

FÁBIO FRANÇA SILVA<sup>1</sup>

EMYGDIA ROSA RÉGO BARROS PIRES LEAL MESQUITA<sup>2,3</sup>

FERNANDO JOSÉ BRITO PATRÍCIO<sup>3</sup>

RITA DA GRAÇA CARVALHAL FRAZÃO CORRÊA<sup>3,4</sup>

IVALDO CÉSAR MACAU FURTADO FERREIRA<sup>5</sup>

MARIA BETHÂNIA DA COSTA CHEIN<sup>1,3</sup>

LUCIANE MARIA OLIVEIRA BRITO<sup>1,3</sup>

# Associação de alelos HLA e aborto espontâneo recorrente em uma população de São Luís/Maranhão, na região Nordeste do Brasil

*HLA alleles association and recurrent spontaneous abortion in a São Luis/Maranhão population, in Brazilian Northeastern region*

## Artigo Original

### Palavras-chave

Aborto espontâneo  
Frequência do gene  
Antígenos HLA

### Keywords

Abortion, spontaneous  
Gene frequency  
HLA antigens

### Resumo

**OBJETIVO:** Investigar a associação dos alelos HLA-A, -B e -DRB1 com a ocorrência de Aborto Espontâneo Recorrente. **MÉTODOS:** Estudo caso-controle com 200 mulheres com idade entre 18 e 35 anos, sendo a amostra de conveniência com 100 mulheres que tiveram aborto espontâneo recorrente idiopático e 100 mulheres sem aborto e com dois ou mais filhos. A obtenção do DNA Genômico foi de sangue periférico, sendo a extração realizada a partir de 500l do Buffy-Coat conservado a -20°C. A Tipificação HLA foi feita pelo método PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction - Specific Sequence of Oligonucleotides Probes*, One Lambda®, CA, EUA). As regiões do DNA amplificado foram o exon 2 e 3 para os loci A e B e apenas o exon 3 para o locus DRB1. Para determinação da genotipagem HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1, utilizou-se o programa HLA FUSION™ (One Lambda, Canoga Park, CA, United States, 3.0 version). Na análise estatística, utilizaram-se frequências absolutas e porcentagens, e cálculo de média e desvio padrão. As variáveis qualitativas foram comparadas utilizando-se o teste  $\chi^2$ , com correção de Yates, ou Teste Exato de Fisher. Para as comparações e significância ( $p < 0,05$ ), foi calculado *Odds Ratio* com IC95%. **RESULTADOS:** O alelo A\*34 apresentou frequência significativamente maior no grupo caso em relação ao controle (4,0 versus 0,5%;  $p < 0,05$ ). Os alelos A\*24 (6,0 versus 12,5%;  $p < 0,05$ ) e B\*35 (8,0 versus 20,5%;  $p < 0,05$ ) foram significativamente menos frequentes no grupo caso. Entre os alelos de classe II, o DRB1\*03 apresentou frequência ligeiramente maior no grupo caso (11,0 versus 5,5%;  $p = 0,056$ ). **CONCLUSÕES:** Foi demonstrado que o alelo HLA-A\*34 é fator de risco para o abortamento espontâneo recorrente, enquanto os alelos HLA-A\*24 e HLA-B\*35 estão associados à proteção, e nenhum alelo do locus DRB1 apresentou associação com AER.

### Abstract

**PURPOSE:** To investigate the association of the HLA-A, -B and -DRB1 alleles with the occurrence of Recurrent Spontaneous Abortion. **METHODS:** A case-control study of 200 women aged 18 to 35 years, consisting of a convenience sample of 100 women who had idiopathic recurrent spontaneous abortion and 100 women without abortion and with two or more children. Peripheral blood genomic DNA was extracted from 500l of Buffy Coat stored at -20°C. HLA typing was performed by the PCR-SSOP method (*Polymerase Chain Reaction - Specific Sequence of Oligonucleotides Probes*, One Lambda®, CA, USA). The regions of the amplified DNA were exon 2 and 3 for the A and B loci and only exon 3 for the DRB1 locus. The HLA FUSION™ program (One Lambda, Canoga Park, CA, USA, version 3.0) was used for HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 genotyping. Absolute frequencies and percentages and calculation of mean and standard deviation were used for standard statistical analysis. The qualitative variables were compared by the  $\chi^2$  test with Yates correction or by Fisher's exact test. The odds ratio with the 95%CI was used for the comparisons, with the level of significance set at  $p < 0.05$ . **RESULTS:** The frequency of the A\*34 allele was significantly higher in the case group compared to control (4.0 versus 0.5%;  $p < 0.05$ ). Alleles A\*24 (6.0 versus 12.5%;  $p < 0.05$ ) and B\*35 (8.0 versus 20.5%;  $p < 0.05$ ) were significantly less frequent in the case group. Among the class II alleles, DRB1\*03 showed a slightly higher frequency in the case group (11.0 versus 5.5%,  $p = 0.056$ ). **CONCLUSIONS:** It was shown that the HLA-A\*34 allele is a risk factor for recurrent spontaneous abortion, while the HLA-A\*24 and HLA-B\*35 alleles are associated with protection, and no allele of the DRB1 locus was associated with RSA.

### Correspondência

Luciane Maria Oliveira Brito  
Universidade Federal do Maranhão  
Avenida dos Portugueses – Anjo da Guarda  
CEP: 65080-805  
São Luís (MA), Brasil

### Recebido

10/11/2014

### Aceito com modificações

25/06/2015

DOI: 10.1590/S0100-720320150005209

Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão – UFMA – São Luís (MA), Brasil.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil, Universidade Federal do Maranhão – UFMA – São Luís (MA), Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão – UFMA – São Luís (MA), Brasil.

<sup>3</sup>Hospital Universitário, Universidade Federal do Maranhão – UFMA – São Luís (MA), Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Enfermagem, Universidade Federal do Maranhão – UFMA – São Luís (MA), Brasil.

<sup>5</sup>Curso de Graduação em Medicina, Universidade Federal do Maranhão – UFMA – São Luís (MA), Brasil.

Conflito de interesses: não há.

## Introdução

O Aborto Espontâneo Recorrente (AER) é uma síndrome caracterizada por três ou mais episódios de aborto consecutivos e espontâneos<sup>1</sup>. Recentemente, a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva ampliou esse conceito ao defini-lo como duas ou mais perdas conceptuais, baseando-se na prevalência de possíveis etiologias<sup>2</sup>. Casos de AER são vistos em até 5% dos casais, mas em apenas 50% encontra-se uma etiologia específica. Entre as causas mais comumente identificadas, estão as alterações cromossômicas, responsáveis por 40–80% dessas perdas. Entre outras causas, observam-se anomalias uterinas, distúrbios endócrinos e resposta imune<sup>3,4</sup>.

O sistema imunológico vem sendo um dos alvos de pesquisa na busca das causas do AER, podendo estar envolvido tanto através da resposta autoimune como por uma alorresposta, na qual os antígenos leucocitários humanos (HLA) têm sido implicados como fatores primários de estímulo do sistema imune materno em relação à presença do feto<sup>5</sup>. Os anticorpos anti-HLA são, em geral, mais frequentes em pacientes com AER, o que sugere que a presença desses anticorpos no início da gravidez pode estar associada a uma redução da chance de nascimento<sup>6</sup>. Além disso, a frequência de abortos espontâneos está associada à sobreposição quantitativa de outros tipos de distúrbios imunológicos, demonstrando a relevância de fatores imunes da fisiopatologia do AER<sup>7</sup>.

A associação entre AER e os diferentes polimorfismos genéticos do HLA tem sido investigada com resultados conflitantes há várias anos. Sabe-se que os antígenos HLA-A, -B e -DR não estão expressos na superfície do trofoblasto<sup>8</sup>, todavia esses antígenos podem atuar por meio de um desequilíbrio de ligação com outros antígenos expressos nos tecidos fetais. Dessa forma, a tipagem desses antígenos HLA clássicos pode revelar alterações no padrão de distribuição de outros antígenos que afetam negativamente a gestação<sup>9</sup>.

É importante destacar a existência de diferença de associações genéticas entre grupos populacionais e variar com o grupo étnico-racial em diversas partes do mundo. Considerando que estudos em grupos miscigenados têm se destacado pela possibilidade de identificar novas associações ou reforçar as já existentes, este estudo teve o objetivo de analisar a associação dos alelos HLA-A, -B, -DRB1 com AER em um grupo de mulheres da região Nordeste do Brasil.

## Métodos

Estudo caso-controle, que incluiu mulheres com idade entre 18 e 35 anos, assistidas no pré-natal do Serviço de Obstetrícia do Hospital Universitário da

Universidade Federal do Maranhão, localizado na cidade de São Luís, Maranhão, região Nordeste do Brasil. A amostra foi de conveniência e constou de 200 mulheres, sendo 100 mulheres que tiveram aborto espontâneo recorrente idiopático e 100 mulheres que nunca tiveram episódio de aborto e que tiveram dois ou mais filhos de gestação normal.

Não foram incluídas mulheres com infecções, com problemas anatômicos do ovário e endócrinos, com suspeita ou confirmação de doenças autoimunes e que apresentaram caso de aborto tardio e/ou óbito fetal.

Os dados demográficos foram coletados por meio de entrevista utilizando-se um formulário com dados epidemiológicos e dados clínicos obtidos por meio de investigação no prontuário. A coleta de material biológico foi realizada após a entrevista. A tipificação dos alelos HLA foi realizada no Laboratório de Estudos Genéticos e Histocompatibilidade do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (LEGH).

### A obtenção do DNA Genômico

Amostras de sangue periférico (4 mL) foram coletadas em tubos a vácuo de vacutainer contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) como anticoagulante e centrifugado a 1.500 rpm por 15 minutos. A extração do DNA genômico foi realizada a partir de 500 µL do Buffy-Coat conservado a -20°C e armazenado. Foi utilizado o *kit* comercial EZ-DNA® (Biological Industries, BeitHaemek, Israel), de acordo com o protocolo padronizado pelo fabricante.

### Tipificação HLA -A, -B e -DRB1

A tipificação HLA foi realizada pela técnica de PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Oligonucleotides Probes*) utilizando *kits* para teste de tipagem LABTYPE®SSO para os *loci* A, B e DRB1 (ONE LAMBDA, CA, USA), conforme recomendações do fabricante. O DNA foi amplificado utilizando *primers* alelo específicos biotinilados que acompanhavam os *kits*. As regiões amplificadas para os *loci* A e B foram os exons 2 e 3, e para o *locus* DRB1 apenas o exon 3. O ciclo da PCR foi: 96°C por 3 minutos, seguido de 5 ciclos de 96°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos; 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 20 segundos com extensão de 72°C por 10 minutos. Após a termociclagem, as amostras foram avaliadas em gel de agarose 5% para confirmação da amplificação dos exons específicos de cada *locus*. Em seguida, esses produtos da PCR foram então hibridizados com sondas oligonucleotídeos sequência-específica conjugados com microesferas fluorescentes. Depois disso, as amostras foram submetidas à corrida em analisador de fluxo LABScan™ 100 que identifica

a intensidade de fluorescência da ficoeritrina em cada microesfera. Para determinação da genotipagem HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1, os dados foram analisados no programa HLA FUSION™ (One Lambda, Canoga Park, CA, United States, 3.0 version).

### ■ Análise estatística

As frequências alélicas foram obtidas por contagem direta dos alelos e confirmadas após análise no *software* Arlequin, versão 3.1.1 (Zoological Institute, University of Berne, Suíça)<sup>10</sup>.

Para o processamento de dados, foi utilizado o programa EPI-INFO 2 (INFO 2.002 do Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA). A análise estatística consistiu na utilização de métodos descritivos: distribuição de frequências absolutas e porcentagens para as variáveis qualitativas, e cálculo de média e desvio padrão para as variáveis quantitativas. As variáveis qualitativas foram comparadas utilizando-se teste do  $\chi^2$ , com correção de Yates, ou Teste Exato de Fisher, quando necessário. Em todos os testes estatísticos foi considerado o nível de significância igual a 5%. Para as comparações e significância ( $p < 0,05$ ) foi calculado *Odds Ratio* com IC95%. Para esses cálculos, foi utilizado o programa STATA 10.0® (Copyright 1996–2010 Stata Corp LP, Texas, USA).

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizando a utilização das amostras. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão com o Protocolo parecer n° 33104-0702/2007.

## Resultados

Estudo realizado com 200 participantes, sendo 100 mulheres com episódios de AER e 100 caracterizadas como Grupo Controle. As mulheres com AER tinham média de idade correspondente a 30,9 anos ( $\pm 3,88$ ), cor parda (53%), consumo de álcool (40%), tabagismo (31%) e média de abortos igual a 2,38 ( $\pm 0,62$ ). Para o Grupo Controle, a média de idade correspondeu a 31,35 anos ( $\pm 3,81$ ), cor parda (52%), consumo de álcool (22%), tabagismo (9%) e média de filhos igual a 2,23 ( $\pm 0,92$ ) (dados não apresentados).

### ■ Frequência alélica HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1

Para o *locus* A, foram encontrados 19 grupos alélicos, sendo A\*02 o mais frequente em ambos os grupos, com uma frequência ligeiramente maior, mas sem significância estatística, no Grupo Controle [(28,0 versus 24,5%) OR=1,32; IC95% 0,73–2,40];  $p=0,395$ ]. O grupo alélico A\*34 apresentou frequência maior entre as mulheres com

AER em relação ao Grupo Controle, mostrando associação como fator de risco na amostra analisada [(4,0 versus 0,5%) OR=8,60; IC95% 1,05–70,17]  $p=0,040$ ]. Por outro lado, o alelo A\*24 apresentou frequência significativamente maior no Grupo Controle, sendo considerado como fator de proteção ao AER [(6,0 versus 12,5%) OR=0,41 IC95% 0,18–0,92]  $p=0,028$ ] (Tabela 1).

Dentre os 29 grupos alélicos encontrados para o *locus* B, o de maior prevalência entre as mulheres com e sem AER foi o B\*15 (16 versus 15%). Não foi observada maior frequência de nenhum alelo no grupo com AER em relação ao Grupo Controle, contudo o alelo HLA-B\*35 apresentou frequência significativamente maior no Grupo Controle, evidenciando um efeito protetor significativo (8,0 versus 20,5%; OR=0,27 IC95% 0,13–0,56;  $p=0,0002$ ) (Tabela 2).

Foram identificados 13 grupos alélicos para o *locus* DRB1 e nenhum deles apresentou frequência com diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O alelo DRB1\*13 foi o mais frequente em mulheres com AER e mulheres sem AER [(15,5 versus 19,5%; OR=0,70; IC95% 0,38–1,31;  $p=0,299$ ]. Já o alelo DRB1\*03 apresentou frequência ligeiramente maior no grupo de pacientes em relação ao Grupo Controle (11,0 versus 5,5%), demonstrando uma tendência à associação ao AER (OR=2,28 IC95% 0,98–5,36;  $p=0,056$ ) (Tabela 3).

**Tabela 1.** Comparação da frequência alélica para o *locus* HLA-A em mulheres com aborto espontâneo recorrente e grupo controle

Alelos	Grupo AER (n=100)		Grupo controle (n=100)		OR (IC95%)	Valor p
	n	%	n	%		
A*01	18	9,0	16	8,0	1,15 (0,52–2,57)	0,8
A*02	56	28,0	49	24,5	1,32 (0,73–2,40)	0,3
A*03	8	4,0	15	7,5	0,49 (0,18–1,32)	0,1
A*11	7	3,5	8	4,0	0,87 (0,27–2,76)	–
A*23	13	7,5	11	5,5	1,21 (0,48–3,08)	0,8
A*24	12	6,0	23	12,5	0,41 (0,18–0,92)	0,02
A*25	3	1,5	–	–	–	0,2
A*26	8	4,0	7	3,5	1,16 (0,36–3,72)	–
A*29	5	2,5	8	4,0	0,61 (0,16–2,14)	0,5
A*30	14	7,0	9	4,5	1,65 (0,63–4,38)	0,3
A*31	14	7,0	15	7,5	0,92 (0,39–2,17)	–
A*32	6	3,0	7	3,5	0,85 (0,24–2,94)	–
A*33	9	4,5	9	4,5	1,0 (0,34–2,90)	0,8
A*34	8	4,0	1	0,5	8,60 (1,05–70,17)	0,04
A*36	1	0,5	–	–	–	–
A*66	1	0,5	1	0,5	1,0 (0,0–37,14)	–
A*68	9	4,5	15	7,5	0,56 (0,21–1,45)	0,2
A*74	6	6,0	4	4,0	1,53 (0,37–6,71)	0,7
A*80	2	2,0	–	–	–	0,4

AER: Aborto espontâneo recorrente.

**Tabela 2.** Comparação da frequência alélica para o *locus* HLA-B em mulheres com aborto espontâneo recorrente e grupo controle

Alelos	Grupo AER (n=100)		Grupo controle (n=100)		OR (IC95%)	Valor p
	n	%	n	%		
B*07	7	3,5	10	5,0	0,68 (0,2–2,0)	0,6
B*08	11	5,5	6	3,0	1,94 (0,6–6,1)	0,3
B*13	2	1,0	1	0,5	2,02 (0,1–57,2)	–
B*14	9	4,5	12	6,0	0,73 (0,2–1,9)	0,6
B*15	32	16,0	30	15,5	1,10 (0,5–2,09)	0,8
B*18	2	1,0	5	2,5	0,39 (0,05–2,3)	0,4
B*27	4	2,0	6	3,0	0,65 (0,1–2,7)	0,7
B*35	16	8,0	41	20,5	0,27(0,1–0,5)	<0,001
B*37	1	0,5	3	1,5	0,33 (0,01–3,6)	0,6
B*38	4	2,0	2	1,0	2,04 (0,3–16,4)	0,6
B*39	6	3,0	7	3,5	0,85 (0,2–2,9)	–
B*40	15	7,5	12	6,0	1,29 (0,5–3,1)	0,6
B*41	2	1,0	–	–	–	0,4
B*42	4	2,0	3	1,5	1,35 (0,2–7,8)	–
B*44	11	5,5	10	5,0	1,11 (0,4–3,0)	–
B*45	3	1,5	4	2,0	0,74 (0,1–4,0)	–
B*47	0	0,0	1	0,5	0,0 (0,0–17,4)	–
B*48	5	2,5	–	–	–	0,05
B*49	13	7,5	8	4,0	1,72 (0,6–4,8)	0,3
B*50	1	0,5	6	3,0	0,16 (0,01–1,3)	0,1
B*51	16	8,0	13	6,5	1,27 (0,5–3,0)	0,6
B*52	6	3,0	3	1,5	2,06 (0,4–10,7)	0,4
B*53	9	4,5	4	2,0	2,37 (0,6–9,5)	0,2
B*55	4	2,0	2	1,0	2,04 (0,3–16,4)	0,6
B*57	6	3,0	4	2,0	1,53 (0,3–6,7)	0,7
B*58	9	4,5	6	3,0	1,55 (0,4–5,1)	0,5
B*78	1	0,5	–	–	–	–
B*81	0	0,0	1	0,5	0,0 (0,00–17,4)	–
B*82	1	0,5	–	–	–	–

AER: Aborto espontâneo recorrente.

**Tabela 3.** Comparação da frequência alélica para o *locus* HLA-DRB1 em mulheres com aborto espontâneo recorrente e grupo controle

Alelos	Grupo AER (n=100)		Grupo controle (n=100)		OR (IC95%)	Valor p
	n	%	n	%		
DRB1*01	16	8,0	23	11,5	0,64 (0,30–1,37)	0,2
DRB1*03	22	11,0	11	5,5	2,28 (0,98–5,39)	0,05
DRB1*04	26	13,0	21	10,5	1,32 (0,65–2,68)	0,5
DRB1*07	24	12,0	13	6,5	2,11 (0,95–4,74)	0,06
DRB1*08	12	6,0	16	8,0	0,72 (0,30–1,71)	0,5
DRB1*09	4	2,0	3	1,5	1,35 (0,25–7,82)	–
DRB1*10	2	1,0	9	4,5	0,21 (0,03–1,06)	0,06
DRB1*11	22	11,0	26	13,0	0,80 (0,40–1,62)	0,6
DRB1*12	4	2,0	2	1,0	2,04 (0,31–16,46)	0,6
DRB1*13	31	15,5	39	19,5	0,70 (0,38–1,31)	0,2
DRB1*14	9	4,5	10	5,0	0,89 (0,31–2,51)	–
DRB1*15	13	6,5	10	5,0	1,34 (0,52–3,52)	0,6
DRB1*16	15	7,5	17	8,5	0,86 (0,38–1,96)	0,8

AER: Aborto espontâneo recorrente.

## Discussão

Este estudo caso-controle investigou um marcador imunogenético envolvido no processo de perda fetal espontânea em comparação à frequência alélica dos genes HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 em um grupo de mulheres.

Em relação ao gene HLA-A, foi observado que o alelo A\*34 representou fator de suscetibilidade para o desenvolvimento de AER. Esse resultado diferiu de estudos anteriores, que indicaram associação positiva dos alelos A\*01, A\*02 e A\*03<sup>11-13</sup> com AER. Por outro lado, o alelo A\*24 apresentou associação negativa com o AER na amostra estudada, indicando seu papel como alelo protetor. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo realizados com mulheres na Índia<sup>12</sup>.

A associação do alelo HLA-B\*35 como fator de proteção ao AER foi encontrado neste estudo, assemelhando-se aos resultados encontrados em estudo realizado com uma população de mulheres japonesas<sup>13</sup>. Embora o papel desempenhado pelas moléculas HLA na manifestação da AER não seja conhecido, algumas evidências indiretas podem sugerir um mecanismo imunológico envolvido no processo de perda fetal. Um desses mecanismos se refere ao balanço da resposta Th1/Th2 e suas citocinas características, sendo demonstrado que mulheres com padrão de resposta imune predominante do tipo Th1 têm maior chance de AER<sup>14,15</sup>. Segundo Imai et al.<sup>16</sup>, os indivíduos portadores do alelo HLA-B\*35 apresentam uma resposta predominante Th2 com declínio de resposta Th1, fato que pode explicar o efeito protetor desse alelo no caso do AER.

Para o *locus* DRB1, apenas uma tendência à associação foi mostrada para o alelo HLA-DRB1\*03. Estudos prévios encontraram uma associação significativa entre o alelo DRB1\*03 e AER na população dinamarquesa, além de referir associação com outras complicações obstétricas, como maior taxa de natimortos e maior prevalência de baixo peso ao nascer<sup>17,18</sup>. Os mecanismos responsáveis pela associação entre DRB1\*03 e AER ainda não são claros, entretanto sabe-se que há uma ligação entre os genes HLA-DRB1 e os genes relacionados à hipersecreção do fator de necrose tumoral (TNF), que possui atividade embriotóxica e de inibição trofoblástica<sup>19,20</sup>.

Takakuwa et al.<sup>21</sup> realizaram um estudo caso-controle que comparou 115 mulheres com AER com 89 de gravidez normal no Japão e concluíram que o alelo DRB1\*15:02 é um potencial fator de risco para AER. Mais recentemente, o alelo HLA-DRB1\*11:04 também foi identificado como fator de risco em um estudo que comparou a frequência alélica dos genes HLA de classe II em mulheres do sul do Brasil com e sem AER<sup>22</sup>. A frequência alélica entre 200 mulheres com gravidez normal e 200 mulheres com episódios de AER em uma

população da China mostrou o alelo DRB1\*09 como fator de risco para AER, enquanto o alelo DRB1\*12 foi considerado fator de proteção<sup>23</sup>.

É importante destacar que diferenças entre subtipos dos alelos HLA não foram observadas no presente estudo, uma vez que o método utilizado para a genotipagem não foi de alta resolução, portanto não foi possível observar diferenças significativas entre os subtipos de alelos, o que representa uma limitação do estudo. Além disso, não foram investigados outros genes que estão envolvidos na fisiopatogênese do AER, como o HLA-G, que é reconhecidamente um fator imunológico protetor para evitar reação aloimune mãe-feto<sup>24,25</sup>. Um estudo de caracterização genética da população de São Luís, Maranhão, mostrou uma diversidade genética, com influência de povos ameríndios, africanos e europeus, caracterizando uma região altamente miscigenada<sup>26</sup>.

A identificação de genes HLA com associações em populações altamente miscigenadas, como a brasileira, pode representar dificuldades em virtude do polimorfismo

mais acentuado, todavia é essencial, pois permite a descoberta de novas associações, assim como a ratificação das já existentes<sup>27,28</sup>.

Os resultados demonstraram que o alelo HLA-A\*34 é fator de risco para o abortamento espontâneo recorrente, enquanto os alelos HLA-A\*24 e HLA-B\*35 foram associados à proteção, e nenhum alelo do *locus* DRB1 apresentou associação com AER.

Dessa forma, a ampliação do estudo, buscando a identificação dos subtipos específicos de alelos HLA e também de associações genéticas com outros genes, pode trazer contribuições futuras para determinação da influência e do valor preditivo dessas moléculas para o diagnóstico precoce de casos de AER.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do estudo.

## Referências

1. Stirrat GM. Recurrent miscarriage. *Lancet*. 1990;336(8716):673-5.
2. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013;99(1):63.
3. Balasch J. Antiphospholipid antibodies: a major advance in the management of recurrent abortion. *Autoimmun Rev*. 2004;3(3):228-33.
4. Morales C, Sánchez A, Bruguera J, Margarit E, Borrell A, Borobio V, et al. Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the broadest spectrum of chromosome abnormalities. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(1):66-70.
5. Choudhury SR, Knapp LA. Human reproductive failure I: immunological factors. *Hum Reprod Update*. 2001;7(2):113-34.
6. Nielsen HS, Witvliet MD, Steffensen R, Haasnoot GW, Goulmy E, Christiansen OB, et al. The presence of HLA-antibodies in recurrent miscarriage patients is associated with a reduced chance of a live birth. *J Reprod Immunol*. 2010;87(1-2):67-73.
7. Motak-Pochrzest H, Malinowski A. The occurrence of immunological disturbances in patients with recurrent miscarriage (RM) of unknown etiology. *Neuro Endocrinol Lett*. 2013;34(7):701-7.
8. Hill JA. Immunological mechanisms of pregnancy maintenance and failure: a critique of theories and therapy. *Am J Reprod Immunol*. 1990;22(1-2):33-41.
9. Souza SS, Voltarelli JC, Ferriani RA. I. Imunologia da reprodução humana. *Medicina*. 1997;30(2):277-88.
10. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. 3.0: Um pacote de software integrado para análise de dados genéticos da população. *Evol Bioinform Online*. 2005;1:47-50.
11. Komlos L, Klein T, Korostishevsky M. HLA-A2 class I antigens in couples with recurrent spontaneous abortions. *Int J Immunogenet*. 2007;34(4):241-6.
12. Shankarkumar U, Pawar A, Gaonkar P, Parasannavar D, Salvi V, Ghosh K. HLA allele associations in idiopathic recurrent spontaneous abortion patients from India. *J Hum Reprod Sci*. 2008;1(1):19-24.
13. Kolte AM, Steffensen R, Nielsen HS, Hviid TV, Christiansen OB. Study of the structure and impact of human leukocyte antigen (HLA)-G-A, HLA-G-B, and HLA-G-DRB1 haplotypes in families with recurrent miscarriage. *Hum Immunol*. 2010;71(5):482-8.
14. Kheshtchin N, Gharagozloo M, Andalib A, Ghahiri A, Maracy MR, Rezaei A. The Expression of Th1- and Th2-related chemokine receptors in women with recurrent miscarriage: the impact of lymphocyte immunotherapy. *Am J Rep Immunol*. 2010;64(2):104-12.
15. Calleja-Agius J, Schembri-Wismayer P, Calleja N, Brincat M, Spiteri D. Obstetric outcome and cytokine levels in threatened miscarriage. *Gynecol Endocrinol*. 2011;27(2):121-7.
16. Imai T, Takakuwa K, Ishii K, Adachi H, Higashino M, Kurata H, et al. HLA-class I antigens in patients with unexplained recurrent abortion. *J Perinat Med*. 2001;29(5):427-32.
17. Kruse C, Steffensen R, Varming K, Christiansen OB. A study of HLA-DR and -DQ alleles in 588 patients and 562 controls confirms that HLA-DRB1\*03 is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2004;19(5):1215-21.
18. Christiansen OB. [Genetic risk factors for recurrent abortion and obstetric complications]. *Ugeskr Laege*. 2010;172(11):872-5. Danish.
19. Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Molvig J, Worsaae H, Abbal M, et al. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol*. 1993;23(1):224-31.

20. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today*. 1997;18(10):478-82.
21. Takakuwa K, Adachi H, Hataya I, Ishii K, Tamura M, Tanaka K. Molecular genetic studies of HLA-DRB1 alleles in patients with unexplained recurrent abortion in the Japanese population. *Hum Reprod*. 2003;18(4):728-33.
22. Bompeixe EP, Carvalho Santos PS, Vargas RG, von Linsingen R, Zeck SC, Wolk PF, et al. HLA class II polymorphisms and recurrent spontaneous abortion in a Southern Brazilian cohort. *Int J Immunogenet*. 2013;40(3):186-91.
23. He M, Kang B, Liao S, Yang K, Ding X, Wu D, et al. [Association of polymorphisms of HLA-DRB1 gene with unexplained recurrent spontaneous abortion in ethnic Hans from Henan]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2014;31(4):504-7. Chinese.
24. Papamitsou T, Toskas A, Papadopoulou K, Sioga A, Lakis S, Chatzistamatiou M, et al. Immunohistochemical study of immunological markers: HLAG, CD16, CD25, CD56 and CD68 in placenta tissues in recurrent pregnancy loss. *Histol Histopathol*. 2014;29(8):1047-55.
25. Dahl M, Hviid TV. Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*. 2012;18(1):92-109.
26. Ferreira FL, Leal-Mesquita ER, Santos SEB, Ribeiro-dos-Santos AKC. Genetic characterization of the population of São Luís, MA, Brazil. *Genet Mol Biol*. 2005;28(1):22-31.
27. Donadi E. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. *Medicina*. 2000;33(1):7-18.
28. Alves C, Meyer I, Vieira N, Toralles MB. Associação do Sistema de Histocompatibilidade Humana (HLA) com doenças endócrinas auto-imunes. *Rev Baiana Saúde Pública*. 2005;29(1):105-20.