

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ-HEMOCE

**ANÁLISE COMPARATIVA DO MÉTODO DA
TROMBOPLASTINA DILUÍDA VERSUS DRVVT NA DOSAGEM DO
ANTICOAGULANTE LÚPICO**

JOÃO HALLISSON LEMOS CARVALHO

Fortaleza
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ-HEMOCE

**ANÁLISE COMPARATIVA DO MÉTODO DA
TROMBOPLASTINA DILUÍDA VERSUS DOSAGEM DO
ANTICOAGULANTE LÚPICO**

JOÃO HALLISSON LEMOS CARCALHO

**Monografia apresentada como
requisito final do curso de
Especialização em Hematologia e
Hemoterapia ministrado pelo
HEMOCE, juntamente à
Universidade Federal do Ceará.**

Orientadores:
Gentil Claudino de Galiza Neto

Co-Orientador:
Ana Cláudia Menezes Sobreira

Fortaleza
2003

JOÃO HALLISSON LEMOS CARVALHO

**ANÁLISE COMPARATIVA DO MÉTODO DA TROMBOPLASTINA
DILUÍDA VERSUS DOSAGEM DO ANTICOAGULANTE LÚPICO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Hematologia e Hemoterapia ministrado pelo HEMOCE, juntamente à Universidade Federal do Ceará.

Data da Aprovação: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Aos meus pais, por sempre terem incentivado os meus estudos, a minha profissão e a vida de maneira geral. Por terem me mostrado os dois lados de tudo dando-me sempre liberdade de escolha. Pelo exemplo de profissionais, de pessoas de união e de família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** em primeiro lugar , por ter me concedido tamanha graça de estar aqui, realizando este objetivo profissional.

Agradeço ainda a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, principalmente aos meus orientadores:

- Dr. Gentil Claudino de Galiza Neto;
- Dr. Marcos Antônio Martins da Silva;
- Dra. Ana Cláudia Menezes Sobreira;
- E aos coordenadores do curso.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	6
RESUMO	8
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Fisiopatologia.....	13
2.2 Manifestações clínicas.....	15
2.3 Avaliação laboratorial do anticorpo lúpico.....	17
3 OBJETIVOS.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Método do tempo de protrombina utilizando tromboplastina diluída...23	
4.2 Tempo de veneno de víbora Russell diluído.....	24
5 RESULTADOS.....	28
6 DISCUSSÃO.....	31
7 CONCLUSÃO.....	33
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Presença de anticorpos antifosfolípidios em pacientes com aborto recorrente	16
TABELA 2 - Presença de anticorpos anticardiolipina e anticoagulante lúpico em pacientes com aborto recorrente	16
TABELA 3 - Presença de anticorpos antifosfolípidios em pacientes sem problemas reprodutivos	17
TABELA 4 - Métodos Laboratoriais Utilizados para Detecção de Anticoagulante Lúpico	18
TABELA 5 - Resultados positivos para o teste do ACC e para o LA	28
TABELA 6 - Resultados ACC (+)/LA(+) e ACC (+)/LA(-)	28
TABELA 7 - Resultados ACC (-)/LA(+) e ACC (-)/LA(-)	29
TABELA 8 - Resultados quanto a relação LA1/ LA2	29

RESUMO

RESUMO

Os anticorpos antifosfolípides são uma família de imunoglobulinas de classe IgG, IgM ou IgA que podem está presentes isoladamente ou em associação, com afinidade por complexos proteína-fosfolípido. Incluídos nesta família estão, o Anticoagulante Lúpico, anticorpos anticardiolipina e os anticorpos que causam reações sorológicas falso-positivas. A presença de anticorpos antifosfolípidios circulantes está altamente associada a complicações tromboembólicas, abortos recorrentes, alterações cutâneas, trombocitopenias, e outras. Este estudo propôs-se a avaliar se dosagem do Anticoagulante Circulante (ACC), pelo teste da tromboplastina diluída, que até março de 2002 era o teste utilizado pelo HEMOCE para a detecção de anticoagulante lúpico, apresenta-se eficaz para a identificação do anticorpo lúpico e observar se análises realizadas pelo método do ACC apresentam resultados compatíveis com o método do tempo de veneno de víbora Russell diluído (DRVVT). Para este fim, foram analisados 110 amostras de pacientes num período de Agosto de 2002 a Abril de 2003, no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro do Ceará. Demonstrou-se que o ACC pode ser utilizado como método de triagem. Diante da possibilidade de um resultado negativo não se pode inferir que o paciente não possua anticoagulante lúpico.

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

O sistema imunológico permite aos indivíduos diferenciar o que é “próprio” do “não próprio” numa base celular e molecular. Quando ocorrem alterações mínimas nos constituintes “próprios” do organismo, estes passam a ser reconhecidos como se fossem “não próprios” e um mecanismo de inativação ou destruição é ativado. Sendo desencadeado uma resposta humoral ou celular dirigida contra um componente específico do hospedeiro, a autoimunidade (Pereira, 2002).

Os fosfolípidos e o colesterol, que constituem cerca de 2% da massa celular total, são os principais constituintes das membranas celulares e nucleares. Algumas porções destes fosfolípidos podem se comportar como antígenos, promovendo a formação de anticorpos antifosfolípidos (Pereira, 2002).

Estudos têm avaliado principalmente a interferência dos anticorpos antifosfolípidos sobre os diversos mecanismos anti-trombóticos naturais e o efeito ativador que estes anticorpos exercem sobre diferentes tipos celulares (Carreras, 1996; Roubey, 1996).

Os Anticorpos antifosfolípidos (AAF) são um grupo de auto-anticorpos com afinidades variáveis por complexos de proteínas e fosfolípidos. Dividem-se em dois tipos: os anticardiolipina (ACP) e o anticoagulante lúpico (AL). Os anticorpos ACP são detectados por técnicas de ELISA ou por ensaios de microfloculação (VDRL) e o AL através da atividade prolongada das reações de coagulação dependentes de fosfolípidos (Segóvia, 1989; Hunt, 1994).

Esses anticorpos podem ser descritos em doenças auto-imunes, infecciosas, associadas à drogas e neoplasias, em indivíduos saudáveis, associados a eventos trombóticos arteriais e venosos, abortos de repetição, trombocitopenias e alterações cutâneas, que combinados a achados sorológicos e a presença do AL e/ou ACP, constitui o que se denomina de Síndrome dos Anticorpos Antifosfolípidos (SaaFLs) (Anais de dermatologia, 1999). Esta Síndrome pode ser classificada em primária, quando não associada a outras doenças e secundária, quando associada a doenças subjacentes (Hunt, 1994; Segóvia, 1989).

Os inibidores da coagulação podem exercer sua função inibitória sobre: um fator da coagulação, inibindo sua atividade procoagulante; interferindo na formação de complexos ativadores (antifosfolípidos); ou interferindo na transformação de fibrinogênio em fibrina como o uso de heparinóides ou inibidores da polimerização (Kordich, 1990).

As manifestações clínicas provocadas por esses inibidores adquiridos são variáveis, dependendo do tipo, intensidade de sua atividade, fatores inibidos, etc. Geralmente estão associados a uma enfermidade de base, mas também podem aparecer em pessoas sãs (Kordich, 1990).

O inibidor do tipo lúpico, se caracteriza por interferir na interação dos fatores da coagulação sem neutralizar, um fator da coagulação específico. O inibidor lúpico é uma imunoglobulina da classe IgG, IgM ou uma mistura de ambos (Kordich e cols., 1990). É chamado de anticoagulante lúpico porque estes anticorpos foram descritos inicialmente em pacientes em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), mas logo foi observado em outras enfermidades de origem auto-imune, podendo estar associado a transtornos mieloproliferativos, neoplasias, reações a fármacos (p. ex. procainamida), infecções (incluindo HIV) e diversos estados patológicos. Também pode ser detectado na ausência de enfermidades (Miguel, 2002).

REVISÃO DE LITERATURA

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - FISIOPATOLOGIA

Este tipo de anticoagulante foi descrito em 1952 por Conley e Hartman, que o consideraram uma "anti-tromboplastina tissular". Rapaport e Col. (1960), propuseram denominá-lo de "anti-protrombinase", que inibia a atividade enzimática capaz de transformar a protrombina em trombina (Kordich e cols., 1990). O termo anticoagulante lúpico foi utilizado pela primeira vez em 1972 por Feinstein e Rapaport.

Em 1965, Yin e Gaston sugeriram que o anticorpo lúpico está dirigido contra o complexo ativador da protrombina. Isto explica sua ação sobre as vias intrínseca e extrínseca da coagulação, interferindo na ativação da protrombina devido o complexo ser comum às duas vias.

Também há uma alta incidência de testes biológicos falso positivos para Sífilis (VDRL) e anticorpos anticardioplipina detectados pós radioimunoensaio em pacientes com inibidor lúpico, o que indica que este anticorpo reage facilmente com estruturas que contém fosfolipídios. Anos mais tarde, utilizando ensaios de fase sólida de alta sensibilidade (Elisa) com cardioplipina como antígeno, demonstrou-se que na maioria dos pacientes com AL, também se encontravam presentes os anticorpos anticardioplipina (Harris, 1983). Veltkamp e cols. (1973) sugeriu que o inibidor lúpico interfere na adsorção de fatores da coagulação sobre superfícies lipídicas. Deste modo, poderia intervir na formação do complexo ativador do fator Xa da via intrínseca e da via extrínseca, assim como na formação do complexo ativador da protrombina na via final.

Laconde e cols (1975) demonstraram em um caso, que o inibidor do tipo lúpico interferia na formação da protrombinase, provavelmente por competir com o fator V à nível de seu sítio de fixação sobre a micela fosfolipídica.

Thiagarajan e cols demonstrou (1980) em um paciente com macroglobulinemia uma paraproteína com atividade de inibidor lúpico, sendo esta capaz de bloquear a união dependente de cálcio da protrombina e do fator X sobre uma micela fosfolipídica. O anticorpo, por outro lado, era incapaz de bloquear a união do fator Xa a superfície plaquetária, reação que pode gerar trombina a partir da protrombina, sem necessidade de adição de fosfolipídios. Isto poderia explicar a ausência de manifestações hemorrágicas e a correção dos

testes de coagulação utilizando plasma rico em plaquetas em muitos pacientes com este tipo de inibidor.

Os primeiros relatos sugerindo que os anticorpos causadores do fenômeno anticoagulante lúpico requerem a presença de β_2 -glicoproteína 1 ou protrombina datam de 1991 (Oosting; Bevers) e foram recentemente confirmados. Opostamente ao que ocorre com anticorpos anti β_2 -glicoproteína 1, os anticorpos anti-protrombina não são detectáveis no teste usual para anticardiolipina (Staub, 2001)

Esta proteína está relacionada com o sistema complemento e parece estar associada ao sistema da coagulação devido inibir: a ativação dos fatores da coagulação de fase de contato (via intrínseca), a agregação plaquetária pelo complexo protrombinase (Neto, 1997). Esta glicoproteína encontra-se ligada à superfície do fosfolipídio da membrana do endotélio vascular e atua como antígeno (Kutteh, 1997).

Com relação a possibilidade do mecanismo implicar na associação entre o inibidor lúpico e trombose, foi demonstrado que o plasma de alguns destes pacientes inibe a produção de prostaciclina pela parede vascular (Pereira, 2002). Há também desarranjo no equilíbrio entre a prostaciclina e tromboxano (Kutteh, 1997).

Foi demonstrado que o inibidor lúpico pode neutralizar o efeito potencializador que os fosfolipídios exercem sobre a atividade da trombomodulina endotelial e, deste modo reduzir a ativação da proteína C. Este poderia ser outro mecanismo relacionado a trombose (Kordich, 1990).

Há diminuição da prostaciclina produzida pelas células endoteliais, aumento do tromboxano produzido pelas plaquetas e decréscimo da ativação da proteína C. Isso leva à vasoconstrição e trombose (Kutteh, 1997).

O endotélio vacular pode liberar ácido araquidônico, através dos fosfolipídios da membrana celular e transformá-lo enzimaticamente em prostaciclina. Esta substância é o mais potente inibidor natural da agregação plaquetária e é, também, um poderoso vasodilatador, constituindo um mecanismo maior de defesa contra as tromboses. O anticorpo lúpico pode interferir na liberação do ácido araquidônico, a partir dos fosfolipídios da membrana celular. Esta inibição pode explicar os episódios trombóticos recorrentes em pacientes com o inibidor (Neto, 1997).

Em um estudo realizado foi encontrado uma ação inibitória do plasma sobre a produção de prostaciclina pela parede vascular em 10 de 16 pacientes com inibidor lúpico,

estudados durante um ano (dos quais só 3 tinham LES). Em 8 destes pacientes foi observado trombose e em seis complicações obstétricas (Kordich, 1990).

2.2 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os pacientes com anticoagulante lúpico habitualmente não apresentam manifestações hemorrágicas, apesar das alterações das provas de coagulação. Em geral, as hemorragias são observadas quando o inibidor está associado a um segundo defeito hemostático, como trombocitopenia ou deficiência de protrombina, o que pode ocorrer em pacientes com LES (Staub, 2001).

Têm-se enfatizado a tendência paradoxal dos pacientes com inibidor lúpico em desenvolver episódios trombóticos associados. A terapia com heparina ou anticoagulantes orais não causam complicações hemorrágicas nestes casos, apesar da presença do inibidor (Staub, 2001).

Há associação do inibidor lúpico com abortos ou mortes fetais de repetição. Pacientes grávidas com anticorpos antifosfolípidos apresentam risco tanto materno quanto perinatal, encontrando-se crescimento fetal restrito e óbito no segundo trimestre, assim como aborto recorrente (Pereira, 2002).

Anticorpos antifosfolípidos são encontrados em 31 a 37% das pacientes com LES e em 16 a 20% das mulheres com aborto recorrente (Tabelas 1 e 2). Destas, quando há gravidez subsequente sem que sejam tratadas, apenas 10 a 19% chegam a ter gestação viável. É importante ressaltar que mesmo em pacientes sem problemas reprodutivos, 4 a 7% apresentam anticorpos antifosfolípidos (tabela 3) (Pereira, 2002).

As Manifestações Clínicas observadas são: Cardiovasculares: infarto agudo do miocárdio em jovens, morte súbita, disfunção diastólica. Manifestações neurológicas: AVC isquêmico, demência, encefalopatia, etc. As alterações hematológicas mais frequentes são a plaquetopenia e anemia hemolítica. Alterações pulmonares como a hipertensão pulmonar e embolia pulmonar podem está presentes. Os pacientes também podem apresentar insuficiência renal (Neto, 1997).

Manifestações cutâneas também são observadas: livedo reticular, úlceras cutâneas, necrose cutânea, púrpuras, equimoses, etc. Estudos mostraram que 41% dos pacientes com ACL tiveram lesões cutâneas como primeira manifestação da doença (Rallings, 1989; Santiago, 1997)

Tabela 1 - Presença de anticorpos antifosfolípidios em pacientes com aborto recorrente

Autores	Número casos	% anticorpos antifosfolípidios
Parke et al. (1992)	81	16,0
Ginsberg et al. (1992)	42	16,7
Yetman et al. (1996)	866	17,3
Kutteh (1997)	2226	20,0

Fonte: Pereira, 2002, Revista científica FEMINA

Tabela 2 - Presença de anticorpos anticardiolipina e anticoagulante lúpico em pacientes com aborto recorrente

Autores	% IgG	% IgM	% Anticoagulante lúpico
	anticardiolipina	anticardiolipina	
Creagh et al.	17,1	8,6	20,0
Rai et al.	3,3	2,2	9,6

Fonte: Pereira, 2002, Revista científica FEMINA

Tabela 3 – Presença de anticorpos antifosfolípidos em pacientes sem problemas reprodutivos

Autores	Número casos	% anticorpos antifosfolípidios
Parke et al. (1992)	88	7,0
Yetman et al. (1996)	288	4,0
Kutteh (1997)	7278	5,3

Fonte: Pereira, 2002, Revista científica FEMINA

2.3 - AVALIAÇÃO LABORATORIAL DO ANTICORPO ANTICOAGULANTE LÚPICO

A pesquisa do anticoagulante lúpico e do anticorpo anticardiolipina (IgG, IgM e IgA) são considerados padrão ouro para diagnóstico da síndrome antifosfolípidios. Na pesquisa do anticoagulante lúpico, o resultado normal é negativo (Pereira, 2002).

Quando existe um inibidor plasmático, as provas da coagulação encontram-se alteradas e não se corrigem com a mistura do plasma do paciente com plasma normal, o que diferencia da deficiência de fatores da coagulação (Miguel, 2002).

Alguns testes são utilizados para rastreamento de anticorpo lúpico. O tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) é usado para detecção de deficiência ou inibidores dos fatores da coagulação da via intrínseca ou comum, para monitorização da anti-coagulação com heparina e para screening do anticoagulante lúpico (Zago,2001).

Os anticoagulantes lúpicos são anticorpos antifosfolípidios que dificultam a coagulação, porque os fosfolípidios representam suportes onde se realizam todas as reações entre os distintos fatores. Por este motivo o TTPA encontra-se alargado, não sendo corrigido pelo teste da mistura, e para a realização desta prova é fundamental a ação de fosfolípidios como a cefalina (Miguel, 2002).

Tabela 4 - Métodos Laboratoriais Utilizados para Detecção de Anticoagulante Lúpico

Teste	Descrição resumida do método	Efeito do anticoagulante lúpico no resultado do teste
TTPA	Plasma + Ativador (contato) + FL + Ca ⁺⁺	↑
TCK	Plasma + Kaolin + Ca ⁺⁺	↑↑↑
TTPA(FL diluído)	Plasma + Sílica + FL diluído + Ca ⁺⁺	↑↑
PNP	Plasma + Ativador + - concent. FL + Ca ⁺⁺	Normaliza
DRVVT	Plasma + RVV + FL diluído + Ca ⁺⁺	↑↑
TIT	Plasma + Tromboplastina diluída + Ca ⁺⁺	↑↑

Fonte: Hematologia fundamentos e prática, Zago, 2001

TCK, tempo de coagulação com o Kaolim; PNP, procedimento de neutralização com plaquetas; DRVVT, diluted Russell viper venom time (tempo de veneno de víbora de Russell diluído); TIT, teste de inibição da tromboplastina tecidual.

O Tempo de Protrombina, utilizando tromboplastina diluída, é considerado o teste de menor sensibilidade, enquanto o DTVVVR vem sendo mais utilizado por apresentar melhor sensibilidade (Holanda et al, 1999).

O prolongamento mais acentuado do TTPA em relação ao TP é explicável pela maior presença de fosfolípidios de carga negativa nas cefaléias utilizadas no primeiro teste. O fato de o anticoagulante lúpico alterar o TP em menor proporção, indica que as etapas finais da coagulação são relativamente poupadas por este inibidor (Staub, 1995).

Além dos testes para identificar a presença do anticoagulante lúpico, recomenda-se os seguintes exames para o diagnóstico das Síndromes do anticorpo anti-fosfolípidos (SaAFLs) primárias: hemograma, contagem de plaquetas, VDRL, imunofluorescência para Sífilis, colesterol LDL, fatores da coagulação: Von Willebrand, V de Leiden, VIII, IX, XI, XII; proteína C, proteína S, antitrombina III, teste de Coombs Direto (afastar anemia hemolítica auto-imune), fibrinogênio, plasminogênio, teste de inibição da tromboplastina tecidual, eletrólitos eletroforese de proteínas, glicemia, sumário de urina, função renal e hepática, complemento (C3, C4, Ch50), FAN (fator anti-nuclear) e crioglobulinas crio-fibrinogênio. Outros exames podem ser necessários, dependendo das manifestações clínicas, no sentido de excluir a possibilidade de associação com outras doenças (SaAFLs secundárias) (Holanda, 1999).

Até Março de 2002 o teste utilizado pelo HEMOCE na detecção do anticoagulante lúpico era o método da Tromboplastina diluída . A partir de Abril de 2002 foi implantado no Laboratório de Hemostasia o método do Tempo de veneno de víbora Russell que é considerado o melhor teste para a detecção do anticoagulante lúpico (Staub, 1995).

OBJETIVOS

3 – OBJETIVOS

- A)** Analisar a capacidade do teste da tromboplastina diluída (ACC), em detectar a presença de anticorpo lúpico (AL), relacionando a sua eficácia na identificação deste anticoagulante.
- B)** Observar e quantificar o grau de concordância positiva ou negativa, entre os métodos laboratoriais utilizados para detecção do anticorpo anticoagulante circulante: ACC X DRVVT

***MATERIAIS E
MÉTODOS***

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

No período de Agosto de 2002 à Abril de 2003 foram realizadas, no Laboratório de Hemostasia do HEMOCE, análises de 110 amostras de pacientes para detecção de Anticorpo Lúpico utilizando duas metodologias diferentes.

4.1 – MÉTODO DO TEMPO DE PROTROMBINA UTILIZANDO TROMBOPLASTINA DILUÍDA

Princípio

É um método coagulométrico que consiste em verificar a ação do Anticorpo lúpico (ou outros anticoagulantes circulantes) em inibir a tromboplastina, prolongando o tempo de protrombina.

Reagentes

Tromborel (tromboplastina) da Dade Behring® – diluída 1: 100

Cloreto de cálcio

Equipamento

ST 4 (STAGO®)

Execução do teste

1. Controle – 50 µL
2. Paciente – 50 µL
3. Incuba no banho-maria do próprio aparelho por 120 segundos
4. Acrescenta-se 50 µL de cloreto de cálcio
5. Anotar o valor em segundos
6. Anotar os resultados do TP, obtido do paciente, diluído e não diluído, e do TP do plasma controle com tromboplastina, diluído e não diluído.

Rosner e col. descreveram uma fórmula para o cálculo do Anticoagulante Circulante:

$$\text{ACC} = \frac{\text{TP}/100 \text{ paciente} \times \text{TP controle}}{\text{TP}/100 \text{ controle} \times \text{TP paciente}}$$

Interpretação

Resultado positivo: ACC > 1,2

Negativo: ACC < 1,2

4.2 – TEMPO DE VENENO DE VÍBORA RUSSELL DILUÍDO (DRVVT)**Princípio**

1. O veneno de víbora Russell ativa o fator X diretamente, evitando o fator VII do sistema extrínseco da coagulação do sangue bem como os fatores de contato e os fatores anti-hemofílicos do sistema intrínseco. Por isso, os testes de DRVVT são mais adequados que para a detecção específica dos LA do que os testes de TTPA, já que não são influenciados pelas anomalias dos fatores de contato, nem pelas deficiências de fator VIII ou de anticorpos (Thiagarajan, 1968). As concentrações de heparina até 1 unidade/ mL não têm efeitos devido à presença de um agente neutralizador tanto no reagente de rastreio LA1, como no reagente de confirmação LA2.
2. O reagente de confirmação LA2 possui, adicionalmente, fosfolípidos para neutralização dos LA.

Reagentes**Composição**

- O reagente de rastreio LA1 contém veneno de víbora Russell, fosfolípidos, agentes anti-heparínicos, cálcio, solução tampão, estabilizadores, azida de sódio e corante verde.
- O reagente de confirmação LA2 contém veneno de víbora Russell, excesso fosfolípidos, agente anti-heparínicos, cálcio, solução tampão, estabilizadores, azida de sódio e corante vermelho.

Equipamento

BCT (Dade Behring®)



Execução do teste

Método manual

1. Aquecer o LA1 e o LA2 até atingir temperatura de 37 °C
2. Colocar 200 μ L de plasma do paciente num recipiente e deixar incubado durante 1 minuto a 37 °C
3. Acrescentar ao plasma 200 μ L de LA1 ou de reagente de confirmação LA2, medir o tempo de coagulação
4. O LA2 é realizado quando o LA1 dá um resultado positivo
5. Repetir o teste da determinação dupla e calcular a média dos resultados

Obs: No Laboratório de Hemostasia do HEMOCE o DRVVT é realizado em aparelho automatizado (BCT)

Interpretação

- ◆ Negativo: LA1 Screening (DRVVT) < 44 segundos
- ◆ Positivo: LA1 Screening (DRVVT) > 44 segundos
- Se o LA1 for positivo, faz o LA2, que é o teste confirmatório (Neutralização) para a presença de Anticoagulante Lúpico.

- ◆ Calculo da relação LA1/ LA2: Se a relação for < 1,2 o resultado é negativo
Se a relação for > 1,2 o resultado é positivo
- Esta relação dá uma estimativa ± quantitativa da presença de anticorpo lúpico presente na amostra.
- Relação LA1/ LA2..... > 2,0 – AL Fortemente Presente
1,5 a 2,0 – AL Moderadamente Presente
1,2 a 1,5 – AL Fracamente Presente

RESULTADOS

5 - RESULTADOS

Foram analisados os exames para anticoagulante lúpico de 110 pacientes realizados no Laboratório de Hemostasia do HEMOCE no período de agosto de 2002 a abril de 2003 sendo encontrados os seguintes resultados:

Tabela 5 - Resultados positivos para o teste do ACC e para o LA

TESTE	N	POSITIVOS	%
ACC	110	13	11,8
LA	110	15	13,6

Onde: N = 110 pacientes

Tabela 6 - Resultados ACC (+)/LA(+) e ACC (+)/LA(-)

TESTE	N	%
ACC (+)/LA(+)	09	8,2
ACC (+)/LA(-)	05	4,5

Onde: N = 110 pacientes

Tabela 7 - Resultados ACC (-)/LA(+) e ACC (-)/LA(-)

TESTE	N	%
ACC (-)/LA(+)	06	5,5
ACC (-)/LA(-)	90	81,8

Onde: N =110.

Tabela 8 - Resultados quanto a relação LA1/ LA2

TESTE	ACC (-)/LA(+)	ANTICOAGULANTE ORAL
MODERADAMENTE PRESENTE	02	01
FRACAMENTE PRESENTE	04	02

DISCUSSÃO

6 - DISCUSSÃO

Dos 110 pacientes encaminhados para o Laboratório de Hemostasia do HEMOCE, 11,8 % (13) apresentaram o teste da tromboplastina diluída (ACC) positivo, e em 13,6 % (15) o teste do tempo de veneno de víbora Russell diluído (DRVVT) também apresentou-se positivo (Tabela 5). Mostrando que o DRVVT apresenta maior sensibilidade que o método do tempo de protrombina utilizando a tromboplastina diluída (Holanda et al, 1999).

Em 8,2 % (9 casos) o teste do ACC e o DRVVT foram positivos (Tabela 6). Demonstrando que o anticoagulante circulante, detectado pelos dois métodos, tratava-se do anticorpo lúpico (AL).

Em 4,5 % (5) dos casos a pesquisa do anticoagulante circulante (ACC) apresentou-se positiva, e o teste do DRVVT negativo (Tabela 6). Este fato demonstra que o anticorpo circulante evidenciado não era o anticorpo lúpico, uma vez que o DRVVT vem sendo utilizado como método de escolha para a identificação do AL por apresentar maior sensibilidade (Holanda et al, 1999).

Cerca de seis casos (5,5 %) analisados o ACC apresentou-se negativo e o DRVVT foi positivo (Tabela 7). Dos quais três destes pacientes (2,7 %) faziam terapia com anticoagulante oral, marevan (Warfarina), que é um anticoagulante cumarínico que bloqueia a γ -carboxilação de vários resíduos de glutamato existentes na protrombina e nos fatores VII, IX e X, bem como na proteína C anticoagulante endógeno. Esta carboxilação promove a desativação da vitamina K (Katzung, 1998), prejudicando a formação de fatores da coagulação vitamina K dependentes II, VII, IX e X., e consequentemente a formação do coágulo (Tabela 8).

Na maior parte das determinações, 81,8 %, não foi evidenciado a presença de nenhum anticorpo circulante (Tabela 7).

Casos em que o ACC (-)/ LA(+), quando analisados quanto a intensidade, encontramos dois destes pacientes apresentando como resultados a presença moderada de anticoagulante lúpico, sendo que um destes fazia uso de marevan. Em outros quatro casos o AL foi evidenciado como fracamente presente, dois destes faziam uso de Warfarina. Podemos avaliar a possibilidade de isso ocorrer devido a uma menor sensibilidade do ACC. Entretanto, não podemos afastar esse resultado quando a uma ação interferente de medicamentos anticoagulantes orais.

CONCLUSÃO

7 - CONCLUSÃO

Os dois métodos podem e devem ser utilizados na investigação laboratorial para a Síndrome do Anticorpo Anti-fosfolípide, entretanto verificou-se uma maior sensibilidade de resultados para o DRVVT no diagnóstico anticorpo lúpico.

O resultado do ACC negativo, não impede que seja realizado o teste do tempo de veneno de víbora Russell diluído, já que constatamos casos em que o LA era positivo.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEVERS, E.M.; Lupus anticoagulant IgG (LA) are not directed to phospholipid only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost*, 1991, cap 66, p. 629-632.

CARRERAS, L.O.; FORASTEIRO R.R.; Patogenic role of antiprotein-phospholipid antibodies. *Hemostasis*, 1996, c. 26, p. 340-357.

HARIS E.N.; Antiphospholipid syndrome. In: Klippel's and Dieppe's "Rheumatology", 2ª ed., Mosby, Loncon, 1998, cap.7, p.1-6.

HOLANDA, R.R.A.; **Anais brasileiros de dermatologia: Síndrome dos anticorpos antifosfolípides**, Rio de Janeiro, 1999, v. 74, n 6, p. 613-619.

HUNT, J.E.; ADELSTEIN, S.; KRILIS, S.A. New basic aspects of the antiphospholipid syndrome. **Clinical and Experimental Rheumatology**, 1994, v. 12, p. 661-668.

KATZUNG, G.B.; **Farmacologia básica e clínica: Fármacos utilizados nos distúrbios da coagulação**, Guanabara Koogan S.A., 1998, c. 33, p. 386-396.

KORDICH, L.C. et al; **Manual de hemostasia**, 2ª ed., Argentina, cap. 9, 1990, p. 341-360.

KUTTEH W.H.; Antiphospholipid antibodies and reproduction. *Reprod Immunol*, 1997, c. 35. p. 151-71.

MIGUEL, J.F.S.; SÁNCHEZ F.M.; **Cuestiones en Hematología**. 2ªed., Salamanca, cap. 21, 2002, p.191-204.

NETO, G.C.G.; HOLANDA, E.M.; Síndrome do anticorpo antifosfolípide, *Revista do Hospital Universitário/UFC*, 1997, n. 10.

OOSTING, J.D. Lupus anticoagulant activity is frequently dependent on the presence of beta-2-glycoprotein I, *Thromb Haemost*, 1991, cap 67, p. 499-502.

PEREIRA, M. D.; MENEGOCI, J. C.; **Revista científica Femina: Mecanismos Imunológicos Relacionados ao Aborto Recorrente**, São Paulo: vol. 30, n. 3, 2002, p. 175-180.

RALLING, P; EXNER, T; ABRAHAM, R. Coronary Artery vasculitis and Myocardial Infarction Associated With Antibodies in a Pregnant Woman. **Aust NZ J Med** 1989; 19:347-50.

ROUBEY R.A.S.; Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum*, 1996, c. 39, p 1444-1454.

SANTIAGO, M.. Anticorpos antifosfolípedes em doenças auto-imunes e infecciosas: participação da beta-2-glicoprote. **Rev Bras Reumatol** 1997; 37 (5) : 282-86.

SEGÓVIA, D.A ; GUERRERO, J.S. Primary Antiphospholipid Syndrome. **J Rheumatol** 1989; 16: 482-88.

STAUB, H.L.; DAHMER, R.; Síndrome antifosfolipídicas. *Revista brasileira de Reumatologia*, 2001, v. 41, n. 1, p. 59-61.

ZAGO, M.A. et al; **Hematologia Fundamentos e Prática: Trombofilias adquiridas**, São Paulo, Atheneu, 2001, c. 79, p. 890-896.