

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MATERNO-INFANTIL  
MESTRADO ACADÊMICO

**FÁBIO FRANÇA SILVA**

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES HLA-A\*, -B\* E -DRB1\* EM  
MULHERES COM ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE (AER)**

São Luís  
2009

**FÁBIO FRANÇA SILVA**

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES HLA-A\*, -B\* E -DRB1\* EM  
MULHERES COM ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE (AER)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde Materno-Infantil.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Emygdia Rosa do Rêgo Barros Pires Leal Mesquita.

São Luís  
2009

Silva, Fábio França

Estudo Molecular do gene HLA (Antígeno Leucocitário Humano) em mulheres com Abortamentos Espontâneos Recorrentes (AER) / Fábio França Silva – São Luís, 2009

62f.

Impresso por computador (Fotocópia)

Orientadora: Emygdia Rosa do Rêgo Mesquita.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil, 2009.

1. Aborto espontâneo 2. Aborto espontâneo recorrente 3. Frequência alélica 4. Gene HLA

CDU 618.39 – 021.3

**FÁBIO FRANÇA SILVA**

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES HLA-A\*, -B\* E -DRB1\* EM  
MULHERES COM ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE (AER)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde Materno-Infantil.

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública considerou o candidato aprovado em \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Emygdia Rosa do Rêgo Barros Pires Leal Mesquita** (Orientadora)  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Semiramis Jamil Hadad do Monte** (1º Examinador)  
Universidade Federal do Piauí

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciane Maria Oliveira Brito** (2º Examinador)  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof. Dr. Alcione Miranda dos Santos** (3º Examinador)  
Universidade Federal do Maranhão

*“Qualquer homem pode desejar alguma coisa;*

*Mas só os ousados e destemidos alcançarão”.*

*Renan*

*“Os dias prósperos não vêm por acaso;*

*Nascem de muita fadiga e persistência”.*

*Henry Ford*

*“Imita no sofrimento as árvores que padecem;*

*Quando feridas, podadas, com mais vigor reflorescem”.*

*Luiz Otávio*

*Nenhum trabalho de pesquisa é de natureza individual. Existem pessoas em nossas vidas sem as quais não só teria sido impossível a realização deste, como o mesmo não teria sentido. A estas pessoas maravilhosas devo, além da compreensão, apoio e força, o sentido da vida e a alegria dos dias. A vocês os meus mais sinceros agradecimentos.*

## AGRADECIMENTOS

A DEUS PAI, A DEUS FILHO e A DEUS ESPÍRITO SANTO princípio, meio e fim de todo conhecimento.

A MARIA DE NAZARÉ (Nossa Senhora) companheira de caminhada.

Aos meus pais, Manoel Felipe Silva Filho e Nicéia de Jesus França Silva por serem os primeiros educadores, incentivadores e amigos.

Aos meus irmãos, Marcelo França Silva e Rodrigo França Silva, exemplos para mim.

A minha avó e mãe, Nadir Conceição Fonseca França (*in memorian*) pois em sua simplicidade ensinou-me a ler e a escrever. E por todo seu apoio que em vida proporcionou aos meus estudos. E ao meu avô materno José João França (*in memorian*).

Ao meu avô paterno, Manoel Felipe Silva exemplo para mim de humildade e que muito me ensinou com suas estórias, e a minha avó paterna, Dulce Ferreira Silva (*in memorian*)

A minha madrinha, tia e mãe Necimar de Jesus França Aragão que em muito colaborou para os meus estudos. Exemplo para mim de estudo.

As minhas tias, Luz Maria Durans (tia Luz) e Elenilde Fonseca França (tia Mana) por estarem presentes na minha vida e servirem de exemplo de determinação, estudo e perseverança.

Aos meus primos e irmãos, Luciana Fonseca França, Fernanda Fonseca França e Fabiano Silva França, que proporcionam muitas alegrias e diversões.

A tia Rosário de Fátima Pereira Pacheco, ao tio Jorge Heleno Castro Pacheco e a tia Cecília Castro, que dispuseram as suas casas para me acolher, quando eu precisava viajar para a minha formação.

Aos tios José Quirino Aragão, José Celso Silva França e a Floriano Diniz Povoas pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade, em especial Fernando José Brito Patrício e Alexsandro dos Santos.

As minhas amigas Ana Cláudia, Eláine Dourado e Francileide Lisboa pelo carinho.

A Marcos Aurélio Marques Carvalho pelo apoio, amizade e compreensão durante este trabalho.

A todos os amigos KARRIANOS.

A meu amigo Moreira Neto que em muito me socorre.

À Patrícia Maria Carvalho Ribeiro e Roxana de Carvalho Veras, pelas coletas e o apoio para a realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Emygdia Rosa Leal Mesquita pela orientação e confiança que depositou em mim para a realização deste trabalho.

Às médicas do IGMA – Instituto de Ginecologia do Maranhão Dr<sup>ª</sup>. Luciane Maria Oliveira Brito e Dr<sup>ª</sup> Maria Bethânia da Costa Chein.

Ao Serviço de Ginecologia e Obstétrica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão na pessoa da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Marília da Glória Martins pelo auxílio na seleção dos sujeitos desta pesquisa.

Aos participantes desta pesquisa, pois sem a contribuição deles não poderia ser realizada.

Aos Funcionários do Programa de Pós Graduação em Saúde Materna Infantil, de modo especial Helena Ribeiro Sousa, Maria da Graça Mendes e Rivaldo, por estarem sempre dispostos a me ajudar.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil pelos valiosos ensinamentos.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil em especial Flávia Carvalho, Irene Silva, Gláucia Freire e Elionora Jansen.

A FAPEMA e a Empresa BIOMETRIX pelo financiamento desta pesquisa.

Ao Hospital Universitário pelo apoio logístico para o desenvolvimento desta pesquisa.

E a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Abortamento Espontâneo Recorrente (AER) caracteriza-se por duas ou mais perdas conceptuais espontâneas e consecutivas antes da 20ª semana de gestação, acometendo entre 1% e 2% das mulheres em idade reprodutiva. Fatores genéticos, anatômicos, endócrinos, infecciosos e imunológicos, por meio de mecanismos que relacionam o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) e a frequência de determinados antígenos HLA (Antígeno Leucocitário Humano), estão associados ao AER. O gene HLA localiza-se no braço curto do cromossomo 6 entre as regiões 6p21.31 e 6p21.33, é herdado em bloco e expresso em co-dominância. O mesmo exerce uma grande influência na modulação e indução da tolerância materna durante a gestação. Esta pesquisa teve como objetivo verificar as frequências alélicas dos *loci* HLA-A\*, -B\* e -DRB1\* em mulheres com e sem AER. Realizou-se um estudo caso-controle em 200 mulheres (100 para cada grupo), entre 18 e 35 anos de idade. Todas as amostras foram tipificadas pelo método PCR-SSOP (Reação em cadeia da Polimerase – Sondas de Oligonucleotídios de Sequências Específicas). Os alelos mais frequentes tanto em mulheres com e sem AER foram, respectivamente: HLA-A\*02 (56%) e (49%), HLA-DRB1\*13 (31%) e (39%)-embora sem resultado estatisticamente significativo; HLA-A\*24 (12%) e (25%), (OR: 0,41; 95% IC: 0,18-0,92; p=0,028); HLA-A\*34 (8%) e (1%), (OR: 8,61; 95% IC: 1,06-187,04; p=0,034); HLA-B\*35 (16%) e (41%) (OR: 0,27; 95% IC: 0,13 – 0,56; p=0,0002). Os haplótipos mais frequentes em mulheres com e sem AER foram, respectivamente: A\*02DRB1\*16 (12%) e (2%) (OR 6,68; 95% IC: 1,36 – 44,52; p=0,012). No presente estudo, apenas o *locus* DRB1\* apresentou desequilíbrio de ligação significativo (p=0,01) em mulheres com AER. A elevada frequência dos alelos HLA-A\*02 e HLA-DRB1\*13 é justificada pela ampla distribuição desses alelos na população maranhense. Os alelos HLA-A\*24 e HLA-B\*35 apresentaram-se como um fator de proteção e o alelo HLA-A\*34 um fator de risco para AER. Para as associações haplotípicas, o haplótipo A\*02DRB1\*16 foi mais frequente em mulheres com AER, sendo um fator de risco para este grupo. Para a ratificação dos resultados deste trabalho, faz-se necessário aumentar o número amostral, bem como estudos de epidemiologia genética para o melhor entendimento do papel dos antígenos HLA e/ou sua ligação a outros genes como fator de risco para o AER.

Palavras-chave: AER. Aborto Espontâneo Recorrente. Frequência alélica. Gene HLA.

## ABSTRACT

Recurrent spontaneous abortion (RSA) is defined as two or more consecutive spontaneous pregnancy losses before the 20<sup>th</sup> week of gestation, a situation that occurs in 1 to 2% of women in reproductive age. Genetic, anatomical, endocrine, infectious and immunologic factors through mechanisms that relate to the Major Histocompatibility Complex (MHC) and the presence of certain HLA (Human Leukocyte Antigens) are associated to RSA. HLA gene is located on the short arm of chromosome 6 between the 6p21.31 and 6p21.33 regions. This gene is inherited in haplotypes and expressed in codominance, having influence on modulation and induction of mother tolerance during the pregnancy. The aim of this study was to compare the allelic frequencies of HLA-A\*, HLA-B\* and HLA-DRB1\* *loci* in women with and without RSA. It was a case-control study in 200 women (100 for each group) between 18 and 35 years of age. All samples were typed by the PCR-SSOP method (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide Probes). The most frequent alleles observed in the group of women with and without RSA were: HLA-A\*02 (56%) and (49%), HLA-DRB1\*13 (31%) and (39%) respectively - there was no statistical significant difference when compared among the groups for this alleles; HLA-A\*24 (12%) e (25%), (OR: 0.41; 95% CI: 0.18-0.92; p=0.028); HLA-A\*34 (8%) e (1%), (OR: 8.61; 95% CI: 1.06-187.04; p=0.034); HLA-B\*35 (16%) e (41%) (OR: 0.27; 95% CI: 0.13 – 0.56; p=0.0002). The most frequent haplotypes observed in the group of women with and without RSA were: A\*02DRB1\*16 (12%) e (2%) (OR: 6.68; 95% CI: 1.36 – 44.52; p=0.012) respectively. In this research, DRB1\* *locus* in women with RSA was in linkage disequilibrium (p=0.01.). The high frequency of HLA-A\*02 and HLA-DRB1\*13 alleles in this study was due to the wide distribution of this allele in the population of Maranhão. HLA-A\*24 e HLA-B\*35 alleles were considered as a protection factor and HLA-A\*34 allele was considered as a risk factor to RSA. The A\*02DRB1\*16 haplotype was the most frequent and considered as a risk factor to RSA. In order to confirm the observed results in this research, a study involving a higher sample size is necessary as well as genetic epidemiology researches to shed light on the role of HLA antigens and/or its connection to other genes as a risk factor.

Keywords: RSA. Recurrent Miscarriage. Allelic frequency. HLA Gene.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AER	–	Aborto Espontâneo Recorrente
DVMO	–	Doadores Voluntários de Medula Óssea
EDTA	–	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - Ácido Etilenodiaminotetracético
HLA	–	<i>Human Leucocitary Antigen</i> - Antígeno Leucocitário Humano
HPA	–	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IFN- $\gamma$	–	Interferon Gama
IgE	–	Imunoglobulina E
IgG	–	Imunoglobulina G
IgM	–	Imunoglobulina M
<i>IL</i>	–	gene que codifica a Interleucina ( <i>IL6, IL10, etc.</i> )
IL	–	Interleucina
IL-2	–	Interleucina do tipo 2
KDa	–	Kilo Dalton
LMP	–	<i>Latent Membrane Protein</i> - Proteína Latente de Membrana
MHC	–	<i>Major Histocompatibility Complex</i> - Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH)
NK	–	Natural Killer
°C	–	Grau Celsius
PCR	–	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
RBC	–	<i>Red Blood Cells</i> – Células Sanguíneas Vermelhas
RCLB	–	<i>Red Cell Lysis Buffer</i> - Solução de Lise de Glóbulos Vermelhos
RFLP	–	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição
rpm	–	Rotações por minuto
SNS	–	Sistema Nervoso Simpático
SSOP	–	<i>Sequence Specific Oligonucleotides Probes</i> – Sondas de Oligonucleotídios de Sequências Específicas
SSP	–	<i>Specific Sequence Primers</i> – Primers de sequência específicas
TAP	–	Transporte de peptídeos
TCR	–	Receptores de Células T
Th	–	Linfócitos T <i>helper</i> – Linfócitos T auxiliares
Th1	–	Células T Auxiliares do tipo 1

- Th2 – Células T Auxiliares do tipo 2
- TNF* – Gene que codifica o fator de necrose tumoral
- TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa
- $\mu$ l – Micro-litro

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Distribuição da frequência alélica para o <i>locus</i> HLA-A* em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.....	36
Tabela 2	–	Distribuição da frequência alélica para o <i>locus</i> HLA-B* em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.....	37
Tabela 3	–	Distribuição da frequência alélica para o <i>locus</i> HLA-DRB1* em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.....	38
Tabela 4	–	Distribuição das frequências haplotípicas A*B*DRB1* observadas em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.....	39
Tabela 5	–	Distribuição das frequências haplotípicas A*B* observadas em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.....	40
Tabela 6	–	Distribuição das frequência haplotípicas A*DRB1* observadas em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.....	41
Tabela 7	–	Distribuição das frequência haplotípicas B*DRB1* observadas em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.....	42
Tabela 8	–	Distribuição das frequências genotípicas para os <i>loci</i> A* B* e DRB1* em mulheres com e sem AER em São Luís (MA). 2009.....	43

## APÊNDICES

- Apêndice I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)
- Apêndice II – Ficha Cadastral (Anamnese)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	21
<b>3.1</b>	<b>Aborto Espontâneo Recorrente (AER)</b> .....	21
<b>3.2</b>	<b>Fatores Associados ao Aborto Espontâneo Recorrente (AER)</b> .....	21
<b>3.3</b>	<b>Sistema HLA</b> .....	23
<b>3.4</b>	<b>Sistema HLA e Aborto Espontâneo Recorrente (AER)</b> .....	26
<b>3.5</b>	<b>Gravidez e a Resposta Imunológica</b> .....	27
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
<b>4.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	29
<b>4.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	29
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	30
<b>5.1</b>	<b>Local da realização da pesquisa</b> .....	30
<b>5.2</b>	<b>Tipo de estudo</b> .....	30
<b>5.3</b>	<b>Casuística</b> .....	30
<b>5.4</b>	<b>Considerações Éticas</b> .....	31
<b>5.5</b>	<b>Análise Genético Molecular</b> .....	31
<b>5.6</b>	<b>Processamento e Análise Estatística de dados</b> .....	33
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	35
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	48
<b>9</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	49
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51
	<b>APÊNDICES</b> .....	58

## 1 INTRODUÇÃO

O abortamento espontâneo pode ser observado em até 15% das mulheres, ocorrendo principalmente no primeiro trimestre da gestação. A incidência de abortamentos espontâneos é semelhante entre as mulheres com gestação natural ou obtida através de técnicas de reprodução assistida (SCHIEVE et al., 2003).

Abortamento caracteriza-se pela eliminação do conceito. É um evento frustrante, principalmente para a mulher que aborta repetidas vezes, no qual se acumula sentimento de pesar e frustração a cada novo fracasso (MATTAR; CAMANO; DAHER, 2003).

Define-se Abortamento Espontâneo Recorrente (AER) como duas ou mais perdas conceptuais espontâneas e consecutivas antes da 20ª semana de gestação (MATTAR; CAMANO; DAHER, 2003).

Casos de AER são vistos em até 5% dos casais, mas em apenas 50% encontra-se um fator específico para as perdas (MICHELON et al., 2006). Entre as causas mais comumente identificadas estão: alterações cromossômicas (aneuploidias envolvendo os cromossomos 13, 16, 18, 21, 22, X e Y), anomalias uterinas (como septos, sinéquias dentre outros), distúrbios endócrinos (hipertireoidismo, *diabetes mellitus* descompensado, síndrome de ovários policísticos) e estados protrombóticos (trombofilias auto-imunes e de origem genética) (BALASCH, 2004).

O sistema imunológico vem sendo um dos alvos de pesquisa na busca das causas do AER, devido a sua importância para o desencadeamento e controle de vários processos fisiológicos e patológicos. Ele apresenta uma íntima inter-relação com o sistema nervoso e endócrino, havendo, entre eles, vários receptores e ligantes em comum. Assim, substâncias características de cada um destes sistemas, como citocinas, neuropeptídeos, neurotransmissores e hormônios, podem ser sintetizadas e modificar determinadas funções e atividades representativas de cada um deles (SOUZA; VOLTARELLI; FERRIANI, 1997).

Durante os anos 50 e 60 iniciou-se um novo campo de pesquisa, a Imunologia Reprodutiva, tendo como base a tolerância imunológica. Desde então,

reconhece-se que, durante o processo reprodutivo, vários fatores imunológicos participam, de forma direta ou indireta, na sobrevivência do conceito (ANDERSON, 1996).

O período gestacional compreende um estado imunológico altamente complexo e com características próprias, envolvendo os fenômenos auto e alo-ímmunes. Os fenômenos auto-ímmunes promovem a produção, por parte do sistema imunológico materno, de auto-anticorpos que vão alterar o leito placentário e com isso determinar a perda gestacional, e os fenômenos aloimunológicos compreendem distúrbios no reconhecimento dos antígenos feto-paternos e/ou no desencadeamento de resposta imunológica modulada e protetora (CHRISTIANSEN, 1996; MATTAR et al., 2004; PEREIRA et al., 2005).

Ainda não há explicação definitiva para o fato de o organismo materno aceitar o desenvolvimento do conceito durante os nove meses da gestação. Uma das características do sistema imunológico é elaborar mecanismos para rejeitar o que é estranho, princípio este aplicado aos transplantes de órgãos, nos quais todo enxerto de órgãos de doadores que não seja geneticamente idêntico ao receptor tende a ser rejeitado. O feto possui antígenos de origem paterna, sendo considerado, portanto, pelos conceitos imunológicos, um aloenxerto que deveria ser rejeitado e, no entanto, o que se observa é que a gravidez não se enquadra a esta regra (MATTAR et al., 2004).

Inicialmente a não-rejeição do feto foi atribuída à ausência de resposta imunológica materna, mas inúmeras investigações demonstraram que na gravidez existe o desenvolvimento de respostas imunológicas com a participação de fatores humorais e celulares (CHRISTIANSEN, 1996).

Sabe-se que os genes HLA (*Human Leucocitary Antigen* - Antígeno Leucocitário Humano) desempenham um importante papel no mecanismo de rejeição a tecidos transplantados. Em virtude de o feto ser um aloenxerto, estes genes são importantes na modulação e indução da tolerância materna durante a gestação, desempenhando um importante papel na reprodução, com efeitos sobre a implantação, sobrevivência e crescimento do feto (CHOUDHURY; KNAPP, 2000; DONADI, 2001).

Komlos e colaboradores relataram, pela primeira vez, uma alta compatibilidade do sistema HLA entre os casais com AER. Apesar de vários trabalhos

realizados na tentativa de elucidar o papel destes antígenos no aborto recorrente, sabe-se que os antígenos HLA-A, -B, -DQ e -DR não estão expressos na superfície do trofoblasto. Estes antígenos, talvez, pudessem atuar por meio de um desequilíbrio de ligação com outros antígenos relevantes, expressos nos tecidos fetais. Portanto, a tipificação dos antígenos HLA clássicos estaria revelando, alterações no padrão de distribuição destes antígenos, e sua frequência nas mulheres com aborto recorrente (SOUZA; VOLTARELLI; FERRIANI, 1997).

O campo da Imunologia da Reprodução, mesmo com todos os avanços, ainda não é totalmente compreendido, o que torna necessário o desenvolvimento de pesquisas que busquem elucidar quais fatores imunológicos seriam responsáveis por complicações gestacionais.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Os avanços das pesquisas no campo da Imunologia da Reprodução têm possibilitado a identificação de alterações imunológicas responsáveis por muitos Abortamentos Espontâneos Recorrentes (AER).

Como a imunologia da reprodução não é totalmente conhecida, e suas vias de manifestação tampouco o são, torna-se um desafio o desenvolvimento de pesquisas para detecção das falhas gestacionais nas quais os fatores imunológicos seriam os responsáveis. A justificativa para a realização deste trabalho está na sua contribuição para melhor conhecer a frequência dos alelos HLA-A\*, -B\* e DRB1\* e sua associação com o AER.

### **3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1 Aborto Espontâneo Recorrente (AER)**

Define-se Aborto Espontâneo Recorrente (AER) à história reprodutiva de duas ou mais perdas espontâneas sucessivas de gestações até a vigésima semana gestacional (HARGER et al., 1983; COULAM, 1986; REGAN et al., 1998; MATTAR; CAMANO; DAHER, 2003).

Ocorre em 10% a 15% das gestações diagnosticadas, acometendo entre 1% a 2% das mulheres em idade reprodutiva. Estimativas mostram que 2% a 5% dos casais passaram pela experiência de AER e referem-na como um grande desgaste emocional em suas vidas (COULAM, 1986; COULAM; MOORE; O'FALLAN, 1987; REGAN et al., 1998).

A incidência de abortamentos espontâneos é semelhante entre as mulheres com gestação natural e as submetidas a técnicas de reprodução assistida (SCHIEVE et al., 2003). Mulheres que tiveram dois abortos sucessivos, a probabilidade de um terceiro vir ocorrer varia de 17% a 35%, e para aquelas que já passaram por três ou mais abortos, a probabilidade de ocorrência do quarto está entre 25% e 46% (BARINI et al., 2000).

Casos de AER são vistos em até 5% dos casais, sendo que uma causa específica para as perdas costuma ser evidenciada em 50% dos casos (MICHELON et al., 2006).

#### **3.2 Fatores associados ao Aborto Espontâneo Recorrente (AER)**

Diversos fatores estão associados ao AER, entre eles estão: os genéticos, anatômicos, endócrinos, infecciosos e os imunológicos (SALOMÃO, 1994).

O fator genético está relacionado com a ocorrência do abortamento e sua posterior repetição, sendo as anomalias cromossômicas no casal, responsáveis por 50% a 60% dos AERs que ocorrem no primeiro trimestre (BOUÉ; BOUÉ; LAZAR, 1975). Entre os fatores genéticos destacam-se as alterações cromossômicas do tipo numéricas,

das quais: 50% a 60% são de trissomias, 20% a 25% de poliploidias e 15% a 25% de monossomias do cromossomo X, além de aneuploidias envolvendo os cromossomos 13, 16, 18, 21, 22, X e Y (CAETANO et al., 2006).

As alterações cromossômicas estruturais, tais como as translocações, também contribuem para o AER. Translocações balanceadas são observadas em 7,2% dos casos de AER. Somam às alterações numéricas e estruturais, a presença de mosaïcismo no cariótipo materno ou paterno (SACHS; JAHODA; VAN HEMEL, 1985; BOUÉ, 1998).

As anomalias morfológicas do útero são responsáveis por cerca de 15,0% a 27% dos casos de AER (HARGER et al., 1983; STRAY-PETERSEN B; STRAY-PETERSEN S, 1984). São incluídos nesse grupo o útero bicorno, unicorno e didelfo, as sinéquias e septos uterinos e a insuficiência cervical (BUTTRAM; GIBBONS, 1979; KURUP; GOLDKRAND, 1999; HOMER; LI; COOKE, 2000). Em um estudo com 509 mulheres com AER investigadas ecograficamente, as alterações uterinas são encontradas em cerca 23,8% dos casos, sendo a distorção da anatomia uterina a mais severa anomalia congênita encontrada (SALIM et al., 2003).

A insuficiência lútea é a responsável pela baixa produção de progesterona levando à maturação endometrial insuficiente para suportar a nidação e o desenvolvimento do ovo (BOTELLA, 1996). É a principal causa endócrina relacionada à perda gestacional. A prevalência dos defeitos da fase lútea varia de 5,1% a 60% nos casos de AER (CSAPO; PULKKINEN; WIEST, 1973; THO; BYRD; MCDONOUGH, 1979; DUDLEY; BRANCH, 1989).

Além da insuficiência lútea, outras alterações hormonais são observadas em mulheres com AER. O *diabetes mellitus* é responsabilizado por abortos (SUTHERLAND; PRITCHARD, 1986). Entretanto, pesquisa realizada não mostra diferença nas taxas de perdas gestacionais precoce entre mulheres diabéticas e saudáveis (MILLS, 1983). As endocrinopatias são bastante relacionadas à ocorrência de óbito fetal (PRITCHARD; MCDONALD; GANT, 1985; THOMAS; REID, 1987).

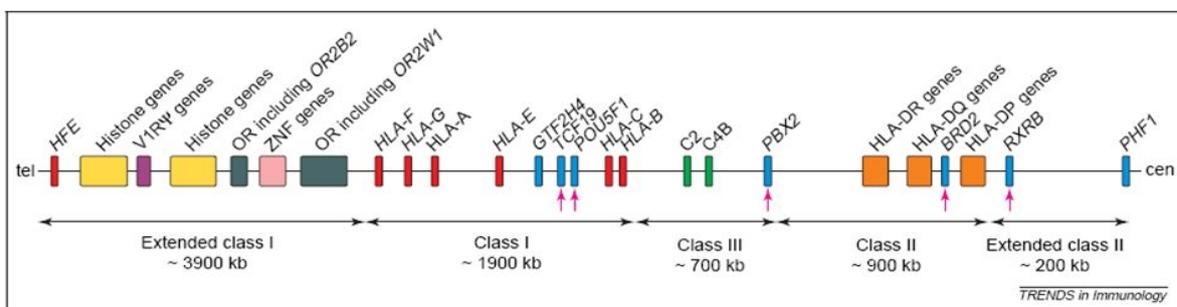
Infecções, promovidas por agentes microbiológicos tais como: *Chlamydia trachomatis*, *Brucella abortus*, *Citomegalovirus spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Herpes*

*simplex*, *Mycoplasma spp.*, têm sido propostos como causadores de AER. Porém, essa associação não está comprovada. O *Ureaplasma urealyticum* foi relacionado ao AER, mas os resultados da literatura permanecem inconclusivos. Não há evidências que comprovem a importância das infecções citadas na gênese do AER. Fatores exógenos, tais como fumo e álcool, parecem aumentar o risco (STRAY-PEDERSEN; ENG; REIKVAN, 1978; ANOKUTE, 1986; CARP et al., 1990; MONTEIRO; PINTO; BEDONE, 1994; CAETANO et al., 2006).

### 3.3 Sistema HLA

O complexo principal de histocompatibilidade (CPH) é um grande complexo gênico com múltiplos *loci*, responsável pela codificação das moléculas apresentadoras de antígenos ao sistema imune no qual exerce grande influência no processo de transplante de órgãos e tecidos (KLEIN; SATO, 2000; ALVES et al., 2007).

Em seres humanos, o CPH é denominado sistema HLA (*Human Leukocyte Antigens*). Compreende uma região de genes altamente polimórficos localizados no braço curto do cromossomo 6, entre as regiões 6p21.31 e 6p21.33. Cada *locus* pode conter um entre diferentes genes para uma determinada glicoproteína, ao que chamamos de polimorfismo, e que possibilitam assim, grande variação na expressão destas glicoproteínas; é herdado em bloco e expresso em co-dominância (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002; MONTE et al., 2004; ALVES et al., 2005; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; PAROLIN; CARNESE, 2009) (Figura 1).



**Figura 1 – Organização genômica do Complexo HLA Estendido (ZIEGLER; KENTENICH; UCHANSKA-ZIEGLER, 2005)**

O Complexo HLA clássico possui cerca de 200 genes, com 3600 quilobases (Kb). O “MHC estendido” (xMHC), o qual foi descrito recentemente, abrange 7,6 Mb, o que equivale a 421 *loci*, dos quais estima-se que 252 (60%) são transcritos e apresentam ORFs (matriz de leitura aberta), 30 *loci* (7%) são transcritos, porém não apresentam ORFs, e 139 (33%) são pseudogenes. O xMHC é dividido em cinco subregiões do telômero ao centrômero: classe I estendida, classe I clássica, classe III clássica, classe II clássica e classe II estendida, respectivamente (HORTON et al, 2004; FERNANDO et al, 2007).

Os genes de HLA classe I são dez e a nomenclatura oficializada desses genes é: HLA-A, B, C, D, E, F, G, H (HFE), K e L. Os três primeiros genes de classe I são comumente usados na identificação de histocompatibilidade em transplantes. Os genes HLA-E e F codificam moléculas encontradas em tecidos fetais e em alguns tecidos da fase adulta e estão relacionadas com a ativação das células NK (*natural killer*). Os genes HLA-G codificam moléculas que também estão diretamente ligadas à ativação das células NK, e estão indiretamente relacionadas com a ativação do HLA-E presentes em tecidos placentários. Os *loci* HLA-J, K e L não codificam proteínas, sendo denominados pseudogenes. De modo geral, os genes de classe I expressam moléculas na superfície estando presente em todas as células nucleadas do organismo (JANEWAY; TRAVES, 2002; SULLIVAN et al., 2006).

Na região de classe II, são reconhecidos os seguintes genes: HLA-DRA; DRB1-9; DQA1,2; DQB1,3; DOA, DOB, DMA; DMB; DPA1,2; DPB1,2; TAP1,2; LMP2,7 e MICA-E. Os produtos dos genes HLA-DR, DQ e DP são as moléculas clássicas de histocompatibilidade de classe II. Os genes DOA e DOB codificam as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  das moléculas de HLA, respectivamente. Além desses, são também encontrados os genes responsáveis pela codificação de moléculas relacionadas ao processamento, transporte e associação de peptídeos às moléculas do HLA, os genes LMP 2 e 7.(OLIVEIRA; SELL, 2002; ALVES et al., 2005; SULLIVAN et al., 2006).

Os genes TAP 1 e 2 transportam os peptídeos degradados no citosol para o retículo endoplasmático, facilitando a associação do peptídeo com a molécula HLA de classe I. As moléculas HLA-DMA e DMB auxiliam no processamento e inserção do peptídeo às moléculas clássicas de histocompatibilidade de classe II. Os genes MIC,

relacionados com a codificação de moléculas relacionadas com as de classe I, foram recentemente distribuídos nas categorias MICA, MICB, MICC, MICD e MICE. Existem diversos pseudogenes incluídos na região do HLA de classe II, tais como DRB2, 6, 7, 8 e 9; DQA2, DQB2 e DQB3, e, ainda, DPA2 e DPB2 (OLIVEIRA; SELL, 2002; ALVES et al., 2005; SULLIVAN et al., 2006).

As moléculas de classe II são expressas em células imunes apresentadoras de antígenos (células B, células T ativadas, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais tímicas (OLIVEIRA; SELL, 2002; ALVES et al., 2005; SULLIVAN et al., 2006).

A região HLA de classe III compreende pelo menos 59 genes, entretanto, não é conhecido se todos os genes desta região são funcionais ou pseudogenes. Dentre eles, destacam-se os do sistema complemento (C4A, C4B, Fator B e C2), os genes que codificam a enzima 21-hidroxilase (21-OH), a proteína do choque térmico (Hsp 70), e TNF e LTA que codificam as citocinas TNF- $\alpha$  e LT- $\beta$  (antigo TNF- $\beta$ ) respectivamente (FERNANDES et al., 2003; ALVES et al., 2005).

Pelo fato dos genes HLA estarem muito próximos uns dos outros, eles são herdados em bloco. O conjunto de genes, herdados em bloco, oriundos do cromossomo materno ou paterno é designado haplótipo. Os haplótipos compreendem complexos de genes fortemente unidos que, com efeito, raramente sofrerão recombinação durante o *crossing over*, isso faz com que a maioria dos indivíduos herde um conjunto intacto de alelos HLA parentais de cada progenitor. Outra característica dos alelos HLA é o perfil de expressão co-dominante, assim indivíduos heterozigotos expressam os dois haplótipos que possui (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002; JANEWAY; TRAVES, 2002; SULLIVAN et al., 2006).

Devido ao seu grande polimorfismo, os genes do sistema HLA apresentam frequências alélicas variadas em diferentes populações. Esta diversidade genética da espécie permite haver diferenças na susceptibilidade a doenças entre grupos geneticamente distintos (FERNANDES et al., 2003; ALVES et al., 2005).

### 3.4 Sistema HLA e Aborto Espontâneo Recorrente (AER)

A relação imunológica entre mãe e feto é importante para a manutenção e o sucesso da gravidez, uma vez que o feto é um enxerto semi-alogênico. Inicialmente, a não-rejeição do feto foi atribuída à ausência de resposta imunológica materna, mas inúmeras investigações demonstraram que na gravidez existe o desenvolvimento de respostas imunológicas com a participação de fatores humorais e celulares (CHRISTIANSEN, 1996).

Ainda não há uma compreensão plena dos mecanismos que protegem o feto do sistema imune materno, mas supõe-se que o trofoblasto e a expressão de alguns HLA não-clássico - HLA-G - exerçam função importante nesta tolerância imunológica, uma vez que representam a interface entre as células fetais e maternas (ALVES et al., 2007).

Outra hipótese é que a presença de HLA em homozigose no enxerto embrionário (semelhança do par de genes HLA entre os pais) resultaria numa produção diminuída de anticorpos "bloqueadores" maternos. Tais anticorpos seriam responsáveis pela proteção do feto contra a resposta imune da mãe, ocasionando a tolerância fetal, suprimindo a rejeição e evitando o AER (KRUSE et al., 2004).

O mecanismo pelo qual o sistema imune materno não rejeita o feto durante a gravidez a despeito da presença de antígenos paternos é desconhecido. Evidências indicam uma interação bidirecional entre o sistema imune materno e o sistema reprodutivo durante a gravidez, o que resultaria no estímulo ou inibição do desenvolvimento da unidade fetoplacentária (WEGMANN et al., 1984).

Estudos associam a compatibilidade de antígenos HLA dos pais com a ocorrência de AER classificando-os como: primário ou secundário. No primário há uma maior compatibilidade de antígenos HLA entre o casal, hiporreatividade na cultura mista de linfócitos e ausência de anticorpos bloqueadores dirigidos contra antígenos paternos, enquanto o secundário apresenta compatibilidade de antígenos HLA no casal, cultura mista de linfócitos normais e presença de anticorpos bloqueadores contra antígenos paternos (SOUZA; VOLTARELLI; FERRIANI, 1997; KRUSE et al., 2004).

### 3.5 Gravidez e a Resposta Imunológica

A maioria das respostas imunes envolve principalmente respostas do tipo humoral ou mediadas por células (PARISH, 1972; KATSURA, 1977). A descoberta de dois subtipos de clones de células T auxiliares (Th) CD4+, Th1 e Th2, fornece algumas explicações para a expressão das duas respostas (MOSMANN et al., 1986; DEL PRETE et al., 1991).

Quando ativadas as células Th1 produzem IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (MOSMANN et al., 1986; CHERWINSKI et al. 1987; COFFMAN et al., 1988; MOSMANN; COFFMAN, 1989). O padrão de citocinas Th1 está frequentemente associado com resposta mediada por células, particularmente apropriadas para destruir patógenos extracelulares endocitados por células fagocíticas ou patógenos que se multiplicam no citoplasma das células infectadas (MOSMANN et al., 1989).

O padrão de citocinas Th2, que inclui IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, estimula respostas de anticorpos, promovendo a produção de quantidades relativamente elevadas de IgM, IgE, e isotipos de IgG não-ativadores do complemento, além de estimular a ativação e diferenciação de eosinófilos e atua nas reações alérgicas (CHERWINSKI et al., 1987; BROWN et al., 2000).

Citocinas são abundantes no útero grávido. Qualquer distúrbio no delicado balanço imunológico que ocorre na interface materno-fetal poderá resultar em perda ou outras complicações gestacionais, sendo consideradas elementos fundamentais no remodelando no ambiente uterino para que aceite um embrião semi-alógeno (ROBERTSON et al., 1994; RIVERA et al., 1998; WEGMANN, 1984; 1988).

Durante a gestação, deve ocorrer um equilíbrio entre os tipos de citocinas, o qual poderia estar alterado favorecendo ou prejudicando o desenvolvimento embrionário. Os primeiros estudos que mostraram a resposta imune anormal, no contexto do paradigma Th1/Th2, demonstraram, *in vitro*, que antígenos do trofoblasto induzem a produção de citocinas embriotóxicas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  pelos linfócitos de mulheres suscetíveis a AER. Isso sugere que a imunidade tipo Th2 pode ser uma resposta natural a antígenos do trofoblasto, enquanto respostas Th1 são aberrantes e

associadas com AER (YAMADA; POLGAR; HILL, 1994; HILL; POLGAR; ANDERSON, 1995).

Assim sendo, o balanço entre a resposta Th1 (IL-2, INF-g e TNF-a) e Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) determina o sucesso da gravidez. Em mulheres com gestação normal é observada uma maior resposta Th2 se comparada com mulheres com história de aborto de repetição ou falhas repetidas de fertilização *in vitro*, na qual se observa tendência à resposta Th1 (SAITO, 2000; POCIOT et al., 1993).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

- Tipificar os genes HLA-A\*, -B\* e -DRB1\* em mulheres com e sem abortamento espontâneo recorrente (AER).

### 4.2 Objetivos Específicos

- Verificar as frequências alélicas dos genes HLA-A\*, -B\*, -DRB1\* e sua associação em mulheres com AER e em mulheres sem AER;
- Identificar as frequências haplotípicas e sua associação em mulheres com AER e em mulheres sem AER;
- Calcular o desequilíbrio de ligação para os *loci* estudados em mulheres com e sem AER.

## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 Local de realização da pesquisa**

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade (LEGH), situado no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão – Unidade Materno Infantil (HUUFMA – UMI).

### **5.2 Tipo de estudo**

Realizou-se um estudo caso-controle composto por 100 mulheres com AER idiopático (caso) e 100 mulheres sem AER (controle). O recrutamento dos sujeitos da pesquisa foi realizado entre julho de 2007 a junho de 2009, todas provenientes do Estado do Maranhão, com faixa etária entre 18 a 35 anos.

### **5.3 Casuística**

Para composição do grupo caso e controle, foi utilizada uma amostra de conveniência.

As mulheres do grupo caso foram identificadas por meio da análise de seus prontuários e que apresentaram dois ou mais AER sem etiologia conhecida, ocorridos até a 20ª semana gestacional. O diagnóstico de AER foi realizado pelo pré-natal especializado do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - Unidade Materno Infantil e pelo IGMA – Instituto de Ginecologia do Maranhão. Não foram incluídas na pesquisa, para este grupo, mulheres: acima de 35 anos e abaixo de 18 anos; com infecções; com problemas anatômicos do ovário e endócrinos; com suspeita de doenças auto-imunes; que apresentaram caso de aborto tardio e/ou óbito fetal.

As mulheres do grupo controle foram selecionadas de forma aleatória não sistematizada, sendo que os critérios de inclusão foram: ter tido dois ou mais filhos de gravidezes normais na faixa etária entre 18 e 35 anos. Não foram incluídas na pesquisa,

para este grupo, mulheres: acima de 35 anos e abaixo de 18 anos e que apresentaram pelo menos um aborto.

Ambos os grupos foram submetidos à anamnese, visando obter dados pertinentes à pesquisa como: grupo étnico, casos de AER na família e outros (APÊNDICE II).

#### **5.4 Considerações Éticas**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão com parecer N° 33104-0702/2007 de 15 de junho de 2007 (ANEXO I).

Todos os sujeitos da pesquisa foram informados dos objetivos da pesquisa e, após concordarem em participar, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 1) no qual autorizavam a coleta de amostras sanguíneas para análise.

#### **5.5 Análise Genético Molecular**

##### **Obtenção do DNA Genômicos**

Foram coletadas amostras do sangue periférico (4mL), utilizando-se o sistema a vácuo em tubos de Vacutainer contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) como anticoagulante.

A Extração do DNA Genômico foi feita com o kit comercial EZ-DNA<sup>®</sup> (Biological Industries, Beit Haemek, Israel). Em alíquota de sangue total (500µl) acrescentou-se 1mL de tampão RCLB (Tris 1M pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 1M, Triton X-100 1.3Mm e sacarose 0.6M), seguido de homogeneização e centrifugação por três minutos a 9000 rpm. Posteriormente adicionou-se 1mL de RBC, seguido de homogeneização e centrifugação no mesmo tempo e rotação. Após, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 500µl de EZ-DNA, a solução foi homogeneizada durante dois minutos e

deixada em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram acrescentados 500µl de etanol absoluto gelado e homogeneizou-se lentamente por inversão. Novamente, repouso por cinco minutos a temperatura ambiente e posterior centrifugação a 9000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi descartado com cuidado e foram adicionados 500µl de etanol 96° gelado. Foi feita uma nova centrifugação a 9000 rpm por três minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado e acrescentado 200µl de água ultra pura. Deixou-se em banho a 65°C por uma hora. Após esse período as amostras foram armazenadas em freezer à -20°C.

### Tipificação HLA Classe I e II para os *loci* A\*, B\* e DRB1\*

A Tipificação HLA para os *loci* A\*, B\* e DRB1\* foi feita pela técnica de PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction - Specific Sequence of Oligonucleotides Probes*), utilizando-se o kit LABType® (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA), conforme recomendações do fabricante.

O DNA alvo foi amplificado na PCR utilizando um *primer* marcado com biotina específico para os éxons 2 e 3 dos genes HLA-A\* e -B\* e éxon 3 do gene HLA DRB1\* seguindo o protocolo abaixo:

Programa PCR SSO LABType®		
Passo	Temperatura e tempo de incubação	Nº de ciclos
Passo 1:	96°C 03:00	1
Passo 2:	96°C 00:20	5
	60°C 00:20	
	72°C 00:20	
Passo 3:	96°C 00:10	30
	60°C 00:15	
	72°C 00:20	
Passo 4:	72°C 10:00	1
Passo 5:	4°C para sempre	1

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese, em cuba micro SSP gel System® (MGS-B, One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA), em gel de agarose a 2%, a 150 volts por 10 minutos, corados com brometo de etídio e visualizados em transluminador de luz ultravioleta e, em seguida, fotografados.

Os DNAs amplificados foram hibridizados, utilizando-se microesferas ligadas a oligonucleotídeos específicos para os *loci* HLA-A\*, B\* e DRB1\* contidos no

kit comercial LABType® SSOP (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA), conforme recomendações do fabricante. A hibridização foi verificada por meio de citômetro de fluxo LABScan™ 100 flow analyzer (Plataforma Luminex® – One Lambda, Canoga Park, CA, USA), que identifica a intensidade de fluorescência e, em seguida, os dados foram analisados por meio do Software HLA Fusion™ (One Lambda, Canoga Park, CA, USA, versão 1.2).

## 5.6 Processamento e Análise Estatística dos dados

Para digitação e processamento de dados, foi utilizado o programa EPI-INFO 2 (INFO 2.002 do CDC, Atlanta, EUA) (DEAN et al., 1994).

As frequências alélicas foram obtidas por contagem direta e para frequências haplotípicas utilizou-se o programa ARLEQUIN 3.11 (ARLEQUIN ver 3.11, Zoological Institute, University of Berne, 2007) (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2007); em ambos os casos a contagem foi independente da condição homocigota ou heterocigota.

A análise estatística consistiu na utilização de métodos descritivos: distribuição de frequências 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 Qui-Quadrado, com correção de Yates, ou Teste Exato de Fisher, quando necessário. Enquanto, as comparações entre as variáveis quantitativas foram realizadas por meio do Teste t de *Student*. Em todos os testes estatísticos foi considerado o nível de significância igual a 5%.

Também foi calculado *Odds Ratio (OR)* com seu respectivo intervalo de confiança (IC) de 95%. Para esses cálculos, foi utilizado o programa STATA 10.0® (Copyright 1996–2010 StataCorp LP, Texas, USA, 2007).

Para calcular os valores relativos ao desequilíbrio de ligação dos *loci HLA-A\**, *-B\** e *DRB1\** das amostras, bem como seu grau de significância, utilizou-se o

programa ARLEQUIN 3.11 (ARLEQUIN ver 3.11, Zoological Institute, University of Berne, 2007) (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2007).

## 6 RESULTADOS

### Características Gerais da Amostra

A média de idade para o grupo caso foi de  $30,9 \pm 3,88$  anos e para o grupo controle foi de  $31,35 \pm 3,81$  anos.

Com relação ao grupo étnico, que foi baseado em auto-referência, obtiveram-se as seguintes proporções para o grupo caso e controle, respectivamente: branco (32% vs 37%); negro (15% vs 11%) e pardo (53% vs 52%). Não se obteve diferença estatisticamente significativa com relação à etnia.

A média de abortos para o grupo caso foi de  $2,38 \pm 0,62$  e a média de filhos para o grupo controle foi de  $2,23 \pm 0,92$ .

Com relação à ocorrência de AER na família, 54% das mulheres com AER e 21% das mulheres sem AER apresentaram aborto espontâneo recorrente na família. Cerca 40% das mulheres com AER e 8% das mulheres sem AER tiveram dificuldade para engravidar.

Com relação ao consumo de bebida alcoólica e a prática do tabagismo durante a gravidez, 40% das mulheres com AER e 22% das mulheres sem AER consumiram algum tipo de bebida alcoólica e 31% das mulheres com AER e 9% das mulheres sem AER fizeram uso de cigarro durante a gravidez.

### Frequências alélicas dos *loci* HLA

Para o *locus* A\* (Tabela 1), foram encontrados 19 dos 853 alelos já descritos, o que equivale a uma frequência de 2,23%. O alelo mais frequente em mulheres com e sem AER foi A\*02 (56% e 49%, respectivamente), contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (OR=1,32; 95% IC=0,73 – 2,40; p=0,395).

O alelo A\*24 foi mais frequente no grupo de mulheres sem AER, apresentando uma frequência de 25%. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (OR=0,41; 95% IC=0,18 – 0,92; p=0,028).

Para o alelo A\*34, a maior frequência foi encontrada no grupo de mulheres com AER (8% vs 1%), sendo esta diferença estatisticamente significativa (OR=8,61; 95% IC=1,06 – 187,04; p=0,034).

Tabela 1 – Distribuição da frequência alélica para o *locus* HLA-A\* em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.

Alelo	Com AER (n=100)		Sem AER (n=100)		OR (IC 95%)	p
	f	%	f	%		
A*01	18	18,0	16	16,0	1,15 (0,52 - 2,57)	0,850
A*02	56	56,0	49	49,0	1,32 (0,73 - 2,40)	0,395
A*03	8	8,0	15	15,0	0,49 (0,18 - 1,32)	0,183
A*11	7	7,0	8	8,0	0,87 (0,27 - 2,76)	>0,999
A*23	13	13,0	11	11,0	1,21 (0,48 - 3,08)	0,827
A*24	12	12,0	25	25,0	0,41 (0,18 - 0,92)	0,028
A*25	3	3,0	0	0,0	NC	0,246
A*26	8	8,0	7	7,0	1,16 (0,36 - 3,72)	>0,999
A*29	5	5,0	8	8,0	0,61 (0,16 - 2,14)	0,566
A*30	14	14,0	9	9,0	1,65 (0,63 - 4,38)	0,375
A*31	14	14,0	15	15,0	0,92 (0,39 - 2,17)	>0,999
A*32	6	6,0	7	7,0	0,85 (0,24 - 2,94)	>0,999
A*33	9	9,0	9	9,0	1,0 (0,34 - 2,90)	0,804
A*34	8	8,0	1	1,0	8,61(1,06 - 187,04)	0,034
A*36	1	1,0	0	0,0	NC	>0,999
A*66	1	1,0	1	1,0	1,0 (0,0 - 37,14)	>0,999
A*68	9	9,0	15	15,0	0,56 (0,21 - 1,45)	0,276
A*74	6	6,0	4	4,0	1,53 (0,37 - 6,71)	0,747
A*80	2	2,0	0	0	NC	0,497

AER= Aborto Espontâneo Recorrente

NC = Não Calculado

Para o *locus* B\* (Tabela 2), foram encontrados 29 alelos dos 1249 já descritos (2,32%). Os alelos mais frequentes para mulheres com e sem AER foram, respectivamente, B\*15 (32%) e o B\*35 (41%). Sendo que apenas o alelo B\*35 apresentou uma diferença estatisticamente significativa quando comparadas entre os grupos (OR=0,27; 95% IC=0,13 – 0,56; p=0,0002).

Tabela 2 – Distribuição da frequência alélica para o *locus* HLA-B\* em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.

Alelo	Com AER (n=100)		Sem AER (n=100)		OR (IC 95%)	p
	f	%	f	%		
B*07	7	7,0	10	10,0	0,68 (0,22 - 2,04)	0,612
B*08	11	11,0	6	6,0	1,94 (0,63 - 6,18)	0,310
B*13	2	2,0	1	1,0	2,02 (0,14 - 57,24)	>0,999
B*14	9	9,0	12	12,0	0,73 (0,27 - 1,96)	0,644
B*15	32	32,0	30	30,0	1,10 (0,58 - 2,09)	0,878
B*18	2	2,0	5	5,0	0,39 (0,05 - 2,33)	0,444
B*27	4	4,0	6	6,0	0,65 (0,15 - 2,72)	0,747
B*35	16	16,0	41	41,0	0,27 (0,13 - 0,56)	0,0002
B*37	1	1,0	3	3,0	0,33 (0,01 - 3,60)	0,621
B*38	4	4,0	2	2,0	2,04 (0,31 - 16,46)	0,682
B*39	6	6,0	7	7,0	0,85 (0,24 - 2,94)	>0,999
B*40	15	15,0	12	12,0	1,29 (0,53 - 3,15)	0,679
B*41	2	2,0	0	0,0	NC	0,497
B*42	4	4,0	3	3,0	1,35 (0,25 - 7,82)	>0,999
B*44	11	11,0	10	10,0	1,11 (0,41 - 3,00)	>0,999
B*45	3	3,0	4	4,0	0,74 (0,13 - 4,06)	>0,999
B*47	0	0,0	1	1,0	0,0 (0,0 - 17,44)	>0,999
B*48	5	5,0	0	0,0	NC	0,059
B*49	13	13,0	8	8,0	1,72 (0,63 - 4,80)	0,356
B*50	1	1,0	6	6,0	0,16 (0,01 - 1,36)	0,118
B*51	16	16,0	13	13,0	1,27 (0,54 - 3,02)	0,687
B*52	6	6,0	3	3,0	2,06 (0,44 - 10,76)	0,497
B*53	9	9,0	4	4,0	2,37 (0,64 - 9,53)	0,251
B*55	4	4,0	2	2,0	2,04 (0,31 - 16,46)	0,682
B*57	6	6,0	4	4,0	1,53 (0,37 - 6,71)	0,747
B*58	9	9,0	6	6,0	1,55 (0,48 - 5,14)	0,591
B*78	1	1,0	0	0,0	NC	>0,999
B*81	0	0,0	1	1,0	0,0 (0,00 - 17,44)	>0,999
B*82	1	1,0	0	0,0	NC	>0,999

AER= Aborto Espontâneo Recorrente

NC = Não Calculado

Para o *locus* DRB1\* (Tabela 3) foram encontrados 13 dos 659 alelos descritos, o que equivale a 1,97% do total de alelos já descritos. O alelo mais frequente em mulheres com e sem AER foi DRB1\*13 (31% vs 39%). Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (OR=0,70; 95% IC=0,38 – 1,31; p=0,299).

Tabela 3 – Distribuição da frequência alélica para o *locus* HLA-DRB1\* em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.

Alelo	Com AER (n=100)		Sem AER (n=100)		OR (IC 95%)	p
	f	%	f	%		
DRB1*01	16	16,0	23	23,0	0,64 (0,30 - 1,37)	0,284
DRB1*03	22	22,0	11	11,0	2,28 (0,98 - 5,39)	0,056
DRB1*04	26	26,0	21	21,0	1,32 (0,65 - 2,68)	0,504
DRB1*07	24	24,0	13	13,0	2,11 (0,95 - 4,74)	0,068
DRB1*08	12	12,0	16	16,0	0,72 (0,30 - 1,71)	0,541
DRB1*09	4	4,0	3	3,0	1,35 (0,25 - 7,82)	>0,999
DRB1*10	2	2,0	9	9,0	0,21 (0,03 - 1,06)	0,062
DRB1*11	22	22,0	26	26,0	0,80 (0,40 - 1,62)	0,619
DRB1*12	4	4,0	2	2,0	2,04 (0,31 - 16,46)	0,682
DRB1*13	31	31,0	39	39,0	0,70 (0,38 - 1,31)	0,299
DRB1*14	9	9,0	10	10,0	0,89 (0,31 - 2,51)	>0,999
DRB1*15	13	13,0	10	10,0	1,34 (0,52 - 3,52)	0,657
DRB1*16	15	15,0	17	17,0	0,86 (0,38 - 1,96)	0,847

AER= Aborto Espontâneo Recorrente

### Frequências haplotípicas

As tabelas 4, 5, 6 e 7 estão constituídas apenas pelos haplótipos que apresentaram frequência igual ou maior que dois e que foram comuns nas duas amostras.

Para a associação haplotípica entre os alelos HLA-A\*, -B\* e -DRB1\* (Tabela 4), o haplótipo A\*02B\*15DRB1\*16 apresentou frequência de 6% e 4% em mulheres com e sem AER, respectivamente, não havendo diferença significativa entre os grupos (OR=1,53; 95% IC=0,37-6,71; p=0,373). O mesmo ocorreu para o haplótipo A\*02B\*51DRB1\*13.

Tabela 4 – Distribuição das frequências haplotípicas A\*B\*DRB1\* observadas em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.

Haplótipo	Com AER (n=100)		Sem AER (n=100)		OR (IC 95%)	p
	f	%	f	%		
A*01 B*08 DRB1*03	4	4,0	2	2,0	2,04 (0,31 – 16,46)	0,341
A*02 B*15 DRB1*16	6	6,0	4	4,0	1,53 (0,37 – 6,71)	0,373
A*02 B*51 DRB1*13	6	6,0	4	4,0	1,53 (0,37 – 6,71)	0,373
A*02 B*52 DRB1*04	2	2,0	2	2,0	1,00 (0,10 – 10,16)	0,689
A*23 B*15 DRB1*11	2	2,0	3	3,0	0,66 (0,08 – 4,99)	0,500
A*26 B*15 DRB1*01	2	2,0	2	2,0	1,00 (0,10 – 10,16)	0,689

AER= Aborto Espontâneo Recorrente

Para a associação haplotípica HLA-A\*-B\*, o haplótipo A\*02B\*15 (Tabela 5) foi o mais frequente em mulheres com e sem AER (8% e 10%, respectivamente), porém, sem diferença significativa entre os grupos (OR=0,78; 95% IC=0,27 – 2,27; p=0,805).

Tabela 5 – Distribuição das frequências haplotípicas A\*B\* observadas em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.

Haplótipo	Com AER (n=100)		Sem AER (n=100)		OR (IC 95%)	p
	f	%	f	%		
A*01 B*08	2	2,0	3	3,0	0,66 (0,08 – 4,99)	0,500
A*01 B*57	3	3,0	3	3,0	1,00 (0,16 – 6,39)	0,658
A*02 B*07	5	5,0	6	6,0	0,82 (0,21 – 3,19)	0,999
A*02 B*15	8	8,0	10	10,0	0,78 (0,27 – 2,27)	0,805
A*02 B*27	2	2,0	6	6,0	0,32 (0,04 – 1,81)	0,139
A*02 B*40	2	2,0	2	2,0	1,00 (0,10 – 10,16)	0,689
A*02 B*44	5	5,0	6	6,0	0,82 (0,21 – 3,19)	0,999
A*02 B*49	5	5,0	2	2,0	2,58 (0,43 – 19,71)	0,222
A*02 B*51	7	7,0	6	6,0	1,18 (0,34 – 4,14)	0,999
A*23 B*15	3	3,0	4	4,0	0,74 (0,13 – 4,06)	0,500
A*24 B*35	2	2,0	7	7,0	0,27 (0,04 – 1,47)	0,084
A*24 B*40	2	2,0	2	2,0	1,00 (0,10 – 10,16)	0,689
A*24 B*51	2	2,0	2	2,0	1,00 (0,10 – 10,16)	0,689
A*26 B*15	3	3,0	2	2,0	1,52 (0,20 – 13,28)	0,500
A*29 B*44	2	2,0	3	3,0	0,66 (0,08 – 4,99)	0,500
A*31 B*35	3	2,0	7	7,0	0,41 (0,08 – 1,83)	0,165
A*31 B*40	7	7,0	2	2,0	3,69 (0,69 – 26,41)	0,084
A*32 B*35	2	2,0	3	3,0	0,66 (0,08 – 4,99)	0,500
A*33 B*14	2	2,0	5	5,0	0,39 (0,05 – 2,33)	0,222
A*74 B*15	3	3,0	3	3,0	1,00 (0,16 – 6,39)	0,658

AER= Aborto Espontâneo Recorrente

Em relação aos haplótipos HLA-A\*-DRB1\*, houve diferença estatisticamente significativa para o A\*02DRB1\*16 (OR= 6,68; 95% IC=1,36 – 44,52; p=0,012), sendo mais frequente em mulheres com AER quando comparadas às sem AER (12% e 2%, respectivamente) (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição das frequência haplotípicas A\*DRB1\* observadas em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.

Haplótipo	Com AER (n=100)		Sem AER (n=100)		OR (IC 95%)	p
	f	%	f	%		
A*01 DRB1*03	6	6,0	5	5,0	1,21 (0,31 – 4,77)	0,999
A*01 DRB1*14	2	2,0	2	2,0	1,00 (0,10 – 10,16)	0,689
A*02 DRB1*01	3	3,0	8	8,0	0,36 (0,07 – 1,53)	0,214
A*02 DRB1*04	9	9,0	5	5,0	1,88 (0,55 – 6,73)	0,405
A*02 DRB1*08	3	3,0	4	4,0	0,74 (0,13 – 4,06)	0,555
A*02 DRB1*11	5	5,0	5	5,0	1,00 (0,24 – 4,14)	0,745
A*02 DRB1*13	10	10,0	13	13,0	0,74 (0,28 – 1,93)	0,657
A*02 DRB1*14	2	2,0	3	3,0	0,66 (0,08 – 4,99)	0,500
A*02 DRB1*15	6	6,0	3	3,0	2,06 (0,44 – 10,76)	0,248
A*02 DRB1*16	12	12,0	2	2,0	6,68 (1,36 – 44,52)	0,012
A*03 DRB1*11	2	2,0	2	2,0	1,00 (0,10 – 10,16)	0,689
A*11 DRB1*07	3	3,0	3	3,0	1,00 (0,16 – 6,39)	0,658
A*23 DRB1*11	3	3,0	6	6,0	0,48 (0,09 – 2,26)	0,248
A*24 DRB1*01	2	2,0	4	4,0	0,49 (0,06 – 3,20)	0,341
A*24 DRB1*14	3	3,0	3	3,0	1,00 (0,16 – 6,39)	0,658
A*26 DRB1*01	3	3,0	3	3,0	1,00 (0,16 – 6,39)	0,658
A*26 DRB1*13	4	4,0	4	4,0	1,00 (0,20 – 4,92)	0,639
A*31 DRB1*08	5	5,0	7	7,0	0,70 (0,18 – 2,57)	0,551
A*33 DRB1*03	3	3,0	2	2,0	1,52 (0,20 – 13,28)	0,500
A*33 DRB1*15	2	2,0	2	2,0	1,00 (0,10 – 10,16)	0,689
A*68 DRB1*13	3	3,0	2	2,0	1,52 (0,20 – 13,28)	0,500

AER= Aborto Espontâneo Recorrente

Para associação haplotípica B\*DRB1\* (Tabela 7), os mais frequentes em mulheres com AER foram B\*08DRB1\*03 e B\*15DRB1\*13, ambos com 9%. Com relação as mulheres sem AER, o haplótipo mais frequente foi B\*35DRB1\*03 (9%). Nenhum dos haplótipos apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados entre os grupos.

Tabela 7 – Distribuição das frequência haplotípicas B\*DRB1\* observadas em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.

Haplótipo	Com AER (n=100)		Sem AER (n=100)		OR (IC 95%)	p
	f	%	f	%		
B*07 DRB1*15	4	4,0	4	4,0	1,00 (0,20 – 4,92)	0,639
B*08 DRB1*03	9	9,0	4	4,0	2,37 (0,64 – 9,53)	0,251
B*14 DRB1*03	6	6,0	3	3,0	2,06 (0,44 – 10,76)	0,248
B*15 DRB1*01	3	3,0	5	5,0	0,59 (0,11 – 2,92)	0,360
B*15 DRB1*03	2	2,0	2	2,0	1,00 (0,10 – 10,16)	0,689
B*15 DRB1*11	5	5,0	3	3,0	1,70 (0,34 – 9,28)	0,360
B*15 DRB1*13	9	9,0	3	3,0	3,20 (0,76 – 15,42)	0,136
B*15 DRB1*16	7	7,0	6	6,0	1,18 (0,34 – 4,14)	0,999
B*35 DRB1*01	6	6,0	9	9,0	0,65 (0,19 – 2,09)	0,591
B*35 DRB1*13	4	4,0	5	5,0	0,79 (0,17 – 3,53)	0,500
B*35 DRB1*14	2	2,0	5	5,0	0,39 (0,05 – 2,33)	0,222
B*35 DRB1*16	2	2,0	8	8,0	0,23 (0,03 – 1,24)	0,104
B*39 DRB1*08	2	2,0	4	4,0	0,49 (0,06 – 3,20)	0,341
B*40 DRB1*13	2	2,0	4	4,0	0,49 (0,06 – 3,20)	0,341
B*44 DRB1*07	5	5,0	4	4,0	1,26 (0,28 – 5,81)	0,500
B*49 DRB1*04	5	5,0	2	2,0	2,58 (0,43 – 19,71)	0,222
B*51 DRB1*04	3	3,0	2	2,0	1,52 (0,20 – 13,28)	0,500
B*51 DRB1*07	5	5,0	2	2,0	2,58 (0,43 – 19,71)	0,222
B*51 DRB1*13	4	4,0	6	6,0	0,65 (0,15 – 2,72)	0,745
B*52 DRB1*04	2	2,0	3	3,0	0,66 (0,08 – 4,99)	0,500
B*53 DRB1*07	3	3,0	2	2,0	1,52 (0,20 – 13,28)	0,500

AER= Aborto Espontâneo Recorrente

**Desequilíbrio de ligação para os alelos A\* B\* e DRB1\* em mulheres com AER e em mulheres sem AER.**

Para o cálculo de desequilíbrio de ligação entre os *loci* HLA-A\*, B\* e DRB1\* em mulheres com e sem AER, obtiveram-se os seguintes resultados apresentados na Tabela 8.

No presente estudo, para os *loci* A\* e B\*, não se encontrou desequilíbrio de ligação entre mulheres com e sem AER, estando estes *loci* em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para o *locus* DRB1\* em mulheres com AER, observou-se um desequilíbrio de ligação, tendo um valor de  $p = 0,01$ . Não estando este locus em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 8 – Distribuição das frequências genotípicas para os *loci* A\* B\* e DRB1\* em mulheres com e sem AER em São Luís (MA), 2009.

<i>Locus</i>	Com AER (n=100)			Sem AER (n=100)		
	Het. Obs.	Het. Esp.	p	Het. Obs.	Het. Esp.	p
A*	0,86	0,88	0,64	0,91	0,89	0,58
B*	0,95	0,93	0,71	0,92	0,91	0,42
DRB1*	0,87	0,90	0,01	0,85	0,89	0,05

AER: Aborto Espontâneo Recorrente

Het. Esp.: Heterozigotos esperados

Het. Obs.: Heterozigotos observados

## 7 DISCUSSÃO

No presente estudo, encontrou-se uma elevada frequência para o alelo A\*02 e DRB1\*13 tanto em mulheres com AER quanto em mulheres sem AER, não havendo, porém, diferença estatisticamente significativa entre estes grupos.

Ferreira et al. (2007), utilizando uma amostra (n=1186) de Doadores Voluntários de Medula Óssea (DVMO) da população do Maranhão encontraram uma elevada frequência do alelo A\*02 (24,87%) e DRB1\*13 (10,61%). Ambos os alelos são característicos de grupos populacionais brasileiros, assim como de ameríndios, europeus, africanos e asiáticos. Dessa forma, a elevada frequência desses alelos em nossa amostra poderia ser explicada pela sua ampla distribuição em nossa população e na população mundial.

Vojvodic; Belic (2001), estudaram 130 casais com AER e um grupo controle de 57 casais sem AER na Rússia, no qual foram investigados antígenos linfocíticos humanos de classe I usando a técnica de microlinfotoxicidade. Os resultados mostraram alto risco relativo ( $RR > 1$ ) para alguns antígenos no grupo de casais com AER para os antígenos: A2, A9, A10, A29, B18 e B40. Destes, houve diferenças estatisticamente significantes para HLA-A2, HLA-B18, HLA-B40 em comparação com os resultados do grupo controle. Os resultados desta investigação sugerem que os antígenos linfocíticos humanos têm um papel etiopatogênico no desenvolvimento do AER e que alguns desses antígenos aumentam a susceptibilidade a desenvolver complicações na gravidez. Na amostra em estudo as frequências para os alelos A\*02, A\*29, B\*18 e B\*40 não foram estatisticamente significantes. O alelo A\*09 não foi encontrado na amostra em estudo.

No presente trabalho, pode-se observar que o alelo A\*03 foi mais frequente em mulheres sem AER e os alelos B\*57, DRB1\*03, e DRB1\*15 foram os mais frequentes em mulheres com AER, porém, em ambos os casos, não foram estatisticamente significantes quando comparados entre os grupos. O alelo A\*24 obteve resultado estatisticamente significativo, tendo um efeito protetor (OR: 0,41; 95% IC: 0,18-0,92) para mulheres sem AER. Constatou-se ainda que A\*34 apresentou um

resultado estatisticamente significante (OR: 8,61; 95% IC: 1,06-187,04; p=0,034), sendo um fator de risco para mulheres com AER.

Shankarkumar et al. (2008), realizaram uma pesquisa com 81 casais indianos com três ou mais AERs. Os alelos A\*030101, B\*5701, DRB1\*030101 e DRB1\*150101, estão associados ao AER em mulheres da Índia. Nesse mesmo trabalho, foi observado que A\*24, B\*40 e DRB1\*11 estão significativamente reduzidos em mulheres com AER, sugerindo um efeito protetor.

Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo para o alelo A\*24 corroboram com o trabalho de Shankarkumar et al. (2008).

Vanoli et al. (1985) investigaram as frequências dos antígenos HLA e seus haplótipos em 47 casais com AER de origem desconhecida, comparando com 65 casais férteis, sendo todos italianos. Foi observado nesse estudo um aumento significativo de HLA-B17 em casais com aborto em comparação aos sem aborto. Já no presente estudo, B\*57(17) foi encontrado, mas sem resultado estatisticamente significante.

Sbracia et al. (1997) estudaram 75 casais com AER e 30 casais normais na população italiana. Todos foram tipados para os antígenos A, B e DR e desses, 57 casais, foram selecionados e acompanhados durante 3 anos para estudar a sua performance reprodutiva. Em seus resultados, eles sugerem uma associação dos alelos B\*44 com AER. Entretanto não se obteve resultado estatisticamente significante para B\*44 no presente trabalho.

Na amostra em estudo, encontrou-se uma elevada frequência do alelo B\*35 em mulheres sem AER (OR: 0,27; 95% IC: 0,13 – 0,56; p=0,0002), caracterizando-se como um efeito protetor para este grupo.

Imai et al. (2001) analisaram a frequência dos alelos HLA-A\*, -B\* e -C\* em 89 mulheres com história de aborto recorrente primário inexplicado. Obtiveram como resultado uma frequência para B\*35 significativamente mais baixa nessas mulheres do que na população geral. As frequências dos outros alelos HLA-A\*, -B\* e -C\* não foram significativamente diferentes entre o grupo estudado e a população geral. Dessa forma, os autores concluíram que a menor frequência do HLA-B\*35 em pacientes com AER

estaria relacionada a ausência de resposta Th2, tendo em vista que esta resposta está relacionada a gravidez normal.

Para o *locus* DRB1\* não se encontrou nenhum alelo que estivesse correlacionado a um fator de risco ou de proteção para AER em nossa pesquisa.

Através de métodos sorológicos, Takamizawa et al. (1987) encontraram uma frequência aumentada de antígenos HLA-DR1 e -DR8 em mulheres japonesas com AER, mas sem significado estatístico.

Sasaki et al. (1997), usando o método PCR-SSP, observaram aumento significativo na frequência de HLA-DR4 em mulheres japonesas com AER. Já Christiansen et al. (1994, 1996, 1999) relataram que marcadores genéticos maternos (HLA-DR1, -DR3 e -DR10) poderiam estar envolvidos no abortamento espontâneo na população dinamarquesa. Posteriormente, a associação de HLA-DRB1\*03 com AER foi confirmada em um trabalho envolvendo 588 pacientes e 562 controles, mas havia pacientes que apresentavam anticorpos antifosfolídeos (KRUSE et al., 2004).

No Japão, Takakuwa et al. (2003), através da técnica PCR-RFLP, analisaram 79 mulheres com abortamento primário comparadas com 115 mulheres férteis normais e constataram a frequência aumentada do alelo HLA-DRB1\*1502 em pacientes com relação aos controles. Mas a diferença não foi estatisticamente significativa após teste de correção.

Para as associações haplotípicas, encontrou-se uma frequência estatisticamente significativa para o haplótipo A\*02DRB1\*16 (OR=6,68; 95% IC=1,36 – 44,52; p=0,012), estando mais frequente em mulheres com AER, sendo um fator de risco para este grupo.

Segundo Shankarkumar et al. (2008), diferenças haplotípicas estatisticamente significantes foram observadas entre as amostras de casais normais e casais com AER. Os haplótipos A1-B17, A10-B8, A3-B7, A9-B35 apresentaram frequências significativamente maiores em casais com AER quando comparados com casais normais.

Na amostra em estudo o único *locus* que apresentou desequilíbrio de ligação foi o DRB1\* (p=0,01) em mulheres com AER. Este resultado obtido pode estar relacionado ao haplótipo A\*02DRB1\*16 que se apresentou como fator de risco para o AER.

É de fundamental importância a compreensão correta dos valores relacionados ao desequilíbrio de ligação. Para confirmar o resultado obtido no presente estudo, faz-se necessário aumentar o número amostral.

Vauvert; Christiansen (2005), estudando desequilíbrio de ligação entre genes HLA de classe II, primariamente HLA-DRB1\* e HLA-G\* em casais com AER e sem AER, encontrou um desequilíbrio de ligação significativo entre HLA-DRB1\*03 e o HLA-G\*010102 em ambas as amostras. Em nossa amostra foi encontrado um desequilíbrio de ligação para o locus DRB1\* para amostra em mulheres com AER (p=0,01).

Considerando os resultados encontrados neste estudo pioneiro com a temática HLA e AER em nossa população, torna-se necessária e de fundamental importância a continuidade desta pesquisa, envolvendo não só os *loci* aqui analisados, mas também outros marcadores relacionados, como por exemplo, o HLA-G.

## 8 CONCLUSÕES

Neste estudo, pode-se concluir que:

1. A elevada frequência do alelo HLA-A\*02 em nossa amostra é justificada pela ampla distribuição deste alelo em nossa população e na população mundial.
2. Os alelos HLA-A\*24 e HLA-B\*35, no presente estudo, apresentaram-se como fator protetor para AER, estando mais frequentes em mulheres sem AER.
3. O alelo HLA-A\*34, no presente estudo, foi um fator de risco para AER, estando mais frequente em mulheres com AER.
4. Para o *locus* DRB1\*, no presente estudo, não se encontrou nenhum alelo que apresentasse resultado estatisticamente significativo e que pudesse estar correlacionado a um fator de risco ou de proteção para AER.
5. Para a associação haplotípica, no presente estudo, o haplótipo A\*02DRB1\*16 foi mais frequente em mulheres com AER, sendo um fator de risco para AER.
6. Encontrou-se um desequilíbrio de ligação para o *locus* DRB1\*, no presente estudo, na amostra de mulheres com AER.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços do conhecimento na área da imunogenética permitiram que diversos segmentos da Medicina se desenvolvessem rapidamente. Áreas privilegiadas por esse desenvolvimento foram os transplantes de órgãos e tecidos e a reprodução humana.

Na atualidade, a imunologia da reprodução constitui um campo de pesquisa que vem crescendo continuamente para a compreensão e resolução de casos obstétricos complexos, podendo oferecer investigação, diagnóstico e terapia específicas, que, em última análise, complementam a rotina reprodutiva.

Em função do importante papel biológico e clínico do Sistema HLA, bem como dos genes que codificam moléculas imunomoduladoras da resposta imune, o papel desempenhado por essas moléculas vem sendo amplamente estudado e poderá contribuir para elucidar a participação desses genes nos AER.

O complexo HLA e seus fatores regulatórios atuam em quase todas as etapas do desenvolvimento embrionário e são fundamentais no sucesso reprodutivo. Tipos específicos, bem como aumento ou diminuição da expressão de moléculas HLA marcam o desenvolvimento dos gametas, a clivagem embrionária, a formação do trofoblasto e do blastocisto, a implantação, desenvolvimento e sobrevivência fetal.

Nesse aspecto, é de grande importância o desenvolvimento de estudos sobre a influência e o valor preditivo do complexo HLA, especialmente em população local, já que poderá direcionar melhores técnicas de manejo de pacientes, favorecendo intervenções precoces e uma terapêutica específica, diminuindo a morbimortalidade materna e perinatal.

É provável que existam outros fatores complicadores em alguns grupos ou associações de várias causas que contribuam para tal insucesso na reprodução. A avaliação dessas associações pode vir a contribuir, no futuro, para o esclarecimento de casos que, apesar de adequadamente diagnosticados e tratados, continuam a apresentar resultado gestacional insatisfatório.

Com base nas considerações anteriormente expostas, esta pesquisa apresenta um aspecto de alta relevância, tendo em vista que foi a primeira em nosso Estado a caracterizar os genes HLA-A\*, B\* e DRB1\* em mulheres com AER.

Todavia, um dos fatores limitantes do nosso trabalho foi o número amostral reduzido, justificado em parte, pela dificuldade encontrada perante alguns médicos em encaminhar pacientes para a participação no estudo e a falta de um maior suporte financeiro.

A partir desta pesquisa outros trabalhos podem ser desenvolvidos com a temática do aborto espontâneo recorrente, tais como aqueles que relacionam HLA-G\*, -E\* e -C\*, que são expressos no trofoblasto e que são de particular interesse para o campo da imunologia da reprodução.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 6.ed. 2008. 564 p.

ALVES, C.; MEYER, I.; VIEIRA, N.; TORALLES, M. B.; Associação do Sistema de Histocompatibilidade Humana (HLA) com doenças endócrinas auto-imunes. **Revista Brasileira da Saúde Pública**, 29: 105-120, 2005.

ALVES, C.; SOUZA, T.; VEIGA, S.; ALVES, C.; TORALLES, M. B.; LEMAIRE, D. Importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. **Pediatrics (São Paulo)**, v. 27, n. 4, p. 274-286, 2005.

ALVES, C.; VEIGA, S.; SOUZA, T.; TORALLES, M.B.; SILVA-BACELLAR, A.L. Papel del sistema de histocompatibilidad humano en La patogénesis de las enfermedades neurológicas. **Rev Neurol.**, 44: 298-302, 2007.

ANDERSON, D.J. The importance of mucosal immunology to problems in human reproduction. **J Reprod Immunol.**, 31:3-14, 1996.

ANOKUTE, C. C. Epidemiology of spontaneous abortions: the effects of alcohol and cigarret smoking. **J. Natl.Med. Assoc.**, 78: 771, 1986.

BALASCH, J. Antiphospholipid antibodies: a major advance in the manegement of recurrent abortion. **Autoimmunity Reviews**, 3:228-233, 2004.

BARINI, R.; COUTO, E.; MOTA, M. M.; SANTOS, C. T. M.; LEIBER, S. R.; BATISTA, S. C. Fatores Associados ao Aborto Espontâneo Recorrente. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** 22(4): 217-223, 2000.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. 4º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

BOTELLA, T.J. The endometrium in repeated abortion. **Int J Fertil.** 7:147-54. 1996.  
BOUÉ, A. Spontaneous abortions and cytogenetic abnormalities. In: Behrman SJ, Kistner RW, Patton GW, editors. **Progress in infertility**. New York: Little, Brown and Company; p.783-95, 1998.

BOUÉ, J.; BOUÉ, A.; LAZAR, P. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. **Teratology.** 12(1):11-26. 1975.

BROWN, N.L.; ALVI, S.A.; ELDER, M.G.; BENNET, P.R.; SULLIVAN, M.H.F. The regulation of prostaglandin output from term intact fetal membranes by anti-inflammatory cytokines. **Immunology Oxford**, v.99, p.124-133, 2000.

BUTTRAM, V.C.; GIBBONS, W.E. Mullerian anomalies: a proposed classification (an analysis of 144 cases). **Fertil Steril.** 32(1):40-6, 1979.

CAETANO, M. R.; COUTO, E.; BARINI, R.; SIMONI, R. Z.; PINTO-SILVA, J. L.; CECATTI, J. G.; PEREIRA, B. G. Fatores Associados ao Aborto Espontâneo Recorrente. **Rev. Ciênc. Méd. Campinas**, 15(1):47-53, jan./fev., 2006.

CARP, H.J.A.; TODER, V.; MASHIACH, S.; NEBEL, L.; SERR, D.M. Recurrent miscarriage: a review of current concepts immune mechanisms, and results of treatment. **Obstet Gynecol Surv.** 45:657-69, 1990.

CHERWINSKI, H.M.; SCHUMACHER, J.H.; BROWN, K.D.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between TH1 and TH2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.166, p.1229-1244, 1987.

CHOUDHURY, S.R.; KANAPP L.A. Human reproductive failure I: immunological factors. **Human Reprod Update**, vol. 7, n° 2 pp. 113 – 134, 2000.

CHRISTIANSEN, O.B. A fresh look at the causes and treatments of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects. **Human Reprod Update** 2:271-93. 1996.

CHRISTIANSEN, O.B.; PEDERSEN, B.; MATHIESEN, O.; HUSTH, M.; GRUNNET, N. Maternal class II alleles predispose to pregnancy losses in Danish women with recurrent spontaneous abortions and their female relatives. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v.33, p.239-244, 1996.

CHRISTIANSEN, O.B.; RASMUSSEN, K.L.; JERSILD, C.; GRUNNET, N. HLA class II alleles confer susceptibility to recurrent fetal losses in Danish women. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.44, p.225-233, 1994.

CHRISTIANSEN, O.B.; RING, M.; ROSGAARD, A.; GRUNNET, N.; GLUUD, C. Association between HLA-DR1 and -DR3 antigens and unexplained repeated miscarriage. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.5, p.249-255, 1999.

COFFMAN, R.L.; SEYMOUR, B.W.; LEBMAN, D. A.; HIRAKI, D.D.; CHRISTIANSEN, J.A ; SHADER, B.; CHERWINSKI, H.M.;SAVELKOUL, H.F.; FINKELMAN, F.D.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v.102, p.5-38, 1988.

COULAM, C.B. Unexplained recurrent pregnancy loss: epilogue. **Clin Obstet Gynecol.** 29(4): 999-1004, 1986.

COULAM, C.B.; MOORE, S.B.; O'FALLON, W.M. Association between major histocompatibility antigen and reproductive performance. **American Journal of Reproductive Immunology e Microbiology**, New York, v.14, p.54-58, 1987.

CSAPO, A.I.; PULKKINEN, M.O.; WIEST, W.G. Effects of luteectomy and progesterone replacement therapy in early pregnancy patients. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 115(6):759-65, 1973.

DEAN A. G.; DEAN J.A., COULOMBIER, D. et al. Epi Info, Version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta, Georgia, USA: Centers for Disease Control and Prevention, 1994.

DEL PRETE, G.F.; DE CARLI, M.; MASTROMAURO, C.; BIAGIOTTI, R.; MACCHIA, D.; FALAGIANI, P.; RICCI, M.; ROMAGNANI, S. Purified protein derivative (PPD) of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) (TES) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type I T helper or type 2 T helper) profiles of cytokine production. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.88, p.346-350, 1991.

DONADI, E. A. Aspectos moleculares do complexo principal de Histocompatibilidade: como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças reumáticas. **Rev Bras Reumatol – vol. 41 – nº 4 – jul/mai, 2001.**

DUDLEY, D.J.; BRANCH, D.W. New approaches to recurrent pregnancy loss. **Clin Obstet Gynecol.** 32:520-32, 1989.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN: a software for population genetics analysis, version 3.1. Genetics and Biometry laboratories, Dept. of Anthropology, University of Genebra, 2006.

FERNANDES, APM; MACIEL, LMZ; FOSS, MC; DONADI, EA. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-ímmunes endócrinas. **Arq Brás Endocrinol Metab**, v.47, n.5, p.601-11, 2003.

FERNANDO, M. M. A.; STEVENS, C. R.; SABETI, P. C.; WALSH, E. C.; McWHINNIE, A. J. M.; SHAH, A.; GREEN, T.; RIOUX, J. D.; VYSE, T. J. Identification of Two Independent Risk Factors for Lupus within the MHC in United Kingdom Families. **PLOS Genetics**, v. 3, p. 2109-2121, 2007.

FERNANDO, M.M.A.; STEVENS, C.R.; WALSH, E.C.; JAGER, P.L.; GOYETTE, P.; PLENGE, R.M.; VYSE, T.J.; RIOUX, J.D. Defining the Role of MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. **PLOS Genetics**, v. 4, p. 1-9, 2008.

FERREIRA, F.L. LEAL-MESQUITA, E.R.; SANTOS, E.M.B.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K. Genetic Characterization of the population of São Luís, MA, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 22-31, 2005.

HARGER, J.H.; ARCHER, D.F.; MARCHESE, S.G.; MURACCA- CLEMENS, M.; GARVER, K.L. Etiology of recurrent pregnancy losses and outcome of subsequent pregnancies. **Obstet Gynecol.** 62:574-81,1983.

HILL, J. A.; POLGAR, K.; ANDERSON, D.J. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.273, n.24, p.1933-1936, 1995.

HOMER, H.A.; LI, T.C.; COOKE, L.D. The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. **Fertil Steril**. 73(1):1-14, 2000.

HORTON, R; . Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**. 2004; 5: 889-99.

IMAI, T.; TAKAKUWA, K.; ISHIL, K.; ADACHI, H.; HIGASHINO, M.; KURATA, H. HLA-class I antigens in patients with unexplained recurrent abortion. **J Perinat Med**. 29:427-32, 2001.

JANEWAY, C. A.; TRAVES, P. Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença. 5ª ed. Porto Alegre: **Editora Artes Médicas**, 2002.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA Sistem. First of two parts. **N Engl J Med**, v.7, p. 702-709, 2000.

KRUSE, C.; STEFFENSEN, R.; VARMING, K.; CHRISTIANSEN, O.B. A study of HLA-DR and -DQ alleles in 588 patients and 562 controls confirms that HLADRB1\*03 is associated with recurrent miscarriage. **Human Reproduction**, Oxford, v.19, n.5, p.1215-1221, 2004.

KURUP, M.; GOLDKRAND, J.W. Cervical incompetence: Eletive, emergent, or urgent cerclage. **Am J Obstet Gynecol**. 181(2):240-6, 1999.

MATTAR, R.; CAMANO, L.; DAHER, S. Aborto Espontâneo de Repetição e Atopia. **RGBO** 25(5): 331-335, 2003.

MATTAR, R.; SOARES, R. V. P.; CAMANO, L.; DAHER, S. Contato com antígenos paternos pela mucosa vaginal e oral e o aborto de repetição. **RBGO** – v.26, nº2, 2004.

MICHELON, T.; SILVEIRA, J.G.; GRAUDENZ, M.; NEUMANN, J. Imunologia da Gestação. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, 50 (2): 145-151, abr.-jun. 2006.

MILLS, J.L. A prospective study of fetal losses in diabetic and control pregnancies from the third week post conception. **Diabetes**. 34:46, 1983.

MONTE, S.J.H.; NETO, J.M.M.; RAMPIM, G.F.; SHULZENCO, N.; MORGUM, A.; GERBASE-DELIMA, M. Polimorfismo do sistema HLA em uma amostra de mestiços da população de Teresina, Piauí. **Revista da Associação Médica Brasileira** 50 (4): 422-426, 2004.

MONTEIRO, I.M.U.; PINTO, C.L.B.; BEDONE, A.J. Aborto de Repetição. **RBM-Ginecologiae Obstetrícia** 5(3): 216-25, 1994.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, Limerick, v.136, p.2348-2357, 1986.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Advances in Immunology**, New York, v.46, p.111-147, 1989.

OLIVEIRA, E. A.; SELL, A. M. Os antígenos HLA e a hemoterapia. **Acta Scientiarum** 24, 731-736, 2002.

PAROLIN, M. L.; CARNESE, F. R. HLA-DRB1 alleles in four Amerindian populations from Argentina and Paraguay. **Genet Mol Biol** v.32, n.2, p. 212-219, 2009  
PEREIRA, A. C.; JESÚS, N. R.; LAGE, L.V.; LEVY, R. A. Imunidade na gestação normal e na paciente com lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Rev Bras Reumatol**, v. 45, n. 3, p. 134-40, mai/jun.,2005.

POCIOT, F.; BRIANT, L.; JONGENEEL, C.V.; MOLVIG, J.; WORSAAE, H.; ABBAL, M.; THOMSEN, M.; NERUP, J.; CAMBON-THOMSEN, A. 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. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.23, p.224-231, 1993.

PRITCHARD, J.A.; MCDONALD, P.C.; GANT, N.F. Hipertensive disorders in pregnancy In: Editores. Williams obstetrics. 17th ed. Appleton: Century-Crafts; p.525-60, 1985.

REGAN, C.L.; MCADAM, B.F.; MCPARLAND, P.; BOYLAN, P.C.; FITZGERALD, G.A.; FITZGERALD, D.J. Reduced fetal exposure to aspirin using a novel controlled-release preparation in normotensive and hypertensive pregnancies. **Br J Obstet Gynecol**. 105(7):732-8,1998.

RIVERA, D.L.; OLISTER,S.M.; LIU, X.; THOMPSON, J.H.; ZHANG, X. J.; PENNLIN, K.; AZUERO, R.; CLARK, D.A.; MILLER, J.S. Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.12, p.189-197, 1998.

ROBERTSON, S.A.; SEAMARK, R.F.; GUILBERT, L.J.; WEGMANN, T. G. The role of cytokines in gestation. **Critical Reviews in Immunology**, New York, v.14, p.239-292, 1994.

SACHS, E.S.; JAHODA, M.G.; VAN HEMEL, J.O. Chromosome studies of 500 couples with two or more abortions. **Obstet Gynecol**. 65(3):375-8, 1985.

SAITO, S. Cytokine network at the feto-maternal interface. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v.47, p.87-103, 2000.

SALIM, R.; REGAN, L.; WOELFER, B.; BACKOS, M.; JURKOVIC, D.A. Comparative study of the morphology of congenital uterine anomalies in women with and without a history of recurrent first trimester miscarriage. **Hum Reprod.** 18(1):162-6.19, 2003.

SALOMÃO, A. J. Anomalias da evolução da gestação: abortamento espontâneo. In: NEME, B. Obstetricia básica. São Paulo: Sarvier, p. 363-71, 1994.

SASAKI, T.; YAMADA, H.; KATO, E.H.; SUDO, S.; KISHIDA, T.; SASAKI, T.; NISHIGAKI, F.; FUJIMOTO, S. Increased frequency of HLA-DR4 allele in women with unexplained recurrent spontaneous abortions, detected by the method of PCR-SSP. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon , v.32, p.237-279,1997.

SBRACIA, M.; MASTRONE, M.; SCARPELLINI, F.; GRASSO, J.A. Influence of histocompatibility antigens in recurrent spontaneous abortion couples and on their reproductive performances. **Am J Reprod Immunol.**37:213-4, 1997.

SCHIEVE, L.A.; TAYHAM, L.; PETERSON, H.B.; TONER, J.; JENG, G. Spontaneous abortion among pregnancies conceived using assisted reproductive technology in the United States. **Obstet Gynecol** 101(5): 959-967, 2003.

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.** Issue 1. Vol 1. 2008.

SOUZA S.S; VOLTARELLI J.C; FERRIANI R.A. I. Imunologia da reprodução humana. **Medicina, Ribeirão Preto**, 30: 277-288, abr./jun. 1997.

STATA Statistical Software Release 10. Texas: College Stations, Stata Corporation. 2007.

STRAY-PEDERSEN, B.; ENG, J.; REIKVAN, T.M. Uterine T-Mycoplasma colonization in reproductive failure. **AM J Obstet Gynecol**, 130:307.1978.

STRAY-PETERSEN, B.; STRAY-PETERSEN, S. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with prior history of habitual abortion. **Am J Obstet Gynecol.**148(2):140-6, 1984.

SULLIVAN, L. C.; HOARE, H. L.; McCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J.; BROOKS, A. G. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. **Trends in Immunology**, Article in press, 2006.

SUTHERLAND, H.W.; PRITCHARD, C.W. Increased incidence of spontaneous abortion in pregnancies complicated by maternal *diabetes mellitus*. **Am J Obstet Gynecol.** 155:135, 1986.

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 Japanese population. **Human Reproduction**, Oxford, v.18, n.4, p.728-733, 2003.

TAKAMIZAWA, M.; JUJI, T.; TSUNEYOSHI, H.; NIEDA, M.; FUJII, T.; KAWANA, T.; MIZUNO, M. Recurrent spontaneous abortion and human leukocyte antigen DR. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v.157, p.514-515, 1987.

THO, P.T.; BYRD, J.R.; MCDONOUGH, P.G. Etiologies and subsequent reproductive performance of 100 couples with recurrent abortion. **Fertil Steril**. 32(4): 389-95, 1979.

THOMAS, R.; REID, R.L. Thyroid disease and reproductive dysfunction: a review. **Obstet Gynecol**. 70:789-98, 1987.

VANOLI, M.; FABIO, G.; BONARA, P.; EISERA, N.; PARDI, G.; ACAIA, B. Histocompatibility in Italian couples with recurrent spontaneous abortions of unknown origin and with normal fertility. **Tissue Antigens**. 26:227-33. 1985.

VAUVERT, T. F.H.; CHRISTIANSEN; O.B. Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G-possible implications for human reproduction and autoimmune disease. **Human immunology**. 66 (6):688-699, 2005.

VOJVODIC. S.; BELIC, B. The HLA antigen system in married couples with recurrent spontaneous abortion. **Med Pregl**. 54:75-9, 2001.

WEGMANN, T.G. Fetal protection against abortion: is it immunosuppression or immunostimulation? **Annals of Immunology**, Paris, v.135, p.309-312, 1984.

WEGMANN, T.G. Maternal T cells promote placental growth and prevent spontaneous abortion. **Annals of Immunology**, Paris, v.17, n.4, p.297-302, 1988.

YAMADA H.; POLGAR, K.; HILL, J.A. Cell-mediated immunity to trophoblast antigens in women with recurrent spontaneous abortion. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, New York, v.170, p.1339-1344, 1994.

ZIEGLER A.; KENTENICH, H.; UCHANSKA-ZIEGLER B. Female choice and the MHC. **Trends in Immunology**, v. 26, p. 496-502, 2005.

## APÊNDICES

## APÊNDICE I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

A perda gestacional é a complicação mais freqüente da gestação. O abortamento espontâneo pode ser observado em até 15% das mulheres, ocorrendo principalmente no primeiro trimestre da gestação.

Aborto é caracterizado pela eliminação do feto. Entre as causas mais comuns de abortamento estão às alterações no número de cromossomo e imunológicas, malformações do útero e problemas hormonais.

Um dos fatores mais estudados e pesquisados na atualidade em relação ao aborto de repetição é o imunológico.

Durante os anos 50 e 60 iniciou-se o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à Imunologia Reprodutiva. Desde então, reconhece-se que, durante o processo reprodutivo, vários fatores imunológicos participam, de forma direta ou indireta, na sobrevivência do feto.

Sabe-se que os genes HLA (Antígeno Leucocitário Humano) exercem uma grande influência no mecanismo de rejeição a tecidos transplantados, de forma que é razoável concluir que também exercem grande influência durante a gestação.

Sendo assim, eu, Fábio França Silva, e a PROF<sup>a</sup>.DR<sup>a</sup>. Emygdia Rosa Leal Mesquita (orientadora), resolvemos elaborar um projeto de pesquisa, tendo como objetivo determinar a frequência do gene HLA para mulheres com abortamento recorrentes.

Caso você queira colaborar com a nossa pesquisa iremos preencher uma ficha de cadastro e em seguida, com material descartável, iremos cuidadosamente, coletar 10 ml do seu sangue, isso será feito por um técnico devidamente treinado. Do sangue iremos extrair o seu DNA que será analisado para investigação do gene HLA. Caso o material obtido não seja adequado ao exame, (DNA fragmentado, por exemplo) poderá ser solicitada a você uma 2<sup>a</sup> ou até 3<sup>a</sup> amostra de sangue (5 ml). Se isso ocorrer estaremos pagando a sua condução caso você venha de ônibus. Todas as informações obtidas a respeito terão caráter sigiloso, tendo acesso apenas os pesquisadores e o seu médico. Apenas os dados obtidos serão publicados, para que a comunidade científica tome conhecimento. Vale ressaltar: SUA IDENTIDADE SERÁ PRESERVADA.

Não há riscos para você. O único desconforto é uma pequena dor no local onde a agulha é introduzida, que cessa de imediato após a retirada desta.

Você tem a liberdade de retirar seu consentimento ou deixar de participar da pesquisa.

Você receberá os resultados do exame e no caso de possuir alguma alteração, será esclarecido tendo assim um aconselhamento genético.

A sua participação é importante e nos ajudará a aprofundar os nossos conhecimentos.

Ao término da pesquisa seu material, DNA, ficará armazenado em nosso Banco de DNA.

Qualquer dúvida sobre o desenvolvimento da pesquisa você poderá ligar para qualquer um dos pesquisadores citados no final deste termo.

Eu, \_\_\_\_\_,  
tendo lido, recebido explicações e entendido o que está escrito acima aceito participar voluntariamente desta pesquisa “**ESTUDO MOLECULAR DO GENE HLA (ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO) EM MULHERES COM ABORTAMENTOS RECORRENTES**” Assim como permito o desenvolvimento de outras pesquisas desde que entrem em contato prévio solicitando a minha participação, como sujeito.

Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis desconfortos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data \_\_\_\_\_

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável: \_\_\_\_\_

Nome e Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

***Pesquisador Responsável:***

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Emygdia Rosa Leal Mesquita  
Rua dos Prazeres, 215 (Cobertura do Hospital Materno Infantil), Centro.  
CEP: 65020 - 090  
Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade - LEGH  
Fone: (098) 2109 – 12 65 ou 12 58

***Pesquisador Técnico Responsável:***

Fábio França Silva  
Rua dos Prazeres, 215 (Cobertura do Hospital Materno Infantil), Centro.  
CEP: 65020 - 090  
Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade - LEGH  
Fone: (098) 2109 – 12 65 ou 12 58

***Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – HUUFMA:***

Prof<sup>o</sup>. Dr. Wildoberto Batista Gurgel  
Rua Barão de Itapary S/N - Centro  
HUUFMA – Unidade Presidente Dutra  
Fone: (098) 2109 – 12 23

## APÊNDICE II – Ficha Cadastral (Anamnese)

Nº. DO CADASTRO: \_\_\_\_\_

NOME DA PACIENTE : \_\_\_\_\_

IDADE: \_\_\_\_ GRUPO ÉTNICO: ( ) BRANCA ( ) PRETA ( ) PARDA ( ) INDIGENA ( ) AMARELA

ABO/RH: \_\_\_\_ NACIONALIDADE: \_\_\_\_\_ NATURALIDADE: \_\_\_\_\_ CIDADE: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_ BAIRRO: \_\_\_\_\_ FONE: \_\_\_\_\_ EMAIL: \_\_\_\_\_

### ANAMNESE FEMININA

#### ANTECEDENTES FAMILIARES

( ) INFERTILIDADE FAMILIAR GRAU: ( ) IRMÃOS (AS)  
 ( ) PRIMOS (AS) TIPO: \_\_\_\_\_  
 ( ) TIOS (AS) TIPO: \_\_\_\_\_  
 ( ) OUTROS \_\_\_\_\_

( ) DIFICULDADE P/ ENGRAVIDAR GRAU: ( ) IRMÃOS (AS) ( ) PRIMOS (AS) TIPO: \_\_\_\_\_  
 ( ) TIOS (AS) TIPO: \_\_\_\_\_  
 ( ) OUTROS \_\_\_\_\_

( ) CONSANGÜINIDADE ( ) MALFORMAÇÕES TIPO: \_\_\_\_\_

( ) ABORTOS ESPONTANEO ( ) DIABETES ( ) HIPERTENSÃO  
 QUANTOS: \_\_\_\_\_

( ) CASOS DE ECLAPSE ( ) PROBLEMAS HORMONAIIS TIPO: \_\_\_\_\_

( ) CASOS DE ALÉRGIAS  
 TIPOS: \_\_\_\_\_

### ANAMNESE FEMININA

#### • ANTECEDENTES PESSOAIS

( ) FUMO ( ) ALCOOL ( ) DROGAS ( ) CONSANGÜINIDADE ( ) TIREOIDOPATIA

( ) ALÉRGIAS ( ) DIABETES ( ) ABORTOS ESPONTANEO  
 TIPOS: \_\_\_\_\_ QUANTOS: \_\_\_\_\_

( ) HIPERTENSÃO ARTERIAL ( ) JÁ ENGRAVIDOU ( ) PROBLEMAS HORMONAIIS  
 QUANTAS VEZES: \_\_\_\_\_ TIPO: \_\_\_\_\_

( ) DIFICULDADE P/ ENGRAVIDAR ( ) ECLAMPSE

( ) CARDIOPATIAS ( ) DOENÇAS RENAIIS CRÔNICAS ( ) ANEMIA

( ) TRANSFUSÕES DE SANGUE OUTRAS INFORMAÇÕES: \_\_\_\_\_  
 QUANTAS: \_\_\_\_\_