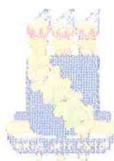


R 13826841/04



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**

ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IgG NOS PROCESSOS HEMOLÍTICOS SECUNDÁRIOS À DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL E À ANEMIA HEMOLÍTICA AUTO-IMUNE

Maria Annecy de Araújo

Fortaleza
2003

Maria Annecy de Araújo

ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IgG
NOS PROCESSOS HEMOLÍTICOS SECUNDÁRIOS À
DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL E À ANEMIA
HEMOLÍTICA AUTO-IMUNE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia e Medicina Legal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Patologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lília Maria Carneiro Câmara
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Elenice Deffune

Fortaleza

2003

Maria Annecy de Araújo

ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IgG
NOS PROCESSOS HEMOLÍTICOS SECUNDÁRIOS A
DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL E A ANEMIA
HEMOLÍTICA AUTO-IMUNE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia e Medicina Legal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Patologia

Aprovada em: ____ / ____ / 2003.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Maria Helena da Silva Pitombeira - UFC

Prof.^a Dr.^a Silvia Maria Meira Magalhães - UFC

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz - UFC

A69a Araújo, Maria Annecy de

Análise da participação das subclasses de IgG nos processos hemolíticos secundários a doença hemolítica perinatal e a anemia hemolítica auto-imune / Maria Annecy de Araújo. – Fortaleza, 2003.

100 f. : il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lília Maria Carneiro Câmara.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-graduação em Patologia e Medicina Legal.

1. Anemia hemolítica – auto-imune. 2. Doença hemolítica – perinatal. I. Título.

CDD 616.152

Esse trabalho foi realizado com o apoio do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará–HEMOCE, Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa–FUNCAP e do Hemocentro de Botucatu – UNESP–SP.

Ao meu esposo Paulo César Rodrigues, que tem sido a minha inspiração na busca de novas qualificações pessoais e profissionais. Dedico esse trabalho a você que, com sabedoria e serenidade, tão bem soube me orientar. Quero expressar meu agradecimento e reforçar minha admiração.

Aos meus pais, Neuzo e Darcy, a quem devo a vida e que com carinho me ensinaram o caminho da verdade.

Aos meus filhos Diana, Lívia e Júnior, minha razão de viver.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, pela participação fundamental na realização desse trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Elenice Deffune, pela confiança ao me receber no Hemocentro de Botucatu-SP. Seus ensinamentos influirão na minha carreira profissional.

Aos Drs. José Alisson Santos e Rommel Abel Vasconcelos, pela contribuição com parte dos recursos materiais.

À Dr.^a Luciana Maria de Barros Carlos, pelas sugestões e apoio no decorrer desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Herivaldo Silva, pelo incentivo e ensinamentos

Ao Prof. Dr. Paulo Machado, pela orientação sobre a metodologia de Citometria de Fluxo.

Ao Dr. Ormando Rodrigues Campos pelos conselhos e apoio recebidos.

Ao Prof. Dr. Naidu G. Talapala, pelas orientações nos momentos de incertezas.

À Dr.^a Clara Maria Bastos Eloy da Costa, Dr.^a Ana Paula Lopes Moreira, Dr.^a Ana Paula Nunes Constâncio e Dr.^a Ana Cesarina Oliveira por colaborarem na pesquisa de prontuários.

À Prof.^a Dr.^a Maria Helena da Silva Pitombeira, pelas valiosas sugestões e por seu exemplo de conduta profissional e científica.

À Prof.^a Dr.^a Silvia Maria Meira Magalhães, pelos ensinamentos e colaboração. Meu mais profundo respeito e admiração.

Às colegas bioquímicas Rita Marinei e Fátima Marques, pela gentileza em colaborar.

À Dr.^a Acy Teles Quixadá, pelo incentivo e apoio.

À Dr.^a Vânia Barreto, pelo estímulo constante.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunohematologia, Solenis, Bernadete, Alexsandra, Auxiliadora, João, Sâmia, Helsiana, Mônica, Socorro e à Telma, Jeovani, Ricardo e Cecília, por prestarem ajuda indispensável para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos João, Marcos, Eunice, Tânica e Dr.^a Odália, que de alguma maneira colaboraram com esse trabalho.

Aos meus amigos do Hemocentro de Botucatu-SP, Valéria, Adaíze, Márjorie, Fátima, Waldir, Cristiane, Amauri, Priscila, Cléo por me ajudarem em momentos difíceis.

Aos meus chefes imediatos, Luís Edson, Déa, Vilany e Sandra Porto por demonstrarem compreensão nas situações em que estive ausente.

À Bibliotecária Norma de Carvalho Linhares, pela elaboração das referências bibliográficas e aos demais funcionários da Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde-UFC.

RESUMO

As doenças hemolíticas imunes podem ser diagnosticadas pelos sinais clínicos, biológicos e demonstração dos anticorpos fixados às hemácias através do teste de antiglobulina direto (TAD). A sensibilização das hemácias envolve a imunoglobulina G (IgG) e/ou o componente C3 do complemento. No homem, a IgG consiste de quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) que diferem entre si do ponto de vista químico e biológico desempenhando atividades específicas. IgG1 e IgG3 têm uma alta afinidade para receptores Fc γ nos macrófagos, sendo, portanto, essenciais no processo hemolítico extravascular. Esse estudo objetivou determinar as subclasses IgG1 e IgG3 na Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) e Anemia Hemolítica Auto-Imune (AHL) correlacionando-as com a gravidade da hemólise. Foram analisadas 42 amostras de gestantes isoimunizadas pela metodologia de citometria de fluxo e 23 amostras de pacientes com AHL pela metodologia do gel teste. A distribuição do número de fetos ou neonatos das 42 gestantes segundo a gravidade foi 13 casos com doença leve, 16 moderada e 13 com doença grave. Os 23 pacientes com AHL também foram distribuídos de acordo com a gravidade da doença, sendo que 6 apresentaram doença leve, 8 moderada e 9 apresentaram doença grave. Níveis elevados das subclasses foram detectados em 33/42 (79%) amostras de gestantes e em 16/23 (69,6%) amostras de pacientes com AHL. A subclasse IgG1 predominou, isoladamente, em 14/33 (42,4%) amostras na DHPN e em 12/16 (75%) na AHL. A IgG1 também esteve presente isoladamente nas três categorias de gravidade das duas populações em estudo. No entanto, observou-se que os valores da mediana da intensidade de fluorescência foram significativamente mais altos nas formas graves da DHPN ($p<0,01$). O mesmo não se pode afirmar com relação a IgG3, pois analisando os valores dentro de cada categoria de gravidade, não houve significância estatística ($p=0,11$). Níveis elevados, apenas de IgG3, foram detectados em 9/33 (27,3%) casos de DHPN e em 1/16 (6,3%) casos de AHL. Considerando o tipo de patologia, é provável que IgG3 contribua de duas maneiras diferentes para o processo hemolítico: na DHPN está relacionada com hemólise leve e na AHL com hemólises moderada e grave, mas não com a leve. A associação de IgG1 com IgG3 pode implicar em uma situação clínica grave, embora seja provável

que esta associação seja mais diretamente relacionada com a presença de IgG1. Esses dados sugerem que a determinação das subclasses IgG1 e IgG3 na DHPN e AHA deve fazer parte de um conjunto de variáveis a serem analisadas, pois os relatos existentes na literatura, até o momento, não dão suporte para seu uso como instrumento exclusivo de avaliação de gravidade e prognóstico dessas doenças.

ABSTRACT

The diagnosis of immune haemolytic diseases might be done by clinical syndrome, biochemical tests and by the demonstration of antibody fixed to red cells, also called direct antiglobulin test (DAT). The red cells are activated by G immunoglobulin (IgG) and/or by the component C3 of the complement. The human IgG is comprised in four subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4) that differ of each other by unique chemical and biological characteristics producing specific activities. IgG1 and IgG3 have high affinity to Fc_y receptors from macrophages, therefore being essentials to the extravascular haemolytic process. This study aimed to determine the IgG1 and IgG3 subclasses in the perinatal haemolytic disease (PNHD) and autoimmune haemolytic anemia (AIHA), correlating the subclasses with the severity of the haemolysis. Forty-two samples of isoimmunised pregnant women were analysed by the method of flow cytometry and 23 samples from patients with AIHA by the method of gel test. According to the severity of the disease the foetuses or newborns from 42 pregnant women were distributed as 13 mild, 16 moderate and 13 severe diseases. Moreover according with the severity of the disease, the 23 patients with AIHA were distributed as 6 mild, 8 moderate and 9 severe cases. High levels of subclasses were detected in 33 out of 42 (72%) pregnant women samples and in 16 out of 23 (69.6%) AIHA patients. IgG1 was the most frequent, in 14 out of 33 (42.4%) PNHD samples and in 12 out of 16 (75%) AIHA samples. Levels of only IgG1 were also found in the three categories of each analysed population. In addition, from the fluorescence intensity were significantly higher in the severe cases of PNHD ($p<0.01$). In opposite way, these IgG3's average values had no statistical significant level in none of the three categories ($p=0.11$). High levels of IgG3 alone were detected in 9 out of 33 (27.3%) PNHD cases and in 1 out of 16 (6.3%) AIHA cases. Considering the type of pathology, IgG3 might contribute in two different ways to the haemolytic process. First, in PNHD might be related with mild haemolysis, and second, in AIHA with moderate and severe haemolysis, but not with the mild cases. The correlation of IgG1 with IgG3 suggests a severe clinical situation, although this putative correlation is more related to IgG1 levels. These data suggest that the detection of IgG1 and IgG3 subclasses in PNHD and AIHA has to be part of a set of variables to be

analysed, which evaluate the illness severity. In addition, the current data in the literature does not recommend the evaluation of IgG1 and IgG3 as an instrument to evaluate the severity and prognostic of these diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1 Características estruturais das diferentes subclasses de IgG	20
2 Teste para padrão positivo	46
3 Teste para padrão negativo	46
4 <i>Dot plot</i> dos testes iniciais	50
5 <i>Dot plot</i> dos testes iniciais	50
6 Histograma do padrão negativo	51
7 Histograma do padrão positivo	51
8 Número de conceptos das gestantes alo-sensibilizadas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal (DHPN) e o resultado do teste de antiglobulina direto (TAD)	54
9 Freqüência de conceptos das gestantes alo-sensibilizadas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal (DHPN) e o título do anticorpo materno	56
10 Número de conceptos segundo as subclasses IgG1, IgG3 maternas e gravidade da doença hemolítica perinatal	59
11 Freqüência de conceptos segundo as subclasses IgG1, IgG3 e título dos anticorpos maternos.....	61
12 Número de pacientes com anemia hemolítica auto-imune segundo a presença na hemácia de imunoglobulinas e fragmentos do complemento	65
13 Número de pacientes segundo a presença das subclasses IgG1 e IgG3 na membrana da hemácia e gravidade da anemia hemolítica auto-imune	67

LISTA DE TABELAS

1 Distribuição do número de conceptos das gestantes alo-sensibilizadas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal (DHPN)	52
2 Distribuição do número de conceptos das gestantes alo-sensibilizadas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal (DHPN) e a necessidade de terapia transfusional	53
3 Distribuição do número de conceptos das gestantes alo-sensibilizadas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal (DHPN) e o resultado do teste de antiglobulina direto (TAD)	54
4 Distribuição dos conceptos das gestantes alo-sensibilizadas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal (DHPN) e o título do anticorpo materno	55
5 Valores em mediana de intensidade de fluorescência (MIF) das subclasses IgG1 e IgG3 maternas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal	57
6 Medidas estatísticas dos valores das medianas de intensidade de fluorescência (MIF) das subclasses IgG1 e IgG3 maternas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal	58
7 Distribuição do número de conceptos segundo as subclasses IgG1, IgG3 maternas e gravidade da doença hemolítica perinatal (DHPN)	59
8 Distribuição de conceptos segundo as subclasses IgG1, IgG3 e título dos anticorpos maternos	60
9 Distribuição de pacientes com anemia hemolítica auto-imune segundo sexo	62
10 Distribuição de pacientes com anemia hemolítica auto-imune segundo a idade	62

11 Distribuição de pacientes com anemia hemolítica auto-imune secundária e tipo de imunoglobulina e/ou complemento fixado(s) às hemácias	63
12 Distribuição do número de pacientes com anemia hemolítica auto-imune segundo a gravidade	64
13 Distribuição do número de pacientes com anemia hemolítica auto-imune segundo a presença na hemácia de imunoglobulinas e fragmentos do complemento e a gravidade do quadro hemolítico	65
14 Distribuição do número de pacientes segundo as subclasses IgG1 e IgG3 e gravidade da anemia hemolítica auto-imune	66
15 Freqüência das subclasses IgG1 e/ou IgG3 em gestantes alergo-sensibilizadas segundo nossos resultados e dos autores consultados	73
16 Freqüência das subclasses IgG1 e/ou IgG3 em pacientes com anemia hemolítica auto-imune segundo nossos resultados e dos autores consultados	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AHAI = Anemia hemolítica auto-imune

DHPN = Doença hemolítica perinatal

PBS = Solução salina tamponada com fosfato

LISS = Solução salina de baixa força iônica

TAD = Teste de antiglobulina direto

PAI = Pesquisa de anticorpos irregulares

MIF = Mediana da intensidade de fluorescência

Ig = Imunoglobulina

EDTA = Etilenodiaminotetraacetato

CCDA = Citotoxicidade celular dependente de anticorpo

MMA = Teste da monocamada de monócitos

FcR = Receptor do fragmento cristalizável

rpm = rotação por minuto

min = minuto

TA = Temperatura ambiente

TIU = Transfusão intra-útero

EXT = Exsanguineotransfusão

FITC = Isotiocianato de fluoresceína

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
3	OBJETIVOS	37
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	39
4.1	Casuística	40
4.1.1	Critérios de inclusão e exclusão da população em estudo ...	41
4.2	Métodos	42
4.2.1	Processamento das amostras biológicas	42
4.2.2	Teste de antiglobulina humana	43
4.2.3	Congelamento e descongelamento de hemárias	44
4.2.4	Desenvolvimento do ensaio em gel centrifugação para determinação das subclasses IgG1 e IgG3 nos eritrócitos	45
4.2.5	Padronização da técnica de citometria de fluxo	46
4.2.6	Sensibilização das hemárias	47
4.2.7	Desenvolvimento do ensaio de citometria de fluxo para determinação das subclasses de IgG nos eritrócitos	47
4.3	Análise estatística	48
5	RESULTADOS	49
5.1	Padronização da técnica de citometria de fluxo	50
5.2	Gestantes alo-sensibilizadas	52
5.2.1	Avaliação da gravidade da DHPN	52

5.2.2	Correlação do teste de antiglobulina direto (TAD) com a gravidade da DHPN	53
5.2.3	Correlação do título do anticorpo materno e gravidade da DHPN	55
5.2.4	Determinação das subclasses IgG1 e IgG3 maternas, por citometria de fluxo, segundo os valores da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) e a gravidade da DHPN	56
5.2.5	Correlação entre as subclasses IgG1 e IgG3 no soro das gestantes alo-sensibilizadas com a gravidade da DHPN	58
5.2.6	Correlação entre as subclasses IgG1, IgG3 e títulos dos anticorpos maternos	60
5.3	Pacientes com anemia hemolítica auto-imune AHAI	50
5.3.1	Análise das amostras de pacientes com AHAI segundo sexo e idade	61
5.3.2	Correlação entre a presença de IgG isolada ou associada a outras classes de imunoglobulinas e/ou complemento e AHAI	62
5.3.3	Correlação entre a detecção das subclasses IgG1, IgG3 e gravidade da AHAI	66
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS	84
	APÊNDICES	93

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O eritrócito é uma célula anucleada, com diâmetro médio de 7micra, formado por uma membrana que circunda uma solução de proteínas e eletrólitos. Mais de 95% das proteínas citoplasmáticas são compostas por hemoglobina, responsável pela função vital de transportar oxigênio para os tecidos e retornar o dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões. Para que a troca gasosa ocorra satisfatoriamente, a hemácia bicôncava e flexível deve passar pela microcirculação cujo diâmetro mínimo é apenas 3,5micra (HOFFBRAND; PETIT, 1991).

A capacidade de deformação dos eritrócitos decorre da estrutura anatômica de sua membrana que é composta de lípides e proteínas. Os lípides se dispõem na membrana formando uma dupla camada. As proteínas transmembranárias atravessam a membrana bilipídica desde a porção externa até a parte interna citoplasmática, onde se relacionam com as proteínas que formam o citoesqueleto. Muitas proteínas da superfície dos eritrócitos funcionam como抗ígenos que são transmitidos geneticamente, configurando os denominados grupos sanguíneos. Esses抗ígenos, em parte são transmitidos em blocos durante a meiose, como no caso dos抗ígenos do sistema Rh (DccEe) e Kell, porém, outros são completamente independentes uns dos outros (PALEK; LUX, 1983).

Análises bioquímicas e imunológicas dos constituintes da membrana eritrocitária ocorreram em paralelo com estudos genéticos, tornando possível caracterizar as estruturas antigênicas destes grupos sanguíneos (GOODMAN; SCHIFFER, 1983; ANSTEE, 1990; CARTRON *et al.* 1998). A literatura especializada tem registrado mais de 250抗ígenos os quais, didaticamente, estão distribuídos em 23 sistemas. O polimorfismo genético envolvendo os grupos sanguíneos determina dificuldades importantes na prática transfusional, como a formação de aloanticorpos. Tal situação é configurada quando um indivíduo não expressando determinado抗ígeno, é a ele apresentado durante um ato transfusional ou gestação e, em função disto, produz uma imunoglobulina dirigida contra o抗ígeno em questão (BENNEBROEK; GRAVENHORST, 1994). Além disso, indivíduos com alterações do sistema imune podem desenvolver auto-anticorpos dirigidos aos seus próprios

antígenos eritrocitários (PETZ; GARRATY, 1980; SOKOL; BOOKER; STAMPS, 1992).

As classes e subclasses das Imunoglobulinas (Ig) que revestem o eritrócito são fatores que afetam sua sobrevida. A hemólise imune pode ser intravascular, induzida pela ativação completa da cascata do complemento ou extravascular, induzida pela interação da Ig e/ou complemento fixado às hemácias com receptores específicos nos macrófagos.

A imunoglobulina responsável pela hemólise imune intravascular é a IgM. Por ser um pentâmero composto de cinco monômeros de IgM e tendo múltiplos domínios funcionais, constitui um potente ativador do complemento pela capacidade de formação do complexo de ataque à membrana (SALAMA; MUELLER-ECKHARDT, 1987; TURNER, 1992; MOLLISON; ENGELFRIET; CONTRERAS, 1997).

A hemólise imune extravascular ocorre devido à ligação de hemácias sensibilizadas a receptores específicos nas células efetoras, produzindo um dano eritrocitário envolvendo eritrofagocitose e/ou lise citotóxica - citotoxicidade celular dependente de anticorpo (CCDA) (SOKOL; BOOKER; STAMPS, 1992). *In vivo*, os macrófagos são as principais células efetoras envolvidas. O baço, por ser o maior órgão do sistema retículo-endotelial e ter circulação lenta, é a sede ideal deste processo. Outros locais e mecanismos são eventuais e secundários (AGARWAL, 1998).

O diagnóstico de hemólise imune se baseia nos sinais clínicos, biológicos e demonstração dos anticorpos fixados às hemácias através do teste de antiglobulina direto (TAD) (MASOUREDIS *et al.*, 1987 e MEYER *et al.*, 1999). Vale salientar que o TAD tem sido uma ferramenta extremamente útil para a distinção entre anemia hemolítica de origem imunológica e não imunológica (GILLILAND, 1976).

A sensibilização das hemácias na hemólise extravascular envolve a imunoglobulina G (IgG) e/ou o componente C3 do complemento (GEHRS; FRIEDBERG, 2002). Foram demonstrados sobre os leucócitos humanos três tipos distintos de receptores Fc para IgG, cuja distinção é feita por suas propriedades estruturais e funcionais. Suas estruturas antigenicas foram detectadas por anticorpos

monoclonais reconhecedores dos denominados *clusters* de diferenciação – CD: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (RAVETCH; KINET, 1991; PEAKMAN; VERGANI, 1999).

A IgG ocorre como um monômero, sendo subdividida em quatro subclasses, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, codificadas por quatro genes separados (CARTRON *et al.*, 1998). Diferenças químicas e antigênicas nos três quartetos do carboxi-terminal das cadeias polipeptídicas gama determinam um grande número de atividades biológicas. Algumas das atividades referidas são subclasse-específicas (MORELL *et al.*, 1971), como por exemplo, a IgG3 se destaca por possuir uma região de “articulação” mais longa (Figura 1). Lobuglio, Cotran e Jandl (1967 *apud* DACIE, 1975) foram os primeiros autores a demonstrar que macrófagos e monócitos humanos possuem receptores específicos para IgG (em particular para o fragmento Fc). IgG1 e IgG3 têm uma alta afinidade para receptores Fc γ nos macrófagos. IgG2 e IgG4 têm afinidade fraca ou nula (DUBARRY *et al.*, 1993).

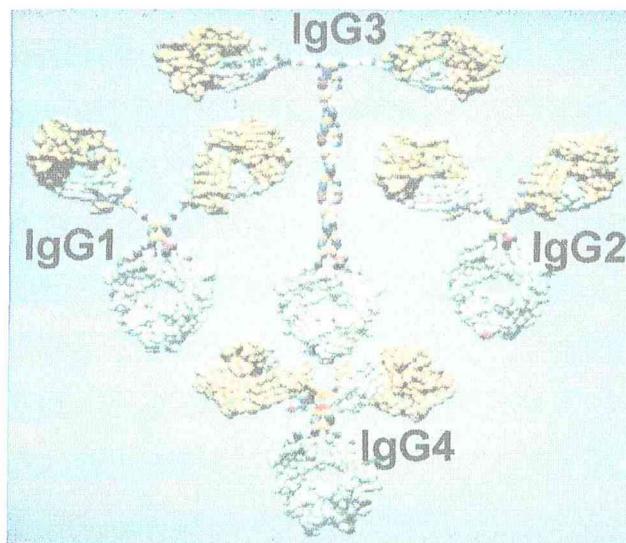


Figura 1 – Características estruturais das diferentes subclasses de IgG

As principais doenças hemolíticas imunes, cuja fisiopatologia envolve diretamente a participação da IgG são: Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) e Anemia Hemolítica Auto-Imune por anticorpos quentes (AHAI) (DACIE, 1999).

Embora o estímulo imunológico e os mecanismos para produção de alo-anticorpos na DHPN e auto-anticorpos na AHAI sejam totalmente diferentes, o produto final quase sempre é a hemólise.

A DHPN relacionada ao sistema Rh, apesar da profilaxia, permanece um problema clínico, principalmente em países subdesenvolvidos devido à falta de recursos financeiros e de acompanhamento pré-natal adequado (BOWMAN, 1985; TASLIMI *et al.*, 1986; REZENDE; JUNQUEIRA; REZENDE FILHO, 1998). Vale ressaltar que a aloimunização materna não foi eliminada em países desenvolvidos, pois cerca de 1,8% das pacientes beneficiadas com a administração da imunoglobulina, foram sensibilizadas (GIRIBELA *et al.*, 1999; KENNEDY; WAHEED, 1999).

A formação de auto-anticorpos quentes na AHAI muitas vezes produz circunstâncias difíceis de ser gerenciadas pelos Laboratórios de Imunohematologia e Agências Transfusionais (LAINE; BEATTIE, 1985; MOLLISON; ENGELFRIET; CONTRERAS, 1999).

Os auto-anticorpos são dirigidos a抗ígenos eritrocitários presentes em quase 100% da população (JAMES; ROWE; TOZZO, 1988; LEGER; GARRATY, 1998). Segundo Laine e Beattie (1985), Petz (1999) e Gonzalez (2000) sessenta a noventa por cento dos pacientes apresentam auto-anticorpos livres no soro que reagem com todas as hemácias-testes e de doadores, dificultando a realização das provas pré-transfusionais, situação denominada "Bloqueio Transfusional".

A etiopatogenia dos quadros hemolíticos auto-imunes permanece um tanto obscuro, restando apenas a avaliação dos fatores envolvidos na hemólise para obtermos parâmetros norteadores quanto ao prognóstico da doença.

Testes com valor preditivo foram desenvolvidos para a gravidade do quadro hemolítico. Na DHPN alguns trabalhos mostraram que a titulação seriada do anticorpo na gestante é bem aceita, porém, muitas vezes sem correlação constante com o desenvolvimento da doença (ROBERTSON, 1966; GALL; MILLER, 1981; BOWELL *et al.*, 1982). A eritrofagocitose fornece bons resultados para as duas doenças, mas, é uma técnica trabalhosa que requer muito tempo para sua realização, não alcançando eficiência em situações de emergência (WIENER *et al.*, 1987; GARNER *et al.*, 1995).

Existem estudos sobre a correlação entre as subclasses de IgG e a gravidade da hemólise, porém os resultados são controversos (BOWELL *et al.*, 1982; ZUPANSKA; THOMSON; MARRY, 1986; LYNEN *et al.*, 1995). As técnicas desenvolvidas para este propósito incluem: testes de aglutinação em tubo e microplaca, ELISA, gel teste e citometria de fluxo (KEMENY *et al.*, 1987; NANCE; GARRATY, 1987; BROUWERS *et al.*, 1987; HILDÉN *et al.*, 1997).

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença hemolítica perinatal

Nosso conhecimento sobre a avaliação prognóstica da DHPN pouco evoluiu, embora os métodos de detecção dos anticorpos maternos antieritrocitários tenham aumentado sua sensibilidade e especificidade nas últimas duas décadas.

Em 1952, Wiener *et al.* (1952) procuraram demonstrar que o título dos anticorpos anti-Rh era um dos principais fatores determinantes da gravidade e prognóstico da doença. Trabalhando com mães aloimunizadas, esses autores observaram que a taxa de natimortos era maior em mães cujos títulos de anticorpos estavam elevados. A esse parâmetro, Greenwalt e Wagner (1955), acrescentaram a pesquisa e quantificação do anticorpo na hemácia fetal através da titulação do teste de antiglobulina direto (TAD). Uma análise feita apenas com o parâmetro TAD revelou que 18,2% dos casos leves, 41,9% dos casos moderados e 39,4% dos casos graves apresentaram títulos altos, sugerindo uma correlação positiva, porém não constante entre o título de TAD e o aumento da probabilidade para um pior prognóstico da DHPN.

Três décadas depois, Gall e Miller (1981) analisaram 202 gestantes Rh imunizadas e demonstraram que existia uma correlação significante entre o índice de gravidade da DHPN e o título do anticorpo da mãe. Porém, não conseguiram determinar a existência de um título crítico de anticorpos a partir do qual ocorreria morte fetal. Bowell *et al.* (1982), estudando uma população semelhante, sugeriram que a concentração do anti-D menor que 4 UI/ml estava associada a um menor risco de desenvolvimento de DHPN grave.

Parinaud *et al.* (1985) pesquisaram em 103 gestantes Rh imunizadas com recém-nascidos Rh positivo, a correlação das subclasses IgG1 e IgG3 com a gravidade da DHPN. Os resultados das subclasses foram deduzidos a partir dos testes feitos com marcadores específicos anti-alótipos G1m(1) e G1m(4) para IgG1 e G3m(5), G3m(21) para IgG3. As subclasses IgG2 e IgG4 não foram estudadas sistematicamente. O estudo mostrou que a freqüência de formas graves da doença

hemolítica fetal foi maior quando o anti-D IgG1, especificamente G1m(4), estava presente. Os autores sugeriram que as formas menos graves da doença foram relacionadas com a presença simultânea de IgG1 e IgG3. Tal fato poderia ser atribuído a um provável efeito protetor da IgG3. Os autores inferiram que a determinação das subclasses de IgG e seus alótípos poderia ter valor preditivo no desenvolvimento da DHPN.

Taslimi *et al.* (1986) identificaram as subclasses de IgG em 22 gestantes isoimunizadas e compararam esses dados com a susceptibilidade dos conceptos ser afetados pela doença hemolítica. O método utilizado foi aglutinação em tubo capilar com dupla camada de albumina. O grupo de gestantes que apresentou somente IgG1 comparado com o grupo que apresentou a associação de IgG1 e IgG3, mostrou um nível significativamente mais alto de DHPN. Os autores concluíram que a determinação das subclasses de IgG é um dado útil na avaliação de gestantes isoimunizadas, entretanto as informações foram limitadas para permitir que aquela avaliação fosse um meio exclusivo de diagnóstico e conduta clínicos frente a DHPN.

Wiener *et al.* (1987) empregaram soro anti-D monoclonal com número pré-estabelecido de IgG1 e IgG3 para avaliar seus papéis na destruição eritrocitária. Verificaram que anti-D monoclonal IgG3 foi aproximadamente 100 vezes mais potente que IgG1 na interação macrófago-hemácia *in vitro*. Foram necessárias 100 moléculas de IgG3 e 10.000 moléculas de IgG1 para a ligação de hemácias aos fagócitos, sendo os anticorpos IgG3 agentes opsônicos mais potentes do que IgG1.

Wiener *et al.* (1988) delinearam as atividades de anticorpos monoclonais anti-D IgG1 e IgG3 na fagocitose e citólise de hemácias por monócitos. Foram realizados testes da monocamada de monócitos (MMA) e da citotoxicidade celular dependente de anticorpo (CCDA). Os anticorpos IgG3 se mostraram altamente eficientes, isto é, foram necessárias poucas moléculas para que se efetuasse o processo de aderência. As hemácias sensibilizadas por IgG3 permaneceram aderidas aos monócitos e somente em altas concentrações de IgG poucas células foram fagocitadas. Porém, muitas células revestidas por anticorpos IgG1 foram ingeridas e só uma minoria permaneceu aderida à membrana externa. No teste CCDA, que mede a destruição eritrocitária, principalmente, por citólise, IgG3 foi mais potente e causou maior lise (15%) do que IgG1 (3 a 8%). Os autores concluíram que

a IgG3 produz destruição eritrocitária, principalmente, por citólise, e IgG1 por fagocitose.

Brojer, Merry e Zupanska (1989) avaliaram a taxa de interação entre hemácias sensibilizadas por anticorpos monoclonais e policlonais anti-D IgG1 e IgG3 com monócitos. Os resultados mostraram que hemácias sensibilizadas por anticorpos IgG3 interagiram mais rapidamente com monócitos apresentando um pico máximo durante os primeiros 30 minutos, enquanto que a interação com anticorpos IgG1 ocorreu lentamente, com pico máximo em duas horas. Os autores atribuem o melhor desempenho de IgG3 à característica estrutural da molécula. IgG3 tem uma região de articulação maior e mais flexível que IgG1, permitindo melhor acesso aos receptores FcR dos monócitos.

Utilizando a técnica de citometria de fluxo, Garraty e Nance (1990) compararam a quantidade de moléculas IgG fixadas às hemácias em amostras de 73 pacientes com e sem anemia hemolítica: 38 amostras foram de recém-nascidos de mães isoimunizadas, 10 foram de pacientes com TAD positivo idiopático e 25 com TAD secundários ao uso de metildopa. Das amostras dos recém-nascidos 20/38 reagiram com anti-soros subclasses específicas (sete IgG1, cinco IgG3, um IgG4, seis IgG1+IgG3 e um IgG1+IgG4). Nos pacientes com TAD idiopático foi possível subclassificar o anticorpo IgG em 5/10 (50%): dois com IgG1 e três com IgG3. Dos 25 pacientes com TAD positivo secundário ao uso de metildopa, foram detectadas subclasses em 17 (14 mostraram apenas IgG1 e três apresentaram IgG1 associada a IgG4). Nas crianças com DHPN a presença de IgG1 e IgG3 estava associada ao quadro hemolítico, mas não houve a mesma correlação nos indivíduos com AHA primária ou secundária.

Zupanska *et al.* (1990) realizaram estudos em 42 amostras de soro de gestantes isoimunizadas com anticorpos diferentes do anti-D. Foram comparados os resultados MMA, o nível de sensibilização *in vitro* (número de moléculas IgG fixadas às hemácias), a composição da subclasse de IgG e suas significâncias clínicas. Em geral, anticorpos IgG1 difíceis de definição nos testes, exibiram um número menor de moléculas por hemácia e foram menos reativos do que IgG3 e IgG1+IgG3. O nível de sensibilização das hemácias em 12 dos 26 anticorpos IgG1 foi baixo (menos de 1000 moléculas por hemácia e suas reatividades não excederam 20%). Entre os 14 anticorpos IgG1 que mostraram reações fortes (o número de moléculas não

excedeu 3200 moléculas por hemácias), apenas em dois casos o MMA foi maior que 20%. Todos os anticorpos IgG3 e IgG1+IgG3 foram ativos no MMA, embora a taxa de sensibilização tenha mostrado uma ampla variação (1000 a 23.500 moléculas IgG por hemácia). Os autores também observaram que a presença do complemento nas hemácias potencializou a reatividade dos anticorpos no MMA.

Pollock e Bowman (1990) estudaram a influência das subclasses de IgG e a gravidade da DHPN em 98 gestações. Os autores mostraram que a relação entre anticorpos IgG1 ou IgG1+IgG3 e o grau da doença foi variável. Quando o anti-D era apenas IgG1, 59% apresentaram quadro grave da doença. Quando houve associação entre as duas subclasses a doença foi grave em 63%.

Iyer, Kulkarni e Gupte (1992) avaliaram os valores prognósticos das subclasses de IgG em 107 gestantes indianas imunizadas. Utilizando reagentes policlonais específicos para as subclasses de IgG, todas as quatro subclasses foram detectadas no soro anti-D, sendo que IgG1 e IgG3 foram predominantes. O título de IgG3 se apresentou freqüentemente baixo. Os autores observaram que ocorreu doença grave quando o anti-D foi IgG1 apesar do baixo título; todos os recém-nascidos de mães com anti-D, exclusivamente IgG3, apresentaram doença leve, porém o risco de natimorto foi maior quando as duas subclasses se apresentaram juntas. Neste mesmo ano, Alie-Daran, Dugoujon e Fournie (1992) demonstraram que a presença isolada de IgG1 estava relacionada a uma maior freqüência de casos graves, quando comparada com os casos onde havia associação dessa subclasse com a IgG3. Esses autores concordaram com as conclusões prévias de que IgG3 foi menos associada com DHPN grave.

Garner *et al.* (1992) investigaram 40 casos de DHPN devido à imunização Rho(D) materna cujo feto necessitou de transfusão intra-útero. Os resultados do micro hematórito foram comparados com os seguintes parâmetros: concentração do anticorpo, subclasse de IgG e teste de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (CCDA). A concentração do anti-D excedeu 4UI/ml em todos os casos indicando risco de doença hemolítica. As subclasses de IgG do anti-D materno foram detectadas por técnicas de aglutinação em microplacas e não foi demonstrada nenhuma relação com a gravidade da anemia. Os resultados daqueles autores sugeriram que IgG3 não parece essencial para o desenvolvimento de hemólise grave no feto que apresenta uma concentração relativamente alta de IgG1 materna.

Thomas *et al.* (1993) avaliaram a importância das subclasses de IgG em gestantes isoimunizadas utilizando a técnica ELISA-quantitativo com reagentes monoclonais específicos para cada subclasse. Os resultados mostraram que IgG1 foi responsável por mais de 50% dos casos que necessitaram de fototerapia ou transfusão. Lubenko *et al.* (1994) determinaram, por imunodifusão radial simples, as concentrações das subclasses de IgG nos soros maternos e fetais com e sem risco de DHPN. Utilizaram também anticorpos monoclonais anti-subclasses de IgG, obtendo resultados semelhantes. Nas gestações de risco de DHPN foram obtidos níveis maiores de IgG1 do que nas gestações sem risco. Houve ainda uma nítida redução dos níveis de IgG3 maternos em ambos os tipos de gestação e um aumento nos fetos do grupo sem risco. Outra observação importante foi que na avaliação da concentração das subclasses no sangue materno em relação ao do cordão umbilical, níveis maiores de IgG1 foram encontrados na amostra do cordão umbilical.

Garner *et al.* (1995) avaliaram no soro de 44 gestantes isoimunizadas os seguintes parâmetros: testes funcionais celulares (CCDA e MMA), concentração do anti-D por nefelometria e a mensuração de IgG1 e IgG3 maternos por citometria de fluxo. Quanto ao valor preditivo desses testes em relação à gravidade da doença, os testes funcionais celulares mostraram maior correlação que os de quantificação de anticorpos. A atividade CCDA e o desenvolvimento de DHPN se correlacionaram com o número de moléculas IgG1, enquanto que a atividade MMA se correlacionou com o número de moléculas IgG3. Os autores atribuíram o melhor valor preditivo ao CCDA devido esse teste refletir, principalmente, o papel da IgG1 na fisiopatologia da DHPN.

Posteriormente, Lynen *et al.* (1995) utilizando método de citometria de fluxo e anticorpos policlonais marcados com fluoresceína, relataram as determinações das subclasses de IgG em 21 recém-nascidos (13 com DHPN por Rh e oito por ABO) e 12 pacientes com linfoma (sete com TAD positivo, sem hemólise, e cinco com AHAI associada). Esses autores não encontraram correlação no aumento das concentrações de IgG1, isolada ou associada a IgG3 na hemólise da DHPN, porém, evidenciaram nos pacientes com linfoma. Portanto, os resultados indicaram que a hemólise clínica é mais freqüente ou grave quando grandes quantidades de IgG1 estão presentes. A detecção de anticorpos IgG3 associados ao IgG1 parece indicar uma situação clínica mais grave.

Palfi e Hildén (1997) avaliaram uma nova técnica de gel teste para subclassificar IgG e compararam os resultados com outros realizados por uma técnica em microplaca já estabelecida. A amostra era composta de soro de 31 gestantes previamente imunizadas. Ambos os métodos detectaram as mesmas subclasses, exceto numa paciente na qual foi detectada IgG3 pelo gel teste, não sendo evidenciada pela outra técnica. Nenhuma subclasse foi detectada em três amostras, provavelmente, devido a baixa concentração de IgG e/ou altas concentrações de anticorpos IgM.

Os resultados das amostras com subclasses detectáveis foram: 14/28 (50%) apresentaram IgG1+IgG3 com ou sem IgG2 e IgG4. Em 11 casos (39,3%) o soro apresentou apenas anticorpos IgG1 e em três casos (10,7%) o anti-D foi somente IgG3. O objetivo do estudo não foi estabelecer a significância clínica das diferentes subclasses dos anti-D, mas comparar um novo teste com outro já estabelecido. Portanto, na opinião dos autores ambos os testes foram fáceis de realizar, relativamente baratos podendo ser introduzidos na prática diária dos Laboratórios de Imunohematologia. O gel teste ainda apresentou duas vantagens, foi mais rápido e a interpretação dos resultados mais fácil do que na microplaca.

Lynen *et al.* (2002) investigaram se um novo teste quantitativo em gel poderia substituir a citometria de fluxo para quantificar IgG ligada às hemácias e para determinar a subclasse de IgG. Sessenta e cinco amostras de pacientes com TAD positivo foram incluídas no estudo. Além disso, foram testadas amostras de 22 gestantes Rh negativo, isoimunizadas.

Para a citometria de fluxo foram utilizados reagentes específicos para as quatro subclasses (*Binding Site, Birmingham-UK*) e o citômetro modelo FACSCalibur, Becton Dickinson.

Das 65 amostras, apenas 16 apresentaram reação com as subclasses (11 IgG1, uma IgG3 e quatro IgG1+IgG3).

Das 22 amostras de gestantes, somente 20 apresentaram subclasses detectáveis (cinco IgG1, quatro IgG3 e 11 IgG1+IgG3).

Em 16 das 22 gestantes foram obtidas informações relacionadas à gestação e ao conceito: oito casos receberam terapia transfusional sendo, portanto, classificados como DHPN grave (duas exsangüineotransfusões pós-parto e seis

transfusões intra-uterinas). Houve um natimorto não relacionado à aloimunização. Oito casos sem terapia transfusional foram classificados como moderados (sete nascidos a termo e um pós-parto normal).

Os casos graves foram observados com altas concentrações de IgG1, moderadas de IgG3 e baixas concentrações de IgG1 quando essa estava associada a IgG3.

Entretanto, houve exceções: um caso não apresentou DHPN, apesar das altas concentrações de IgG1 e IgG3, outro, necessitou de exsangüineotransfusão, apesar de baixas concentrações de IgG3.

Os autores concluíram mostrando a eficiência do gel teste para detecção de subclasse quando o título de IgG é ≥ 300 .

2.2 Anemia hemolítica auto-imune

Goldberg e Fudenberg (1968) publicaram, em breve relato, que um paciente no ano de 1962 apresentou AHAI em remissão induzida por corticosteróide. A terapia durou 7 meses, porém, o TAD permaneceu fortemente positivo por um período maior que 6 anos, apesar de o paciente estar hematologicamente normal. Os dados indicaram que a persistência de um TAD fortemente positivo não necessariamente implica hemólise contínua.

Dacie (1975) expôs resultados de investigações realizadas em 121 pacientes com AHAI por anticorpo quente. A imunoglobulina G predominou em 87%, isoladamente 79% ou associada à IgA, IgM ou complemento (8%).

Von dem Borne *et al.* (1977) descreveram, em relato de caso, um paciente com diagnóstico de AHAI ativa, por um certo período. O TAD, após tratamento com prednisona, continuou fortemente positivo sem qualquer evidência de hemólise. Várias investigações foram realizadas: estudo de sobrevida das hemácias do paciente, teste *in vitro* de aderência aos monócitos, avaliação da função dos macrófagos, porém todos apresentaram resultados normais ou quase normais. Os autores conseguiram esclarecer a justificativa para tais achados, quando

descobriram que os anticorpos responsáveis pela forte sensibilização das hemácias pertenciam principalmente à subclasse IgG4, embora, IgG1 e IgG3 também estivessem presentes em baixas concentrações. Os autores inferiram uma provável troca de subclasse, causada pela corticoterapia ou de forma espontânea.

Van der Meulen *et al.* (1980), utilizando a metodologia de citometria de fluxo e reagentes anti-IgG policlonal marcado com fluoresceína, determinaram a quantidade relativa de moléculas IgG1 nas hemácias de 29 pacientes com auto-anticorpos IgG1. Os resultados obtidos foram relacionados com a presença ou ausência de hemólise e com os biotestes celulares. Os autores concluíram que a quantidade de auto-anticorpos IgG1 presentes na superfície eritrocitária foi o fator determinante para a ocorrência da hemólise, sugerindo existir um nível de sensibilização acima do qual a destruição eritrocitária *in vivo* torna-se evidente.

Nance e Garraty (1983) compararam resultados de estudos obtidos entre um grupo de 92 indivíduos: 56 doadores de sangue, 18 pacientes apresentando TAD positivo sem evidência de hemólise e 18 pacientes com quadro bem definido de AHAI. A intensidade de reação do TAD e a presença de hemólise foram relacionadas com múltiplas subclasses.

Straton *et al.* (1983) estudando 22 doadores de sangue com TAD positivo, observaram que nenhum deles possuía mais de 1000 moléculas IgG1 por hemácia, porém, em pacientes com AHAI esse número foi bem maior.

Ben-Izhak, Schechter e Tatarsky (1985) analisaram em 85 pacientes com TAD positivo, as possíveis relações entre as classes de imunoglobulinas com doença de base, presença e gravidade de hemólise e resposta ao tratamento. O grupo de estudo envolveu pacientes com AHAI primária ou secundária a desordens linfoproliferativas, ao lupus eritematoso sistêmico, uso de metildopa ou a uma miscelânea de doenças. A correlação entre a presença/grau de hemólise e tipo de imunoglobulina responsável pelo TAD também foi analisada. Pacientes em uso de metildopa apresentaram apenas IgG na superfície das hemácias. Todos os pacientes com LES apresentaram IgG associada ao complemento, sendo que em dois deles a hemólise grave estava associada a presença de IgG e IgA. Pacientes que apresentaram apenas complemento não tinham evidência de hemólise e, quando presente não era grave.

Sokol *et al.* (1985) descreveram suas experiências preliminares com a realização do TAD ligado a enzima para detectar pequenas quantidades de IgG, IgA e IgM nas hemácias. Amostras de 219 pacientes com suspeita de hemólise auto-imune foram investigadas por métodos de aglutinação e ELISA. Foram utilizados reagentes monoespecíficos anti-IgG, anti-IgA e anti-IgM. Os testes envolvendo enzima foram mais sensíveis porque detectaram níveis de imunoglobulinas normalmente presentes nas hemácias de indivíduos saudáveis, assim como níveis anormais, embora baixos, presentes nas hemácias de indivíduos com hemólise auto-imune e TAD negativo. Houve correlação entre a presença do complemento e a hemólise ativa. Os pacientes que mostraram mais de uma classe de imunoglobulina fixadas às hemácias, embora em pequenas quantidades, apresentaram hemólise evidente. Esses achados sugeriram que pode ocorrer um sinergismo entre tais moléculas para que se desenvolva o processo hemolítico.

Esses autores avaliaram a ocorrência de hemólise auto-imune em pacientes com TAD negativo em técnicas padrões de aglutinação. Das amostras que apresentaram um número menor ou igual a 200 moléculas de IgG por hemácia foi realizada a pesquisa pela técnica de TAD ligado a enzima cujos resultados foram relacionados à presença de hemólise. Os pacientes foram divididos em 3 grupos: grupo 1 – pacientes com hemólise auto-imune independente da gravidez; grupo 2 – pacientes com quadro hemolítico duvidoso e grupo 3 – pacientes com hemólise ausente ou improvável. A análise estatística mostrou uma associação altamente significante entre pequenos aumentos na concentração de IgG, IgM e IgA e a presença de hemólise quando foram comparados os grupos 1 e 3. Os autores concluíram que é importante utilizar técnicas mais sensíveis para detecção de baixas quantidades de imunoglobulinas fixadas às hemácias, e que a presença de múltiplas classes de imunoglobulinas, mesmo que detectadas apenas por técnicas mais sensíveis, podem agir sinergicamente, provocando hemólise grave (SOKOL *et al.*, 1987).

Sokol *et al.* (1990), utilizando a mesma técnica dos trabalhos anteriores, investigaram os efeitos e inter-relações de múltiplas classes de imunoglobulinas fixadas às hemácias em 404 pacientes com auto-anticorpos quentes. Os testes feitos em eluatos mostraram maior sensibilidade do que aqueles realizados diretamente nas hemácias dos pacientes. Os resultados mostraram que 37% das

amostras apresentavam IgG além de IgM e/ou IgA e 63% apenas IgG, indicando que pacientes com hemácias sensibilizadas por múltiplas imunoglobulinas são mais suscetíveis à hemólise.

Chaplin (1990) fez uma análise geral, baseada em relatos existentes na literatura, sobre testes com valor preditivo para a gravidade do processo hemolítico em pacientes com AHAI. As controvérsias encontradas pelo autor variaram desde a estimativa do valor preditivo real em testes simples, como a quantificação do anticorpo, aos mais complexos biotestes celulares. Foram abordados critérios de classificação de anemia hemolítica, porém as variáveis são muitas: concentração de hemoglobina, percentual de reticulócitos, concentração de bilirrubinas e haptoglobina. No entanto, esses testes podem apresentar valores anormais por razões outras que não hemólise. A escolha de reagentes para a realização de técnicas que envolvem auto-anticorpos, também foi motivo de discussão para o autor. As características individuais da antiglobulina podem influenciar os resultados: o número de epítopos reconhecidos, afinidade dos anticorpos, presença de anticorpos não-gama específico (em reagentes policlonais) e a extensão do excesso de anticorpo para cada subclasse (presentes em reagentes monoclonais). Finalmente, foi comentado o estado do sistema retículo-endotelial do paciente. Supressão do seqüestro esplênico de hemácias sensibilizadas por complexos imunes circulantes foi demonstrada em estudos de população lúpica ativa e em uso de metildopa,.

O autor concluiu incentivando a continuidade de pesquisas relacionadas ao assunto com esperanças de que novas tecnologias serão valiosas tornando os testes mais baratos, rápidos e precisos. Entretanto, a predição clínica grave requer bom senso do médico assistente em aproveitar o máximo de informações possíveis de fatores que culminam com hemólise auto-imune *in vivo*.

Engelfriet *et al.* (1992) mostraram a freqüência relativa de vários tipos de auto-anticorpos eritrocitários. Estudos realizados em 1825 pacientes com anemia hemolítica mostraram que a IgG isolada ou associada a IgA e IgM predomina. As subclasses dos auto-anticorpos IgG foram determinadas em outra série de 746 pacientes. Nessa série, a grande maioria dos pacientes 552/746 (80%) apresentaram apenas a subclasse IgG1, 5 IgG2, 16 IgG3, 7 IgG4 e 65 apresentaram

IgG1 associada as outras subclasses. As subclasses não foram detectadas em 14 pacientes.

Dubarry *et al.* (1993) determinaram os aspectos qualitativos e quantitativos das classes e subclasses dos auto-anticorpos em pacientes com e sem hemólise. A casuística foi composta por: 23 pacientes com AHAI por auto-anticorpos IgG, 11 doadores de sangue com TAD positivo mas sem evidência de hemólise e 10 doadores de sangue saudáveis com TAD negativo. As concentrações de IgG, IgA, IgM, assim como as subclasses de IgG foram medidas por testes imunoenzimáticos (ELISA) utilizando anticorpos monoclonais específicos para cada subclasse. O número total de moléculas IgG por hemácia se correlacionou bem com o número de moléculas IgG1, IgG2 e IgG4, mas não com IgG3. A IgG1 foi a subclasse predominante em todos os eluatos. A determinação do número de moléculas IgG e suas respectivas subclasses foi melhor analisada utilizando os eluatos ao invés das próprias hemácias dos pacientes. Em testes realizados com eluatos de doadores normais foi encontrado um número médio de 54 moléculas IgG e 7 moléculas IgM por hemácia. A proporção das subclasses foi determinada nesses doadores: 36 moléculas de IgG1, 11 de IgG2, 4 IgG3 e 3 moléculas de IgG4. A IgG3 mostrou um comportamento diferente das outras subclasses, não foi observada correlação entre IgG3 e IgG total ou qualquer outra subclasse, e embora IgG3 tenha se mostrado mais comum nos pacientes com AHAI, também foi observada nas hemácias de pessoas com TAD positivo, sem hemólise evidente. A diferença entre indivíduos normais TAD positivo e/ou TAD negativo é basicamente o número de moléculas IgG1 por hemácia. Nenhuma diferença foi associada a outras subclasses.

Roush *et al.* (1996) descreveram, em relato de caso, homem de 36 anos que apresentou um quadro grave de AHAI com início agudo. Por ocasião do primeiro atendimento apresentava hematócrito 15%, bilirrubinas e desidrogenase láctica elevadas, TAD e PAI positivos. Após transfusão incompatível de sete concentrados de hemácias, houve um agravamento do estado clínico. A cor rosa-avermelhada do soro, ausência de esferócitos no sangue periférico, MMA normal e a rapidez do processo hemolítico apontaram para uma possível hemólise intravascular. Testes imunohematológicos revelaram a presença de auto-anticorpo com especificidade anti-U pertencente à subclasse IgG2. Sete unidades de hemácias U negativas foram infundidas nos 4 dias subsequentes e iniciada corticoterapia. Houve um aumento do

hematócrito para 23%, cujo valor continuou a aumentar sem necessidade de transfusão. Os autores expuseram na discussão uma série de argumentos na tentativa de explicar o envolvimento do auto-anticorpo de subclasse IgG2 na destruição eritrocitária, entre os quais os mais importantes foram: a IgG2 estava associada à ativação do complemento ou ocorreu destruição extravascular maciça por CCDA mimetizando hemólise intravascular. Finalmente afirmaram ser esse o primeiro relato de hemólise grave envolvendo auto-anticorpo IgG2.

Fabijanska-Mitek, Lopienska e Zupanska (1997) adaptaram a técnica em gel, utilizando microtubos com anti-soros policlonais específicos para a determinação das subclasses de IgG. Foram investigadas amostras de 49 pacientes com AHAI cujos testes foram procedidos utilizando-se hemácias de doadores sensibilizadas com os eluatos de pacientes com TAD positivo ou as próprias hemácias do paciente. Os procedimentos do gel teste foram comparados aos testes de aglutinação em tubo e em microplacas. Os testes realizados em gel detectaram subclasses em 100% das amostras, mostrando-se mais eficientes que os testes de aglutinação em tubo (65,2%) e em microplaca (96,4%). Os resultados em gel revelaram que IgG1 foi detectada em 95,5% dos pacientes, tanto isolada (59,1%) ou associada a outras subclasses (36,4%). Houve uma melhor associação entre múltiplas subclasses e gravidade da hemólise. Na maioria dos casos leves (69%) somente IgG1 foi detectada e no restante foram detectadas IgG2 ou IgG4. Os autores concluíram que o gel teste mostrou melhor resultado (maior sensibilidade) na análise de subclasses em eluatos ou diretamente nas hemácias dos pacientes. A presença de múltiplas subclasses foi associada a um maior número de anticorpos fixados às hemácias e a hemólise grave.

Li *et al.* (1999) detectaram as subclasses de IgG em 40 pacientes utilizando anticorpos monoclonais e analisaram suas implicações clínicas. Três grupos de pacientes foram avaliados: grupo A: 20 pacientes com IgG3; grupo B: 14 pacientes com apenas IgG1; grupo C: 6 pacientes com ausência de IgG1 e IgG3. As concentrações de hemoglobina no grupo A foram significativamente mais baixas que no grupo C. As diferenças entre os grupos B e C foram insignificantes. Os parâmetros de anemia (Hb), hemólise (bilirrubina total e hemoglobina fetal) foram similares. Foram encontrados IgG3 nas hemácias de 2 pacientes com TAD positivo sem anemia hemolítica. Os autores comentaram os relatos de Wiener para justificar

o fato de que são requeridas quantidades relativamente altas de IgG3 para mediar fagocitose.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

1. Determinar a relação entre TAD e gravidade da DHPN.
2. Determinar a relação entre o título do anticorpo em gestantes alosensibilizadas e gravidade da DHPN.
3. Determinar a relação entre as subclasses de IgG em gestantes isoimunizadas e a gravidade da DHPN.
4. Determinar a relação entre as subclasses de IgG e o quadro hemolítico em pacientes com AHAI.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

A população desse estudo foi composta por gestantes alo-sensibilizadas e pacientes com AHAI primária ou secundária.

As amostras de soro das gestantes foram obtidas de pacientes alo-sensibilizadas cujos filhos desenvolveram doença hemolítica perinatal. Alíquotas de 500 μ L do soro de cada gestante foram armazenadas, até o momento de realização dos ensaios, em freezer localizado no Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro de Botucatu-UNESP-SP.

Os critérios usados para classificar a gravidade da doença no conceito, foram baseados nos de Gall e Miller (1981) modificados. Os conceptos que apresentaram doença leve não necessitaram de terapia transfusional, os que apresentaram doença moderada receberam exsangüíneotransfusão e os casos graves foram relacionados a transfusão intra-útero ou morte fetal.

As amostras de sangue dos pacientes com AHAI foram obtidas de alíquotas de exames de rotina para acompanhamento ou investigação laboratorial, realizados no Laboratório de Imunohematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará - Hemoce. Os relatos clínicos e exames laboratoriais foram retirados dos respectivos prontuários, conforme protocolo em anexo.

Os critérios de classificação para a gravidade do processo hemolítico foram baseados nos de Fabijanska-Mitek, Lopienska e Zupanska (1997) modificados:

- hemólise leve: Hb>10mg/dL; Ret<2%; BI<0,4mg/dL;
- hemólise moderada: 6,5mg/dL<Hb≤10mg/dL; 2%≤Ret≤3%; BI≥0,4mg/dL;
- hemólise grave: Hb≤6,5mg/dL; Ret>3%; BI>2mg/dL.

A população controle foi composta por 8 doadores de sangue, saudáveis, de ambos os sexos, provenientes do Hemocentro de Botucatu - SP.

A casuística foi dividida em 3 grupos, com critérios de inclusão e exclusão abaixo discriminados.

4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão da população em estudo

- **Gestantes alo-sensibilizadas**

Critérios de inclusão: gestantes alo-sensibilizadas, sem passado transfusional nem uso de drogas injetáveis ou tatuagem, relatando gestações prévias e sem uso de Rhogam®.

- **Pacientes com anemia hemolítica auto-imune**

Critérios de inclusão: pacientes de ambos os sexos, com diagnóstico clínico e laboratorial de anemia hemolítica auto-imune, a saber: TAD positivo, com ou sem co-morbidades.

Critérios de Exclusão: história transfusional nos últimos 4 meses .

- **População controle**

Critérios de inclusão: doadores saudáveis de sangue.

Critérios de Exclusão: foram excluídos doadores com sorologia (HIV, HTLV, VDRL, HCV, HbsAG, anti-HBC, TGO, TGP) e/ou TAD positivo.

Pacientes que preenchiam os critérios de inclusão foram informados e convidados a participar do estudo após consentimento esclarecido, sendo solicitada a autorização para a participação dos pacientes com idade inferior a 18 anos (Termo de consentimento pós-esclarecido) (APÊNDICE A).

4.2 Métodos

4.2.1 Processamento das amostras biológicas

Os doadores de sangue foram informados e aquiesceram na utilização de suas amostras nos testes adicionais. De cada indivíduo foram coletados 5ml de sangue por punção venosa periférica, em tubos tipo vacutainer® (Beckton-Dickinson, Plymouth, UK), com EDTA como anticoagulante, para a realização do teste de falcilização. A realização dos ensaios ocorreu de 2 a 3 horas após a coleta da amostra.

As amostras de soro das gestantes alo-sensibilizadas estavam congeladas a -20°C em tubos Eppendorf® de 1,5ml (Sigma Chemical, Co., St. Louis, USA), devidamente identificados.

As amostras de sangue dos pacientes portadores de AHA1 foram identificadas pelos pedidos de exames para diagnóstico da patologia. Após a realização dos exames de tipagem sanguínea, teste de antiglobulina (TAD)-mono e poliespecífico e pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), as amostras selecionadas foram centrifugadas em 900g por 10 minutos, separadas hemácias e soro, que foram distribuídos em Eppendorf® de 1,5mL (Sigma Chemical, Co., St Louis, USA). Cada componente foi estocado, até o momento de uso, da seguinte maneira: 0,5 mL de hemácias congeladas a -70°C e 0,5mL de soro a -20°C.

4.2.2 Teste de antiglobulina humana

O princípio do teste de antiglobulina, também conhecido como teste de Coombs, foi descrito em 1908 por Moreschi e inicialmente aplicado na sorologia eritrocitária por Coombs e col. em 1945 (MORESCHI, 1908; COOMBS; MOURANT; RACE, 1945). A capacidade do soro antiglobulina reagir com componentes do complemento humano ligado às hemácias foi descrita em 1957 por Dacie, Crookston e Christensen (1957).

Para a determinação do TAD foi utilizado o método em tubo, segundo técnicas sorológicas padrão (AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS-AABB, 1999). Inicialmente as hemácias passaram por um processo de lavagem (3 vezes) com solução fisiológica 0,9% e, a partir do concentrado, foi preparada uma suspensão de hemácias a 5%.

Em cada dois tubos limpos e secos, devidamente identificados com o nome do paciente e a sigla MONO (monoespecífico) e POLI (poliespecífico) foi colocada uma gota da suspensão de hemácias. Ao tubo identificado como MONO adicionou-se uma gota do soro de Coombs anti-IgG Gamma Clone® (Gamma Biologicals/Houston, Texas, E.U.A) e ao tubo identificado como POLI, adicionou-se uma gota do soro anti-humano BSA® (anti-IgG e C_{3d}) ASEM-NPBI, São Paulo, Brasil. Os tubos foram centrifugados a 3400g por 15 segundos e agitados levemente para observar aglutinação, conforme padrões de leitura estabelecidos nos protocolos do laboratório.

- **Teste de antiglobulina direto poliespecífico - técnica em gel**

Uma suspensão de hemácias a 0,8% foi preparada em ID-Diluente 2 (DiaMed-Latino® América S.A., MG – Brasil) e colocados 50µl em um microtubo do ID – Cartão LISS/Coombs (DiaMed® – Latino América S.A., MG - Brasil). Após centrifugação do cartão por um período de 10 minutos, o resultado foi interpretado e anotado na ficha do protocolo de pesquisa (APÊNDICE B, APÊNDICE C).

- **Teste de antiglobulina direto monoespecífico - técnica em gel**

Uma suspensão de hemácias a 0,8%, preparada em ID-Diluente 2 (DiaMed®-Latino América S.A., MG – Brasil), foi testada utilizando ID-Cartão “Screening I” para teste de Coombs direto IgG-IgA-IgM-C3c-C3d-ctl (DiaMed® AG, Cressier sur Morat – Switzerland). 50 µL foram colocados em cada microtubo do cartão e, em seguida, centrifugado durante 10 minutos. O resultado foi interpretado e anotado na ficha do protocolo de pesquisa (APÊNDICE B, APÊNDICE C).

- **Pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) para triagem, identificação e titulação de anticorpos - técnica em gel**

O soro do paciente foi submetido a uma pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), utilizando ID-Cartão “LISS/Coombs” (DiaMed®-Latino América S.A., MG – Brasil) e ID-Diacell I+II (DiaMed AG, Cressier sur Morat – Switzerland). Em microtubos do cartão, devidamente identificados I e II, foi colocada uma gota das respectivas hemácias-reagentes I e II e adicionados 25 µL do soro do paciente. Após um período de incubação de 15 minutos e centrifugação por 10 minutos os resultados foram interpretados e anotados na ficha do protocolo de pesquisa (APÊNDICE B, APÊNDICE C).

Nos testes com resultados positivos continuamos com o estudo para a identificação do anticorpo em questão. A metodologia foi a mesma utilizada no teste de triagem, só acrescentando outros tipos de cartões ID-Cartão NaCl/Enzima e as hemácias reagentes foram constituídas de 2 conjuntos diagnósticos formados por 11 hemácias cada: ID-DiaPanel e ID-DiaPanel P (DiaMed®-Latino América S.A., MG – Brasil). A titulação dos anticorpos foi realizada pela mesma metodologia do PAI.

4.2.3 Congelamento e descongelamento de hemácias

O procedimento de congelamento das hemácias foi baseado na técnica desenvolvida por Mitchell, na qual as amostras são, inicialmente, lavadas três vezes

com solução salina 0,9%. Para cada lavagem, após a adição e mistura da solução salina, centrifugou-se em 900g por 10 minutos. O concentrado de hemácias foi diluído volume/volume com a solução de glicerol (Reagen, São Paulo-Br) 40% e citrato trissódico (Merk) 5%, distribuído em um volume de 1mL em tubos de Eppendorff® e estocado em freezer a -80°C (MITCHELL; SIM, 1989).

O processo de descongelamento das hemácias foi baseado naquele proposto por Marletta. Inicialmente a amostra é colocada a temperatura ambiente até descongelamento, seguido da lavagem em soluções de citrato trissódico 5% (preparado a partir do citrato trissódico monohídrico - Reagen, São Paulo – Br) com diferentes concentrações de glicerol (Reagen, São Paulo – Br) obedecendo a seguinte ordem: 12%, 5%, 2,5% e uma última solução preparada a partir de iguais quantidades de Citrato trissódico a 5% e salina isotônica (MARLETTA, 1979).

4.2.4 Desenvolvimento do ensaio em gel centrifugação para determinação das subclasses IgG1 e IgG3 nos eritrócitos

Após o descongelamento, as hemácias foram lavadas mais 3 vezes antes da realização do ensaio. Cinquenta microlitros de uma suspensão a 0,8% em tampão ID-Diluent 2 (DiaMed®-Latino América S.A., MG – Brasil) foram colocados em cada microtubo do ID-Card “DAT IgG1/IgG3” (DiaMed AG, Cressier sur Morat – Switzerland) com seis microtubos dos quais dois continham anti-IgG1 monoclonal (cell line M 345/795) em duas diferentes diluições (1:1 e 1:100), outros dois continham anti-IgG3 (cell line M346/805) em duas diferentes diluições (1:1 e 1:100), o quinto continha anti-IgG (rabbit) 1:10 dentro do gel matriz e por último um microtubo que continha apenas uma solução de LISS, servindo como controle negativo. Após a centrifugação por 10 minutos os resultados foram interpretados e anotados na ficha do protocolo de pesquisa (APÊNDICE B, APÊNDICE C).

4.2.5 Padronização da técnica de citometria de fluxo

A constituição do padrão positivo, padrão negativo e a padronização da técnica foram feitas com o uso de anticorpos monoclonais murinos antiglicoforina humana produzidos no Hemocentro de Botucatu-SP. Para o padrão positivo, inicialmente foram colocados 100 μ L de uma suspensão contendo 20.000 hemácias humanas em um tubo de hemólise e adicionados 100 μ L do AcMm antiglicoforina humana (clone ED11-21) em diferentes concentrações para se estabelecer o melhor padrão de reação para o citômetro de fluxo. A melhor diluição foi 1:64. Após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente com o AcMm antiglicoforina a suspensão foi lavada três vezes com salina e adicionados 10 μ L do anticorpo de cabra anti-mouse diluição 1:20 (goat-anti-mouse Ig total-FITC –GAM-FITC- Serotec®). Nesta etapa a reação foi incubada com diferentes quantidades de anticorpo marcado com FITC (Figura 2).

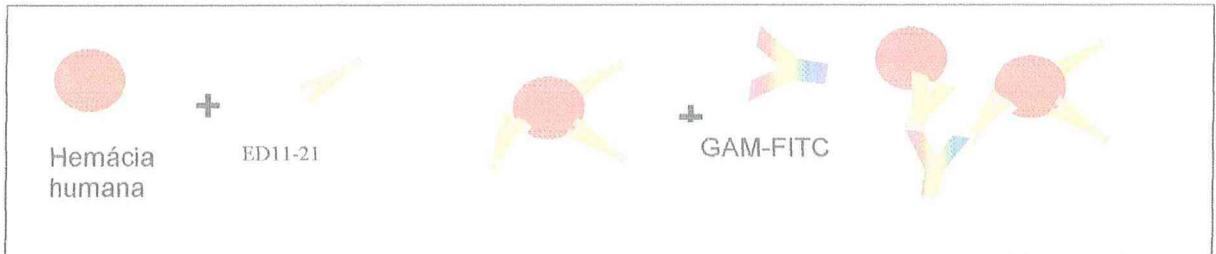


Figura 2 – Teste para padrão positivo

O padrão negativo foi realizado invertendo-se a posição dos anticorpos monoclonais sensibilizadores, isto é, hemácias humanas foram incubadas com AcMm anti-DEA1.1 (antieritrócitos caninos) (Figura 3).



Figura 3 – Teste para padrão negativo

4.2.6 Sensibilização das hemárias

Os soros foram utilizados para sensibilização das hemárias de doadores do grupo “O” que continham os antígenos apropriados:

- RR₂, Di(a+) – Painel 15 lote: 0827207 (Gamma Biologicals, Texas-USA)
- RR₁, K-k+, Fy(a-b+), Jk(a-b+), Le(a-b+), M+ N+ S- s+, Lu(a-b+), Kp(a-b+)
- r, K+ k+, Fy(a-b+), Jk(a+b-), Le(a-b+), M- N+ S+ s+, Lu(a-b+), Kp(a-b+).

Uma suspensão de 100µL de hemárias a 10% em LISS, ID-Diluent 2 (DiaMed®-Latino América S.A., MG–Brasil) foi incubada com 200µL do soro do paciente em presença do soro AB. Após 15 minutos de incubação em banho-maria a 37°C, três lavagens foram efetuadas. Um TAD foi realizado para comprovar a eficiência da sensibilização.

4.2.7 Desenvolvimento do ensaio de citometria de fluxo para determinação das subclasses de IgG nos eritrócitos

Com as hemárias sensibilizadas *in vitro* foi preparada uma nova suspensão com a concentração ajustada para 20.000 hemárias/mm³ utilizando contador automático (Coulter T – 890, Coulter Corporation, Florida - USA). A 100µL desta última suspensão em SSI foram adicionados 50µL de anticorpo marcado com fluoresceína diluído (anti-IgG₁ e IgG₃ γ chain – fluorescein conjugate – Binding Site Limited – Birmingham – UK) seguido de um período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, protegendo-os da luz.

Os anticorpos anti-IgG1-FITC e o anti-IgG3-FITC foram padronizados na diluição 1:10 em PBS (salina tamponada com fosfato; 0,1M; pH 7,2). Após o período de incubação foram adicionados 100µL de solução de paraformaldeído 1% (Becton Dickinson, San Jose – USA) e 500µL de isoton II (Beckman Coulter – Coulter electronics, RJ – Br). A leitura foi feita no citômetro de fluxo - FACS Escalibur - Becton & Dickinson (San Jose, USA) usando o software CellQuest.

Para a quantificação das subclasses de IgG adotamos o valor da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) das amostras de cada paciente, descontado o valor do controle, em duplicata.

4.3 Análise estatística

Na análise estatística foi utilizado o teste de correlação de Pearson para investigar as correlações existentes entre as variáveis. Sobre o comportamento entre as variáveis categóricas e contínuas, foi utilizado a avaliação descritiva dos dados, o teste de independência (teste do Qui-Quadrado e teste Exato de Fisher), onde foi necessário agrupar os valores da variável contínua em função de cada categoria da outra variável. O estudo das variáveis contínuas, foi possível com o teste de Kruskal-Wallis, que verifica a existência de diferença entre as médias dos grupos. O nível de significância máximo de 5% ("p") foi considerado para definir todas as associações significativas. Todos os testes foram realizados através do programa *SPSS for Windows versão 8.0*, onde os resultados foram formatados dentro de uma linguagem apropriada ao estudo.

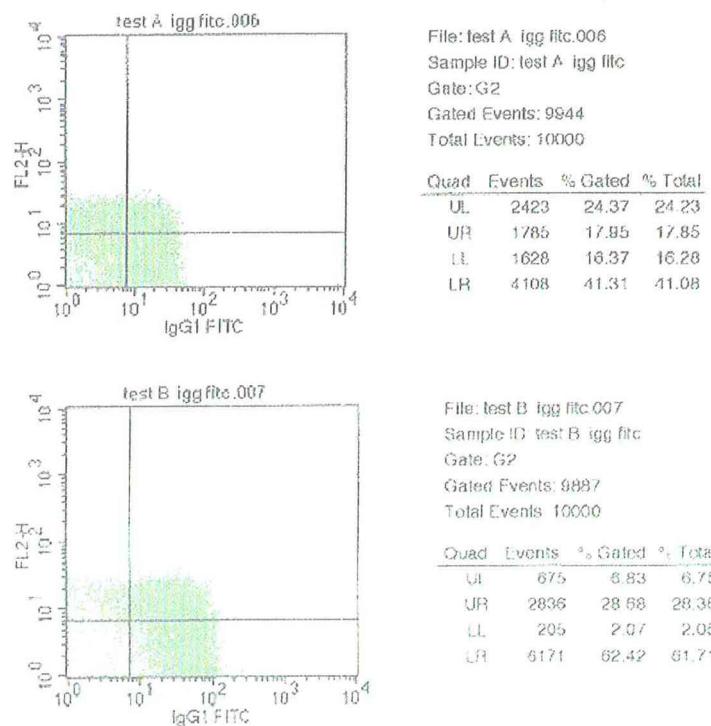
RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Padronização da técnica de citometria de fluxo

Os primeiros resultados desse trabalho foram obtidos com a padronização da técnica de citometria de fluxo usando a hemácia como célula-estudo. Houve necessidade de formação do grupo controle, uma vez que existe um percentual variável de imunoglobulinas fixadas às hemácias de indivíduos normais.

Os testes iniciais são mostrados nos *dot plots* (Figuras 4 e 5). As primeiras observações evidenciaram que, apesar de usar anticorpos específicos para cada subclasse IgG, houve a presença de *debris*, dispersão de células e formação de microagregados que interferiram na análise dos resultados de citometria de fluxo. Os agregados podem obstruir os finos canais da câmara de fluxo do aparelho na qual incidirá o feixe de *laser* sobre cada célula.



FIGURAS 4 e 5: *Dot plots* dos testes iniciais

5.2 Gestantes alo-sensibilizadas

5.2.1 Avaliação da gravidade da DHPN

O diagnóstico de DHPN nos conceptos de 42 gestantes alo-sensibilizadas foi estabelecido pela positividade do TAD. A gravidade da doença foi analisada com base na indicação de terapia transfusional (APÊNDICE D). Considerando o número de conceptos segundo a gravidade da DHPN observou-se que 13/42 (30,9%) dos casos apresentavam doença leve, 16/42 (38,2%) doença moderada e 13/42 (30,9%) doença grave (Tabela 1).

TABELA 1 - Distribuição do número de conceptos das gestantes alo-sensibilizadas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal (DHPN)

Gravidade da DHPN	Nº de conceptos	%
Leve	13	30,9
Moderada	16	38,2
Grave	13	30,9
Total	42	100,0

Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.

Não houve necessidade de terapia transfusional nos 13/42 (30,9%) conceptos com doença leve. A exsangüineotransfusão foi realizada nos 16/42 (38,1%) conceptos com doença moderada. Nos 13/42 (30,9) conceptos com doença grave, nove (21,4%) receberam exsangüineotransfusão e transfusão intra-útero, um (2,4%) recebeu apenas transfusão intra-útero e três (7,1%) foram a óbito (dois abortos e um natimorto) (Tabela 2, APÊNDICE D).

TABELA 2 - Distribuição do número de conceptos das gestantes alo-sensibilizadas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal (DHPN) e a necessidade de terapia transfusional

Gravidade da DHPN	Exsangüíneo-transfusão	Transfusão intra-útero	Exsangüíneo-transfusão e transfusão intra-útero	Aborto/Natimorto
Leve (n=13)	0	0	0	0
Moderada (n=16)	16	0	0	0
Grave (n=13)	0	1	9	3
Total (n=42)	16(38,1%)	1(2,4%)	9(21,4%)	3(7,1%)

Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.

5.2.2 Correlação do teste de antiglobulina direto (TAD) com a gravidade da DHPN

O TAD no sangue do cordão umbilical foi realizado em 38/42 amostras. A intensidade da reação de aglutinação foi classificada em escores (1+ a 4+), cujos resultados foram correlacionados com a gravidade da DHPN. Dentre os 13 (34,2%) conceptos com doença leve, observou-se que 12 (92,3%) mostraram escore (1+) e um (2,7%) mostrou escore (2+). Dos 16 (42%) conceptos com doença moderada, sete (43,8%) apresentaram escore (2+), oito conceptos (50%) apresentaram escore (3+) e um (6,2%) apresentou escore (4+). Dentre os nove (23,7%) conceptos com doença grave, cinco (55,6%) mostraram escore (3+) e quatro (44,4%) mostraram escore (4+). Não foi realizado TAD em quatro casos: dois abortos, um de morte intra-útero e um caso no qual a gestante não retornou ao hospital para acompanhamento pré-natal (Tabela 3 e Figura 8).

Portanto, a um nível de significância de 0,001, existe uma maior probabilidade de os escores para o TAD se elevarem na mesma proporção em que se observa o agravamento da DHPN.

5.2.3 Relação entre o título do anticorpo materno e gravidade da DHPN

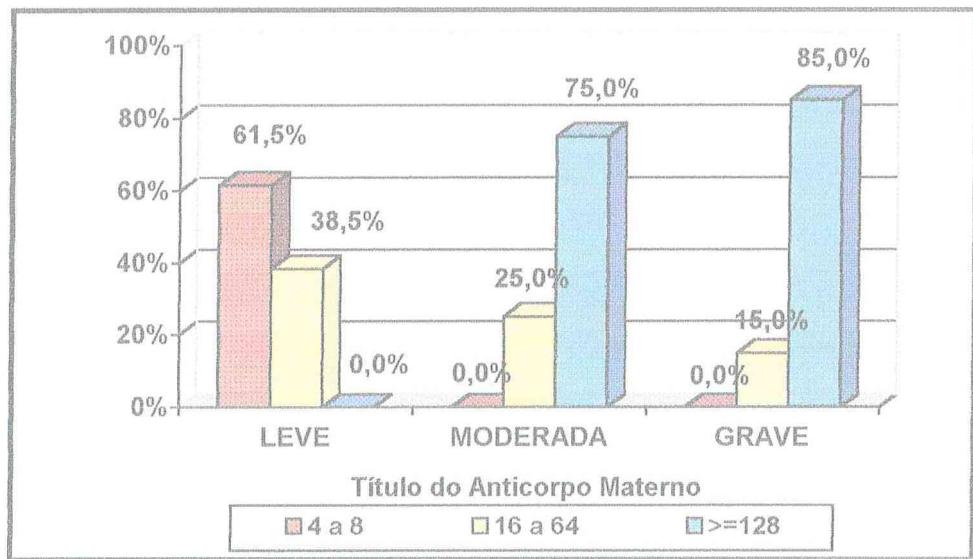
A identificação dos anticorpos foi realizada nas 42 gestantes alo-sensibilizadas. As especificidades dos anticorpos foram: 39 anti-D, um anti-C,-D,-E e um anti-Di^a. Os valores dos títulos dos anticorpos variaram de 4 até 2048.

Relacionando-se a gravidade da DHPN com o título do anticorpo materno, verificou-se que nas mães dos conceitos com estado leve da doença, os títulos de 4 a 8 foram observados em 8/13 (61,5%) e os títulos 16 a 64 em 5/13 (38,5%). Nas mães dos conceitos com doença moderada, 4/16 (25%) e 12/16 (75%) possuíam títulos de anticorpos que variaram de 16 a 64 e ≥ 128, respectivamente. Dos 13/42 (30,9%) casos considerados graves, 11/13 (85%) possuíam títulos ≥ 128, sendo que dois atingiram título 1024 e quatro apresentaram títulos ≥ 2048 (Tabela 4, Figura 9 e Apêndice D).

TABELA 4 - Distribuição do número de conceitos das gestantes alo-sensibilizadas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal (DHPN) e o título do anticorpo materno

Título do anticorpo materno	Gravidade da DHPN						Total			
	Leve		Moderada		Grave					
	Nº PAC.	%	Nº PAC.	%	Nº PAC.	%				
4 a 8	8	61,5	-	-	-	-	8	19,0		
16 a 64	5	38,5	4	25,0	2	15,0	11	26,0		
≥128	-	-	12	75,0	11	85,0	23	55,0		
Total	13	30,9	16	38,2	13	30,9	42	100,0		

Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.
Leve X moderada X grave: *Teste Qui-quadrado, nível de significância – p≤ 0,05*
p’-nível mínimo de significância encontrado (p’=0,001)



Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu.

FIGURA 9 - Freqüência de conceitos das gestantes alo-sensibilizadas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal (DHPN) e o título do anticorpo materno

Com base nos dados acima especificados verificou-se que os baixos títulos dos anticorpos maternos corresponderam a DHPN leve. Nos casos moderados e graves observaram-se títulos de anticorpos maternos mais elevados. Portanto, a um nível mínimo de significância de 0,001, estatisticamente o título do anticorpo materno se eleva em função da gravidade da DHPN, isto é, existe uma relação de dependência.

5.2.4 Determinação das subclasses IgG1 e IgG3 maternas, por citometria de fluxo, segundo os valores da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) e a gravidade da DHPN

A análise das subclasses IgG1 e IgG3 foi realizada na população controle e nas 42 amostras das gestantes, por técnica de citometria de fluxo, cujos resultados foram fornecidos em mediana da intensidade de fluorescência (MIF). O maior valor da MIF encontrada na população controle para IgG1 foi 13,8 e para IgG3 foi 8,67. Os resultados acima destes valores foram considerados positivos.

Para evitar esses problemas foi estabelecida uma diluição ideal do anticorpo para sensibilização das hemácias, isto é, foi produzida uma reação de aglutinação visível apenas ao microscópio. Dessa forma, a diluição dos anticorpos monoclonais antiglicoforina (1:16) e antieritrócitos de cão (1:100) produziram os padrões positivo e negativo para as análises de citometria de fluxo. Os histogramas evidenciam os padrões negativo e positivo (Figuras 6 e 7).

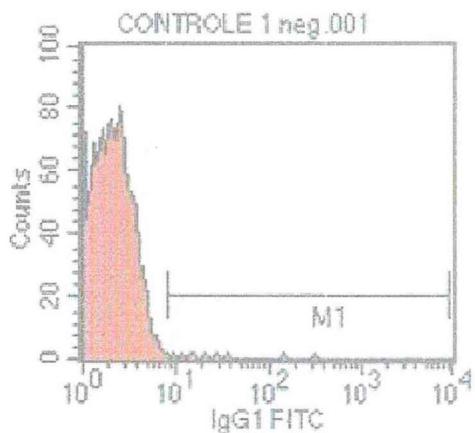


Figura 6: Histograma do padrão negativo

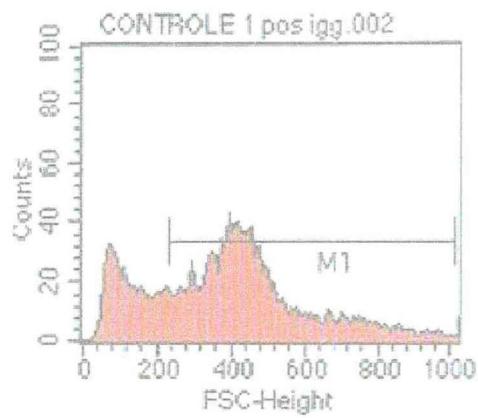


Figura 7: Histograma do padrão positivo

Observamos que houve semelhança entre os resultados dos testes realizados com diferentes tampões de diluição para as suspensões de hemácias (solução salina isotônica, tampão PBS e tampão com baixa força iônica).

No período de março de 2001 a dezembro de 2002, analisamos 65 amostras de soro de pacientes com quadro hemolítico, sendo 42 gestantes alergosensibilizadas, cujos filhos apresentaram TAD positivo e 23 pacientes com diagnóstico de AHAI. A população controle foi composta de 8 indivíduos adultos, saudáveis, doadores de sangue.

Níveis elevados das subclasses de IgG foram detectados em 33/42 (79%) gestantes (Tabela 5). Na relação entre gravidade da doença e subclasses de IgG, encontramos IgG1 predominante em todos os grupos. No entanto, observou-se uma relação estatisticamente significante ($p < 0,001$) entre os valores da MIF para IgG1 e gravidade, isto é, os valores foram significativamente mais altos nos casos mais graves. O mesmo não se pode afirmar quanto à IgG3, cujos valores se apresentaram mais homogêneos em todos os estados da doença. Dentro do grupo onde houve a associação de IgG1+IgG3, a IgG1 foi usualmente a principal subclasse. Apenas em um caso, o valor da MIF para IgG3 foi mais alto do que para IgG1 (Tabelas 5 e 6).

TABELA 5 - Valores em mediana de intensidade de fluorescência (MIF) das subclasses IgG1 e IgG3 maternas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal

Gravidade da DHPN								
Leve (n=13)			Moderada (n=16)			Grave (n=13)		
MIF		Subclasses >controle	MIF		Subclasses >controle	MIF		Subclasses >controle
IgG1	IgG3		IgG1	IgG3		IgG1	IgG3	
10,75	8,58	-	10,75	8,82	IgG3	69,78	8,66	IgG1
10,65	8,9	IgG3	11,55	9,73	IgG3	345,99	8,58	IgG1
10,65	9,65	IgG3	13,7	8,58	-	13,82	9,39	IgG1 +3
10,18	8,66	-	14,07	8,58	IgG1	13,82	8,66	IgG1
10,65	8,82	IgG3	14,86	8,58	IgG1	114,44	nd	IgG1
10,18	9,73	IgG3	12,63	8,66	-	196,32	8,66	IgG1
10,84	9,65	IgG3	14,46	8,66	IgG1	69,16	26,9	IgG1 +3
10,46	7,84	-	15,4	8,9	IgG1 +3	97,34	37,18	IgG1 +3
10,18	7,91	-	14,2	8,74	IgG1 +3	330,77	28,64	IgG1 +3
10,55	7,91	-	104,6	nd	IgG1	85,82	36,52	IgG1 +3
10,76	8,82	IgG3	18,43	8,66	IgG1	57,25	9,14	IgG1 +3
21,87	8,35	IgG1	14,2	8,43	IgG1	11,04	12,98	IgG3
13,46	8,51	-	37,86	58,29	IgG1 +3	12,41	8,35	-
			14,46	8,51	IgG1			
			17,78	10,09	IgG1 +3			
			13,82	8,2	IgG1			
Nº casos			Nº casos			Nº casos		
IgG1 - n=1			IgG1 - n=8			IgG1 - n=5		
IgG3 - n=6			IgG3 - n=2			IgG3 - n=1		
IgG1+3 - n=0			IgG1+3 - n=4			IgG1+3 - n=6		
N=7			n=14			n=12		

Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP

nd: não determinado - MIF: mediana de intensidade de fluorescência

Leve X moderada X grave: Teste Qui-quadrado, nível de significância – $p \leq 0,05$ / IgG1 - nível mínimo de significância encontrado ($p' = 0,001$) e IgG3 – nível mínimo de significância encontrado ($p' = 0,634$)

Leve X moderada X grave: Teste Kruskal-Wallis, nível de significância – $p \leq 0,05$ / IgG1 - nível mínimo de significância encontrado ($p' = 0,001$) e IgG3 – nível mínimo de significância encontrado ($p' = 0,116$)

TABELA 6 - Medidas estatísticas dos valores das medianas de intensidade de fluorescência das subclasses IgG1 e IgG3 maternas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal

Medidas Estatísticas	Gravidade Da Doença					
	LEVE		Moderada		Grave	
	MIF	IgG1	MIF	IgG1	MIF	IgG3
Nº de Pacientes	13	13	16	15	13	12
Média	11,63	8,72	21,42	12,09	109,07	16,97
Mediana	10,65	8,87	14,33	8,67	69,78	9,27
Desvio Padrão	3,19	0,65	23,02	12,79	114,21	11,73

Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.

Através do teste de Kruskal-Wallis verificou-se que os valores de IgG1 são estatisticamente diferentes em cada estado da DHPN ($p= 0,001$). Na subclasse IgG3, embora se observe variações nos valores entre os estados da DHPN, essas variações não são relevantes quando se compara o nível de gravidade dos pacientes. Portanto, nada se pode afirmar quanto ao comportamento dos valores de IgG3 na evolução do quadro hemolítico ($p=0,116$).

Com relação aos resultados positivos de IgG1, através do teste Qui-quadrado verificou-se que, estatisticamente, existe a relação entre a presença de IgG1 e nível de gravidade da DHPN ($p=0,001$). Por outro lado, analisando a gravidade da DHPN e a presença da subclasse IgG3 não se pode afirmar, estatisticamente, que existe relação entre essas variáveis ($p=0,634$).

5.2.5 Correlação entre as subclasses IgG1 e IgG3 no soro das gestantes alo-sensibilizadas com a gravidade da DHPN

Para uma melhor avaliação das subclasses foram analisados os resultados do estudo em três categorias: (1) IgG1, (2) IgG3 e (3) IgG1+IgG3. Níveis elevados de subclasses foram detectados em 33/42 (79%) amostras das gestantes. (Tabela 7). Os resultados foram comparados com a gravidade da DHPN dos

respectivos fetos ou neonatos. Em 14/33 (42,4%) gestantes foi detectada apenas a subclasse IgG1, 1/14 (7,2%) conceito apresentou doença leve, 8/14 (57,1%) apresentaram doença moderada e 5/14 (35,7%) doença grave. Em 9/33 (27,3%) gestantes em que foi detectada apenas IgG3, 6/9 (66,7%) conceitos apresentaram doença leve, 2/9 (22,2%) doença moderada e 1/9 (11,1%) doença grave. Em 10/33 (30,3%) gestantes que foram detectadas as presenças simultâneas de IgG1 e IgG3, 4/10 (40%) conceitos apresentaram doença moderada e 6/10 (60%) doença grave (Tabela 7 e Figura 10).

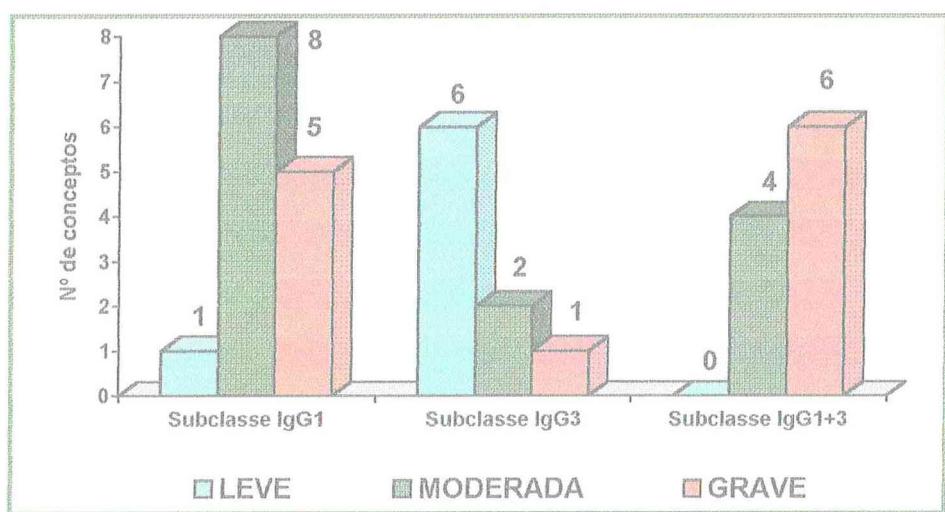
TABELA 7 - Distribuição de conceitos segundo as subclasses IgG1, IgG3 maternas e gravidade da doença hemolítica perinatal (DHPN)

Gravidade	Subclasses					
	IgG1	(%)	IgG3	(%)	IgG1+IgG3	(%)
Leve (n=7)	1	7,2	6	66,7	0	0,0
Moderada (n=14)	8	57,1	2	22,2	4	40,0
Grave (n=12)	5	35,7	1	11,1	6	60,0
Total (n=33)	14 <i>p' = 0,05</i>	42,4	9 <i>p' = 0,03</i>	27,3	10 <i>p' = 0,02</i>	30,3

Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.

Teste Qui-quadrado, nível de significância – $p \leq 0,05$

p' -nível mínimo de significância encontrado



Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.

FIGURA 10 - Número de conceitos segundo as subclasses IgG1, IgG3 maternas e gravidade da doença hemolítica perinatal

A análise estatística mostrou uma relação significante entre: IgG1 com DHPN moderada e grave ($p' = 0,05$), IgG3 com DHPN leve ($p' = 0,03$) e a associação das duas subclasses com DHPN grave ($p' = 0,02$).

5.2.6 Correlação entre as subclasses IgG1, IgG3 e títulos dos anticorpos maternos

As amostras com subclasses IgG1 e IgG3 foram correlacionadas com os títulos dos anticorpos maternos. A subclasse IgG1 foi relacionada a títulos ≥ 16 . Dos 9/33 (27,2%) casos que apresentaram apenas a subclasse IgG3, 4/9 (44,4%) mostraram título 8; 2/9 (22,1%) apresentaram título 16; 1/9 (11,2%) mostrou título 32 e 2/9 (22,3%) apresentaram título 128. O mesmo não foi observado com relação a IgG1+3, cujas presenças foram associadas a títulos ≥ 128 (Tabela 8 e Figura 11).

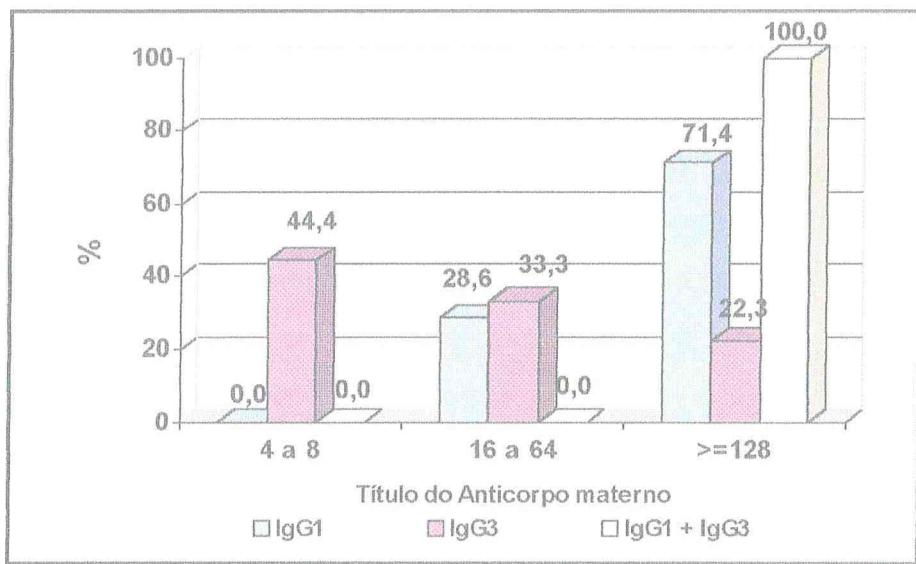
TABELA 8 - Distribuição de conceptos segundo as subclasses IgG1, IgG3 e título dos anticorpos maternos

Títulos dos anticorpos maternos	Subclasses de IgG					
	IgG1	(%)	IgG3	(%)	IgG1+3	(%)
4 a 8	0	0,0	4	44,4	0	0,0
16 a 64	4	28,6	3	33,3	0	0,0
≥ 128	10	71,4	2	22,3	10	100,0
Total (N=33)	14	42,4	9	27,3	10	30,3
	$p' = 0,05$		$p' = 0,02$		$p' = 0,01$	

Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.

Teste Qui-quadrado, nível de significância – $p \leq 0,05$

p' -nível mínimo de significância encontrado



Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu.

FIGURA 11 - Freqüência de conceptos segundo as subclasses IgG1, IgG3 e título dos anticorpos maternos

Com base nos dados acima especificados verificou-se que 100% das gestantes com presença simultânea de subclasses IgG1 e IgG3 apresentaram altos títulos de anticorpo (≥ 128), enquanto que IgG3 foi em sua maioria associada a baixos títulos. A IgG1 esteve presente quando os títulos foram ≥ 16 .

A análise estatística mostrou uma relação significante entre a subclasse IgG1 com altos títulos dos anticorpos maternos ($p' = 0,05$). Para a subclasse IgG3 houve uma relação significante com baixos títulos de anticorpos maternos ($p' = 0,02$). A associação de IgG1+IgG3 mostrou uma relação significante com altos títulos de anticorpos maternos ($p' = 0,01$).

5.3 Pacientes com anemia hemolítica auto-imune (AHL)

5.3.1 Análise das amostras de pacientes com AHL segundo sexo e idade

Foram analisados 23 pacientes com AHL, sendo dois (8,7%) do sexo masculino e 21 (91,3%) do sexo feminino (Tabela 9).

Com relação a faixa etária do grupo pesquisado, observou-se que 39,1% possuíam idade ≤30 anos (idade média 3,4 anos) e 52,2% com faixa etária >30 anos (idade média 51,5). Dois (8,7%) pacientes não informaram a idade (Tabela 10).

TABELA 9 - Distribuição de pacientes com anemia hemolítica auto-imune segundo o sexo

Sexo				Total	
Masculino		Feminino			
nº pac.	%	nº pac.	%		
2	8,7	21	91,3	23 (100,0%)	

Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.

TABELA 10 - Distribuição de pacientes com anemia hemolítica auto-imune segundo a idade

Idade	Nº de Pacientes	%	Idade Média (anos)
≤30 anos	9	39,1	3,4
>30 anos	12	52,2	51,5
Não Informaram idade	2	8,7	-
Total	23	100,0	36,3

Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.

Com base nos dados acima especificados verificou-se que nos pacientes com AHAI houve um predomínio do sexo feminino e uma maior freqüência (52,2%) na faixa etária acima dos 30 anos refletindo maior vulnerabilidade destes pacientes ao desenvolvimento de doenças auto-imunes.

5.3.2 Correlação entre a presença de IgG isolada ou associada a outras classes de imunoglobulinas e/ou complemento e AHAI

As classes de imunoglobulinas e o fragmento C3d do complemento foram analisados nos 23 pacientes com AHAI pelo método de gel centrifugação. A AHAI foi

considerada idiopática em 10/23 (43,5%) pacientes. Treze dos 23 (56,5%) pacientes apresentavam patologias associadas: 7/13 (53,8%) apresentavam lupus eritematoso sistêmico (LES); 1/13 (7,7%) apresentava Trombose Venosa Profunda (TVP); 2/13 (15,4%) eram portadores de hepatite C; 2/13 (15,4%) eram cardiopatas e usavam metildopa; e 1/13 (7,7%) era diabético. O LES foi a patologia associada mais freqüente (53,8%). A presença da IgG associada ao fragmento C3d do complemento predominou (60%) na AHAI idiopática. A IgG isolada foi encontrada em 4/7 (57,1%) casos de LES (Tabela 11).

TABELA 11 - Distribuição de pacientes com anemia hemolítica auto-imune secundária e tipo de imunoglobulina e/ou complemento fixado(s) às hemácias.

AHAI	Classes de Imunoglobulinas e/ou Complemento				
	IgG N(%)	IgG+C n(%)	IgG+IgA+ IgM+C N(%)	IgG+IgM+C n(%)	Total (n=23) (%)
Idiopática (n=10)	3 (30)	6 (60)	-	1 (10)	10 (43,5)
Secundárias (n=13)					
LES	4 (57,1)	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (14,3)	7 (53,8)
TVP	1 (100)	-	-	-	1 (7,7)
Hepatite C	-	2 (100)	-	-	2 (15,4)
Metildopa	-	1 (50)	-	1 (50)	2 (15,4)
Diabetes	1 (100)	-	-	-	1 (7,7)
Total (%)	6 (46,2)	4 (30,7)	1 (7,7)	2 (15,4)	13 (56,5)

Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.

C: fragmento C3d do complemento

A avaliação da gravidade do quadro hemolítico na AHAI foi feita com base nas concentrações de hemoglobina, bilirrubina indireta e no percentual de reticulócitos (Apêndice E). Dentre os 23 pacientes com diagnóstico de Anemia Hemolítica Auto-imune, 6/23 (26,1%) eram pacientes que se encontravam em estado leve da doença, 8/23 (34,8%) em estado moderado e 9/23 (39,1%) eram pacientes que se encontravam em estado grave (Tabela 12).

TABELA 12 - Distribuição do número de pacientes com anemia hemolítica auto-imune segundo a gravidade

Gravidade	Nº de Pacientes	%
Leve	6	26,1
Moderada	8	34,8
Grave	9	39,1
Total	23	100,0

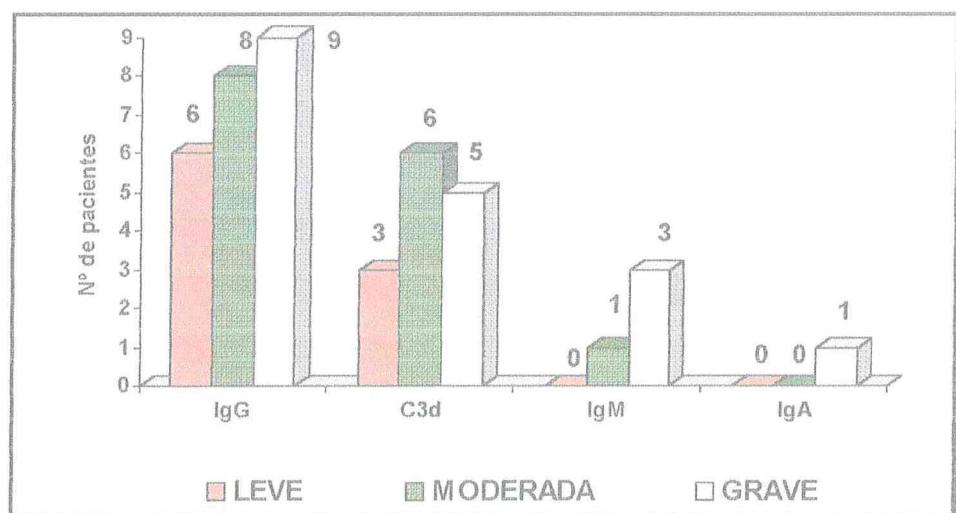
Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.

A presença de imunoglobulinas e/ou fragmento C3d do complemento fixados às hemácias foi relacionada com a gravidade da AHAI. Observou-se a presença de IgG em todos os pacientes. O componente C3d esteve presente em 14/23 (60,8%) pacientes: três apresentaram doença leve, seis doença moderada e cinco apresentaram doença grave. A IgM foi encontrada em 4/23 (17,4%) pacientes: um apresentou doença moderada e três apresentaram doença grave. A IgA foi encontrada em 1/23 (4,3%) pacientes o qual apresentava doença grave (Tabela 13 e Figura 12).

TABELA 13 - Distribuição de pacientes com anemia hemolítica auto-imune segundo a presença na hemácia de imunoglobulinas e fragmentos do complemento e a gravidade do quadro hemolítico

Gravidade da AHAI	Classes			
	IgG	C3d	IgM	IgA
LEVE (n=6)	6	3	0	0
MODERADA (n=8)	8	6	1	0
GRAVE (n=9)	9	5	3	1
Total (n=23)	23 (100%)	14 (60,8%)	4 (17,4%)	1 (4,3%)

Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.



Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.

FIGURA 12 - Número de pacientes com anemia hemolítica auto-imune segundo a presença na hemácia de imunoglobulinas e fragmentos do complemento

A presença simultânea de duas ou mais classes de imunoglobulinas associadas ao complemento sugeriram doença grave. A análise estatística não mostrou relação significante, provavelmente, devido o baixo número de casos estudados ($p' = 0,310$).

5.3.3 Relação entre a detecção das subclasses IgG1, IgG3 e gravidade da AHAI

A detecção das subclasses IgG1 e IgG3 na membrana da hemácia foi realizada nos 23 pacientes com AHAI pela técnica de gel teste. As subclasses foram detectadas em 16/23 (69,6%) pacientes, cujos resultados foram avaliados em três categorias: (1) IgG1, (2) IgG3 e (3) IgG1+IgG3. As freqüências de IgG1, IgG3 e IgG1+IgG3 foram 75%, 6,3% e 18,7%, respectivamente.

A gravidade da AHAI foi relacionada com a presença de subclasses isoladas ou associadas. Observou-se que IgG1 estava presente em todos os níveis de gravidade, entretanto, a freqüência desta subclasse (50%) foi maior nos casos graves. Foi encontrado apenas um caso de IgG3 associado à doença moderada. A freqüência da associação das duas subclasses se relacionou com quadros moderados e graves da doença, 33,3% e 66,7% respectivamente. (Tabela 14, Figura 13).

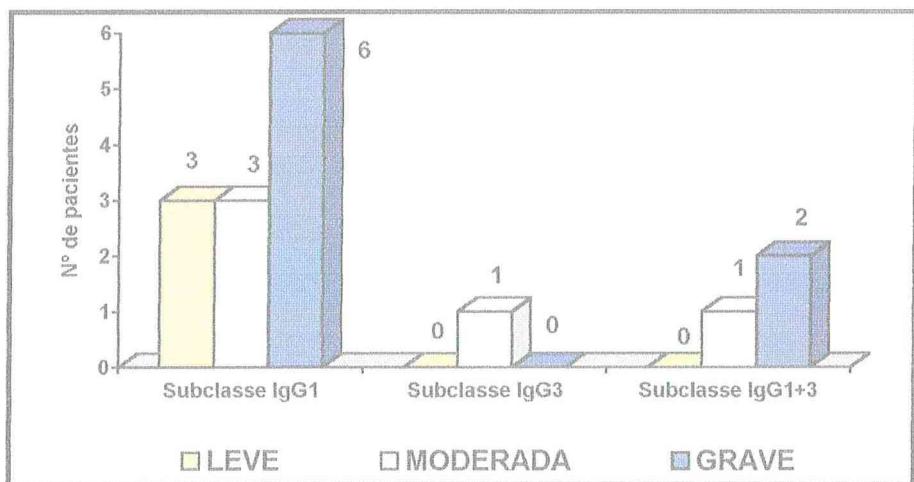
TABELA 14 - Distribuição do número de pacientes segundo as subclasses IgG1 e IgG3 e gravidade da anemia hemolítica auto-imune

GRAVIDADE DA DOENÇA AHAI	Subclasses					
	IgG1	(%)	IgG3	(%)	IgG1+IgG3	(%)
Leve (n=3)	3	25,0	0	0,0	0	0,0
Moderada (n=5)	3	25,0	1	100,0	1	33,3
Grave (n=8)	6	50,0	0	0,0	2	66,7
Total (n=16)	12 <i>p' = 0,51</i>	75,0	1 <i>p' = 0,60</i>	6,3	3 <i>p' = 0,75</i>	18,7

Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.

Teste Exato de Fisher, nível de significância – $p \leq 0,05$

p' - nível mínimo de significância encontrado



Fonte: Pesquisa Direta/Hemocentro do Ceará e Hemocentro de Botucatu-SP.

FIGURA 13 - Número de pacientes segundo a presença das subclasses IgG1 e IgG3 na membrana da hemácia e gravidade da anemia hemolítica auto-imune

Com base nos dados acima especificados verificou-se que apesar da IgG1, isoladamente, ser a subclasse mais freqüente, nada se pode afirmar sobre a correlação entre a presença de IgG1 e gravidade da AHLA. As presenças de IgG3, isoladamente ou sua associação com IgG1 mostraram uma maior concentração na AHLA moderada e grave.

Estatisticamente, não se pode afirmar a relação da presença das subclasses e a gravidade da doença, provavelmente, devido o baixo número de casos analisados.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nos processos hemolíticos imunes, devido à presença do anticorpo, podem surgir dificuldades na obtenção de sangue compatível para transfusão. Em pacientes com AHAI que possuem auto-anticorpos livres no soro e em conceptos de gestantes alo-sensibilizadas, deve-se analisar o risco benefício de uma transfusão antes de requisitá-la. A avaliação da significância clínica do anticorpo nesses casos é importante, podendo estar diretamente relacionada com a gravidade do processo hemolítico. A busca pelo desenvolvimento de testes preditivos para esse propósito tem sido constante.

O presente estudo inclui testes realizados em 42 amostras de gestantes alo-sensibilizadas, seus respectivos fetos ou neonatos que desenvolveram DHPN e em 23 pacientes com AHAI, na tentativa de correlacionar esses testes com a gravidade da hemólise.

Na doença hemolítica perinatal (DHPN) o teste de antiglobulina direto (TAD) é utilizado, normalmente, para diagnóstico, entretanto, poucos estudos foram realizados com o objetivo de correlacionar o nível de sensibilização dos eritrócitos fetais com a gravidade da DHPN. Os resultados são avaliados conforme a intensidade da reação de aglutinação (1+, 2+, 3+, 4+) ou conforme a titulação do TAD (MOLLISON; CUTBUSH, 1949; GREENWALT; WAGNER, 1955; DACIE, 1975; HARMENING, 1999).

Mollison e Cutbush (1949) avaliaram uma possível correlação entre o TAD e a gravidade da DHPN em amostras de sangue de 69 recém-nascidos Rh+, cujas mães eram alo-sensibilizadas. Reações mais fracas foram observadas em recém-nascidos moderadamente afetados. Por outro lado, reações fortes não necessariamente corresponderam à hemólise intensa. Os autores consideraram uma baixa correlação entre TAD e gravidade da DHPN, pois as exceções foram mais freqüentes.

Em uma análise feita em 86 conceptos com DHPN, utilizando apenas o parâmetro TAD, Greenwalt e Wagner (1955) tentaram correlacionar a gravidade da doença e o nível de sensibilização dos eritrócitos fetais. Os resultados mostraram

que 18,2% dos casos leves, 41,9% dos casos moderados e 39,4% dos casos graves apresentaram títulos ≥ 256 . Isto sugere que um TAD com alto título pode implicar em uma maior probabilidade para doença clinicamente significante. Portanto, não foi encontrada uma correlação constante entre este teste e a gravidade clínica.

Em nosso estudo analisamos o nível de sensibilização dos eritrócitos fetais através dos escores obtidos pelas reações de aglutinação. Os resultados foram discordantes de Mollison e Cutbush (1949) e de Greenwalt e Wagner (1955). Estatisticamente, houve uma dependência positiva significativa entre a intensidade de reação TAD (1+ até 4+) e gravidade da hemólise. Foram encontrados TAD (2+) tanto nas formas leves como nas moderadas e (3+) a (4+) nas formas moderadas e graves. Nossos dados sugerem que o TAD quantitativo pode ser utilizado, como parte de um conjunto de critérios, mas não isoladamente, para avaliar gravidade da DHPN.

Outro parâmetro para avaliar o prognóstico do quadro hemolítico associado a DHPN é a estimativa e interpretação da potência do anticorpo em gestantes alo-sensibilizadas. A análise é feita através de métodos manuais de titulação ou métodos automatizados de quantificação.

Os relatos contraditórios sobre a importância do título do anticorpo materno na avaliação da gravidade da DHPN incentivaram Wiener, Nappi e Gordon (1952), a pesquisar um número mais significativo de recém-nascidos ($n=188$) afetados pela DHPN. Os resultados revelaram uma correlação entre a taxa de natimorto com o título dos anticorpos maternos (6,1% quando o título foi 4 unidades e 44,4% quando o título do anticorpo variou de 65 a 256 unidades). Os autores sugeriram novas investigações para verificar se possíveis fatores constitucionais, tais como a resistência do recém-nascido ao anticorpo materno, contribuiriam para uma maior susceptibilidade à DHPN.

Gall e Miller (1981) avaliaram em estudo retrospectivo, a correlação entre os títulos máximos dos anticorpos maternos e o índice de gravidade da DHPN. Para tal propósito, foram avaliadas 49 gestantes e seus respectivos conceptos. Os dados mostraram uma relação altamente significante ($p<0,0001$) entre o índice de gravidade e títulos dos anticorpos maternos, no entanto, foram observados 12 recém-nascidos com sensibilização variando de leve a grave quando o título do anticorpo materno foi ≤ 16 . Esses autores não incentivaram o estabelecimento de

um título crítico para a não ocorrência de natimorto e sugeriram a necessidade de análises seriadas do líquido amniótico em qualquer gestante com PAI positivo independente do título do anticorpo.

Bowell *et al.* (1982) mostraram, através de análises de amostras seriadas de 184 gestantes, que existe uma clara relação entre o aumento das concentrações de anti-D e a chance de um conceito ser gravemente afetado. Os autores sugeriram que gestações cujas concentrações de anti-D permaneceram menores que 4UI/ml representaram um grupo relativamente seguro, no qual a amniocentese pode ser evitada.

Garner *et al.* (1992) observaram que, em 40 casos de DHPN nos quais os fetos receberam transfusão intra-útero, todos apresentaram título do anti-D maior que 4UI/mL, indicando o risco fetal.

No entanto, Parinaud *et al.* (1985), Kennedy e Waheed (1999) mencionaram não existir uma boa correlação entre o título do anticorpo materno e a gravidade da DHPN. Em algumas gestantes, o título do anticorpo pode permanecer num valor moderado e constante, porém, o feto continua evoluindo para a forma mais grave. De modo semelhante, mulheres sensibilizadas anteriormente podem ter títulos constantemente altos durante a gravidez independente de o feto possuir ou não o antígeno Rho(D).

No presente estudo utilizamos os métodos manuais de titulação dos anticorpos maternos, cujos resultados mostraram uma relação significativa com a gravidade da DHPN. Dados semelhantes foram encontrados por Wiener *et al* (1952); Gall e Miller (1981); Bowell *et al.* (1982); Garner *et al.* (1992). É importante salientar a ocorrência de casos moderados com títulos de anticorpos maternos elevados e títulos não muito altos em casos graves. Sugerimos que esses parâmetros sejam incluídos nos critérios de avaliação de gravidade da DHPN, porém, a interpretação deve ser feita com bom senso e cautela.

Na procura de outros parâmetros para auxílio no prognóstico do quadro hemolítico, pesquisamos a presença das subclasses IgG1 e IgG3.

Sabemos que o transporte de IgG através da barreira placentária pode resultar em títulos de anticorpos mais elevados no feto com relação àqueles da mãe, o que nem sempre está associado a hemólise perinatal (REZENDE,

JUNQUEIRA e REZENDE FILHO, 1998; MOLLISON, ENGELFRIET e CONTRERAS, 1999; GIRIBELA *et al.*, 1999). A influência das diferentes subclasses de IgG maternas na produção da hemólise fetal ou neonatal tem sido mencionada por vários autores. Dentre as técnicas já descritas para esse propósito estão desde a simples aglutinação em lâmina, microplacas ou em tubos, imuno difusão radial, testes mais sensíveis e melhor padronizados como ELISA, gel teste e citometria de fluxo (TASLIMI *et al.*, 1986; KEMENY *et al.*, 1987; NANCE; GARRATY, 1987; BROUWERS *et al.*, 1987; ZUPANSKA *et al.*, 1990; IYER; KULKARNI; GUPTA, 1992; GARNER *et al.*, 1992; THOMAS *et al.*, 1993; LUBENKO *et al.*, 1994; GARNER *et al.*, 1995; PALFI; HILDÉN, 1997).

Taslimi *et al.* (1986) e Lubenko *et al.* (1994) destacaram IgG1 como o subtípo de IgG produzido em maior quantidade e transportado com maior eficiência e rapidez, além da sobrevida mais longa. A IgG1 atravessa a placenta por volta da 17^a semana, enquanto a IgG3 o faz dois meses depois (POLLOCK; BOWMAN, 1990; LUBENKO *et al.*, 1994). Há quem associe DHPN grave a mulheres que sofreram estimulação antigênica repetida (transfusões prévias ou multíparas). Nesses casos o início da doença pode acontecer antes da 18^a semana de gestação (ALIE-DARAN; DUGOUJON; FOURNIE, 1992).

A avaliação das subclasses de IgG em uma amostra comprovadamente positiva para IgG total nem sempre é possível, variáveis como baixas concentrações dos anticorpos, tipo de reagente utilizado podem interferir nos testes (Dacie, 1975; GARRATY; NANCE, 1990).

No presente estudo, níveis elevados de IgG1 e IgG3 foram detectados em 78,6% das amostras. Levando-se em consideração o percentual de distribuição das subclasses nos três grupos pré-estabelecidos, nossos resultados se aproximam dos de Taslimi *et al.* (1986); Garraty e Nance (1990); Iyer, Kulkarni e Gupte (1992); Palfi e Hildén (1997); assemelharam-se aos de Alie-Daran, Dugoujon e Fournie (1992) que encontraram 43% de IgG1, 27% de IgG3 e 30% de IgG1+3 e diferiram dos de Pollock e Bowman (1990); Zupanska *et al.* (1990) e de Lynen *et al.* (1995) (Tabela 15). Assim como alguns investigadores (GARRATY; NANCE, 1990; ZUPANSKA *et al.*, 1990; ALIE-DARAN; DUGOUJON; FOURNIE, 1992; IYER; KULKARNI; GUPTA, 1992; LUBENKO *et al.*, 1994; LYNEN *et al.* 1995), nossos dados mostraram que

gestantes alo-sensibilizadas produzem mais anticorpos de subclasse IgG1 (Tabela15).

TABELA 15 - Freqüência das subclasses IgG1 e/ou IgG3 em gestantes alo-sensibilizadas segundo nossos resultados e dos autores consultados.

Autores	Metodologia	n	IgG1 n (%)	IgG3 n (%)	IgG1+3 n (%)
Taslimi <i>et al.</i> , 1986	Aglutinação em tubo capilar	15	5 (33,3)	2 (13,3)	8 (53,4)
Pollock e Bowman, 1990	Teste de antiglobulina automatizado	98	32 (33)	3 (3)	63 (64)
Zupanska <i>et al.</i> , 1990	Aglutinação	39	26 (66)	1 (3)	12 (31)
Garraty e Nance, 1990	Citometria de fluxo	18	7 (39)	5 (28)	6 (33)
Alie-Daran <i>et al.</i> , 1992	Inibição de aglutinação	618	264 (43)	165(27)	189(30)
Iyer <i>et al.</i> , 1992	Aglutinação	88	52 (59)	13 (15)	23 (26)
Lynen <i>et al.</i> , 1995	Citometria de fluxo	13	10 (77)	0 (0)	3 (23)
Palfi e Hildén, 1997	Gel e aglutinação em microplaca	28	11 (39,3)	3 (10,7)	14 (50)
Lynen <i>et al.</i> , 2002	Gel e citometria de fluxo	20	5 (25)	4 (20)	11 (55)
Araújo <i>et al.</i> , 2003	Citometria de fluxo	33	14 (42,4)	9 (27,3)	10 (30,3)
Presente estudo					

Fonte: Referenciadas na bibliografia

n: número da amostra

Outros autores buscaram analisar a contribuição da subclasse IgG1 na fisiopatologia da DHPN. Thomas *et al.* (1993) evidenciaram que IgG1 foi responsável por mais de 50% dos casos que necessitaram de fototerapia ou transfusão. Análises realizadas nos soros maternos e fetais com e sem risco de

DHPN mostraram níveis maiores de IgG1 no soro de gestantes com risco (LUBENKO *et al.*, 1994).

Van der Meulen *et al.* (1980), através da técnica de citometria de fluxo, estudaram 29 pacientes com TAD positivo por auto-anticorpos IgG1 e demonstraram uma diferença no número de moléculas IgG nas hemácias de pacientes com e sem hemólise, sugerindo existir um nível crítico de sensibilização acima do qual a destruição eritrocitária *in vivo* torna-se aparente. Nossos resultados reforçam os relatos que atribuem à IgG1 o mais importante papel na DHPN. A IgG1 isolada esteve presente em todos os níveis de gravidade da doença e observou-se uma correlação estatisticamente significante ($p<0,001$) entre os valores MIF para IgG1 e gravidade. Contrariamente, os valores de IgG3 apresentaram-se mais homogêneos em todos os estados da doença e não houve significância estatística ($p=0,11$).

Com relação à freqüência de IgG3 os dados aqui relatados diferem daqueles observados por Zupanska *et al.* (1990); Pollock e Bowman (1990) e Lynen *et al.* (2002). A freqüência nesses estudos, obtida através de análises de 98, 13 e 39 gestantes, respectivamente, foi inferior aos dados aqui apresentados.

Os valores da MIF para IgG3 foram, usualmente, baixos na amostra aqui analisada. Observamos também que a presença dessa subclasse, em sua maioria (44,4%), foi correlacionada com baixos títulos (menores que 8) de anticorpos maternos. Dados semelhantes foram encontrados por Iyer, Kulkarni e Gupte, (1992) que analisaram amostras de 107 gestantes, das quais 13 apresentaram apenas IgG3, cujos títulos dos anticorpos foram menores que 16 em 62% das amostras. Garner *et al.* (1995) não detectaram IgG3 em oito das 40 amostras de DHPN grave, sugerindo que tal subclasse não parece essencial para o desenvolvimento da hemólise grave quando IgG1 materna se apresenta relativamente elevada. Portanto, é possível que a associação IgG3 com gravidade da DHPN esteja mais relacionada ao efeito IgG1 e IgG3 simultaneamente.

Alguns autores relacionaram um sinergismo entre IgG1 e IgG3 contribuindo para o agravamento da doença (POLLOCK; BOWMAN, 1990; GARRATY; NANCE, 1990; IYER; KULKARNI; GUPTA, 1992; LYNEN *et al.*, 2002). No entanto, Parinaud *et al.* (1985) presumiram haver um efeito protetor de IgG3 neutralizando as ações de IgG1. Garner *et al.* (1992) analisaram 40 casos

selecionados de DHPN grave que necessitaram de transfusão intra-útero. Não foi mostrada correlação, estatisticamente significante, entre o déficit do hematocrito em fetos cujas mães apresentaram apenas anti-D IgG1 daqueles em que as mães apresentaram IgG1 e IgG3. Entretanto, três anos depois os mesmos investigadores demonstraram, através de testes celulares *in vitro*, que o número de predições corretas foi maior quando as amostras de soro materno apresentaram anti-D IgG1 e IgG3 (GARNER *et al.*, 1995). Pollock e Bowman (1990) observaram a ocorrência de fetos hidrópicos na 20^a semana de gestação, quando o anticorpo materno envolveu uma associação das subclasses IgG1 e IgG3; fato não observado antes da 27^a semana quando apenas IgG1 esteve envolvida. Esses estudos corroboram o possível sinergismo entre as subclasses na destruição eritrocitária. Em nossos resultados, apesar do alto índice de casos graves (6/12 casos - 50%), quando as duas subclasses (IgG1+IgG3) estavam presentes simultaneamente, observamos que IgG1 foi a subclasse predominante o que, de acordo com Pollock e Bowman (1990), Alie-Daran, Dugoujon e Fournie (1992) explicaria a freqüência mais alta da doença grave.

A capacidade de anticorpos anti-D IgG3 se ligarem aos receptores Fc dos monócitos é maior do que IgG1 (WIENER *et al.*, 1987; ZUPANSKA *et al.*, 1990). No entanto, a subclasse IgG1 ultrapassa a barreira placentária mais precocemente e com mais eficiência, o que faz com que ocorra seu acúmulo e na DHPN, desempenhe papel mais decisivo de determinante da severidade da doença (LUBENKO *et al.*, 1994). No presente estudo, dentre os nove casos em que somente IgG3 foi demonstrada, um deles resultou em aborto, por isso foi considerado grave. Vale ressaltar que, apesar da isoimunização materna, não existem dados que comprovem ter sido o aborto produzido pela doença hemolítica. Esses achados estão de acordo com os de Iyer, Kulkarni e Gupte (1992), Lubenko *et al.* (1992), Alie-Daran, Dugoujon e Fournie (1994) que associaram doença leve com a presença de IgG3 e discordam de Taslimi *et al.* (1986) que associaram doença grave com a presença de IgG3. A discordância nesse último estudo pode ser justificada pelo pequeno número de gestantes ($n=2$) que apresentaram apenas essa subclasse.

A hemólise é mais freqüente e grave quando altos títulos de anticorpos IgG1 estão presentes. A detecção de anticorpos IgG3 em associação com IgG1

também sugere uma situação clínica grave. É certo que fatores adicionais de variabilidade desconhecida podem influenciar o grau de anemia fetal. Esses fatores incluem a transferência do anticorpo através da placenta, fenótipo dos antígenos eritrocitários do feto, número e função das células efetoras e a atividade eritropoiética em resposta à destruição eritrocitária.

Outra entidade cujo quadro hemolítico é o principal fator de lesão e que possui uma etiopatogenia pouco esclarecida é a anemia hemolítica auto-imune, idiopática ou acompanhada por outras doenças de base.

A anemia hemolítica auto-imune (AHAI) afeta indivíduos de ambos os sexos, mas foi registrada uma predominância em pacientes do sexo feminino, principalmente em relação ao tipo idiopático da doença (LI *et al.*, 1999; GERS; FRIEDBERG, 2002). Nossas análises mostraram que a grande maioria dos pacientes era do sexo feminino. A relação homem:mulher foi 1:11,5.

A AHAI acomete indivíduos de qualquer idade (PIROFSKY, 1976). Uma maior incidência de AHAI secundária do tipo de anticorpo quente foi observada em pacientes com mais de 45 anos de idade. A forma idiopática de AHAI pode atingir qualquer faixa etária, sendo uniformemente distribuída durante toda a vida (SOKOL; BOOKER; STAMPS, 1992; LI *et al.*, 1999; GERS; FRIEDBERG, 2002). O grupo de pacientes por nós estudado, mostrou uma variação ampla com relação à idade, entretanto, a maioria (52,2%) apresentava idade acima de 30 anos.

O teste de antiglobulina direto (TAD) é muito útil para a distinção entre anemia hemolítica de origem imunológica e não imunológica. É importante ressaltar que a positividade deste teste nem sempre significa que as hemácias têm uma sobrevida diminuída (GORST *et al.*, 1980; MERRY *et al.*, 1984; YADIN *et al.*, 1989). Riebben *et al.* (1991) e Win *et al.* (1997) relataram uma incidência de TAD positivo em um para cada 10.000 doadores de sangue.

Goldberg e Fudenberg (1968) relataram o caso de um paciente que, após tratamento com corticosteróide, apresentou remissão completa da AHAI, mas permaneceu com TAD positivo por mais de seis anos. O nosso estudo envolveu 23 pacientes com AHAI, dos quais quatro apresentaram boa resposta à corticoterapia, exibindo parâmetros normais de avaliação da gravidade, sendo enquadrados no grupo com doença leve.

Apesar dos critérios adotados para classificação dos pacientes com AHAI segundo a gravidade, houve dificuldade em separar os casos com hemólise compensada ou aqueles que não preencheram os critérios em sua totalidade. Existe controvérsia quanto a avaliação dos exames laboratoriais específicos para diagnóstico de hemólise (CHAPLIN, 1990; WRIGHT; SMITH, 1999). Normalmente, os pacientes apresentam reticulocitose, porém, Hegde, Gordon-smith e Worlledge, (1977), Conley, Lippman e Ness (1980, 1982), relataram reticulocitopenia nos casos graves. Além disso, pacientes jovens podem ter a capacidade de conjugar com eficiência a bilirrubina nos processos hemolíticos e apresentarem bilirrubina indireta não aumentada (GARRATY; NANCE, 1990). Esses fatores são importantes e devem ser lembrados quando se analisa a gravidade dos processos hemolíticos.

Em nosso estudo a AHAI foi considerada idiopática em 43,5%. Dados semelhantes foram relatados por Sokol, Hewitt e Stamps (1981), Garraty e Nance (1990) que encontraram, respectivamente, 40,9% e 28,6%. Entre as doenças associadas a AHAI, nossos dados foram semelhantes aos de Li *et al.* (1999) que encontraram LES presente na maioria dos casos (53,8%). Gers e Friedberg (2002) consideram as doenças linfoproliferativas como principais doenças associadas causadoras de hemólise.

Agarwal (1998) menciona a detecção simultânea de IgG e complemento na maioria dos casos de hemólise imune associada ao LES. Kokori *et al.* (2000), encontraram apenas IgG em 43% dos 41 pacientes com LES. Nossos resultados diferem dos de Agarwal (1998) e mostraram que em pacientes com LES o TAD foi variável, ou seja, detectamos a presença de IgM e IgA, além do IgG e complemento, em dois dos sete pacientes.

A(s) classe(s) de imunoglobulina(s) que reveste(m) o eritrócito pode(m) definir o sítio e a velocidade no qual essa célula é destruída. Na AHAI, alguns autores tentaram correlacionar a presença distinta de determinadas classes de imunoglobulinas e/ou complemento com as formas idiopáticas ou secundárias. Kemppnem *et al.* (1981) encontraram uma ou mais classes de imunoglobulinas associadas ao complemento em 80 % dos pacientes com AHAI idiopática e em 24% dos pacientes com AHAI secundária, sendo que, no último grupo o quadro hemolítico se apresentou de forma grave. Essa mesma associação foi encontrada por Ben-Izhak, Shechter e Tatarsky (1985) em uma série de 85 pacientes, dos quais

22 apresentaram estado hemolítico grave - quinze com duas ou mais classes de imunoglobulinas e 7 com uma só classe. Outros autores não encontraram essa relação (WORLLEDGE; BLAJCHMA, 1972; PETZ; GARRATY, 1980). Nossos dados foram semelhantes aos relatos de Kemppinem *et al.* (1981), pois mostramos uma associação da classe IgG com a fração C3d do complemento na maioria (60%) dos pacientes com AHAI idiopática. Observamos também um quadro hemolítico grave nas AHAI secundárias que apresentaram múltiplas classes de imunoglobulinas.

Esses resultados sugerem a possibilidade que imunoglobulinas de diferentes classes possam agir sinergicamente efetuando a destruição eritrocitária (SOKOL; BOOKER; STAMPS, 1992; FABIJANSKA-MITEK; LOPIENSKA; ZUPANSKA, 1997; LI *et al.*, 1999). Tal efeito é bem conhecido para o complemento e IgA secretória "in vitro", no qual o processo de CCDA induzido por IgG aumenta devido à presença simultânea desses componentes (SOKOL *et al.*, 1985, 1987, 1990; BECKERS *et al.*, 2001). Fatores como a variedade de doenças associadas, também podem interferir na complicação do quadro hemolítico.

As subclasses IgG1 e IgG3 também foram investigadas nos 23 pacientes com AHAI. Embora sendo uma doença pouco freqüente (PIROFSKY, 1976), o número de casos por nós estudado foi semelhante ao da literatura (GARRATY; NANCE, 1990; LYNEN *et al.*, 1995, 2002) (Tabela 16).

Pacientes com AHAI primária ou associada com outra patologia podem apresentar uma ou mais classes de imunoglobulinas. Essa relação pode existir com as subclasses de IgG (WORLLEDGE; BLAJCHMA, 1972; PETZ; GARRATY, 1980).

As subclasses foram detectadas em 16/23 (69,6%) amostras. Semelhante a outros pesquisadores (Dacie, 1975; GARRATY; NANCE, 1990; DUBARRY *et al.*, 1993; LYNEN *et al.* 1995; FABIJANSKA-MITEK; LOPIENSKA; ZUPANSKA, 1997; LI *et al.*, 1999; LYNEN *et al.*, 2002), nossos resultados mostraram que IgG1 foi a subclasse predominante (Tabela 16).

TABELA 16 - Freqüência das subclasses IgG1 e/ou IgG3 em pacientes com anemia hemolítica auto-imune segundo nossos resultados e dos autores consultados.

Autores	Metodologia	n	IgG1 N (%)	IgG3 n (%)	IgG1+3 n (%)
Dacie, 1975	Aglutinação	45	36(80)	-	9(20)
Garraty e Nance, 1990	Citometria de fluxo	22	19(86,4)	3(13,6)	-
Lynen <i>et al</i> , 1995	Citometria de fluxo	12	9(75)	-	3(25)
Fabijanska-Mitek, 1997	Aglutinação (tubo, microplaca) e gel	66	40(60,6)	-	26(39,4)
Li <i>et al</i> , 1999	Imunodifusão radial	34	14(41,2)	7(20,6)	13(38,2)
Lynen <i>et al</i> , 2002	Citometria de fluxo e gel	16	11(68,7)	1(6,3)	4(25)
Araújo, 2003	Gel	16	12(75)	1(6,3)	3(18,7)
Presente estudo					

Fonte: Referenciadas na bibliografia

n: número da amostra

No presente estudo, encontramos IgG1 nas três categorias de gravidade. Garraty e Nance (1990) analisaram 22 amostras de pacientes com AHAI e encontraram também a presença de IgG1 em todos os níveis de gravidade. Os autores não encontraram correlação entre a presença de IgG1 ou IgG3 e anemia hemolítica. Talvez os relatos de van der Meulen *et al.* (1980) de que existe um valor limiar de moléculas IgG1 para que ocorra a lise eritrocitária, seja um importante dado que se deve levar em consideração. Stratton *et al.* (1983) observaram, através de estudo em doadores de sangue com TAD positivo e em pacientes com AHAI, que a diferença entre esses grupos era referente ao número de moléculas IgG1 significantemente maior no segundo grupo. Também é possível que as subclasses IgG1 e IgG3 apresentem comportamentos diferentes com relação à hemólise em função da patologia envolvida (FOERSTER, 1993; HARMENING; PRIHODA; GREEN, 1999).

Nance e Garraty (1983) sugeriram que IgG3 está sempre associada à hemólise. Essa molécula tem uma região de articulação maior e mais flexível que as outras subclasses, permitindo um melhor acesso aos receptores FcR dos fagócitos mononucleares (BROJER; MERRY; ZUPANSKA, 1989). Engelfriet, Overbeeke e von dem Borne (1992) mostraram que enquanto 35% dos pacientes com apenas auto-anticorpos IgG1 não apresentaram sinais de hemólise, virtualmente todos os pacientes que apresentaram apenas IgG3 tinham anemia hemolítica grave. No presente estudo detectamos IgG3 em um caso moderado da doença, mas em nenhum dos casos leves; tal observação também foi feita por Fabijanska-Mitek, Lopienska e Zupanska (1997).

Em vários estudos clínicos foi encontrada uma pobre correlação entre subclasses e grau de hemólise clínica, independente da metodologia utilizada. Esse fato, provavelmente, ocorre por causa da complexidade da patogênese da hemólise imune *in vivo* que depende do número de anticorpos ligados às hemácias, da ativação do complemento e da atividade funcional do sistema fagocítico mononuclear em reagir com as hemácias sensibilizadas (SOKOL; HEWITT; STAMPS, 1981; WIENER, *et al.*, 1987; GARRATY; NANCE, 1990; CHAPLIN, 1990; LYNEN *et al.*, 1995).

O tipo e estágio da patologia de base ou ações terapêuticas, como por exemplo, uso de corticosteróides devem ser considerados (SOKOL; HEWITT; STAMPS, 1981; KOKORI *et al.*, 2000). Von dem Borne *et al.* (1977) presumiram uma possível troca de subclasse ao analisar um caso de AHAI que, após corticoterapia, continuou com TAD positivo apesar da ausência de hemólise; a justificativa para esse fato logo foi estabelecida com a descoberta de que o anticorpo pertencia à subclasse IgG4.

Apesar de termos encontrado tendência para associação das subclasses IgG1 e IgG3 com doença grave, nossos resultados sugerem que a determinação dessas subclasses na AHAI deve fazer parte de um conjunto de variáveis a ser analisadas, pois os relatos existentes na literatura, até o momento, não permitem que esse teste seja um meio exclusivo para avaliar a gravidade e o prognóstico da referida doença. No entanto, fatores como o baixo número de casos estudados, diferentes metodologias e reagentes utilizados devem ser considerados.

Como bem comentaram Palfi e Hildén (1997), a maioria dos testes para subclassificação de IgG foi realizada por técnicas qualitativas de aglutinação, cuja padronização é difícil; essa pode ter sido a principal causa para as discrepâncias existentes na literatura. Acreditamos que estudos multicêntricos com técnicas e materiais padronizados poderão definir melhor o real papel das subclasses IgG na AHAI.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. Houve relação entre o TAD e a gravidade da DHPN.
2. Houve relação entre o título do anticorpo em gestantes alo-sensibilizadas com a gravidade da DHPN.
3. IgG1 foi a subclasse predominante na DHPN.
4. A gravidade da hemólise na DHPN parece ser diretamente proporcional ao número de moléculas IgG1 presente na membrana eritrocitária.
5. A subclasse IgG3 parece estar relacionada à hemólise leve na DHPN.
6. A associação das subclasses IgG1 e IgG3 sugere DHPN grave.
7. IgG1 foi a subclasse predominante na AHAI.
8. Não houve relação entre a subclasse IgG1 e a gravidade da hemólise na AHAI.
9. Não houve relação entre a subclasse IgG3 e a gravidade da hemólise na AHAI.
10. A associação das subclasses IgG1 e IgG3 sugere AHAI grave.
11. A determinação das subclasses de IgG é importante na avaliação do quadro hemolítico associado a DHPN.
12. A importância das subclasses de IgG nos quadros de hemólise associada a AHAI necessita de maiores estudos para ser elucidada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, B. Autoimmune hemolytic anemia. *Indian J. Pediatr.*, v. 65, p. 663-668, 1998.
- ALIE-DARAN, S.J.; DUGOUJON, J.-M.; FOURNIE, A. Gm typing, IgG subclasses of anti-Rh(D) and severity of hemolytic disease of the newborn. *Vox Sang.*, v. 62, p. 127-128, 1992.
- AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. *Technical manual*. 13th ed. Bethesda, MD, 1999.
- ANSTEE, D. J. Blood group-active surface molecules of the human red blood cell. *Vox Sang.*, v. 58, p. 1-20, 1990.
- BECKERS, E.A.M.; VAN GULDENER, C.; OVERBEEKE, M.A.M.; VAN RHENEN, D.J. Intravascular hemolysis by IgA red cell autoantibodies. *Neth. J. Med.*, v. 58, p. 204-207, 2001.
- BEN-IZHAK, C.; SHECHTER, Y.; TATARSKY, I. Significance of multiple types of antibodies on red blood cells of patients with positive direct antiglobulin test: A study of monospecific antiglobulin reactions in 85 patients. *Scand. J. Haematol.*, v. 35, p. 102-108, 1985.
- BENNEBROEK GRAVENHORST, J. Diagnosis and treatment of severe alloimmunization. *Vox Sang.*, v. 67, suppl. 13, p. 235-238, 1994.
- BOWELL, P.; WAINSCOAT, J.S.; PETO, T.E.A.; GUNSON, H.H. Maternal anti-D concentrations and outcome in Rhesus haemolytic disease of the newborn. *Br. Med. J.*, v. 285, p. 327-329, 1982.
- BOWMAN, J.M. Controversies in Rh profilaxis: who needs Rh immune globulin and when it should be given? *Am. J. Obstetr. Gynecol.*, v. 151, p. 289, 1985.
- BROJER, E.; MERRY, A.H.; ZUPANSKA, B. Rate of interaction of IgG1 and IgG3 sensitized red cells with monocytes in the phagocytosis assay. *Vox Sang.*, v. 56, p. 101-103, 1989.
- BROUWERS, H.A.A.; OVERBEEKE, M.A.M.; GEMKE, R.J.B.J.; MAAS, C.J.; Van LEEUWEN, E.F.; ENGELFRIET, C.P. Sensitive methods for determining subclasses of IgG anti-A and anti-B in sera of blood-group-O women with a blood-group-A or -B child. *Br. J. Haematol.*, v. 66, p. 267-270, 1987.
- CARTRON, J.P.; BAILLY, P.; LE VAN KIM, C.; CHERIF-ZAHAR, B.; MATASSI, G.; BERTRAND, O.; COLIN, Y. Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens. *Vox Sang.*, v. 74 suppl. 2, p. 29-64, 1998.

- CHAPLIN, H. Red cell-bound immunoglobulin as a predictor of severity of hemolysis in patients with autoimmune hemolytic anemia. **Transfusion**, v. 30, n. 7, p. 576-578, 1990.
- CONLEY, C.L.; LIPPMAN, S.M.; NESS, P. Autoimmune hemolytic anemia with reticulocytopenia. **JAMA**, v. 244, p. 1688-1690, 1980.
- CONLEY, C.L.; LIPPMAN, S.M.; NESS, P. Autoimmune hemolytic anemia with reticulocytopenia and erythroid marrow. **N. Engl. J. Med.**, v. 306, p. 281-286, 1982.
- COOMBS R.R.A.; MOURANT, A.E.; RACE, R.R. New test for detection of 'weak and incomplete' antibodies. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 26, p. 255-256, 1945.
- DACIE, J.V. Autoimmune hemolytic anemia. **Arch. Intern. Med.**, v. 135, p. 1293-1300, 1975.
- DACIE, J.V. Drug-and chemical-induced haemolytic anaemias In: _____. **The haemolytic anaemias**, 3rd ed. Edinburgh: Chirchill Livingstone, 1999. p. 1-138.
- DACIE, J.V.; CROOKSTON, J.H.; CHRISTENSEN, W.N. Incomplete cold antibodies. Role of complement in sensitization to antiglobulin serum by potentially hemolytic antibodies. **Br. J. Haematol.**, v. 3 p. 77-87, 1957.
- DUBARRY, M.; CHARRON, C.; HABIBI, B.; BRETAGNE, Y.; LAMBIN, P. Quantitation of immunoglobulin classes and subclasses of autoantibodies bound to red cells in patients with and without hemolysis. **Transfusion**, v. 33, p. 466-471, 1993.
- ENGELFRIET, C.P.; OVERBEEKE, M.A.M.; VON DEM BORNE, A.E.G. Autoimmune hemolytic anemia. **Semin. Hematol.**, v. 29, p. 3-12, 1992.
- FABIJANSKA-MITEC, J.; LOPIENSKA, H.; ZUPANSKA, B. Gel test application for IgG subclass detection in auto-immune haemolytic anaemia. **Vox Sang.**, v. 72, p. 233-237, 1997.
- FOERSTER, J. Autoimmune hemolytic anemias. In: Wintrobe M M. **Clinical hematology**. 9th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 1170 -1196.
- GALL, S.A.; MILLER, J.M. Rh isoimmunization: A 24 year experience at Duke University Medical Center. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 140, p. 902-909, 1981.
- GARNER, S.F.; GORICK, B.D.; LAI, W.Y.; BROWN, D.; TAVERNER, J.; HUGHES-JONES, N.C.; CONTRERAS, M.; LUBENKO, A. Prediction of the severity of haemolytic disease of the newborn. **Vox Sang.**, v. 68, p. 169-176, 1995.
- GARNER, S.F.; WIENER, E.; CONTRERAS, M.; NICOLINI, U.; KOCHENOUR, N.; LETSKY, E.; RODECK, C.H. Mononuclear phagocyte assays, AutoAnalyzer quantitation and IgG subclasses of maternal anti-RhD in the prediction of the

severity of haemolytic disease in the fetus before 32 weeks gestation. **Br. J. Haematol.**, v. 80, n. 1, p. 97-101, 1992.

GARRATTY, G.; NANCE, S.J. Correlation between in vivo hemolysis and the amount of red cell-bound IgG measured by flow cytometry. **Transfusion**, v. 30, n. 7, p. 617-621, 1990.

GEHRS, B.C.; FRIEDBERG, R.C. Autoimmune hemolytic anemia. **Am. J. Hematol.**, v. 69, p. 258-271, 2002.

GILLILAND, B.C. Coombs-negative immune hemolytic anemia. **Semin. Hematol.**, v. 13, p. 267-275, 1976.

GIRIBELA, C.; CABAR, F.F.; NISHIE, E.N.; BUNDUKI, V.; ZUGAIB, M. Aloimunização Rh. **Femina**, v. 27, p. 783 -786, 1999.

GOLDBERG, L.S.; FUDENBERG, H.H. Warm antibody hemolytic anemia; Prolonged remission despite persistent positive coombs test. **Vox Sang.**, v. 15, p. 443-445, 1968.

GONZALEZ, C.A. Diagnóstico inmunohematológico de anemias hemolíticas autoinmunes. **Rev. Arg. Transf.**, v. 26, p. 21-40, 2000.

GOODMAN, S.R.; SHIFFER, K. The spectrin membrane skeleton of normal and abnormal human erythrocytes: a review. **Am. J. Physiol.**, v. 244, n. 3, p. 121-141, 1983.

GORST, D.W.; RAWLINSON, V.I.; MERRY, A.H.; STRATTON, F. Positive direct antiglobulin test in normal individuals. **Vox Sang.**, v. 38, p. 99-105, 1980.

GREENWALT, T.B.; WAGNER, J.A. Evaluation of the quantitative Direct Antiglobulin Test in Hemolytic Disease of the Newborn due to Anti-D. **Blood**, v. 10, p. 29-34, 1955.

HARMENING, D.M.; PRIHODA, L.A.; GREEN, R.E.B. **Autoimmune hemolytic anemias**. In: HARMENING, D.M. Modern blood banking and transfusion practices. 4th ed. Philadelphia: F. A. Davis, 1999. chapt. 21, p. 436-473.

HEGDE, U.M.; GORDON-SMITH, E.C.; WORLLEDGE, S.M. Reticulocytopenia and "absence" of red cell autoantibodies in immune haemolytic anaemia. **Br. Med. J.**, v. 2, p. 1444-1447, 1977.

HILDÉN, J.-O.; BACKTEMAN, K.; NILSSON, J.; ERNERUDH, J. Flow-cytometric quantitation of anti-D antibodies. **Vox Sang.**, v. 72, p. 172-176, 1997.

HOFFBRAND, A.V.; PETTIT, J.E. **Hematologia clínica ilustrada**: manual de atlas colorido. São Paulo: Manole, 1991. p. 1-14.

- IYER, Y.S.; KULKARNI, S.V.; GUPTA, S.C. Distribution of IgG subtypes in maternal anti-D sera and their prognostic value in Rh haemolytic disease of the new-born. *Acta Haematol.*, v. 88, p. 78-81, 1992.
- JAMES, P.; ROWE, G.P.; TOZZO, G.G. Elucidation of alloantibodies in autoimmune haemolytic anaemia. *Vox Sang.*, v. 54, p. 167-171, 1988.
- KEMENY, D.M.; URBANEK, R.; RICHARDS, D.; GREENALL, C. Development of a semi-quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human IgG subclass antibodies. *J. Immunol. Methods*, v. 96, p. 47-56, 1987.
- KEMPPNEM, E.; VUOPIO, P.; SANDSTRÖM, R.; WAGER, O. Significance of monospecific antisera in the diagnosis and prognosis of haemolytic anaemias. *Ann. Clin. Res.*, v. 13, p. 85-90, 1981.
- KENNEDY, M.; WAHEED, A. Hemolytic disease of the newborn and fetus In: HARMENING, D. M. *Modern blood banking and transfusion practices*. 4.th ed. Philadelphia: F. A. Davis, 1999. chapt. 20, p. 421-435.
- KOKORI, S.I.G.; IOANNIDIS, J.P.A.; VOULGARELIS, M. TZIOUFAS, A.G.; MOUTSOPoulos, H.M. Autoimmune Hemolytic anemia in patients with Systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med.*, v. 108, p. 198-204, 2000.
- LAINE, M.L.; BEATTIE, K.M. Frequency of alloantibodies accompanying autoantibodies. *Transfusion*, v. 25, p. 545-546, 1985.
- LEGER, R.M.; GARRATY, G. Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies. *Immunohematology*, v. 39, p. 11-16, 1998.
- LI Z.; SHAO, Z.; XU, Y.; SHEN, L.; CHEN, G.; ZHANG, Y.; CHU, Y. Subclasses of warm autoantibody IgG in patients with autoimmune hemolytic anemia and their clinical implications. *Chin. Med. J.*, v. 112, p. 805-808, 1999.
- LOBUGLIO, A.F.; COTRAN, R.S.; JANDL, J.H. Red cells coated with immunoglobulin G: binding and spherling by mononuclear cells in man. *Science*, v. 158, p. 1582-1585, 1967.
- LUBENKO, A.; CONTRERAS, M.; RODECK, C.H.; NICOLINI, U.; SAVAGE, J.; CHANA, H. Transplacental IgG subclass concentrations in pregnancies at risk of haemolytic disease of the newborn. *Vox Sang.*, v. 67, n. 3, p. 291-298, 1994.
- LYNEN, R.; KRONE, O.; LEGLER, T.J.; KOHLLER, M.; MAYR, W.R. A newly developed gel centrifugation test for quantification of RBC-bound IgG antibodies and their subclasses IgG1 and IgG3: comparison with flow cytometry. *Transfusion*, v. 42, p. 612-618, 2002.
- LYNEN, R.; NEUHAUS, R.; SCHWARZ, D.W.M.; SIMSON, G.; RIGGERT, J.; MAYR, W.R.; KOHLER, M. Flow cytometric analyses of the subclases of red cell IgG antibodies. *Vox Sang.*, v. 69, p. 126-130, 1995.

- MARLETTA, J. Metodos y tecnicas. In: MARLETTA, J. **Hemoterapia e imunohematologia**. Buenos Aires: Cientifico-Tecnicas Americanas, 1979. p. 325.
- MASOUREDIS, S.P.; BRANKS, M.J.; GARRATY, G.; VICTORIA, E.J. Immunospecific red cell binding of iodine 125-labeled immunoglobulin G erythrocyte autoantibodies. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 110, p. 308-317, 1987.
- MERRY, A.H.; THOMPSON, E.E.; RAWLINSON, V.I.; STRATTON, F. Quantitation of IgG on erythrocytes: correlation of number of IgG molecules per cell with the strength of the direct and indirect antiglobulin tests. **Vox Sang.**, v. 47, p. 73-81, 1984.
- MEYER, F.; GARIN, L.; SMATI, C.; GASPARD, M.; GIANNOLI, C.; RIGAL, D. Application du gel test utilisant une antiglobuline anti-IgA au diagnostic immunologique d'anémie hémolytique auto-immune à test de Coombs direct négatif. **Transfus. Clin. Biol.**, v. 6, p. 221-226, 1999.
- MITCHELL, J.A.; SIM, E. Size polymorphism of the erythrocyte complement receptor type 1 (CR1) in Systemic Lupus Erythematosus induced by hydralazine. **Compl. Inflamm.**, v. 6, p. 88-93, 1989.
- MOLLISON, P.L.; CUTBUSH, M. Haemolytic disease of the newborn: Criteria of severity. **Br. Med. J.**, v. i, p. 123-130, 1949.
- MOLLISON, P.L.; ENGELFRIET, C.P.; CONTRERAS, M. **Blood transfusion in clinical medicine**. 10th ed. Oxford: Blackwell, 1997. p. 61-92.
- MOLLISON, P.L.; ENGELFRIET, C.P.; CONTRERAS, M. **Blood transfusion in clinical medicine**. 10th ed. Oxford: Blackwell, 1999. p. 61-92.
- MORELL, A.; SKVARIL, F.; VAN LOGHEM, E.E.; KLEEMOLA, M. Human IgG subclases in maternal and fetal serum. **Vox Sang.**, v. 21, p. 481-492, 1971.
- MORESCHI, C. Neue tatsache ubre die blutkörperchen agglutinationen. **Zbl Bakú**, v. 46, p. 449-456, 1908.
- NANCE, S.; GARRATTY, G. Subclass of IgG on red cells of donors and patients with positive direct antiglobulin tests. **Transfusion**, v. 23, suppl., p. 413, 1983. abs. S27.
- NANCE, S.J.; GARRATTY, G. Application of flow cytometry to immunochemistry. **J. Immunolog. Methods**, v. 101, p. 127-131, 1987.
- PALEK, J.; LUX, S.E. Red cell membrane skeletal defects in hereditary and acquired hemolytic anemias. **Sem. Hematol.**, v. 20, p. 198-224, 1983.
- PALFI, M.; HILDÉN, J.-O. Application of gel test in IgG subclassing – A comparison of two agglutination assays. **Vox Sang.**, v. 72, p. 114-117, 1997.

PARINAUD, J.; BLANC, M.; GRANDJEAN, H.; FOURNIE, A.; BIERME, S.; PONTONNIER, G. IgG subclasses and Gm allotypes of anti-D antibodies during pregnancy: correlation with the gravity of the fetal disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 151, p. 1111, 1985.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. Respostas imunes celulares In: PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 64-77.

PETZ, L.D. Blood transfusion in haemolytic anemias. *Immunohematology*, v. 15, p. 15-23, 1999.

PETZ, L.D.; GARRATY, G. **Acquired immune haemolytic anaemias**. London: Churchill Livingstone, 1980. p. 185-231.

PIROFSKY, B. Clinical aspects of autoimmune hemolytic anemia. *Semin. Haematol.*, v. 13, p. 251-265, 1976.

POLLOCK, J.M.; BOWMAN, J.M. Anti-Rh(D) IgG subclasses and severity of Rh hemolytic disease of the newborn. *Vox Sang.*, v. 59, p. 176-179, 1990.

RAVETCH, J.V.; KINET, J.P. "Fc receptors". *Annu. Rev. Immunol.*, v. 9, p. 457, 1991.

REZENDE, J.; JUNQUEIRA, P.C.; REZENDE FILHO, J. Doença hemolítica perinatal In: REZENDE, J. **Obstetrícia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 33, p. 908-931.

RIEBBEN, R.; BUCHS, J.P.; FLÜCKIGER, E.E.; NYDEGGER, U.E. Antibodies to histo-blood group substances A and B: agglutination titers, Ig class, and IgG subclasses in healthy persons of different age categories. *Transfusion*, v. 31, p. 607-615, 1991.

ROBERTSON, J.G. Evaluation of the reported methods of interpreting spectrophotometric tracings of amniotic fluid in rhesus isoimmunization. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 95, p. 120-126, 1966.

ROUSH, G.R.; ROSENTHAL, N.S.; GERSON, S.L.; TOY, E.M.; McCARTHY, P.; HIRSCHLER, N.V.; YOMTOVIAN, R. An unusual case of autoimmune hemolytic anemia with reticulocytopenia, erythroid dysplasia, and an IgG2 autoanti-U. *Transfusion*, v. 36, p. 575-580, 1996.

SALAMA, A.; MUELLER-ECKHARDT, C. Autoimmune haemolytic anaemia in childhood associated with non complement binding IgM autoantibodies. *Br. J. Haematol.*, v. 65, n. 1, p. 6-71, 1987.

SOKOL, R.J.; HEWITT, S.; BOOKER, D.J.; STAMPS, R. Small quantities of erythrocyte bound immunoglobulins and autoimmune haemolysis. *J. Clin. Pathol.*, v. 40, n. 3, p. 254 – 257, 1987.

- SOKOL, R.J.; BOOKER, D.J.; STAMPS, R. The pathology of autoimmune haemolytic anaemia. *J. Clin. Pathol.*, v. 45, p. 1047-1052, 1992.
- SOKOL, R.J.; HEWITT, S.; BOOKER, D.J.; BAILEY, A. Red cell autoantibodies, multiple immunoglobulin classes, and autoimmune hemolysis. *Transfusion*, v. 30, p. 714-717, 1990.
- SOKOL, R.J.; HEWITT, S.; BOOKER, D.J.; STAMPS, R. Small quantities of erythrocyte bound immunoglobulins and autoimmune haemolysis. *J. Clin. Pathol.*, v. 40, p. 254-257, 1985.
- SOKOL, R.J.; HEWITT, S.; STAMPS, B.K. Autoimmune haemolysis: na 18-year study of 865 cases referred to a regional transfusion centre. *Br. Med. J.*, v. 282, p. 2023-2027, 1981.
- STRATON, F.; RAWLINSON V.I.; MERRY, A.H. et al Positive direct antiglobulin test in normal individuals. II. *Clin. Lab. Haemat.*, v. 5, p. 17-21, 1983.
- TASLIMI, M.M.; SIBAI, B.M.; MASON, J.M.; DACUS, J.V. Immunoglobulin G and isoimmunized pregnancy outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 154, p. 1326-1332, 1986.
- THOMAS, N.; KICKLER, T.; SHIREY, R.S.; NESS, P.M.; LANKIEWICZ, M.A quantitative assay for subclassing IgG antibodies implicated in hemolytic disease of the newborn (HDN). *Transfusion*, v. 33, suppl., p. 64S, 1993. Abs. 248.
- TURNER, M. Moléculas que reconhecem抗ígenos. As Imunoglobulinas. In: ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D.K. *Imunologia*. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. cap. 5, p. 5.1.
- UKITA, M.; TAKAHASHI, A.; NUNOTANI, T.; KIHANA, T.; WATANABE, S.; YAMADA, N. IgG subclasses of anti-A and anti-B antibodies bound to the cord red cells in ABO incompatible pregnancies. *Vox Sang.*, v. 56, n. 3, p. 181-186, 1989.
- ULVESTAD, E.; BERENTSEN, S.; Bo, K.; SHAMMAS, F. V. Clinical immunology of chronic cold agglutinin disease. *Eur. J. Haematol.*, v. 63, n. 4, p. 259-266, 1999.
- VAN DER MEULEN, F.W.; BRUIM, H.G.; GOOSEN, P.C.M.; BRUYNES, E.C.G.; JOUSTRA-MAAS, C.J.; TELKAMP, H.G.; VON DEM BORNE, A.E.G.K.; ENGELFRIET, C.P. Quantitative aspects of the destruction of red cells sensitized with IgG1 autoantibodies: an application of flow cytometry. *Br. J. Haematol.*, v. 46, p. 47-56, 1980.
- VON DEM BORNE, A.E.; BECKERS, D.; VAN DER MEULEN, F.W.; ENGELFRIET, C.P. IgG₄ autoantibodies against erythrocytes, without increased haemolysis: a case report. *Br. J. Haematol.*, v. 37, n. 1, p. 137-144, 1977.

- WIENER, A.S.; NAPPI, R.; GORDON, E.B. Studies in Rh sensitization V. Importance of the titer of Rh antibodies in the sensitized pregnant Rh-negative woman for prognosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 63, p. 6-15, 1952.
- WIENER, E.; ATWAL, A.; THOMPSON, K.M.; MELAMED, M.D.; GORICK, B.; HUGHES-JONES, N.C. Differences between the activities of human monoclonal IgG1 and IgG3 subclasses of anti-D(Rh) antibody in their ability to mediate red cell-binding to macrophages. *Immunology*, v. 62, p. 401-404, 1987.
- WIENER, E.; JOLLIFFE, V.M.; SCOTT, H.C.; KUMPEL, B.M.; THOMPSON, K.M.; MELAMED, M.D.; HUGHES-JONES, N.C. Differences between the activities of human monoclonal IgG1 and IgG3 anti-D antibodies of the Rh blood group system in their abilities to mediate effector functions of monocytes. *Immunology*, v. 65, n. 2, p. 159-163, 1988.
- WIN, N.; ISLAM, S.I.A.M.; PETERKIN, M.A.; WALKER, I.D. Positive direct antiglobulin test due to antiphospholipid antibodies in normal healthy blood donors. *Vox Sang.*, v. 72, p. 182-184, 1997.
- WORLLEDGE, S.M.E.; BLAJCHMA, M.A. The autoimmune haemolytic anaemias. *Br. J. Haematol.*, v. 23, suppl., p. 61-69, 1972.
- WRIGHT, M.S.; SMITH, L.A. Laboratory investigation of autoimmune anemias. *Clin. Lab. Sci.*, v. 12, p. 119-122, 1999.
- YADIN, O.; SAROV, B.; NAGGAN, L.; SLOR, H.; SHOENFELD, Y. Natural autoantibodies in the serum of healthy women – a five-year follow-up. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 75, p. 402-406, 1989.
- ZUPANSKA, B.; BROJER, E.; McINTOSH J.; SEYFRIED, H.; HOWELL, P. Correlation of monocyte-monolayer assay results, number of erythrocyte-bound IgG molecules, and IgG subclass composition in the study of red cell alloantibodies other than D. *Vox Sang.*, v. 58, p. 276-280, 1990.
- ZUPANSKA, B.; THOMSON, E.E.; MARRY, A.H. Fc receptors for IgG1 and IgG3 on human mononuclear cells – an evaluation with known levels of erythrocyte-bound IgG. *Vox Sang.*, v. 50, p. 97-103, 1986.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

TEMA DA PESQUISA – Análise da participação dos isótipos de IgG nos processos hemolíticos secundários à doença hemolítica perinatal e à anemia hemolítica auto-imune.

Investigadores Responsáveis pelo projeto: MARIA ANNECY ARAÚJO E LÍLIA MARIA CARNEIRO CÂMARA. Endereços e Telefones: Centro de Hematologia do Ceará – HEMOCE. Fones: 433-4385 (HEMOCE), 491-4370 (Residência), 99988651 (Celular). Laboratório de Imunologia, Departamento de Patologia e Medicina Legal da FM - UFC. Fones: 288-8313 (Laboratório), 268-2085 (Residência), 99732748 (Celular).

O abaixo-assinado (ou o responsável no caso de menor)

_____, atendido no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará, declara que autoriza sua inclusão no grupo de estudo da pesquisa acima citada de responsabilidade das pesquisadoras Dras. Maria Annecy Araújo e Lília M.C. Câmara.

O abaixo-assinado (ou o responsável no caso de menor) está ciente que:

1. O objetivo da pesquisa é estudar alterações que ocorrem no sangue de pessoas com anemia hemolítica de origem imunológica.
2. As amostras de sangue, para o fim a que se destina a pesquisa, é dos procedimentos de rotina laboratorial aos quais todos os pacientes com suspeita de anemia hemolítica são submetidos.
3. A participação neste estudo não lhe acarretará nenhum benefício terapêutico, pois busca servir apenas de fator prognóstico em relação a evolução da doença.
4. A recusa não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento.
5. Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico.
6. Os resultados obtidos durante a pesquisa serão mantidos em sigilo e a pesquisadora não identificará o paciente por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.
7. A pesquisadora envolvida na pesquisa manterá o paciente (ou o responsável pelo menor) informado em relação ao progresso da pesquisa caso julgue relevante ou seja inquirida pelo paciente e/ou familiares.
8. Poderá contactar a Secretaria da Comissão de Ética (fone 288-8346) para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

Local _____ Data _____

Assinatura (se menor o responsável)

APÊNDICE B - PROTOCOLO DE PESQUISA EM DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL

DADOS DA GESTANTE

Nome da gestante: _____

Data de Nascimento: _____ Idade gestacional: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____

Telefone: () _____ E-mail: _____

Hospital: _____ RG Hospital: _____

Transfusão prévia? () Sim () Não. Data: _____

Medicamentos: _____

▪ PROVAS IMUNO-HEMATOLÓGICAS

ABO/Rh: _____

PAI: _____ Anticorpo: _____ Título: _____

TAD: _____ Auto-controle: _____

▪ PESQUISA DOS ISÓTIPOS DE IgG

IgG1

IgG3

TESTES REALIZADOS NO CONCEITO

▪ ERITROGRAMA:

Hm:	Ht:	Hb:
-----	-----	-----

▪ BIOQUÍMICA:

Bilirrubina Indireta:

▪ PROVAS IMUNO-HEMATOLÓGICAS

ABO/Rh: _____

TAD: _____

APÊNDICE C - PROTOCOLO DE PESQUISA EM ANEMIA HEMOLÍTICA AUTO-IMUNE

Nome do Paciente: _____
 Data de Nascimento: _____ Sexo: () Masc () Fem
 Endereço: _____
 Cidade: _____ CEP: _____
 Telefone: () _____ E-mail: _____
 Hospital: _____ RG Hospital: _____
 Diagnóstico: _____
 Transfusão prévia? () Sim () Não. Data: _____
 Medicamentos: _____

TESTES REALIZADOS

▪ **HEMOGRAMA:**

Hm:	Ht:	Hb:
VCM:	HCM:	CHCM:
Obs: _____		

Leucócitos:		Eosino:	
Bt:	Seg:		Baso:
Linfo:	Mono:		
Obs: _____			

Nº Plaquetas:
Reticulócitos:

▪ **BIOQUÍMICA:**

Bilirrubina Direta:
Bilirrubina Indireta:
Bilirrubina Total:
LDH:
Haptoglobina:
Função Renal: Uréia:
Creatinina

■ PROVAS IMUNO-HEMATOLÓGICAS

ABO/Rh: _____

PAI: _____ Anticorpo: _____ Título: _____

TCD: _____ Auto-controle: _____

Polivalente:

IgG

IgM

IgA

C3d

IgG1

IgG3

**APÊNDICE D - DADOS RELACIONADOS ÀS GESTANTES E AOS CONCEITOS
COM DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL**

NÚMERO DE TRANSFUSÃO INTRA-ÚTERO (TIU), NÚMERO DE EXSANGÜINEOTRANSFUSÃO (ET), TESTE DE ANTIGLOBULINA DIRETO (TAD), TÍTULO DO ANTICORPO (Tít. Ac), ABORTO (Ab), NATIMORTO (NM)

LEVE								
No		TIU	ET	TAD	Tít. Ac	IgG1	IgG3	Subclasse
4a		0	0	+	16	10,75	8,58	-
3a		0	0	+	16	10,65	8,9	3
2a		0	0	+	8	10,65	9,65	3
16a		0	0	+	8	10,18	8,66	-
15a		0	0	+	8	10,65	8,82	3
11a		0	0	+	8	10,18	9,73	3
10a		0	0	+	8	10,84	9,65	3
60		0	0	+	4	10,46	7,84	-
59		0	0	+	4	10,18	7,91	-
58		0	0	+	8	10,55	7,91	-
47		0	0	+	16	10,76	8,82	3
7		0	0	+	16	21,87	8,35	1
54		0	0	++	16	13,46	8,51	-
<hr/>								
MODERADA								
No		TIU	ET	TAD	Tít. Ac	IgG1	IgG3	Subclasse
5a		0	1	++	32	10,75	8,82	3
1a		0	1	++	128	11,55	9,73	3
57		0	1	++	32	13,7	8,58	-
51		0	1	++	128	14,07	8,58	1
45		0	1	++	32	14,86	8,58	1
6a		0	1	+++	128	12,63	8,66	-
55		0	1	+++	64	14,46	8,66	1
53		0	1	+++	128	15,4	8,9	1+3
52		0	1	+++	128	14,2	8,74	1+3
6		0	1	+++	128	104,6	nd	1
5		0	1	+++	256	18,43	8,66	1
49		0	2	++	128	14,2	8,43	1
8b#		0	2	+++	1024	37,86	58,29	1+3
48		0	2	+++	128	14,46	8,51	1
7a		0	2	++++	256	17,78	10,09	1+3
50		0	3	++	256	13,82	8,2	1

GRAVE No					Tít. Ac	IgG1	IgG3	Subclasse
	TIU	ET	TAD					
15	1	1	+++	1024	69,78	8,66	1	
8	1	1	+++	64	345,99	8,58	1	
9a	1	2	+++	256	13,82	9,39	1+3	
56	1	2	+++	128	13,82	8,66	1	
3	2	3	+++	2048	114,44	nd	1	
12	2	3	++++	1024	196,32	8,66	1	
14	3	2	++++	512	69,16	26,9	1+3	
10	3	2	++++	>2048	97,34	37,18	1+3	
4	3	3	++++	>2048	330,77	28,64	1+3	
9	0	Ab	nd	>2048	85,82	36,52	1+3	
100**	1		nd	512	57,25	9,14	1+3	
69		Ab	nd	256	11,04	12,98	3	
103**		NM	nd	64	12,41	8,35	-	

nd: não determinado

**APÊNDICE E - DADOS RELACIONADOS AOS PACIENTES COM ANEMIA
HEMOLÍTICA AUTO-IMUNE**

SEXO, IDADE (ANOS), HEMOGLOBINA (Hb), PERCENTUAL DE RETICULÓCITOS (Ret %), BILIRRUBINA INDIRETA (B.I), CORTICOTERAPIA (Cort), TRANSFUSÃO PRÉVIA (Trans), DOENÇA ASSOCIADA (Assoc), IDIOPÁTICA (Idiop).

PAC G1=Leve	Sexo	Idade	Hb	Ret %	B.I.	Cort	Trans	Assoc	IgG	C3d	IgM	IgA
N.T.S	F	16	12.9	0.8	0.4	S	0	Idiop	3	2	0	0
J.S.M.	F	40	12.9	0.9	0.5	S	0	Idiop	4	4	0	0
E.R.C	M	34	11.9	0.4	0.6	S	0	Idiop	4	0	0	0
J.L.C.F.	M	62	11.7	1.9	0.4	N	0	Diabet	4	0	0	0
M.L.M.	F	18	11.6	0.9	0.5	S	0	Idiop	4	0	0	0
M.Z.S.	F	36	10.2	0.2	0.8	N	0	Idiop	3	1	0	0
PAC G2=Moderada	Sexo	Idade	Hb	Ret %	B.I.	Cort	Trans	Assoc	IgG	C3d	IgM	IgA
L.S.A	F	57	11.9	3.0	0.6	N	1	Hep. C	4	2	0	0
Z.A.N	F		9.4	2.0	2.3	N	0	Hep. C	2	3	0	0
H.M.R.S.	F	32	8.6	0.7	0.2	N	0	LES	4	0	0	0
I.P.C.	F	24	8.4	1.9	0.1	S	0	LES	4	4	0	0
R.C.F	F	72	7.5	3.0	0.7	S	0	Idiop	4	4	4	0
L.S.S.	F	18	7.3	2.4	0.7	S	0	Idiop	4	1	0	0
M.J.T	F	29	6.6	2.6	0.4	S	0	LES	3	0	0	0
M.C.N	F	32	6.5	2.5	0.2	S	0	Mdopa	3	3	0	0
PAC G3=GRAVE	Sexo	Idade	Hb	Ret %	B.I.	Cort	Trans	Assoc	IgG	C3d	IgM	IgA
M.G.S.	F	47	7.8	6.6	nd	S	0	Idiop	4	0	0	0
M.A.S 06/06/02	F	41	6.2	19.5	4.8	S	0	TVP	4	0	0	0
M.C.S.O.	F		6.0	2.1	nd	S	0	LES	4	0	0	0
M.L.M.	F	18	5.9	10.0	4.2	S	0	Mdopa	4	3	3	0
M.S.G.	F	33	5.1	14.0	4.2	S	0	LES	4	2	1	0
M.R.O	F	39	4.7	10.7	2.3	S	0	Idiop	1	1	0	0
V.A.S.	F	16	4.6	14.0	3.0	N	0	LES	1	1	1	1
D.M.	F	15	3.6	8.9	3.6	S	1	LES	4	0	0	0
A.V.L.S.	F	7meses	3.4	2.0	nd	S	0	Idiop	4	1	0	0

Nd: não determinado

S: sim N: não

0: não transfundido 1: transfundido