

SILVIA FERNANDES RIBEIRO DA SILVA

ANTICORPOS ANTI-HLA
INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE GESTAÇÕES NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS
ANTI-HLA

TRABALHO APRESENTADO COMO REQUISITO
FINAL AO CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA.
CONVÊNIO MEC/BID III/UFC.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - CEARÁ

1 9 8 7

AOS MEUS PAIS.

Que a estrada se abra à sua frente,
Que o vento sopra levemente às suas costas,
Que o sol brilhe morno e suavemente em sua face,
Que a chuva caia docemente em seus campos,
E até que nos encontremos de novo,
Que Deus lhe guarde nas palmas de suas mãos.

(Prece irlandesa, traduzida e adaptada por
Terezinha Maciel).

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Henry Campos pela orientação deste trabalho e pelo reconhecimento das minhas qualidades como profissional, que está acima de qualquer agradecimento.

A Dr.^a Laise Chaves Vieira, exemplo de dedicação e amor à profissão, refletido no decurso da minha formação profissional, a minha profunda admiração e o meu mais sincero agradecimento.

Ao Dr. José Murilo Martins pela ampliação dos meus conhecimentos e por me proporcionar esta inesquecível experiência.

A Dr.^a Helena Pitombeira pela valiosa colaboração na revisão deste trabalho.

Ao amigo, José Amauri Soares Júnior pela preciosa ajuda nas traduções dos trabalhos.

Aos doadores de sangue do painel de linfócitos e as parturientes da Maternidade Escola Assis Chateaubriand que tornaram possível a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Dr.^a Zélia Petrola a quem devo a minha formação básica referente ao sistema HLA, e pela valiosa colaboração na análise dos resultados. O meu mais profundo reconhecimento.

"Amigo é coisa pra se guardar no la
do esquerdo do peito, dentro do co
ração...".

Milton Nascimento

Aos meus colegas e amigos do curso, principalmente
aqueles que comigo percorreram quilômetros e quilômetros de
parágrafos nas inúmeras sessões de estudos, pela agradável
convivência, estímulo e apoio moral recebidos no momento
oportuno.

DAISY MARIA MEIRELES ARRUDA

MARIA DE LISIEUX DA JUSTA NEVES (LIS)

MÁRCIA MARIA SILVA SANTOS (MARCINHA)

MARIA DAS GRAÇAS LOPES ALVES (PRINCESA)

JOSÉ NAPOLEÃO MONTE DA CRUZ (NAPÔ)

ÍNDICE

PÁGINA

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA	3
3 - MATERIAL E MÉTODOS	17
4 - RESULTADOS	21
5 - DISCUSSÃO	30
6 - CONCLUSÃO	34
7 - SUMMARY	35
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

ANTICORPOS ANTI-HLA

INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE GESTAÇÕES NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA

Silvia Fernandes Ribeiro da Silva*

Foram analisadas 210 amostras de soros de puérperas, obtidas nas 72 horas após o parto, com o intuito de verificar sua sensibilização aos antígenos do Sistema HLA: Foi observado que 50 (23,5%) dos soros estudados apresentavam anticorpos linfocitotóxicos anti-HLA. Destes, 34% apresentaram anticorpos possivelmente monoespecíficos e 66% poliespecíficos. Observou-se que 15% das primíparas, 20% das secundíparas e 33% das multíparas estavam sensibilizadas, havendo uma relação significativa entre o número de gestações e a presença de anticorpos anti-HLA.

Comparados estes resultados àqueles da literatura internacional, verificou-se uma estreita correlação.

* Farmacêutica do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) e aluna do Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia.

1 - INTRODUÇÃO

Na década de 50 foram realizados importantes estudos objetivando elucidar a forma principal de imunização por leucócitos humanos (8-25-26-34-45-46).

Jean Dausset, em 1954, se questionando a respeito de alguns indivíduos politransfundidos que apresentavam leucopenia, testou os soros desses pacientes com leucócitos de doadores de sangue e teve a surpresa de constatar que alguns soros aglutinavam os leucócitos dos doadores. E deste modo, concluiu que existia no soro desses pacientes leucopênicos anticorpos anti-leucócitos (8-11-26-34).

Após esta notável contribuição de Dausset, repetidas transfusões de sangue foram consideradas por muito tempo como sendo a única forma de imunização por antígenos leucocitários, enquanto que outras formas de imunização, como por exemplo a gravidez, eram consideradas apenas como uma possibilidade teórica (12-26-34).

Entretanto em 1958 os trabalhos pioneiros de Payne e Rolfs (25) e van Rood e cols. (45), analisando os soros de gestantes, demonstraram que a incompatibilidade feto-materna poderia induzir a formação de leucoaglutininas.

Posteriormente, em 1959 (46) van Rood e cols. foram capazes de comprovar através de achados clínicos a veracidade dessas observações concluindo que não somente a transfusão, mas também a gravidez poderia ser responsável pela imunização por antígenos leucocitários, fato confirmado por diversos autores (2-17-23-25-36-39-40).

Em 1971, Ahrons (2) analisou três possibilidades de imunização primária por antígenos HLA: a primeira prefere-se a imunização leucocitária que pode ser causada pela hemorragia feto-materna que ocorre principalmente no último trimestre, evidenciada através do fato de que mulheres imunizadas pelo sistema Rh apresentam uma mais alta frequência de anticorpos HLA do que as não imunizadas (1). Uma outra forma de imunização seria através das células do tecido placentário, pois sabe-se que essas células carregam antígenos idênticos aos antígenos leucocitários do feto (46). Finalmente, é sabi

do que o esperma humano contém um certo número de leucócitos e que essas células podem ser encontradas na cavidade peritô^unial após o coito (2). Devido a isso é possível que as mulhe^ures se tornem sensibilizadas por antígenos HLA carreados por essas células da ejaculação absorvidas na cavidade peritô^unial, e que os anticorpos HLA observados durante a gesta^ução sejam uma resposta secundária causada pelo pequeno número de leucócitos que passam do feto para a mãe.

Hoje sabe-se que os anticorpos HLA são produzidos em resposta aos haplotipos HLA paternos do feto que atrav^uesam a barreira placentária caindo na circulação materna (1-29-30-31-38-39-40-43).

Jensen em 1962 (17) analisando o soro de 314 gestan^utes, observou que 20% das multíparas apresentavam leucoaglu^utininas no soro, e que a freqüência de imunização aumentava com o número de gestações. Estas observações de Jensen, com^uprovadas por diversos autores (13-17-24-34-39-49), foram fun^udamentais para o desenvolvimento de reativos sorológicos para a detecção de antígenos HLA.

O presente trabalho tem por finalidade mostrar a in^ufluência do número de gestações na produção de anticorpos an^uti-leucócitos e paralelamente verificar a freqüência com que as mulheres imunizadas produzem anticorpos monoespecíficos e poliespecíficos, o que servirá de base para produção de anti^usoros HLA em nosso serviço.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1- HISTÓRICO

A descoberta das moléculas de histocompatibilidade e de suas funções fisiológicas resultou de estudos em dois campos diferentes: a transplantação e a imunogenética (11-14-34 44).

Em 1936, com os estudos pioneiros de Peter Gorer (7-11-44), na Inglaterra, empregando linhagens isogênicas de camundongos, estabeleceram-se as leis básicas da imunidade da transplantação. As células tumorais comportavam-se como um transplante e esse fragmento, que conteria antígenos de histocompatibilidade, seria reconhecido como estranho (um aloenxerto) e rejeitado por linhagens isogênicas às quais faltariam estes antígenos. Peter Gorer, um ano depois, estabeleceu a identidade de um gen deste sistema (que regia o antígeno II) como sendo um gen de resistência tumoral.

Subseqüentemente, Peter Medawar e colaboradores (26-44), expandiram essas observações, demonstrando que os aloenxertos de pele, embora induzissem a formação de anticorpos, eram rejeitados em decorrência da imunidade celular.

Novas descobertas neste campo vieram de estudos em linhagens isogênicas de camundongos e do desenvolvimento das linhagens congênicas por George Snell (7-11-44), sendo então formuladas as leis de histocompatibilidade ou leis de Snell. Estas leis indicam que existe um sistema principal de histocompatibilidade que controla a rejeição dos enxertos e cujos gens estão situados em uma mesma região cromossômica. Esta região é a região H-2 no camundongo e a região HLA no homem (7-10).

Dausset em 1954 (8-21-26-34-50), relatou a presença de anticorpos contra leucócitos humanos no soro de pacientes politransfundidos. Muitos cientistas contemporâneos no campo relatam essas contribuições de Dausset, mas anticorpos que reagem com leucócitos foram descritos pela primeira vez em 1926 por Doan (48-50).

Posteriormente, van Rood (1958) e Payne e cols (1958) detectaram anticorpos semelhantes no soro de mulheres grávi

das e, logo após estas descobertas, várias especificidades antigênicas foram caracterizadas por estes anti-soros (25-45).

Em 1958 (8-10-11-21-34), Dausset definiu o primeiro antígeno leucocitário pela técnica de leucoaglutinação (34), com a ajuda de alo-anticorpos imunes provenientes de indivíduos politransfundidos. Este antígeno "Mac" correspondia à reunião das especificidades atuais: HLA A₂ + A₂₈ (34).

Entre 1962 e 1965, Payne e Bodmer identificaram três antígenos (LA₁, LA₂ e LA₃) e mostraram que eles são governados por três genes alelos, considerados como um esboço do locus HLA-A atual (34).

Em 1965, Dausset, Ivanyi P. e Ivanyi D. descreveram 10 antígenos leucocitários, graças a técnica de microlinfocitotoxicidade descrita por Terasaki e Mac Clelland em 1964 (6-8-34), e sugeriram que esses antígenos pertenciam a um mesmo sistema genético chamado Hu-1 que posteriormente foi denominado HLA (Human Leucocyte Antigen Locus A). O termo HLA foi originalmente usado para definir o primeiro políformo antígeno encontrado no leucócito humano (8-34).

A exploração detalhada do complexo HLA tem sido ativamente estimulada graças a um sistema de cooperação internacional organizado em grupos de trabalho (Workshops) iniciados em 1965, em Durham (8-11-34). Através destes Workshops, realizados a cada 2 anos, pesquisadores de todo o mundo reúnem-se partilhando de técnicas e anti-soros, o que possibilita uma padronização internacional da linguagem referente a este sistema antigênico e permite que se responda, a cada dia, às muitas questões ainda existentes sobre o assunto (8-11).

2.2- GENÉTICA DO SISTEMA HLA

O controle genético do sistema HLA encontra-se localizado no braço curto do cromossoma 6 (6-14-26-34-48). Esta localização foi definida pela análise genética de famílias, assim como pelas técnicas de hibridação celular, método que consiste em injetar cromossomas humanos em uma célula de origem animal (camundongo ou hamster) e estudar os produtos enzimáticos e antigênicos em função de sua progressiva eliminação (14).

A região do cromossoma 6, também denominada "Complexo Maior de Histocompatibilidade", é constituída por 4 unidades funcionais (Locus A, B, C e D(DR)). Os genes de cada um desses loci transmitidos juntos no mesmo cromossoma constituem o que se denomina haplotipo e normalmente é transmitido aos descendentes como unidades genéticas (6-10-14-28-33). Desta forma, sobre cada cromossoma 6, um indivíduo possui 4 genes que definem o haplotipo e o conjunto de 2 haplotipos define o genótipo (14). Esta transmissão por haplotipo é a regra geral, entretanto em cerca de 1% dos casos pode ocorrer o fenômeno de "Crossing-over" (26-48).

A cada um desses loci corresponde uma série de alelos. O número de alelos possíveis em cada locus é elevado, o que explica o polimorfismo do sistema (10-14-15-26-33). Esses alelos são transmitidos como caracteres co-dominantes mendelianos, isto é, todos eles se exprimem nos heterozigotos (18-33-48). Cada progenitor transmite um haplotipo (7), logo os filhos possuem um haplotipo em comum com cada um dos pais (semi-identidade) e os irmãos podem ser idênticos entre si (quatro antígenos idênticos), semi-idênticos (dois antígenos em comum), ou diferentes (quatro antígenos diferentes). (Figura 1).

Uma peculiaridade própria do sistema HLA é a associação de gametas ou desequilíbrio de ligação (8-14-33-48). Certos alelos HLA estão mais freqüentemente ligados em certas populações do que seria esperado através da análise estatística da população. Por exemplo, 16% da população francesa apresenta o antígeno HLA-A₁ e 10% o antígeno HLA-B₈ (26). Através do cálculo estatístico espera-se o haplotipo A₁/B₈ em 1,6% dos casos, entretanto, observa-se essa associação em 8,8%. Isto quer dizer, que a associação dos antígenos A₁/B₈ é mais freqüente do que se ela ocorresse por um simples acaso. O desequilíbrio de ligação fornece dados estatísticos sugerindo que dois genes do locus ocorrem estreitamente ligados em um modelo não atribuível ao acaso, sendo este uma medida sensível da seleção natural (48).

2.3- ANTÍGENOS DO SISTEMA HLA

Como foi dito anteriormente, o controle genético do sistema HLA está localizado no braço curto do cromossoma 6 em locais determinados que se chamam locus. Em cada um dos cromossomas 6, um de origem paterna e um de origem materna, o indivíduo apresenta 4 loci principais que vão codificar os antígenos HLA na superfície de membranas. Na membrana de cada célula nucleada o indivíduo possui 2 antígenos entre os 20 alelos possíveis do locus A, 2 antígenos entre os 40 alelos do locus B, 2 antígenos entre os 8 alelos do locus C e 2 antígenos entre os 14 alelos possíveis do locus D/DR (33). O polimorfismo do sistema HLA é então marcado, como mostra a Tabela I.

Os antígenos dos loci A, B e C (antígenos da Classe I) são glicoproteínas que se encontram presentes na superfície de praticamente todas as células nucleadas (14-18-21-26-48). As concentrações antigênicas estão especialmente elevadas nos linfócitos (linfócito T e B) e plaquetas sanguíneas, mas são também encontradas nos fibroblastos, células epidérmicas e células do parênquima renal (6-14-18-26-34). Entretanto, existe uma outra série de antígenos, denominados HLA D/DR, que possui uma composição química diferente e uma distribuição mais restrita. Encontram-se nos linfócitos B, nos monócitos, nas células dendríticas e em certas células epiteliais (6-14-18-26-34). Não se encontram sobre as plaquetas (6-26).

Os produtos antigênicos da Classe I são formados por duas cadeias (leve e pesada) unidas de forma não covalente. A cadeia leve com um peso molecular de 11.000 corresponde à B₂ microglobulina e a cadeia pesada com um peso molecular de 45.000 apresenta 3 domínios (α_1 , α_2 e α_3), sendo que os domínios α_1 e α_2 são os responsáveis pela antigenicidade da molécula (8-10-18-48).

Os antígenos da Classe II constam também de duas cadeias (α e β). A cadeia α é a porção não variável e a cadeia β é a porção variável da molécula do antígeno, sendo esta última responsável pela especificidade antigênica (8-10-18-48).

Os antígenos HLA, descobertos por equipes diferentes, eram designados por símbolos e cada autor usava sua própria nomenclatura: Da (Dausset), Te (Terasaki), Ao (Amos), Bt (Batchelor), et. (33). Em 1976 foram elaboradas as normas atuais pelo Comitê Internacional de Nomenclatura da Organização Mundial de Saúde para substituir a nomenclatura anteriormente empregada (33).

Os antígenos cuja especificidade são universalmente aceitas, designam-se com números arábicos precedidos pelo locus A, B ou C após o símbolo HLA: HLA B₁₇, HLA A₁₁, etc. Os antígenos prováveis, ou seja, as especificidades menos conhecidas, designam-se provisoriamente com a letra "W" antes do número: HLA AW₃₂, HLA BW₂₂, etc., exceto os antígenos do locus C aonde o "W" é preservado mesmo após o reconhecimento da especificidade do antígeno, para distinguir da nomenclatura do sistema complemento (8-14-21-33-48).

2.4- ANTICORPOS ANTI-HLA

As linfocitotoxinas quentes anti-HLA são anticorpos capazes de se fixar sobre os antígenos HLA presentes na membrana linfocitária e provocar, em associação com o complemento, a lise dos linfócitos. As linfocitotoxinas são chamadas quentes quando seu poder lítico se exerce a 37 °C. No entanto elas apresentam atividades a temperatura inferiores, muitas vezes até a 15 °C, zona de ação das linfocitotoxinas frias. Por outro lado, estas são desprovidas de qualquer eficácia a 37°C (33). Na Tabela II estão representadas as características das linfocitotoxinas quentes e frias (33).

Na maioria das vezes, as linfocitotoxinas quentes são alo-anticorpos encontrados no soro de indivíduos imunizados com antígenos HLA incompatíveis (21-33). Esses alo-anticorpos são formados essencialmente em 3 categorias de indivíduos: os politransfundidos, as mulheres grávidas e os voluntários intencionalmente imunizados com leucócitos (8-18-49).

São freqüentes as imunizações devido a transfusão, freqüência esta que pode aumentar em mulheres com gestações anteriores. A imunização depende de vários fatores, entre os quais, os mais importantes são a periodicidade e a repetição da estimulação, a qualidade do produto transfundido (Leucóci

tos, plaquetas, etc.) e a frequência do antígeno HLA em uma dada população (14). Os anticorpos formados pelos politransfundidos são poliespecíficos pois os antígenos imunizantes variam a cada transfusão, ou seja, o doador e o receptor são freqüentemente HLA incompatíveis (26).

No curso de uma gestação, a mãe pode se imunizar contra os antígenos HLA do feto, no momento em que as células fetais (leucócitos, plaquetas, etc.) passam para a circulação materna após atravessarem a placenta (1-29-30-31-33). A frequência de linfocitotoxinas quentes nas mulheres grávidas varia segundo alguns autores entre 7 a 26%, a média se estabelecendo entre 12 a 14%, dependendo da sensibilidade dos métodos de pesquisa (33). Os anticorpos das mulheres grávidas são mono ou poliespecíficos. Sua relativa monoespecificidade faz dos soros das puérperas uma fonte excelente de anti-soros empregados na tipagem HLA (26-33).

Os voluntários, tendo recebido transfusões de linfócitos ou de sangue total, podem produzir anticorpos anti-HLA. O principal interesse neste método é de poder orientar a especificidade do anticorpo, escolhendo habilmente o doador e o receptor de maneira que eles difiram apenas por um antígeno HLA (8-26-33).

2.5- APLICAÇÃO DA TIPAGEM HLA

2.5.1- TRANSPLANTAÇÃO

Atualmente os transplantes de órgãos representam uma alternativa importante no tratamento de várias doenças, especialmente nos transtornos que envolvem uma perda irreversível do órgão (4).

Os fatores prognósticos que têm uma participação na transplantação de órgãos incluem a identidade dos antígenos HLA, a presença de anticorpos anti-HLA e não HLA (ABO) e as transfusões sanguíneas pré-transplantes (4).

A tipagem HLA tem sido extensivamente utilizada na avaliação da compatibilidade entre o doador e o receptor para transplantação (Tabela III). Na transplantação renal, quando o doador e o receptor são de uma mesma família, a sobrevida

da de um transplante renal pode freqüentemente ser prevista com base na identificação HLA (4-5).

2.5.2- ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS

A área mais notável da utilização da tipagem HLA na investigação médica é a associação de várias doenças com certos antígenos do sistema HLA (4-8-14-32-37-43-50). Através do discernimento do fenótipo HLA de um indivíduo pode-se prever um grande avanço, tanto a nível clínico (especialmente na nosologia, diagnóstico, prognóstico e prevenção) como a nível fundamental, que é o conhecimento das forças de seleção, que permitem a propagação ou eliminação de um gen, a constituição e a manutenção do polimorfismo (4).

Partindo da clássica associação, Espondilite anquilosante e antígeno HLA-B₂₇ aonde 96% dos pacientes com esta enfermidade possuem o antígeno B₂₇ quando comparado com 4% do grupo controle, muitas outras doenças incluindo artropatias, doenças endócrinas, dermatológicas, gastrointestinais e neurológicas têm revelado associação com certos antígenos HLA (Tabela IV).

2.5-3- EXCLUSÃO DE PATERNIDADE

Um outro aspecto fascinante do complexo HLA, cuja realização da tipagem HLA tem se tornado útil é na exclusão de paternidade (FIGURA 2), pois sabe-se que o sistema HLA apresenta um alto polimorfismo, que os antígenos são herdados como caracteres co-dominantes mendelianos, e que nenhum desses antígenos ocorre com alta freqüência em uma dada população. É sabido que as técnicas de tipagens HLA são cada vez mais precisas e fidedígnas (4-8-14-32-48-50).

Postula-se que a probabilidade da tipagem HLA, sem o emprego de outros sistemas de grupos sanguíneos, vir a excluir o parentesco ultrapassa 85% (4-32).

TABELA I - Lista completa das especificidades HLA conhecidas
(Workshop 1984).

Locus A	Locus B	Locus C	Locus D/DR
A ₁	B ₅ { BW51 BW52	CW1	DR1
A ₂	B ₇	CW2	DR2
A ₃	B ₈	CW3	DR3
A ₉ { AW23 AW24	B ₁₂ { BW44 BW45	CW4	DR4
A ₁₀ { AW25 AW26	B ₁₃	CW5	DR5
A ₁₁	B ₁₄	CW6	DRW6
A ₂₈	B ₁₅ { BW62 BW63	CW7	DR7
A ₂₉	B ₁₇ { BW57 BW58	CW8	DRW8
AW ₃₀			DRW9
AW ₃₁ AW ₁₉	B ₁₈		DRW10
AW ₃₂	BW ₂₁ { BW49 BW50		DRW11
AW ₃₃			DRW12
AW ₃₄	BW ₂₂ { BW54 BW55 BW56		DRW13
AW ₃₆	B ₂₇		DRW14
AW ₄₃	BW ₃₅		DRW52
	B ₃₇		DRW53
	BW ₁₆ { BW38 BW39		
	B ₄₀ { BW48 BW60 BW61		

continua...

TABELA I - Lista completa das especificidades HLA conhecidas
(Workshop 1984). Continuação...

Locus A	Locus B	Locus C	Locus D/DR
	BW ₄₁		
	BW ₄₂		
	BW ₄₆		
	BW ₄₇		
	BW ₅₃		
	BW ₅₉		

TABELA II - Características das linfociloloxinas quentes e frias.

Características	Quentes	Frias
Estrutura	Geralmente IgG	Geralmente IgM
Especificidade	Anti-HLA ou Anti-Ia	Não Anti-HLA
Temperatura de Ação	20 a 37°C	15°C
Significação	Somente allo- anticorpos	Somente auto- anticorpos
Principais origens	Politransfundi- dos Multíparas	Viroses Parasitoses Doenças auto- imunes.

TABELA III - Resultado da tipagem HLA em uma família para seleccionar um doador.

Família	Antígenos do Locus A				Antígenos do Locus B				Fenótipo HLA
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₉	B ₅	B ₇	B ₈	B ₁₂	
Receptor: Paciente	+	+				+	+		A ₂ A ₃ B ₇ B ₈
Doadores: Pai			+	+		+		+	A ₃ A ₉ B ₇ B ₁₂
Mãe	+	+			+		+		A ₁ A ₂ B ₅ B ₈
Irmão ₁	+		+		+	+			A ₁ A ₃ B ₅ B ₇
Irmão ₂		+		+			+	+	A ₂ A ₉ B ₈ B ₁₂
Irmão ₃	+			+	+			+	A ₁ A ₉ B ₅ B ₁₂
*Irmão ₄		+	+			+	+		A ₂ A ₃ B ₇ B ₈

* Provável doador do órgão a ser transplantado devido a identidade dos antígenos do Locus A e B.

TABELA IV - Associações demonstradas entre antígenos HLA e doenças

Doenças	Antígenos HLA	Frequência nos Pacientes %	Frequência nos Controles %	Risco Relativo
Espondilite Anquilosante	B27	90	6	141
Síndrome de Reiter	B27	79	6	58,9
Artropatias Psoriáticas	B27	78	6	55,5
Artrite Reumatóide Juvenil (tipo Spondilite)	B27	90	6	141
Ouveite Anterior Aguda	B27	55	6	19,1
Doença Celíaca	DR3	63	16	8,1
	DR3	66	16	10,2
	B8	48	16	4,8
Dermatite Herpetiforme	B8	52	16	5,7
	DW3	72	16	13,5
Myasthenia Gravis	DR3	55	16	6,4
Hepatite Crônica Ativa (não Hbs)	CW7	67	21	9,1
Doença de Basedow	B8	35	16	2,8
	DW3	52	16	5,7
	DR3	48	16	4,9
Tireoidite Atrófica auto- imune	DR3	50	16	5,2
Nefropatia membranosa Idiopática	DR3	60	16	7,9
	B8	50	16	7,9
Síndrome de Sjögren	DW3	65	16	5,3
Dermatomiosite juvenil	B8	55	16	6,4
	DW3	40	16	3,5
Diabetes Sacarino Juvenil	DR3	40	16	3,3
	DW4	42	15	4,1
Psoríase vulgar	CW6	75	16	15,7
	BL7	26	4	8,4
Doença de Behçet	B5	65	13	12,4
Tireoidite de Hashimoto	DR5	60	30	3,5
Hemocromatose idiopática	A3	72	21	9,7
	B14	31	6	7
	B7	30	15	2,4
Lupus Eritematoso Sistêmico	DR3	46	16	4,5

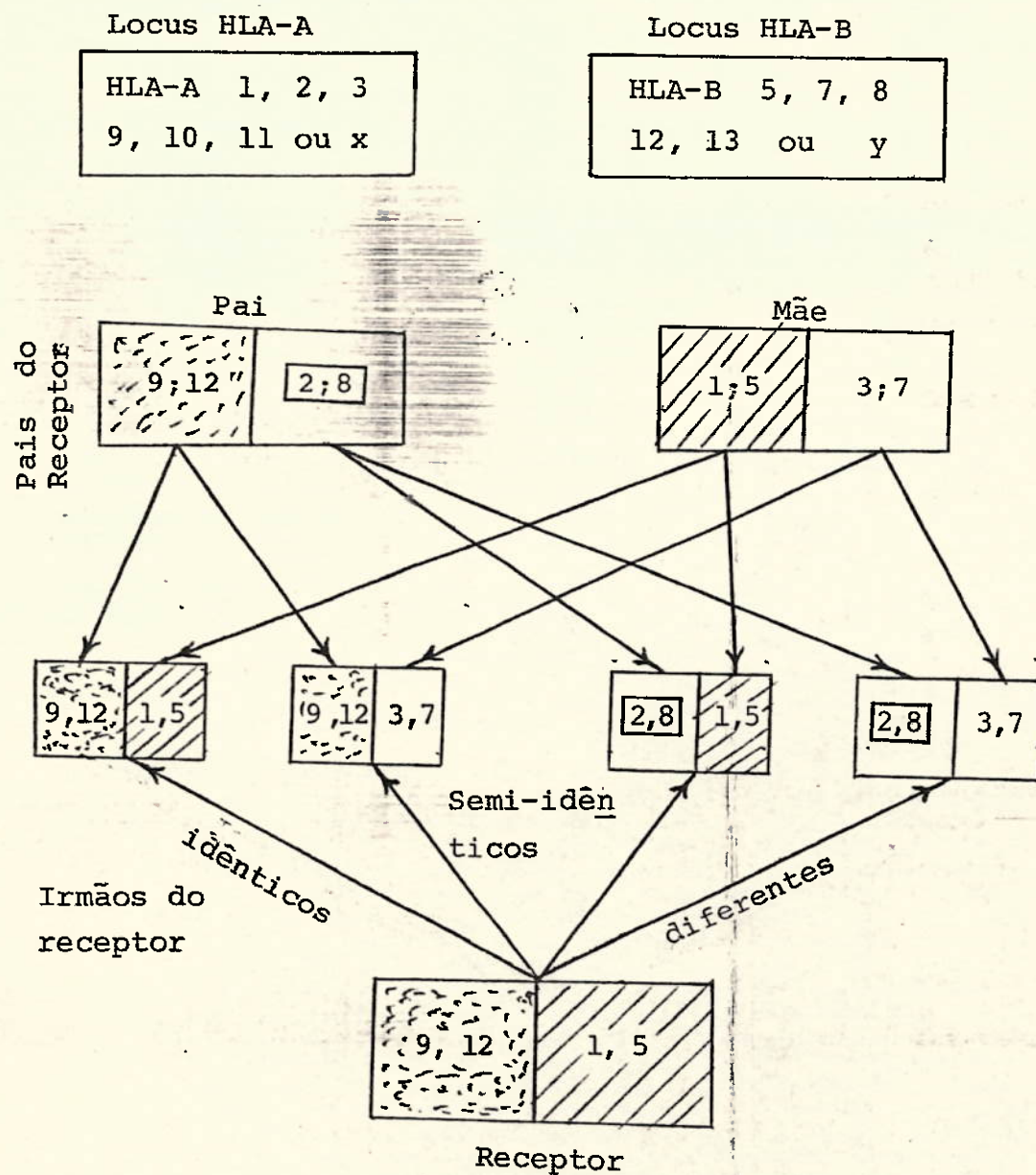


FIGURA 1 - Transmissão familiar dos antígenos HLA: o pai ou a mãe possui sempre um haplotipo HLA em comum com o filho. O irmão ou a irmã pode ter 0,1 ou 2 haplotipos em comum.

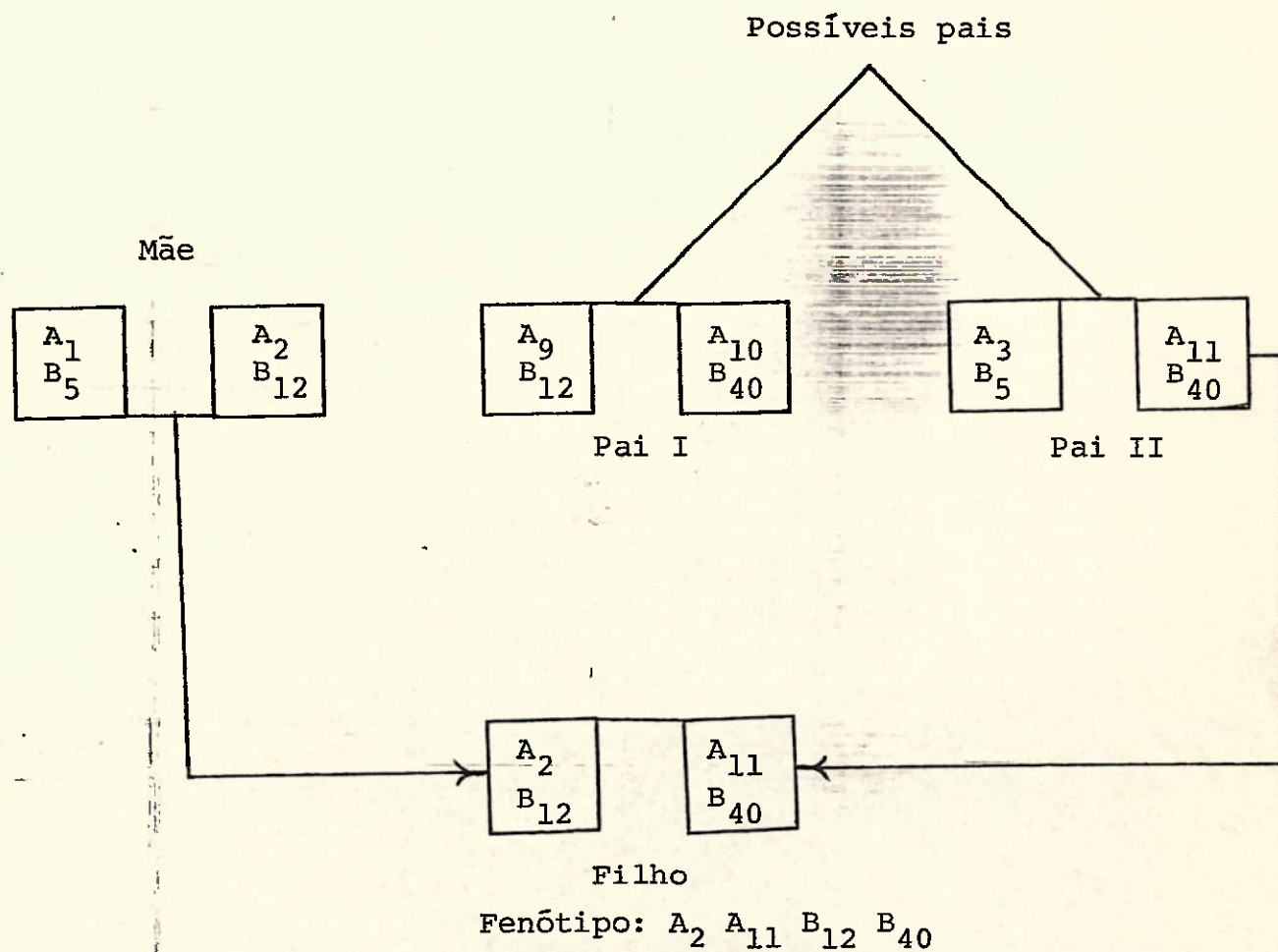


FIGURA 2 - Exclusão da paternidade pela tipagem HLA.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos no presente estudo 210 mulheres em período de pós-parto imediato, na Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC) e 20 nulíparas, no período de março a maio de 1987.

A investigação do soro foi realizada no laboratório de Histocompatibilidade do Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-Renais funcionando no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

Na ocasião da coleta do sangue, as parturientes foram submetidas a um questionário contendo os seguintes quesitos: nome, idade, estado civil, endereço, nº de gestações, nº de partos, nº de abortos e nº de transfusões.

As mulheres foram divididas em 3 grupos de acordo com o número de gestações: 73 primíparas (Grupo I), 50 secundíparas (Grupo II) e 87 multíparas (Grupo III). O grupo controle foi formado por 20 mulheres nulíparas (Grupo 0). Nenhuma mulher tendo recebido transfusão de sangue foi incluída no estudo.

As amostras de sangue de cada parturiente, aproximadamente 20ml, foram colhidas nas 72 horas(h) após o parto por punção venosa e acondicionados em frascos sem anticoagulante. Após 30 minutos (min) os soros foram separados por centrifugação a 3.000 r.p.m. durante 10 min e armazenados a -20°C . Em seguida os soros foram descongelados em grupos de 50-60 amostras, procedendo-se então a pesquisa de anticorpos linfocitotóxicos anti-HLA.

Utilizando-se microseringas de Hamilton de 50 microlitros (μl) foi colocado 1 μl do soro não diluído de cada parturiente em um dos orifícios das 25 microplacas de Terasaki utilizadas, ocupando cada soro a mesma posição em cada uma das microplacas.

Cada microplaca recebeu posteriormente as células de um doador diferente de um painel de linfócitos, havendo esses doadores sido previamente fenotipados e selecionados de modo a representar as diversas especificidades dos loci A e B.

Em cada microplaca, um mesmo orifício sempre correspondia a um testemunho negativo e um outro orifício representava um testemunho positivo. Como controle negativo foi utilizado soro de indivíduos do sexo masculino, não transfundido, de grupo sanguíneo AB, sendo o soro inativado a 56°C por 30 min. Como controle positivo foi utilizada uma ilunoglobulina de cavalo anti-linfócitos humano (Lymphoglobuline^R - Institut Merrieux, Lyon - France, lote AO - 944) na diluição de 1:128.

As especificidades dos loci A e B presentes no painel de linfócitos estão discriminadas na Tabela V. Este painel de linfócitos foi selecionado depois da fenotipagem de 60 indivíduos tomados aleatoriamente na população de Fortaleza. Para o reconhecimento dos antígenos foi utilizado a bateria de soros anti-HLA denominada FT50, proveniente do Laboratório de Histocompatibilidade do Hospital Saint Louis - Paris, França. Após a fenotipagem dos 60 indivíduos foram selecionados 25 que melhor representassem as diversas especificidades dos loci A e B, de acordo com os critérios recomendados por A. Zachary e Degelo (49).

Para a determinação dos antígenos HLA dos doadores do painel, bem como para a pesquisa de anticorpos linfocito-tóxicos anti-HLA nos soros por nós estudados, foi utilizada a técnica de microlinfocitotoxicidade descrita pela primeira vez em 1964 por Terasaki (8-19) adaptada em 1979 por Hors (16). Esta reação produz-se em dois tempos: reação antígeno-anticorpo e fixação de complemento para mediação de lise celular.

Para obtenção da suspensão linfocitária (antígeno) foram colhidos 60 ml de sangue em 0,6 ml de Heparina Sódica (Liquemine) e diluídos volume a volume com solução de NaCl 0,15 Molar. Em seguida foram colocados 30 ml do sangue diluído em tubo de fundo cônico contendo 10 ml de Ficoll-Hypaque (densidade 1077). Os tubos foram centrifugados a 1.800 r.p.m. por 20 min à temperatura de 18°C , para obtenção do anel de linfócitos existente entre o plasma sobrenadante e a camada de Ficoll-Hypaque.

Após esta etapa, o anel linfocitário foi aspirado com pipeta de Pasteur e resuspenso em solução de Hanks e no

vamente centrifugado a 1.800 r.p.m. por 10 min a 18°C. Este procedimento foi repetido mais uma vez e a concentração de células, após nova ressuspensão em solução de Hanks, foi contada em câmara de Newbauer e ajustada (rediluindo-se e concentrando-se) para uma concentração entre 2×10^6 e 3×10^6 células/mm³.

Em seguida, com a ajuda de microseringas de Hamilton de 50 µl foi colocado 1µl da suspensão de linfócitos em cada escavação da micro-placa de Terasaki que continha os soros anteriormente distribuídos.

As micro-placas foram incubadas à temperatura de 26°C por 30 min. A seguir foram adicionados 3 µl de complemento a cada escavação e a micro-placa novamente foi incubada à temperatura de 26°C por 14 min. Após este período foram acrescentados 3 µl de eosina a 5% em solução aquosa (filtrada antes do uso) e após 6 min, 6 µl de formol a 30% (pH=7,2) a cada escavação. Em seguida as micro-placas foram guardadas a 4°C e a leitura foi realizada após 24 horas em microscópio de contraste de fase.

A percentagem de células mortas; ou seja, as células que sofreram lise celular, refletem a intensidade da reação, tendo sido utilizado o seguinte score: 0 a 20%: negativo, 21 a 50%: ++, 51 a 80%: +++ e 81 a 100%: ++++.

Foram consideradas positivas apenas as reações com mais de 50% de mortalidade (+++ e ++++). Em seguida, foram realizadas a análise das reações positivas de acordo com o fenótipo de cada um dos integrantes do painel, permitindo essa análise uma separação dos soros em possivelmente monoespecíficos e poliespecíficos. No caso de soros poliespecíficos foi considerado apenas os soros em que foi identificado no máximo três especificidades. O caráter e a especificidade da sensibilização observada serão estudadas com maiores detalhes, não constituindo objetivo do presente trabalho.

Na análise estatística dos resultados foi realizado o teste do qui-quadrado (χ^2) com nível de significância (α) igual a 0,05.

TABELA V - Especificidades dos loci A e B presentes no painel de linfócitos, representando o fenótipo de 25 indivíduos.

Loci HLA A e HLA B	Frequência do Antígeno no Pannel
HLA A1	03
HLA A2	10
HLA A3	04
HLA A9	05
HLA A10	03
HLA A11	02
HLA A28	02
HLA A29	02
HLA A30	05
HLA A32	01
HLA AW33	03
HLA AW34	01
HLA B5	01
HLA B7	04
HLA B8	02
HLA B13	01
HLA B14	04
HLA B18	03
HLA B27	01
HLA BW35	05
HLA BW38	01
HLA BW39	01
HLA BW41	01
HLA BW44	05
HLA BW49	02
HLA BW50	03
HLA BW56	01
HLA BW57	03
HLA BW60	02
HLA BW61	03
HLA BW62	02
HLA BW63	01

4 - RESULTADOS

A pesquisa de anticorpos linfocitotóxicos anti-HLA foi positiva em 50 amostras de soros das 230 que foram analisadas, representando 21,7%. Considerando-se apenas o grupo experimental, ou seja, excluindo as nulíparas integrantes do grupo controle observou-se uma sensibilização da ordem de 23,5%. Como pode-se observar na Tabela VI e Figura 3, a frequência de sensibilização aumentou de acordo com o número de gestações: 15% de soros positivos nas primíparas, 20% nas secundíparas e 33% nas múltiparas. A análise pelo teste do χ^2 mostrou que a relação paridade e sensibilização é estatisticamente significativa para $\alpha = 0,05$.

Dos 50 soros positivos, 17 (34%) são possivelmente monoespecíficos. O achado desses soros possivelmente monoespecíficos foram mais freqüentes nas primíparas (54,5%) do que nas secundíparas (30%) e múltiparas (27,6%), como mostra a Tabela VII e Figura 4a. Os 33 soros poliespecíficos, representando 66% das mulheres sensibilizadas, foram observados com maior freqüência nas múltiparas (72,4%) e secundíparas (70%) do que nas primíparas, como é mostrado na Tabela VII e Figura 4b. Em razão do pequeno número das amostras, o teste do χ^2 não alcançou resultados estatisticamente significantes.

Na Tabela VIII, os 17 soros possivelmente monoespecíficos são individualizados de acordo com as especificidades HLA A e B, e com os grupos em que foram identificados. Cinco desses soros parecem específicos para o antígeno A2, que está presente em 10 dos 25 indivíduos do nosso painel. Outro antígeno contra o qual aparece o segundo maior número de soros possivelmente específicos é o B13, que está presente em apenas um dos integrantes do painel por nós utilizado. Como discutiremos mais adiante, o caráter específico da sensibilização observada nesses 17 soros carece ainda de confirmação através de estudos mais detalhados.

Em relação aos 33 soros poliespecíficos, em apenas 9 deles (27,3%) foi possível definir as possíveis especificidades contra os quais estariam dirigidos. A Tabela IX mostra essas especificidades e o número de gestações observados em

cada parturiente. Os 24 soros restantes apresentaram reativi
dade contra mais de 65% das células do painel, e por isso,
não foi possível analisar as suas especificidades.

TABELA VI - Frequência de anticorpos anti-HLA no soro de 230 mulheres segundo o número de gestações.

Grupos	Mulheres Sensibilizadas	Mulheres não Sensibilizadas	Total
Grupo 0	0	20 (100%)	20 (100%)
Grupo I	11 (15%)	62 (85%)	73 (100%)
Grupo II	10 (20%)	40 (80%)	50 (100%)
Grupo III	29 (33%)	58 (67%)	87 (100%)
TOTAL	50 (21,7%)	180 (78,3%)	230

$$\chi^2_1 = 7,080$$

$$\alpha = 0,05$$

TABELA VII - Freqüência de anticorpos monoespecíficos e poliespecíficos em 50 mulheres sensibilizadas segundo o número de gestações.

Grupos	Possíveis Especificidades		Total
	Mono específico	poliespecífico	
Grupo I	06 (54,5%)	05 (45,5%)	11 (100%)
Grupo II	03 (30%)	07 (70%)	10 (100%)
Grupo III	08 (27,6%)	21 (72,4%)	29 (100%)
TOTAL	17 (34%)	33 (66%)	50 (100%)

$$\chi^2_2 = 1,265$$

$$\alpha = 0,05$$

TABELA VIII - Especificidades HLA A e B observadas nos 17 soros pos
sivelmente monoespecificos de acordo com os grupos es
tudados.

Especificidades	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Total
A2	1	1	3	5
A9	1	0	0	1
A28	2	0	0	2
B13	1	1	2	4
BW35	1	0	1	2
B40	0	0	1	1
BW44	0	0	1	1
BW63	0	1	0	1
TOTAL	6	3	8	17

TABELA IX - Soros poliespecíficos de acordo com as possíveis especificidades HLA A e B e o número de gestações.

Nº dos Soros	Possíveis Especificidades HLA A e B	Número de Gestações
F87011	HLA B16, B27, B12	5
F87017	B7 ou B27, B5	3
F87050	HLA A2 ou A28, A9	2
F87065	HLA A2, BW57	6
F87093	AW23 B12	6
F87111	A1, A10, B27	3
F87122	A2, B7 ou B27	1
F87134	A11, B12	1
F87153	BW35 B40	1

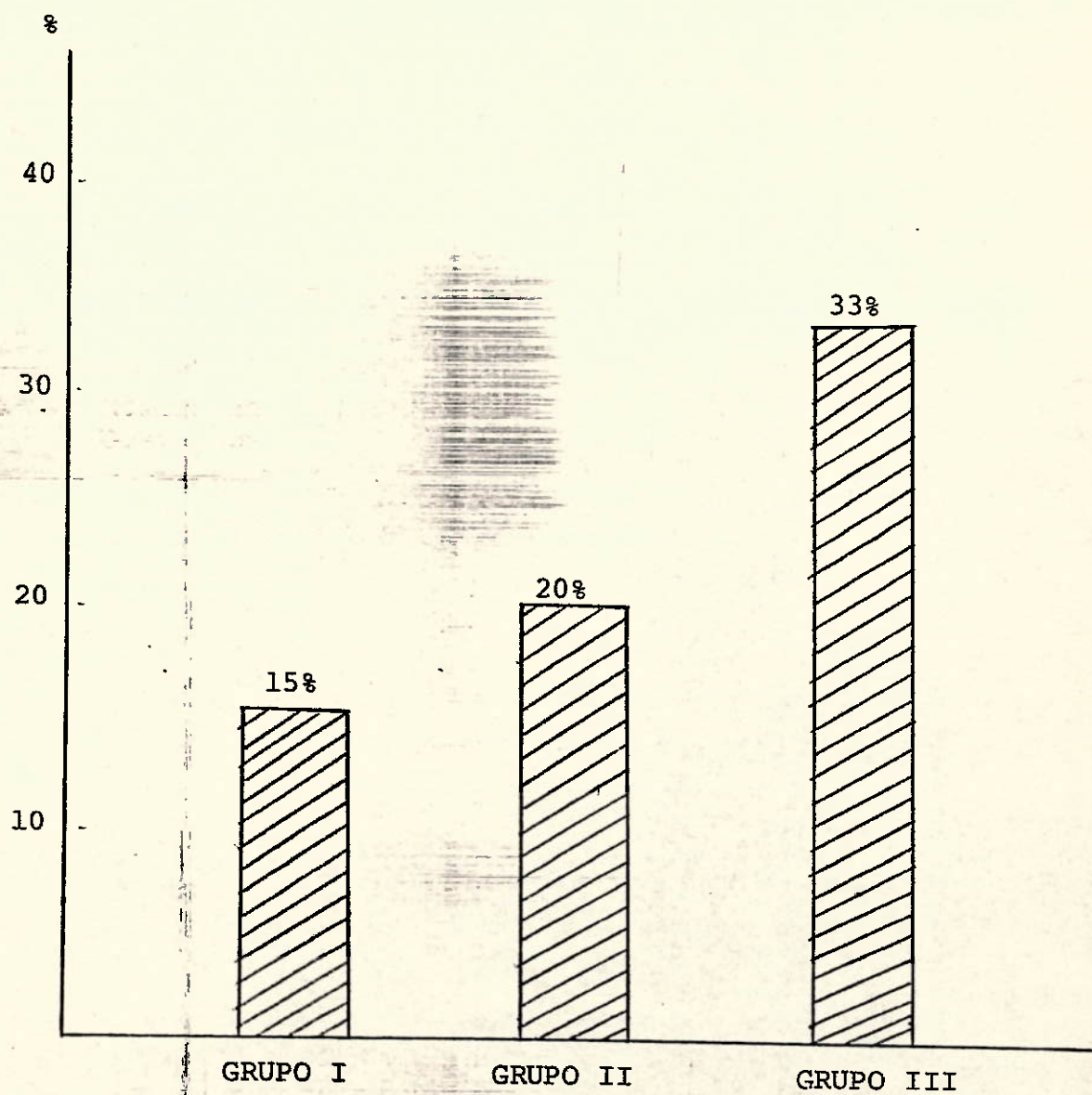


FIGURA 3 - Percentual de mulheres sensibilizadas nos grupos estudados.

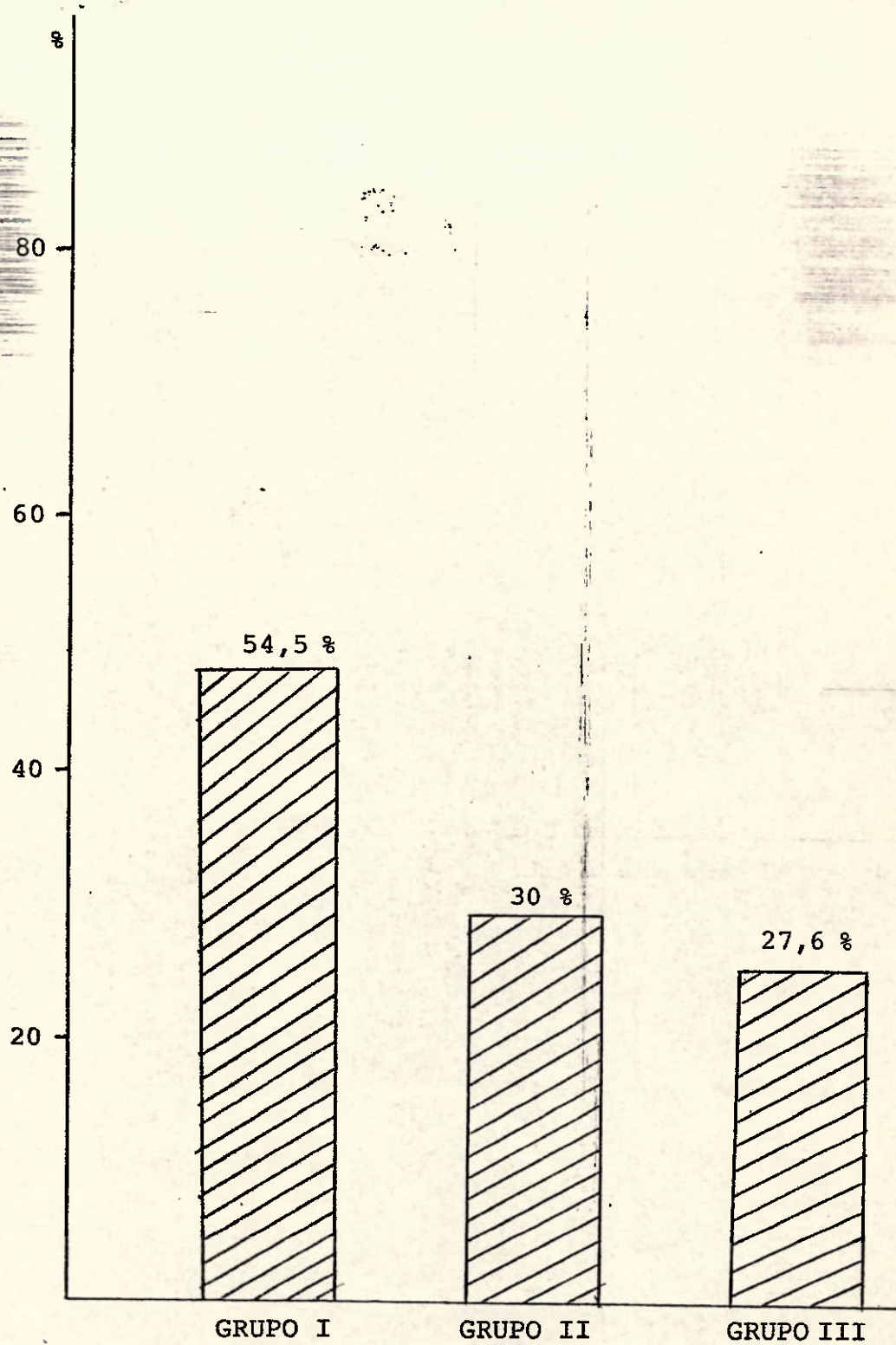


FIGURA 4a - Percentual de mulheres com possíveis anticorpos Anti-HLA monoespecíficos.

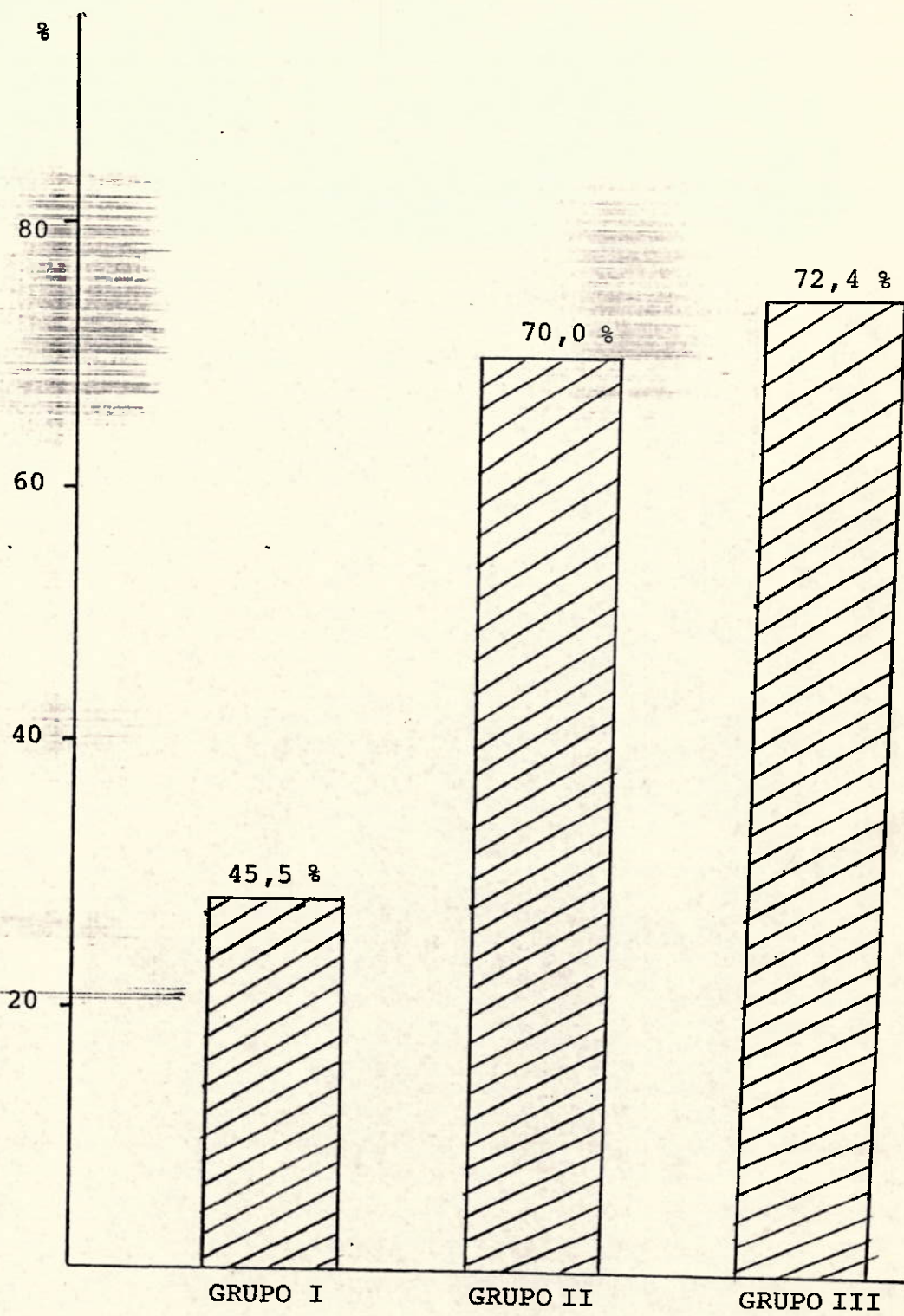


FIGURA 4b - Percentual de mulheres com possíveis anticorpos Anti-HLA poliespecíficos.

5 - DISCUSSÃO

A análise de nossos resultados também confirma a capacidade imunogênica da gestação na produção de anticorpos linfocitotóxicos anti-HLA (25-29-35-39-42-45). A ausência de sensibilização encontrada no grupo controle formado por nulíparas que nunca receberam transfusão sanguínea, confirma observações anteriores (25-29-35-39-42-45), de que apesar do alto polimorfismo do sistema HLA a imunização por esses antígenos só ocorre devido a estímulos antigênicos precisos. A saber: transfusão de sangue, plaquetas ou leucócitos HLA incompatíveis, transplante de pele ou de órgãos e gestação (14-34). A formação espontânea de anticorpos anti-HLA, embora já descrita, é ocorrência rara (20-26).

A frequência de sensibilização por nós observado, 23,5%, é semelhante aos resultados encontrados por Ahrons (1), Vives (47) e Doughty (13) - 22%, 19,6% e 19,8%, respectivamente.

Esses níveis de sensibilização podem ser influenciados pela época de gestação em que é colhida a amostra de sangue, já que são discordantes os dados disponíveis sobre o período da ocorrência de um pico na produção desses anticorpos linfocitotóxicos (2-23). Ahrons em 1971 mostrou que a incidência de atividade citotóxica é maior no período de pós-parto imediato, achado reproduzido por outros autores (1-17), e utilizado na prática pelos laboratórios que se dedicam à pesquisa e obtenção de anti-soros. Entretanto, Vives, em 1976, analisando o soro de 2686 mulheres em diferentes períodos de gestação, mostrou que na primípara haveria um pico de produção de anticorpos anti-HLA no sexto mês de gestação, diminuindo significativamente a formação desses anticorpos até o 9º mês (47). Ainda segundo esse estudo ocorreria nas múltiparas dois picos de maior atividade do soro, um no terceiro mês quando nenhuma atividade foi encontrada na primípara, e outro no sexto mês coincidindo com aquele encontrado nas primigestas. De acordo com Vives, as múltiparas podem apresentar essa atividade máxima no segundo mês, exibindo títulos crescentes entre as 16 e 37 semanas, permanecendo constantes ou diminuindo após o parto. Apesar do número significativo

de amostras estudadas por este autor, o seu trabalho não re flete um acompanhamento sequencial da produção de anticorpos durante a gestação, já que foi colhida apenas uma amostra de sangue de cada paciente, sendo vista a uma diferente idade gestacional e nunca a mesma paciente seguida ao longo de to da a gestação. Esses iso-anticorpos formados durante a gravidez podem persistir por longo tempo após o parto, como foi bem estudado por Rose Payne (24).

É possível que a persistência desses anticorpos in fluencie fortemente o aparecimento de níveis mais altos de sensibilização em gestações ulteriores. Nossos resultados 33% de sensibilização entre as múltiparas e 15% para as pri mÍparas confirma a existência de uma relação positiva entre paridade e sensibilização contra os antígenos HLA. Nossos da dos são confirmativos dos achados de Van Rood, Tongio e Dou ghty (13-24-41-42-45), mostrando um aumento da incidência de imunização durante a primeira, segunda e terceira gestação, observando-se uma estabilização do nível de anticorpos nas gestações subseqüentes.

Além da importância prática desses dados na pesqui sa de soros ricos em anticorpos dirigidos contra os antígenos HLA, como assinala Van Rood, esses anticorpos podem ser também responsáveis por reações transfusionais, principalmente em múltiparas, sendo aconselhável no caso da necessidade de transfusão, que se realizem testes de compatibilidade não só eritrocitária, mas também leucocitária, para evitar-se uma incompatibilidade com os antígenos leucocitários do doador (45-46).

Grande parte da variabilidade de freqüência e especificidade do anticorpo presente na gravidez, depende no mo mento no qual se realizam as provas de investigação, os antígenos HLA imunizantes, a freqüência de imunização, a imunorreatividade da mãe e as características do painel de linfócitos utilizados para análise do soro. E na grande maioria das vezes se trata de anticorpos poliespecíficos, que respondem a estimulação antigênica de um ou de dois haplotipos paternos.

Nossos dados também mostram o predomínio de anticorpos poliespecíficos, que ocorreu em 66% das mulheres sensibi

zadas, notadamente as que tiveram mais de uma gestação: 72,4% das múltiparas e 70% das secundíparas apresentaram anticorpos reagentes contra duas ou mais das especificidades presentes no painel. Os dados obtidos por Staub, também mostraram que os anticorpos poliespecíficos são mais frequentes em múltiparas (36).

A obtenção de soros com características fortemente sugestivas de monoespecificidades, foi mais observada no grupo das primíparas: 54,5% contra 30% e 27,6% das secundíparas e múltiparas, respectivamente. O caráter monoespecífico desses soros só poderá ser confirmado após realização de outros estudos, notadamente reações com maior número de células de indivíduos portadores do antígeno específico, em diluições variadas. A complexidade do sistema HLA torna difícil a identificação dessas especificidades e exige que esses soros sejam também testados por outros laboratórios.

O caráter e a especificidade do anticorpo durante a gravidez, segundo Tongio poderia ser evidenciado pelos seguintes fatos: o soro pode conter um único anticorpo (monoespecífico) dirigido contra um único antígeno HLA - isto ocorreria se a mãe e o pai apresentarem um haplotipo em comum e se a imunização ocorrer preferencialmente contra um anticorpo do haplotipo. O soro apresentaria uma mistura de 2 anticorpos, se a imunização ocorresse contra 2 antígenos do haplotipo paterno do feto. E por último, os soros podem conter anticorpos poliespecíficos, naonde os antígenos HLA do marido seriam responsáveis pelo aparecimento tanto do anticorpo correspondente na mãe como também pelo aparecimento do anticorpo induzido por reação cruzada.

A medida que aumenta o conhecimento do sistema HLA quanto ao seu número de loci e alelos e às suas aplicações que englobam desde os transplantes de órgãos, transfusão, associação com doenças, provas de exclusão de paternidade, resposta imune, estudos de cruzamento, mapeamento genético e investigação antropológica, aumenta também a necessidade de obtenção de maiores quantidades de soros anti-HLA de boa qualidade (3-9-11-27-35). É pouco provável, pelo polimorfismo do sistema HLA, que mesmo os anticorpos monoclonais venham a preencher num curto período de tempo essa necessidade (26).

Nossos resultados preliminares nos permitem vislumbrar com entusiasmo um futuro próximo de auto-suficiência para o nosso laboratório na produção desses anti-soros.

6 - CONCLUSÃO

1- A ocorrência de uma ou mais gestações é fator determinante na formação de anticorpos dirigidos contra o sistema HLA, já que observamos ausência de sensibilização no grupo controle formado por nulíparas, e 23,5% da sensibilização em primíparas, secundíparas e multíparas que constituíram nosso grupo experimental.

2- Observamos uma relação positiva entre paridade e sensibilização ($\chi^2 = 7,080$, $\alpha = 0,05$). Em 15% das primíparas, 20% das secundíparas e 33% das multíparas foram identificados anticorpos linfocitotóxicos anti-HLA.

3- A ocorrência de anticorpos poliespecíficos foi mais observada no grupo das secundíparas (70%) e multíparas (72,4%), do que nas primíparas (45,4%), embora o pequeno número da amostra não tenha alcançado resultados estatisticamente significantes ($\chi^2 = 1,265$, $\alpha = 0,05$).

4- Anticorpos possivelmente monoespecíficos foram observados em 54,5% das primíparas, 30% das secundíparas e 27,6% das multíparas. A monoespecificidade desses alo-anticorpos carece ainda de realização de estudos posteriores.

7 - SUMMARY

Serum samples from 210 women were taken in the 72 hours after delivery and analysed for the presence of Anti-HLA of antibodies: 23,5% of these serum presented such antibodies - 34% of them were possibly monospecific, while 66% were polyspecific. Antibodies were found in 15% of the primiparous women, in 20% of the women in the second pregnancy and in 33% of the multiparous: such a relation, between the number of pregnancies and the Anti-HLA immunization, was found to be statistically significant.

Our results were compared to those from the international literature, and they were quite similar.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHRONS, S. HLA antibodies; influence on the human foetus
Tissue antigens, 1:121-8, 1971.
2. ——. Leukocyte antibodies: Occurrence in primigravidae.
Tissue antigens, 1:178-83, 1971.
3. ALBERT, E. D.; MICKEY, M.R.; TINGA; TERASAKI, P. I. Reduction of 2140 HLA haplotypes and segregation analysis in 535 families. Transplant. Proc., 5(1):215-21, 1973.
4. AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. HLA antigens and antibodies, and their significance. In: —. Technical manual. 7. ed. Washington, DC., 1977. Cap. 11, p. 128-39.
5. AMOS, D.B. & YUNIS, E. J. A New interpretation of the major histocompatibility gene complexes of man and mouse. Cell. Immunol., 2:517-20, 1971.
6. AMOS, D.B.; POOL, P.; GRIER, J. HLA-A, HLA-B, HLA-C y DR. In: ROSE, N.R. & FRIEDMAN, H. El Laboratorio en inmunología clínica. 2. ed. Buenos Aires, Médica Panamericana, 1984. Cap. 129, p. 1076-85.
7. BACH, J.F. A imunogenética de transplante, o complexo principal de histocompatibilidade. In: —. Imunologia. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. Cap. 23, p. 369-88.
8. BENDER, K. HLA system Biotest. Bull., 2:64-116, 1984.
9. CROSS, D.E.; WHITTIER, F.C.; GREINER, R.F. Preparation of monospecific HLA antibodies from cross-reactive multispecific antisera. Tissue antigens, 8:101-8, 1976.
10. DAUSSET, J. The major histocompatibility complex in man. Science, 213(4515):1469-74, 1981.
11. ——. Perspectivas in inmunologia e imunogenética de los transplantes. In: ROSE, N.R. & FRIEDMAN, H. El laboratorio en inmunología clínica. 2. ed. Buenos Aires, Médica Panamericana, 1984. Cap. 127, p. 1060-2.
12. DAUSSET, J. Leuco-agglutinins IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion - Vox Sang. 4:190 (1954).

13. DOUGHTY, R. W. & GELSTHORPE, K. Same parameters of lymphocyte antibody activity through pregnancy and further eluates of placenta material. Tissue antigens, 8:43-8, 1976.
14. GENETET, B. & MANNONI, P. Sistema HLA. In: —. La Transfusion. Cuba, Ed. Revolucionária, 1980. Cap. 13, p. 478-524.
15. HOOD, L.; STEINMETZ, M.; GOODNOW, R. Genes of the major histocompatibility complex. Cell, 28:685-7, 1982.
16. HORS, J. Microlymphocytotoxicite (groupage pour les antigenes HLA de locus A, B, et C). Tecnicien Biol., 516:497-7, 1979.
17. JENSEN, K. G. Leucocyte antibodies in serums of pregnant women. Vox. Sang., 7:454-69, 1962.
18. JOYCE, L. Le systeme HLA. Tecnicien Biol., 314:421-4, 1979.
19. LAVEENSTEIN, K. J. Lymphocytotoxicity test for typing In: MALLORY, D. & FAWLETT, K. HLA Techniques for blood bankers. Arlington, Virginia, 1984. Cap. 3, p. 33-76.
20. LEPAGE, V.; DEGOS, L.; DAUSSET, J. Descriptive serological analysis. Tissue antigens, 5:301-14, 1975.
21. MOLLISON, P. L. Antigens on leucocytes, platelets and serum proteins. In: —. Blood transfusion in clinical medicine. 7. ed. Oxford, Blackwell Scientific, 1983. Cap. 15, p. 699-728.
22. OH, J. H. & MacLEAN, L.D. Comparative immunogenicity of HLA-A antigens: a study in primiparas. Tissue antigens, 5:33-7, 1975.
23. OVERWEG, J. & ENGELFRIET, P. Cytotoxic leucocyte ISO-antibodies formed during the first pregnancy. VOX Sang., 16(1):97-104, 1969.
24. PAYNE, R. The development and persistence of leukoagglutinins in parous women. Blood, 19(4):411-24, 1962.
25. PAYNE, R. & ROLFS, M.R. Fetomaternal leukocyte incompatibility J. Clin. Invest., 37(12):1756, 1958.
26. RAFFOUX, C. Comunicação pessoal.

27. RODEY, G. E.; STURM, B.; ASTER, R.H. Crossreactive HLA antibodies. Separation of multiple HL-A antibody specificities by platelet adsorption an acid. Tissue antigens, 3:63-9, 1973.
28. ROSALES, T.; XAVIER, M.A.; DIVINOMAR, P. de O.; MELO, C. P.; COSSERMELLI, W. Antigenos HLA em população de São Paulo. HC. Rev. Hosp. Clin., 40(1):27-31, 1985.
29. SCHRODER, J. Passage of leukocytes from mother to fetus. Scand. J. Immunol., 3(3):369-73, 1974.
30. SCHRODER, J. & CHAPELLE, A. de la. Fetal lymphocytes in The maternal blood. Blood, 39(2):153-62, 1972.
31. SCHRODER, J.; TIILIKAINEN, A.; CHAPELLE, A. de la. Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery. Transplantation, 17(4):346-54, 1974.
32. SEIGNALET, J. HLA et maladies. In: —. Le Complexe genetique HLA. Montpellier, 1983. Cap. 8, p. 101-22.
33. SEIGNALET, J. Les Lous HLA-A, B, C. In: —. Le Complexe genetique HLA. Montpellier, 1983. Cap. 2, p. 13-48.
34. SEIGNALET, J. Notion generales et historique, In: —. Le Complex genetique HLA. Montpellier, 1983. Cap. 1, p. 1-12.
35. STASTNY, P. Tissue Typing antigena from immunization by pregnancy. Tissue antigens, 2:123-7, 1972.
36. STAUBL, N. & SVEJGAARD, A. H.L.A. imunization and HLA Types in pregnancy. Tissue antigens, 2:315-27, 1972.
37. SVEJGAARD, A. HLA y enfermedad. In: ROSE, N.R.; FRIEDMAN, H. El Laboratorio en inmunologia clinica. 2. ed. Buenos Aires, Médica Panamericana, 1984. Cap. 137, p. 1153-63.
38. TIILIKAINEN, A.; SCHRODER, J.; CHAPELLE, A. de la. Fetal leukocytes in the maternal cuculation after delivery. Transplantation, 17(4):355-60, 1974.
39. TONGIO, M.M. & MAYER, S. Narrowing of feto-maternal immunization at time of delivery. Tissue antigens, 9: 174-6, 1977.
40. TONGIO, M. M.; BERREBI, A.; MAYER, S. Anti-HL-A foeto-maternal immunization. Persistence of antibodies Tis

sue antigens, 3:115-22, 1973.

41. —. A study of lymphocytotoxic antibodies in multiparous having had at least four pregnancies. Tissue antigens, 2:378-88.
42. TONGIO, M. M.; BERREBI, A.; PFEIFFER, B.; MAYER, S. Sero logical studies on lymphocytotoxic antibodies in primiparous women. Tissue antigens, 1:243-57, 1971.
43. TONGIO, M. M.; MAYER, S.R.; LEBEC, A. Transfer of HLA-A antibodies from the mother to the child. Transplantation, 20:(2):163-6, 1975.
44. UNANUE, E.R. & BENACERRAT, B. Histocompatibilidad. In:—. Imunologia. 2. ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1986. Cap. 6, p. 105-20.
45. Van ROOD, J. J.; EERNISSE, J.G.; Van LEEVWEN, A. Leucocyte Antibodies in sera from pregnant women. Nature, 181(4625):1735-6, 1958.
46. Van ROOD, J. J.; Van LEEVWEN, A.; EERNISSE, J. G. Leucocyte antibodies in the sera of pregnant women. Vox Sang., 4(6):427-44, 1959.
47. VIVES, J.; GELABERT, A.; CASTILLO, R. HLA antibodies and period of gestation: decline in frequency of positive sera during last trimester. Tissue antigens, 7:209-12, 1976.
48. WEISZ, P. THE HLA system. In:—. Principles of clinical immunohematology. Chicago, Year Book, 1986. Cap. 7, p. 218-35.
49. ZACHARY, A.A.; DEJELO, C.L.; KAYHOE, D.G.; BRAUN, W. E. Investigación de anticuerpos HLA en sueros. In: ROSE, N.R. & FRIEDMAN, H. El Laboratorio en inmunología clínica. 2. ed. Buenos Aires, Médica Panamericana, 1984. Cap. 128, p. 1063-75.
50. ZMIJEWSKI, C.M. Historical overview of HLA techniques In: MALLORY, D. & FAWCETT, K. HLA techniques for blood bankers. Arlington, Virginia, American Association of Blood Banks, 1984. Cap. 1, p. 1-20.