadas (total de 1000 pacientes com LES) e encontraram prevalência de 34% para o ACGL e 44% para o ACL. VIANA et al. (1992), que consideravam como positivos valores acima de cinco desvios-padrões, encontraram prevalência de 14% para o ACL em uma série de 95 pacientes lúpicas.

Para que a pesquisa de ACL por ELISA apresente maior especificidade, devem ser adotados critérios rígidos de positividade. Quanto mais altos os valores encontrados de anticorpos circulantes, maior a correlação clínica com complicações gestacionais como AER (KWAK et al., 1994). No presente estudo, foram considerados positivos valores acima de três desvios-padrões acima da média, e altamente positivos valores acima de sete desvios-padrões acima da média. Resultados entre dois e três desvios-padrões acima da média foram considerados intermediários e, abaixo de dois desvios-padrões, negativos, segundo técnica descrita por TRIPLETT et al. (1993).

Os antígenos leucocitários podem estar relacionados com a expressão dos AAF. Assim, mulheres que têm o HLA DQalfa0501, e cujos fetos são genotipicamente semelhantes, são de risco para o desenvolvimento de auto-anticorpos contra moléculas de fosfolípidos e podem abortar, apesar da terapia (KWAK et al., 1992).

De acordo com KWAK et al. (1994), é possível que certos genótipos materno-fetais, especialmente aqueles que envolvem os antígenos DQalfa e DQbeta, sejam inaceitáveis para o organismo materno.

Podemos questionar se, em uma mãe com um tipo específico de HLA-DQ, pode haver um processo auto-imune durante a gestação, levando a maior risco de desenvolvimento de auto-anticorpos.

MacLEAN et al. (1994), estudando a prevalência do ACGL e ACL em mulheres com história de abortos de primeiro trimestre, questionaram a relação entre os AAF e os abortos. Referiram que não se pode concluir se eles são causa ou marcadores das perdas, ou se eles se desenvolvem como consequência do processo de aborto. Contudo, confirmaram a existência de uma relação entre os AAF e abortos de primeiro trimestre. Parece não haver evidências conclusivas de que os AAF são causa direta destas complicações, mas vários dados sugerem participação dos anticorpos na patogênese das perdas (HARRIS, 1990).

A relação entre o ACL e a perda fetal ainda é conflitante (HARRIS & PHIL, 1988). Nossos resultados nos levam a questionar algumas "verdades" estabelecidas com relação à associação entre o ACL e AER, principalmente se a pesquisa do anticorpo é realizada independentemente da avaliação de outros fatores de risco para aborto.

Há um longo caminho a percorrer no âmbito da Imunologia da Reprodução. A associação entre a presença do ACL e AER pode ser influenciada por vários outros fatores além da presença isolada do anticorpo. Resta-nos continuar investigando.

## **CONCLUSÕES**

---

## 6. CONCLUSÕES

---

- 6.1.** Não foi encontrada associação entre a presença do anticorpo anticardiolipina e o antecedente de aborto espontâneo recorrente.
- 6.2.** O anticorpo anticardiolipina esteve presente em 7,7% das pacientes com antecedente de AER e em 8,7% das pacientes que tinham pelo menos um filho vivo.
- 6.3.** A frequência com que os anticorpos anticardiolipina estiveram presentes nas mulheres com antecedente de AER não diferiu significativamente daquela entre as mulheres que tinham pelo menos uma gestação bem-sucedida;
- 6.4.** Não houve diferença significativa na frequência de positividade de anticorpos anticardiolipina da classe IgM entre os dois grupos estudados;
- 6.5.** Não houve diferença significativa na frequência de positividade de anticorpos anticardiolipina da classe IgG entre os dois grupos estudados.

**ANEXOS**

---

## 7. ANEXOS

---

### ANEXO 1

ESTUDO COMPARATIVO DA FREQUÊNCIA DO ANTICORPO  
ANTICARDIOLIPINA EM MULHERES COM ABORTO RECORRENTE E  
MULHERES FÉRTEIS

#### GRUPO 1

1. N

2. DATA DE ADMISSÃO

3. IDADE

4. PARIDADE G\_\_P\_\_AE\_\_AP\_\_Cs\_\_FV\_\_NM\_\_

5. ANTICORPO ANTICARDIOLIPINA:  POSITIVO  IgG  IgM  
 INTERMEDIÁRIO  IgG  IgM  
 NEGATIVO

## ANEXO 2

### ESTUDO COMPARATIVO DA FREQUÊNCIA DO ANTICORPO ANTICARDIOLIPINA EM MULHERES COM ABORTO RECORRENTE E MULHERES FÉRTEIS

#### GRUPO 2

1. N

2. DATA DE ADMISSÃO

3. IDADE

4. PARIDADE G\_\_P\_\_AE\_\_AP\_\_Cs\_\_FV\_\_NM\_\_

5. ANTICORPO ANTICARDIOLIPINA:  POSITIVO  IgG  IgM  
 INTERMEDIÁRIO  IgG  IgM  
 NEGATIVO

### ANEXO 3

## ESTUDO COMPARATIVO DA FREQUÊNCIA DO ANTICORPO ANTICARDIOLIPINA EM MULHERES COM ABORTO RECORRENTE E MULHERES FÉRTEIS

### CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, \_\_\_\_\_,  
aceito colaborar com um trabalho que está sendo realizado na Divisão de Obstetrícia do CAISM. Para isso, sei que colherão 5 a 10ml do meu sangue, que não vai prejudicar a minha saúde, nem o meu tratamento.

Fui informada de que não terei benefício imediato com este trabalho, mas que posso ajudar a estudar uma doença nova. Está claro para mim que poderei desistir de participar do trabalho a qualquer hora, e que isto não irá prejudicar o meu atendimento.

Campinas, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 1994.

---

Nome e assinatura da paciente

---

Nome e assinatura do médico

## ANEXO 4

ESTUDO COMPARATIVO DA FREQUÊNCIA DO ANTICORPO  
ANTICARDIOLIPINA EM MULHERES COM ABORTO RECORRENTE E  
MULHERES FÉRTEIS

### IDENTIFICAÇÃO

NOME \_\_\_\_\_ HC \_\_\_\_/\_\_\_\_

Nº NO ESTUDO  DATA \_\_/\_\_/\_\_

## ANEXO 5

### SOROS DE CALIBRAÇÃO DE HARRIS

Amostra positiva: LAPL - MP - 005

Lote # 1245LPH

LAPL - GP - 005

Lote # 3866BKH

Antiphospholipid Standardization Laboratory

University of Louisville

Medical Dental Research Building

511 South Floyd St.

Louisville, KY 40202

## ANEXO 6

TABELA 12

Distribuição percentual dos resultados obtidos na UNICAMP e em laboratórios fora da UNICAMP, para o Grupo 1

Resultado ACL	UNICAMP	Fora da UNICAMP	p
Positivo	7,7	1,9	N.S.
Negativo	92,3	98,1	
(n)	(52)	(52)	

N.S. - Não-Significativo

## **SUMMARY**

---

## 8. SUMMARY

---

Current medical literature indicates that a group of women with recurrent spontaneous abortion (RSA) are carriers of the anticardiolipin antibody (ACA). It has been suggested that this antibody is related to the etiology of RSA. A clinical-controlled study was performed including 52 women with RSA and 104 women with at least one live born child, to determine the association between the positivity for ACA and RSA. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay was used to identify the presence of ACA and the immunoglobulin subtype: IgM or IgG. Statistical analysis was performed using Chi-square, Fisher's Exact Test and "t" Student test to compare the mean differences between the two groups. No statistical differences were detected on the frequency of ACA, between women with RSA and women with fertile past history, both for IgM and IgG.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

---

- ALMESHARI, K.; ALFURAYH, O.; AKHTAR, M. - Primary antiphospholipid syndrome and self-limited renal vasculitis during pregnancy: case report and review of the literature. **Am. J. Kidney Dis.**, **24**:505-8, 1994.
- ARTHURS, M.; MORGAN, O.S.C.; DECEULAER, K.; BROWNE, B. - Primary antiphospholipid syndrome: a case report. **West Indian Med. J.**, **43**:27-9, 1994.
- ASHERSON, R.A. & CERVERA, R. - "Primary", "secondary" and other variants of the antiphospholipid syndrome. **Lupus**, **3**:293-8, 1994.
- BARBUI, T.; RADICI, E.; CORTELAZZO, S.; ROSSI, E.; GALLI, M.; FINAZZI, G.; PARAZZINI, F. - Antiphospholipid antibodies in early repeated abortions: a case-controlled study. **Fertil. Steril.**, **50**:589-92, 1988.
- BARINI, R.; KWAK-KIM, J.Y.H.; BEER, A.E. - Imunologia da Reprodução. In: NEME, B., ed. - **Obstetricia básica**. São Paulo, Sarvier, 1994. p. 938-945.
- BARROS, V.I.P.V.L. - **Correlações anátomo-clínicas de placentas de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico**. São Paulo, 1994. [Tese Mestrado - Universidade de São Paulo]

---

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

- BEER, A.E.; QUEBBEMAN, J.F.; AYERS, J.W.T.; HAINES, R.F. - Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **141**:987-99, 1981.
- BOCCIOLONE, L.; MERONI, P.; PARAZZINI, F.; TINCANI, A.; RADICI, E.; TARANTINI, M.; ROSSI, E.; BIANCHI, C.; MEZZANOTTE, C.; D'ANGELO, A. - Antiphospholipid antibodies and risk of intrauterine late fetal death. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, **73**:389-92, 1994.
- BOWIE, E.J.W.; THOMPSON, J.H.; PASCUZZI, C.A.; OWEN, C.A. - Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. **J. Lab. & Clin. Med.**, **62**:416-30, 1963.
- BRANCH, D.W.; SCOTT, J.R.; KOCHENOUR, N.K.; HERSHGOLD, E. - Obstetric complications associated with the lupus anticoagulant. **N. Engl. J. Med.**, **313**:1322-6, 1985.
- BRANCH, D.W. - Immunologic disease and fetal death. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **30**:295-311, 1987.
- BRANCH, D.W.; ANDRES, R.; DIGRE, K.B.; ROTE, N.S.; SCOTT, J.R. - The association of antiphospholipid antibodies with severe preeclampsia. **Obstet. Gynecol.**, **73**:541-5, 1989.
- BRANCH, D.W.; SILVER, R.M.; BLACKWELL, J.L.; READING, J.C.; SCOTT, J.R. - Outcome of treated pregnancies in women with antiphospholipid syndrome: an update of the Utah experience. **Obstet. Gynecol.**, **80**:614-20, 1992.
- BROWN, H.L. - Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **34**:17-26, 1991.
- CANOSO, R.T.; ZON, L.I.; GROOPMAN, J.E. - Anticardiolipin antibodies associated with HTLV-III infection. **Br. J. Haematol.**, **65**:495-8, 1987.

- CARRERAS, L.O. & VERMYLEN, J.G. - "Lupus" anticoagulant and thrombosis: possible role of inhibition of prostacyclin formation. **Thromb. Haemost.**, **48**:38-40, 1982.
- CARUSO, A.; DE CAROLIS, S.; FERRAZZANI, S.; VALESINI, G.; CAFORIO, L.; MANCUSO, S. - Pregnancy outcome in relation to uterine artery flow velocity waveforms and clinical characteristics in women with antiphospholipid syndrome. **Obstet. Gynecol.**, **82**:970-7, 1993.
- CLAUVEL, J.P.; TCHOBROUTSKY, C.; DANON, F.; SULTAN, Y.; INTRATOR, L.; BROUET, J.C. - Spontaneous recurrent fetal wastage and autoimmune abnormalities: a study of fourteen cases. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **39**:523-30, 1986.
- CONLEY, C.L. & HARTMANN, R.C. - A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. **J. Clin. Invest.**, **31**:621-2, 1952.
- COSGRIFF, T.M. & MARTIN, B.A. - Low functional and high antigenic antithrombin III level in a patient with the lupus anticoagulant and recurrent thrombosis. **Arthritis Rheum.**, **24**:94-6, 1981.
- COSTA, H.L.F. - **Autoimunidade e perda conceptual**. Ribeirão Preto, 1994.  
[Tese - Doutorado - Universidade de São Paulo]
- COSTA, H.L.F.F.; MOURA, M.D.; FERRIANI, R.A.; ANCESCHI, M.I.S.; BARBOSA, J.E. - Prevalence of anti-cardiolipin antibody in habitual aborters. **Gynecol. Obstet. Invest.**, **36**:221-5, 1993.
- COWCHOCK, S.; DEHORATIUS, R.D.; WAPNER, R.J.; JACKSON, L.G. - Subclinical autoimmune disease an unexplained abortion. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **150**:367-71, 1984.
- COWCHOCK, S.; SMITH, J.B.; GOCIAL, B. - Antibodies to phospholipids and nuclear antigens in patients with repeated abortions. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **155**:1002-10, 1986.

- CRONIN, M.E.; BISWAS, R.M.; VAN DER STRAETON, C.; FLEISHER, T.A.; KLIPPEL, J.H. - IgG and IgM anticardiolipin antibodies in patients with lupus with anticardiolipin antibody associated clinical syndromes. **J. Rheumatol.**, **15**:795-8, 1988.
- DE WOLF, F.; CARRERAS, L.O.; MOERMAN, P.; VERMYLEN, J.; VAN ASSCHE, A.; RENAER, M. - Decidual vasculopathy and extensive placental infarction in a patient with repeated thromboembolic accidents, recurrent fetal loss, and a lupus anticoagulant. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **142**:829-34, 1982.
- DEACON, W.E.; LUCAS, J.B.; PRICE, E.V. - Fluorescent treponemal antibody-absorption (FTA-Abs) test for syphilis. **JAMA**, **198**:624-8, 1966.
- DIEZ-EWALD, M. - Anticuerpos antifosfolípidos. Revisión. **Invest. Clin.**, **34**:143-58, 1993.
- DRUZIN, M.L.; LOCKSHIN, M.; EDERSHEIM, T.G.; HUTSON, J.M.; KRAUSS, A.L.; KOGUT, E. - Second-trimester fetal monitoring and preterm delivery in pregnancies with systemic lupus erythematosus and/or circulating anticoagulant. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **157**:1503-10, 1987.
- EL-ROEIY, A. & GLEICHER, N. - Definition of normal autoantibody levels in an apparently healthy population. **Obstet. Gynecol.**, **72**:596-602, 1988.
- ERLENDSSON, K.; STEINSSON, K.; JÓHANNSSON, J.H.; GEIRSSON, R.T. - Relation of antiphospholipid antibody and placental bed inflammatory vascular changes to the outcome of pregnancy in successive pregnancies of 2 women with systemic lupus erythematosus. **J. Rheumatol.**, **20**:1779-85, 1993.
- FEINSTEIN, D.I. & RAPAPORT, S.I. - Acquired inhibitions of blood coagulation. In: SPART, T. H., ed. - **Progress in hemostasis and thrombosis**. vol. 1. New York: Grune and Stratton, 1972. p. 75-95.
- FEINSTEIN, D.I. - Lupus anticoagulant, thrombosis, and fetal loss. **N. Engl. J. Med.**, **313**:1348-50, 1985. [Letter]

- FIRKIN, B.G.; HOWARD, M.A.; RADFORD, N. - Possible relationship between lupus inhibitor and recurrent abortion in young women. **Lancet**, **2**:366, 1980. [Letter]
- FREYSSINET, J.-M.; WIESEL, M.-L.; GAUCHY, J.; BONEU, B.; CAZENAVE, J.-P. - An IgM lupus anticoagulant that neutralizes the enhancing effect of phospholipid on purified endothelial thrombomodulin activity - a mechanism for thrombosis. **Thromb. Haemost.**, **55**:309-13, 1986.
- FRICK, P.G. - Acquired circulating anticoagulants in systemic "collagen disease": auto-immune thromboplastin deficiency. **Blood**, **10**:691-706, 1955.
- GALLI, M.; COMFURIUS, P.; MAASSEN, C.; HEMKER, H.C.; DE BAETS, M.H.; VAN BREDA-VRIESMAN, P.J.C.; BARBUI, T.; ZWAAL, R.F.A.; BEVERS, E.M. - Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. **Lancet**, **335**:1544-7, 1990.
- GEVA, E.; YARON, Y.; LESSING, J.B.; YOVEL, I.; VARDINON, N.; BURKE, M.; AMIT, A. - Circulating autoimmune antibodies may be responsible for implantation failure in in vitro fertilization. **Fertil. Steril.**, **62**:802-6, 1994.
- GIACOMUCCI, E.; BULLETTI, C.; POLLI, V.; PREFETTO, R.A.; FLAMIGNI, C. - Immunologically mediated abortion (IMA). **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, **49**:107-21, 1994.
- GLEICHER, N. & FRIBERG, J. - IgM gammopathy and the lupus anticoagulant syndrome in habitual aborters. **JAMA**, **253**:3278-81, 1985.
- GLEICHER, N. - Immunology of pregnancy: the relationship to autoimmune pathology. In: SCOTT, J.S. & BIRD, H.A., eds. - **Pregnancy, autoimmunity and connective tissue disorders**. 1. ed. New York, Oxford University Press, 1990. p. 1-14.
- GLEICHER, N. - Autoimmunity. In: \_\_\_\_\_, ed. - **Principles and practice of medical therapy in pregnancy**. 2. ed. New York, Appleton & Lange, 1992. p. 413-21.

- GLEICHER, N.; HARLOW, L.; ZILBERSTEIN, M. - Regulatory effect of antiphospholipid antibodies on signal transduction: a possible model for autoantibody-induced reproductive failure. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **167**:637-42, 1992.
- GLEICHER, N. - Autoantibodies and pregnancy loss. **Lancet**, **343**:747-8, 1994. [Commentary]
- HARMON, C.E.; LEE, L.A.; PROVOST, T.T. - Anticardiolipin antibodies in normal and lupus pregnancies. **Arthritis Rheum.**, **29**:S96, 1986. [Abstract]
- HARRIS, E.N.; GHARAVI, A.E.; BOEY, M.L.; PATEL, B.M.; MACKWORTH-YOUNG, C.G.; LOIZOU, S.; HUGHES, G.R.V. - Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. **Lancet**, **2**:1211-4, 1983.
- HARRIS, E.N. - Antiphospholipid antibodies. **Br. J. Haematol.**, **74**:1-9, 1990. [Annotation]
- HARRIS, E.N.; GHARAVI, A.E.; HUGHES, G.R.V. - Anti-phospholipid antibodies. In: WILLIAMS, R.C., ed. - **Clinics of rheumatic diseases**. London, W B Saunders, 1985. v. 11. p. 591-609.
- HARRIS, E.N. & PHIL, M. - The second international anti-cardiolipin standardization workshop / The Kingston anti-phospholipid antibody study (KAPS) group. **Am. J. Clin. Pathol.**, **94**:476-84, 1990a.
- HARRIS, E.N.; PHIL, M.; SPINNATO, J.A. - Should anticardiolipin tests be performed in otherwise healthy pregnant women ? **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **165**:1272-7, 1991.
- HARRIS, E.N. & PHIL, M. - Solid-phase anti-cardiolipin test revisited. **Am. J. Med.**, **85**:599-601, 1988. [Editorial]
- HARRIS, E.N. - Syndrome of the black swan. **Br. J. Rheumatol.**, **26**:324-6, 1987. [Editorial]

- HARRIS, E.N. & PHIL, M. - A reassessment of the antiphospholipid syndrome. **J. Rheumatol.**, **17**:733-5, 1990b. [Editorial]
- HARRIS, E.N.; PHIL, M.; CHAN, J.K.H.; ASHERSON, R.A.; ABER, V.R.; GHARAVI, A.E.; HUGHES, G.R.V. - Thrombosis, recurrent fetal loss, and thrombocytopenia: predictive value of the anticardiolipin antibody test. **Arch. Intern. Med.**, **146**:2153-6, 1986.
- HASERICK, J.R. & LONG, R. - Systemic lupus erythematosus preceded by false-positive serologic tests for syphilis: presentation of five cases. **Ann. Intern. Med.**, **37**:559-65, 1952.
- HOCHFELD, M.; DRUZIN, M.L.; MAIA, D.; WRIGHT, J.; LAMBERT, R.E.; McGUIRE, J. - Pregnancy complicated by primary antiphospholipid antibody syndrome. **Obstet. Gynecol.**, **83**:804-5, 1994.
- HUGHES, G.R.V. - Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. **Br. Med. J.**, **287**:1088-9, 1983.
- INBAR, O.; BLANK, M.; FADEN, D.; TINCANI, A.; LORBER, M.; SHOENFELD, Y. - Prevention of fetal loss in experimental antiphospholipid syndrome by low-molecular-weight heparin. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **169**:423-6, 1993.
- INFANTE-RIVARD, C.; DAVID, M.; GAUTHIER, R.; RIVARD, G.-E. - Lupus anticoagulants, anticardiolipin antibodies, and fetal loss. A case-control study. **N. Engl. J. Med.**, **325**:1063-6, 1991.
- KAJINO, T. - Polyclonal activation of IgM antibodies to phospholipids in patients with idiopathic fetal growth retardation. **Am. J. Reprod. Immunol.**, **25**:28-34, 1991.
- KAMPE, C.E. - Clinical syndromes associated with lupus anticoagulants. **Semin. Thromb. Hemost.**, **20**:16-26, 1994.

- KOCHENOUR, N.K.; BRANCH, D.W.; ROTE, N.S.; SCOTT, J.R. - A new postpartum syndrome associated with antiphospholipid antibodies. **Obstet. Gynecol.**, **69**:460-8, 1987.
- KONIDARIS, S.; PAPADIAS, K.; GREGORION, O.; GARGAROPOULOS, A.; DALMAGA, A.; MANTZAVINOS, T. - Immune dysfunction in patients with unexplained repeated abortions. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, **45**:221-6, 1994.
- KUPFERMINC, M.J.; LEE, M.-J.; GREEN, D.; PEACEMAN, A.M. - Severe postpartum pulmonary, cardiac, and renal syndrome associated with antiphospholipid antibodies. **Obstet. Gynecol.**, **83**:806-7, 1994.
- KWAK, J.Y.H.; OBER, C.; BARINI, R.; BEER, A.E. - Maternal autoimmune abnormalities and fetal HLA-DQ A1 alleles in women with recurrent spontaneous abortion (RSA). In: **Proceedings of the thirty-ninth annual meeting of the Society for Gynecologic Investigation**. San Antonio, Texas, March 18-21, San Antonio: Society for Gynecologic Investigation, 1992. p. 363.
- KWAK, J.Y.H.; BARINI, R.; GILMAN-SACHS, A.; BEAMAN, K.D.; BEER, A.E. - Down-regulation of maternal antiphospholipid antibodies during early pregnancy and pregnancy outcome. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **171**:239-46, 1994.
- LECHNER, K. - Acquired inhibitors in nonhemophilic patients. **Haemostasis**, **3**:65-93, 1974.
- LENZI, R.; RAND, J.H.; SPIERA, H. - Anticardiolipin antibodies in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. **N. Engl. J. Med.**, **314**:1392-3, 1986.
- LOCKSHIN, M.D.; DRUZIN, M.L.; GOEI, S.; QAMAR, T.; MAGID, M.S.; JOVANOVIC, L.; FERENC, M. - Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. **N. Engl. J. Med.**, **313**:152-6, 1985.

- LOCKSHIN, M.D.; QAMAR, T.; DRUZIN, M.L.; GOEI, S. - Antibody to cardiolipin, lupus anticoagulant and fetal death. **J. Rheumatol.**, **14**:259-62, 1987.
- LOCKSHIN, M.D. - Anticardiolipin antibody. **Arthritis Rheum.**, **30**:471-2, 1987.  
[Editorial]
- LOCKSHIN, M.D.; DRUZIN, M.L.; QAMAR, T. - Prednisone does not prevent recurrent fetal death in women with antiphospholipid antibody. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **160**:439-43, 1989.
- LOCKSHIN, M.D.; QAMAR, T.; LEVY, R.A. - Anticardiolipin and related antibodies: thrombosis and fetal death. In: SCOTT, J.S. & BIRD, H.A., eds. - **Pregnancy, autoimmunity, and connective tissue disorders**. 5. ed. Oxford, Oxford University Press, 1990. p. 185-211.
- LOCKWOOD, C.J.; REECE, E.A.; ROMERO, R.; HOBBS, J.C. - Anti-phospholipid antibody and pregnancy wastage. **Lancet**, **1**:742-3, 1986.
- LOCKWOOD, C.J.; ROMERO, R.; FEINBERG, R.F.; CLYNE, L.P.; COSTER, B.; HOBBS, J.C. - The prevalence and biologic significance of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in a general obstetric population. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **161**:369-73, 1989.
- LOIZOU, S.; McCREA, J.D.; RUDGE, A.C.; REYNOLDS, R.; BOYLE, C.C.; HARRIS, E.N. - Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. **Clin. Exp. Immunol.**, **62**:738-45, 1985.
- LOVE, P.E. & SANTORO, S.A. - Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders: prevalence and clinical significance. **Ann. Inter. Med.**, **112**:682-98, 1990.
- LUBBE, W.F.; WALKOM, P.; ALEXANDER, C.J. - Hepatic and splenic haemorrhage as a complication of toxemia of pregnancy in a patient with circulating lupus anticoagulant. **N. Z. Med. J.**, **95**:842-4, 1982.

- LUBBE, W.F.; BUTLER, W.S.; PALMER, S.J.; LIGGINS, G.C. - Fetal survival after prednisone suppression of maternal lupus-anticoagulant. **Lancet**, 1:1361-3, 1983.
- LUBBE, W.F. & WALKER, E.B. - Chorea gravidarum associated with circulating lupus anticoagulant: successful outcome of pregnancy with prednisone and aspirin therapy: case report. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, 90:487-90, 1983.
- LUBBE, W.F.; BUTLER, W.S.; PALMER, S.J.; LIGGINS, G.C. - Lupus anticoagulant in pregnancy. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, 91:357-63, 1984.
- LUBBE, W.F.; PATTISON, N.; LIGGINS, G.C. - Antiphospholipid antibodies and pregnancy. **N. Engl. J. Med.**, 313:1350-1, 1985. [Letter]
- LYNCH, A.; MARLAR, R.; MURPHY, J.; DAVILA, G.; SANTOS, M.; RUTLEDGE, J.; EMLEN, W. - Antiphospholipid antibodies in predicting adverse pregnancy outcome: a prospective study. **Ann. Intern. Med.**, 120:470-5, 1994.
- MacLEAN, M.A.; CUMMING, G.P.; McCALL, F.; WALKER, I.D.; WALKER, J.J. - The prevalence of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with a history of first trimester miscarriages. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, 101:103-6, 1994.
- MANNUCCI, P.M.; CANCIANI, M.T.; MARI, D.; MEUCCI, P. - The varied sensitivity of partial thromboplastin and prothrombin time reagents in the demonstration of the lupus-like anticoagulant. **Scand. J. Haematol.**, 5:423-32, 1979.
- McCRAE, K.R.; DeMICHELE, A.M.; PANDHI, P.; BALSAL, M.J.; SAMUELS, P.; GRAHAM, C.; LALA, P.K.; CINES, D.B. - Detection of antitrophoblast antibodies in the sera of patients with anticardiolipin antibodies and fetal loss. **Blood**, 82:2730-41, 1993.
- McHUGH, N.J.; KOMANN, L.H.; BLAND, P.R. - Predictive value of anticardiolipin antibodies in antenatal screening of routine pregnancy. **Clin. Exp. Rheumatol.**, 6:208, 1988. [Abstract]

- McINTYRE, J.A.; TAYLOR, C.G.; TORRY, D.S.; WAGENKNECHT, D.R.;  
WILSON, J.; FAULK, W.P. - Heparin and pregnancy in women with a history  
of repeated miscarriages. **Haemostasis**, **23 (suppl 1)**:202-11, 1993.
- MOISE, K.J. - Autoimmune thrombocytopenic purpura in pregnancy. **Clin. Obstet.  
Gynecol.**, **34**:51-63, 1991.
- MOLTA, C.; MEYER, O.; DOSQUET, C.; OCA, M.M.; BABRON, M.-C.; DANON,  
F.; KAPLAN, C.; CLÉMENCEAU, S.; CASTELLANO, F.; LEVY, M. -  
Childhood-onset systemic lupus erythematosus: antiphospholipid antibodies  
in 37 patients and their first-degree relatives. **Pediatrics**, **92**:849-53, 1993.
- MOWBRAY, J.F.; GIBBINGS, C.; LIDDELL, H.; REGINALD, P.W.; UNDERWOOD,  
J.L.; BEARD, R.W. - Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous  
abortion by immunisation with paternal cells. **Lancet**, **1**:941-3, 1985.
- NILSSON, I.M.; ASTEDT, B.; HEDNER, U.; BEREZIN, D. - Intrauterine death and  
circulating anticoagulant ("antithromboplastin"). **Acta Med. Scand.**, **197**:153-  
9, 1975.
- OUT, H.J.; BRUINSE, H.W.; CHRISTIAENS, G.C.M.L.; VAN VLIET, M.; DE  
GROOT, P.G.; NIEUWENHUIS, H.K.; DERKSEN, R.H.W.M. - A prospective,  
controlled multicenter study on the obstetric risks of pregnant women with  
antiphospholipid antibodies. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **167**:26-32, 1992.
- PARKE, A.L.; WILSON, D.; MAIER, D. - The prevalence of antiphospholipid  
antibodies in women with recurrent spontaneous abortion, women with  
successful pregnancies, and women who have never been pregnant.  
**Arthritis Rheum.**, **34**:1231-5, 1991.
- PATTISON, N.S.; CHAMLEY, L.W.; MCKAY, E.J. - Prevalence of antiphospholipid  
antibodies in a normal pregnant population. **Clin. Exp. Rheumatol.**, **6**:210,  
1988. [Abstract]

- PATTISON, N.S.; CHAMLEY, L.W.; McKAY, E.J.; LIGGINS, G.C.; BUTLER, W.S. - Antiphospholipid antibodies in pregnancy: prevalence and clinical associations. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **100**:909-13, 1993.
- PETRI, M.; GOLBUS, M.; ANDERSON, R.; WHITING-O'KEEFE, Q.; CORASH, L.; HELLMAN, D. - Antinuclear antibody, lupus anticoagulant, and anticardiolipin antibody in women with habitual abortion: a controlled, prospective study of 44 women. **Arthritis Rheum.**, **30**:601-7, 1987.
- ROSOVE, M.H.; TABSH, K.; WASSERSTRUM, N.; HOWARD, P.; HAHN, B.H.; KALUNIAN, K.C. - Heparin therapy for pregnant women with lupus anticoagulant or anticardiolipin antibodies. **Obstet. Gynecol.**, **75**:630-4, 1990.
- ROSSI, E. & COSTA, M. - Fish oil derivatives as a prophylaxis of recurrent miscarriage associated with antiphospholipid antibodies (APL): a pilot study. **Lupus**, **2**:319-23, 1993.
- RUPIN, A.; GRUEL, Y.; WATIER, H.; GIRARD, A.C.; LEROY, J.; BARDOS, P. - ELISA for the detection of anticardiolipin antibodies: high specificity based on the use of adult bovine serum as buffer and systematic subtraction of non-specific binding. **J. Immunol. Meth.**, **138**:225-31, 1991.
- SANCHEZ-GUERRERO, J. & ALARCÓN-SEGOVIA, D. - Course of antiphospholipid antibodies in patients with primary antiphospholipid syndrome before, during and after pregnancy treated with low dose aspirin: relationship of antibody levels to outcome in 7 patients. **J. Rheumatol.**, **19**:1083-8, 1992.
- SANFELIPPO, M.J. & DRAYNA, C.J. - Prekallikrein inhibition associated with the lupus anticoagulant: a mechanism of thrombosis. **Am. J. Clin. Pathol.**, **77**:275-9, 1982.
- SCOTT, J.R.; ROTE, N.S.; BRANCH, D.W. - Immunologic aspects of recurrent abortion and fetal death. **Obstet. Gynecol.**, **70**:645-56, 1987.

- SHERIDAN-PEREIRA, M.; PORRECO, R.P.; HAYS, T.; BURKE, M.S. - Neonatal aortic thrombosis associated with the lupus anticoagulant. **Obstet. Gynecol.**, **71**:1016-8, 1988.
- SILVEIRA, L.H.; HUBBLE, C.L.; JARA, L.J.; SAWAY, S.; MARTÍNEZ-OSUNA, P.; SELEZNICK, M.J.; ANGEL, J.; O'BRIEN, W.; ESPINOZA, L.R. - Prevention of anticardiolipin antibody-related pregnancy losses with prednisone and aspirin. **Am. J. Med.**, **93**:403-11, 1992.
- SILVEIRA, L.H. & ESPINOZA, L.R. - Course of aPL in patients with primary antiphospholipid syndrome before, during and after pregnancy treated with low dose aspirin. **J. Rheumatol.**, **20**:1440-1, 1993. [Letter]
- SILVER, R.M.; DRAPER, M.L.; BYRNE, J.L.B.; ASHWOOD, E.A.; LYON, J.L.; BRANCH, D.W. - Unexplained elevations of maternal serum alpha-fetoprotein in women with antiphospholipid antibodies: a harbinger of fetal death. **Obstet. Gynecol.**, **83**:150-5, 1994.
- STIRRAT, G.M. - Recurrent spontaneous abortion. In: COULAM, C.B.; FAULK, W.P.; McINTYRE, J.A., eds. - **Immunological obstetrics**. London, Norton Medical Books, 1992. p. 357-76.
- TABUTT, S.; GRISWOLD, W.R.; OGINO, M.T.; MENDOZA, A.E.; ALLEN, J.B.; REZNIK, V.M. - Multiple thrombosis in a premature infant associated with maternal phospholipid antibody syndrome. **J. Perinatol.**, **14**:66-70, 1994.
- TCHOBROUTSKY, C.; CLAUVEL, J.P.; SULTAN, Y.; DAMON, F.; INTRATOR, L.; WEIL, B. - Successful pregnancies in the antiphospholipid syndrome without prednisone. **Clin. Exp. Rheumatol.**, **6**:213, 1988. [Abstract]
- TRIPLETT, D.A.; BRANDT, J.T.; MUSGRAVE, K.A.; ORR, C.A. - The relationship between lupus anticoagulants and antibodies to phospholipid. **JAMA**, **259**:550-4, 1988.

- TRIPLETT, D.A.; BARNA, L.; UNGER, G. - Laboratory identification of lupus anticoagulants. XIVth CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS. Indiana, 1993. New York, 1993, New York Hilton & Towers. p. 70-9.
- TRIPLETT, D.A. - Obstetrical complications associated with antiphospholipid antibodies. In: COULAM, C.B.; FAULK, W.P.; McINTYRE, J.A., eds. - **Immunological Obstetrics**. London, Norton Medical Books, 1992. p. 377-403.
- UNANDER, A.M.; NORBERG, R.; HAHN, L.; ARFORS, L. - Anticardiolipin antibodies and complement in ninety-nine women with habitual abortion. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **156**:114-9, 1987.
- VIANNA, J.L.; HAGA, H.J.; TRIPATHI, P.; CERVERA, R.; KHAMASHTA, M.A.; HUGHES, G.R.V. - Reassessing the status of antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. **Ann. Rheum. Dis.**, **51**:160-1, 1992.
- VISCARELLO, R.R.; WILLIAMS, C.J.; DeGENNARO, N.J.; HOBBS, J.C. - Prevalence and prognostic significance of anticardiolipin antibodies in pregnancies complicated by human immunodeficiency virus-1 infection. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **167**:1080-5, 1992.
- VYSE, T.; LUXON, L.M.; WALPORT, M.J. - Audiovestibular manifestations of the antiphospholipid syndrome. **J. Laryng. Otol.**, **108**:57-9, 1994.
- YAMAMOTO, T.; YOSHIMURA, S.; GESHI, Y.; SASAMORI, Y.; OKINAGA, S.; KOBAYASHI, T.; MORI, H. - Measurement of antiphospholipid antibody by ELISA using purified beta 2-glycoprotein I in preeclampsia. **Clin. Exp. Immunol.**, **94**:196-200, 1993.