

MARIA DAS GRAÇAS LIMA COELHO

DETERMINAÇÃO DA CLASSE DE IMUNOGLOBULINA DE ANTI
CORPOS LINFOCITOTÓXICOS EM CANDIDATOS A
TRANSPLANTE RENAL

Trabalho apresentado como requisito
final ao título de Especialista em
Hematologia e Hemoterapia.

HEMOCE
FORTALEZA - CEARÁ

1990

"Os vencedores da batalha da vida são
homens que sem se julgarem gênios con
venceram-se de que só pela perseve
rança e esforço poderiam chegar ao
fim almejado."

Aos meus avós
dedico este Trabalho.

AGRADECIMENTOS

- A DEUS, de modo especial, o dom da vida. Com Ele, vieram as maravilhas que desfrutei no dia-a-dia, e o êxito de mais uma etapa vencida.
- Aos mestres que repartiam conosco os seus conhecimentos, colocando em nossas mãos as ferramentas com as quais abriremos novos horizontes.
- À Dra. Laise Chaves Vieira pela valiosa colaboração na orientação e revisão deste trabalho.
- À Dra. Sílvia Fernandes Ribeiro da Silva pelas informações recebidas e, acolhida no laboratório, os meus conhecimentos e sincera gratidão.
- A todos os amigos que me auxiliaram e prestaram contribuições afetivas para a realização deste trabalho, em especial aqueles que fazem o laboratório de HLA, meu eterno reconhecimento e amizade.

ÍNDICE

	<u>PÁGINA</u>
I - INTRODUÇÃO	02
II - MATERIAL E MÉTODOS	05
III - RESULTADOS	10
IV - DISCUSSÃO	17
V - CONCLUSÃO	19
VI - SUMMARY	20
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

**DETERMINAÇÃO DA CLASSE DE IMUNOGLOBULINA DE ANTICORPOS
LINFOCITOTÓXICOS EM CANDIDATOS A TRANSPLANTE RENAL**

MARIA DAS GRAÇAS LIMA COELHO*

A classe de imunoglobulina de anticorpos linfocitotóxicos (ACL) foi determinada em 53 amostras de soros provenientes de 49 pacientes candidatos à transplante renal potencialmente sensibilizados contra os antígenos do sistema HLA. Inicialmente essas amostras foram testados frente a um painel de linfócitos (PRA), em seguida tratadas com dithiothreitol (DTT) de acordo com o padrão de reatividade apresentado e retestadas após tratamento. Foi observado uma perda de 6% de reatividade contra o painel, enquanto que 94% dos soros apresentaram reatividade, demonstrando que a maioria dos anticorpos pertenciam a classe IgG. Na população por nós estudada, provavelmente em decorrência de transfusões repetidas, a frequência de anticorpos da classe IgM foi inferior àquela descrita na literatura internacional.

* Farmacêutica-Bioquímica, aluna do Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia.

I - INTRODUÇÃO

Os anticorpos linfocitotóxicos anti-HLA (ACL) são anticorpos que surgem como consequência de uma aloimunização. Esses aloanticorpos aparecem essencialmente em três categorias de indivíduos: os politransfundidos, com sensibilização por antígenos leucocitários e plaquetários do doador; as mulheres grávidas, com sensibilização da mãe por antígenos fetais herdados do pai e os transplantados com rejeição prévia do enxerto por antígenos de histocompatibilidade, como por exemplo, do rim do doador. (14, 16, 20, 32, 34, 35, 36)

A imunização contra os antígenos HLA depende de vários fatores, entre os quais, os mais importantes são a periodicidade e a repetição da estimulação, a qualidade do componente hemoterápico transfundido (leucócitos, plaquetas etc) e a frequência do antígeno HLA em uma dada população. (16, 32)

A resposta humoral ocorre geralmente a partir do momento em que não existe compatibilidade HLA entre o receptor e doador (16). Esta resposta pode levar a aparição de anticorpos linfocitotóxicos no soro dos pacientes candidatos a transplante renal e conseqüentemente, os mesmos serão excluídos do transplante, pois esses anticorpos quando dirigidos contra os linfócitos do doador, especialmente os linfócitos T, são responsáveis pelas rejeições hiperagudas ou aceleradas. Essas imunoglobulinas são na maioria das vezes, da classe IgG, mas em alguns casos podem também ser da classe IgM. (1, 14, 18, 34, 36).

Antes da realização de um transplante renal são efetuados testes de seleção imunológica do receptor e do doador como: tipagem ABO, tipagem sorológica dos antígenos HLA

de classe I (A, B e C) e classe II (Dr) e provas cruzadas. (35)

Em transplantes renais intervivos e com rim de cadáver, indicam-se usualmente provas cruzadas periódicas ("screening") contra linfócitos de vários indivíduos normais, o que se conhece como painel de linfócitos (PRA) e provas cruzadas ("crossmatches") algumas horas antes do transplante com linfócitos totais ou subpopulações linfocitárias do doador. (8, 19, 35)

Ao contrário do que vem ocorrendo com a tipagem HLA, cuja importância prognóstica em transplante renal vem sendo questionada por muitos, desde o advento da ciclosporina A, a utilização de técnicas de "crossmatches" atestam bem o valor deste exame, indicador único da evolução imediata do transplante renal, ou seja, quando positivo pressupõe presença de anticorpos formados no receptor contra antigênos de histocompatibilidade do doador, enquanto um "crossmatch" negativo indicaria exatamente o contrário. (5, 13, 18, 24, 35)

Outro fator que pode ser importante neste contexto é a natureza do anticorpo responsável pelo "crossmatch" positivo. Assim se o anticorpo for da classe IgM a evolução do transplante renal tende a ser boa, ao passo que se for IgG tende a ser má, pois tem sido demonstrado que os anticorpos IgM não são anticorpos perigosos, o que permite uma evolução satisfatória do enxerto. (1, 7, 18, 31, 35)

A distinção dos anticorpos de classe IgG dos de classe IgM foi inicialmente estudada por Deutsch e Morton em 1957 (26, 29) com utilização do 2-Mercaptoetanol (2-ME) que inativava a molécula de IgM através da clivagem das pontes de sulfeto, dividindo a molécula em subunidades de 19s para 7s. Este reagente porém não foi bem aceito por di

ref 29, de
1974 x 226
de 1976.
Sua primeira
em 1957
de 1976
o livro de 1960
1960-1961?

versos centros em todo o mundo. (21, 25, 26, 29)

regredir de 57 → 54?

Em meados de 1954, Cleland (10) em substituição ao 2-ME introduziu como agente dissulfídrico redutor o Dithiothreitol (1,4 dimercapto 2,3 butanodiol) comumente chamado de DTT, proporcionando assim um método mais simples, rápido, inodoro e menos irritante que o 2-ME (6, 21, 25, 26, 29)

O presente estudo teve como objetivo determinar a classe de imunoglobulina de anticorpos linfocitotóxicos nos soros de pacientes portadores de insuficiência renal crônica que apresentaram reatividade frente ao painel de linfócitos. O conhecimento da natureza e especificidade desses anticorpos é da maior relevância para a sobrevivência dos transplantes renais.

II - MATERIAL E MÉTODOS

Em um estudo anterior foram analisados 947 amostras de soros provenientes de 244 pacientes portadores de insuficiência renal crônica (IRC) candidatos a transplante renal. Este estudo teve como objetivo verificar o padrão de sensibilização anti-HLA dos candidatos a transplante renal segundo o número de soros testados por pacientes: 87 pacientes apresentaram apenas 1 soro; 42 pacientes apresentaram 2 soros e 115 pacientes apresentaram 3 ou mais soros (33).

As amostras de soros foram obtidas de 10 a 15 dias após cada transfusão e armazenadas a -20°C . No momento da análise, os soros foram descongelados, procedendo-se então a pesquisa de anticorpos linfocitotóxicos anti-HLA, utilizando-se a técnica de microlinfocitotoxicidade, descrita pela primeira vez em 1964 por Terasaki. (3; 22)

Após a análise dos soros, os pacientes ficaram divididos nos seis padrões de sensibilização observados frente ao painel de linfócitos. Padrão (+) - pacientes sensibilizados; padrão (-+) pacientes que inicialmente não eram sensibilizados e que em seguida se sensibilizaram; padrão (+-) pacientes sensibilizados que em seguida perderam a sensibilização; Padrão (-+-) pacientes que inicialmente não eram sensibilizados, sensibilizaram-se e em seguida perderam a sensibilização; padrão (+++) pacientes que inicialmente eram sensibilizados, perderam a sensibilização e em seguida se sensibilizaram; padrão (-) pacientes não sensibilizados.

Como mostra a tabela I, 66 pacientes apresentaram o padrão (+), 25 o padrão (-+), 05 o padrão (+-), 18 o pa

drão (-+-), 10 o padrão (+-+) e 120 pacientes apresentaram o padrão (-), ou seja, não apresentaram reatividade contra o painel de linfócitos.

Para o presente estudo desses 947 soros foram selecionados 53, provenientes de 49 pacientes distribuídos por diferentes padrões, segundo a tabela II: 11 soros pertenciam ao padrão (+); 16 ao padrão (-+); 5 ao padrão (+-); 8 ao padrão (-+-) e 9 soros pertenciam ao padrão (+-+). Os soros pertencentes ao padrão (-) e os demais soros que não apresentaram reatividade contra o painel de linfócitos foram excluídos desse estudo.

Em seguida usando a técnica de Profsky e Rosner (29) esses soros foram tratados com DTT, afim de determinar a classe de imunoglobulina responsável pela reatividade contra o painel.

A solução de DTT 50mM (0,007715g + 1ml de RPMI) foi preparada e estocada em alíquotas de 10 microlitros (μ l) a -20°C . No momento do tratamento foi adicionado 10 μ l de DTT a 90 μ l de soro de cada paciente e incubado a 37°C por 30 minutos. O controle, soro sem DTT, foi simultaneamente incubado.

Utilizando-se microseringas de Hamilton de 50 μ l foram adicionados à microplacas de Terasaki 1 μ l em triplicata, do soro tratado com DTT e do controle.

Cada microplaca recebeu posteriormetne as células de um painel de linfócitos (PRA), constituído de 38 células selecionadas de especificidade conhecida, onde 90% dos antígenos HLA estão representados. Esse painel de linfócitos foi o mesmo utilizado no estudo anterior.

As microplacas foram incubadas à temperatura am

biente por 30 minutos. A seguir foram adicionados 5 μ l de complemento a cada escavação da placa e novamente incubadas por uma hora. Após este período foram acrescentados 3 μ l de solução de eosina a 5% e após seis minutos, 6 μ l de formol a 30% em cada orifício. Em seguida as microplacas foram guardadas a 4°C e a leitura 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: 0-20% negativo; 21 a 50% ++; 51 a 80% +++; 81-100% +++. Foram consideradas positivas apenas as reações com mais de 50% de mortalidade. (+++ e ++++)

Todos os testes foram realizados no laboratório de Histocompatibilidade e Imunologia de Transplantes do Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-Renais localizado no Centro de Hematologia e Hematerpia do Ceará (HEMOCE).

TABELA I

PADRÃO DE SENSIBILIZAÇÃO ANTI-HLA EM 244 CANDIDATOS
A TRANSPLANTE RENAL SEGUNDO O NÚMERO
DE SOROS TESTADOS POR PACIENTE

PADRÕES Nº DE SOROS	PADRÕES						TOTAL
	—	+	— +	+ —	— + —	+ — +	
1	51 (59)	36 (41)	—	—	—	—	87
2	24 (57)	06 (14)	09 (22)	3 (7)	—	—	42
≥ 3	45 (39)	24 (21)	16 (14)	02 (2)	18 (15)	10 (9)	115
TOTAL	120 (49)	66 (27)	25 (10)	05 (2)	18 (8)	10 (4)	244 (100)

Obs.: OS VALORES ENTRE PARÊNTESES REPRESENTAM AS PERCENTAGENS

TABELA II
DISTRIBUIÇÃO DOS 49 PACIENTES SELECIONADOS POR
DIFERENTES PADRÕES, SEGUNDO O NÚMERO
DE SOROS TESTADOS POR PACIENTES

PADRÕES Nº DE SOROS						
	+	- +	+ -	- + -	+ - +	
1	6 (100)	-	-	-	-	6
2	3 (37)	2 (26)	3 (37)			8
≥ 3	2 (6)	14 (40)	2 (6)	8 (23)	9 (25)	35
TOTAL	11 (22)	16 (33)	5 (10)	8 (16)	9 (19)	49 (100)

Obs.: OS VALORES ENTRE PARENTESES REPRESENTAM AS PERCENTAGENS.

III - RESULTADOS

Após as 53 amostras de soros terem sido tratadas com DTT e retestadas contra o painel de linfócitos, nossos resultados mostraram que em apenas 3 (6%) dos soros, a reatividade foi completamente inibida contra o painel de linfócitos, demonstrando a presença de anticorpos da classe IgM. No entanto, a maior percentagem de anticorpos (94%), presentes nos soros, foram os da classe IgG, que reagiram quando retestados contra o painel da seguinte maneira: 47 (88%) dos soros permaneceram com a mesma reatividade verificada antes do tratamento com DTT e 3 (6%) dos soros exibiram aumento da reatividade. Estão expressos na tabela III e na figura 1 os resultados acima citados.

Como se pode observar na Tabela IV e na Figura 2, os soros sensíveis ao DTT pertenciam a pacientes que se submeteram a menos de 10 transfusões, representando 6% do total de pacientes, e que a frequência de sensibilização por anticorpos da classe IgG aumenta de acordo com o número de transfusões sanguíneas.

A Tabela V e Figura 3 demonstram que os anticorpos sensíveis ao DTT (Ac. IgM) foram detectados naqueles soros que apresentaram antes do tratamento com DTT, percentuais entre 25-75% de reatividade contra as células do painel.

TABELA III
REATIVIDADE OBSERVADA NAS AMOSTRAS DE SORO
CONTRA O PAINEL DE LINFÓCITOS APÓS
TRATAMENTO COM DTT

REATIVIDADE	Nº DE SOROS	%
PERMANECEU	47 (IgG)	88
INIBIDA	3 (IgM)	6
AUMENTADA	3 (IgG)	6
TOTAL	53	100

Obs.: OS VALORES ENTRE PARENTESSES REPRESENTAM
AS PERCENTAGENS.

FIGURA 1
INCIDÊNCIA DE IMUNOGLOBULINA DE CLASSE IgG E
CLASSE IgM NAS 53 AMOSTRAS
DE SORO ESTUDADAS

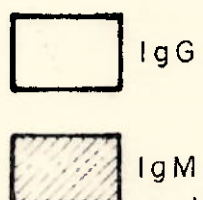
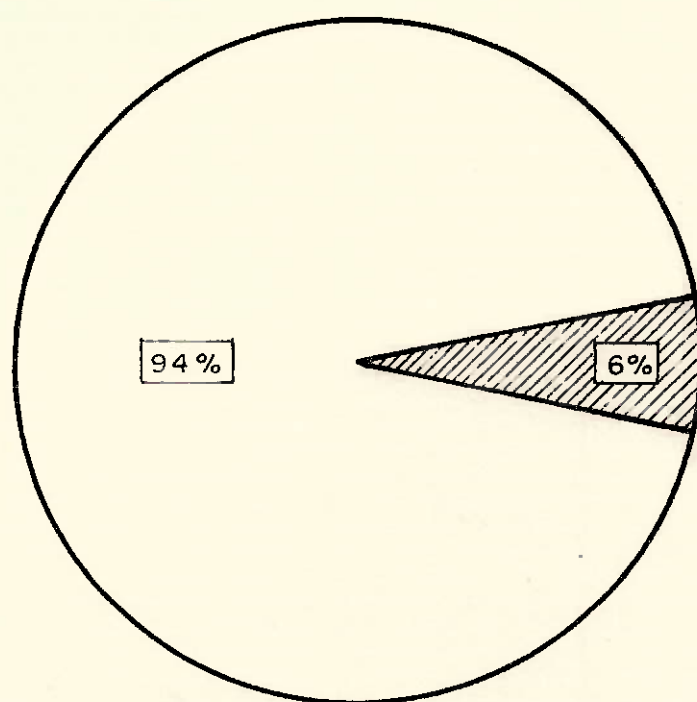


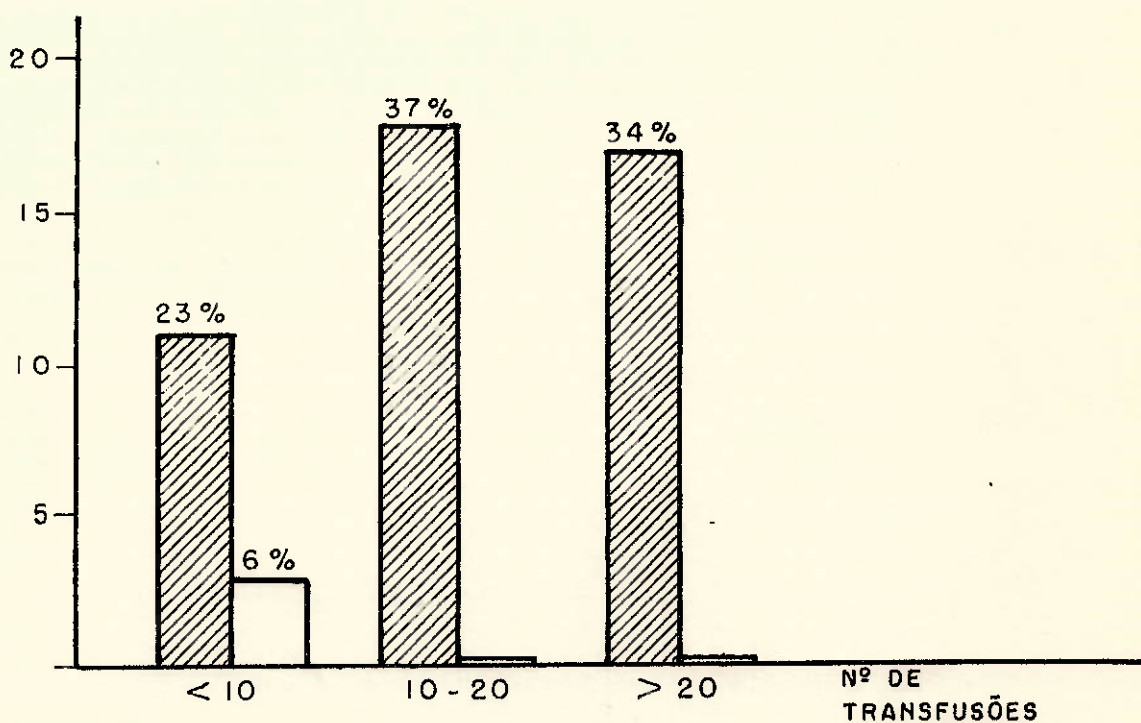
TABELA IV
FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS SENSÍVEIS E NÃO SENSÍVEIS
AO DTT, NOS CANDIDATOS A TRANSPLANTE
RENAL, SEGUNDO O NÚMERO DE TRANSFUSÕES

DTT Nº DE TRANSFUSÕES			TOTAL
	SENSÍVEL	NÃO SENSÍVEL	
< 10	3 (6)	11 (23)	14 (29)
10 - 20	-	18 (37)	18 (37)
≥ 20	-	17 (34)	17 (34)
TOTAL	3 (6)	46 (94)	49 (100)

Obs.: OS VALORES ENTRE PARENTESSES REPRESENTAM AS PERCENTAGENS.

PERCENTUAL DE PACIENTES SENSÍVEIS E NÃO
SENSÍVEIS AO DTT, SEGUNDO O
NÚMERO DE TRANSFUSÕES

Nº DE PACIENTES
SENSIBILIZADOS



IgG

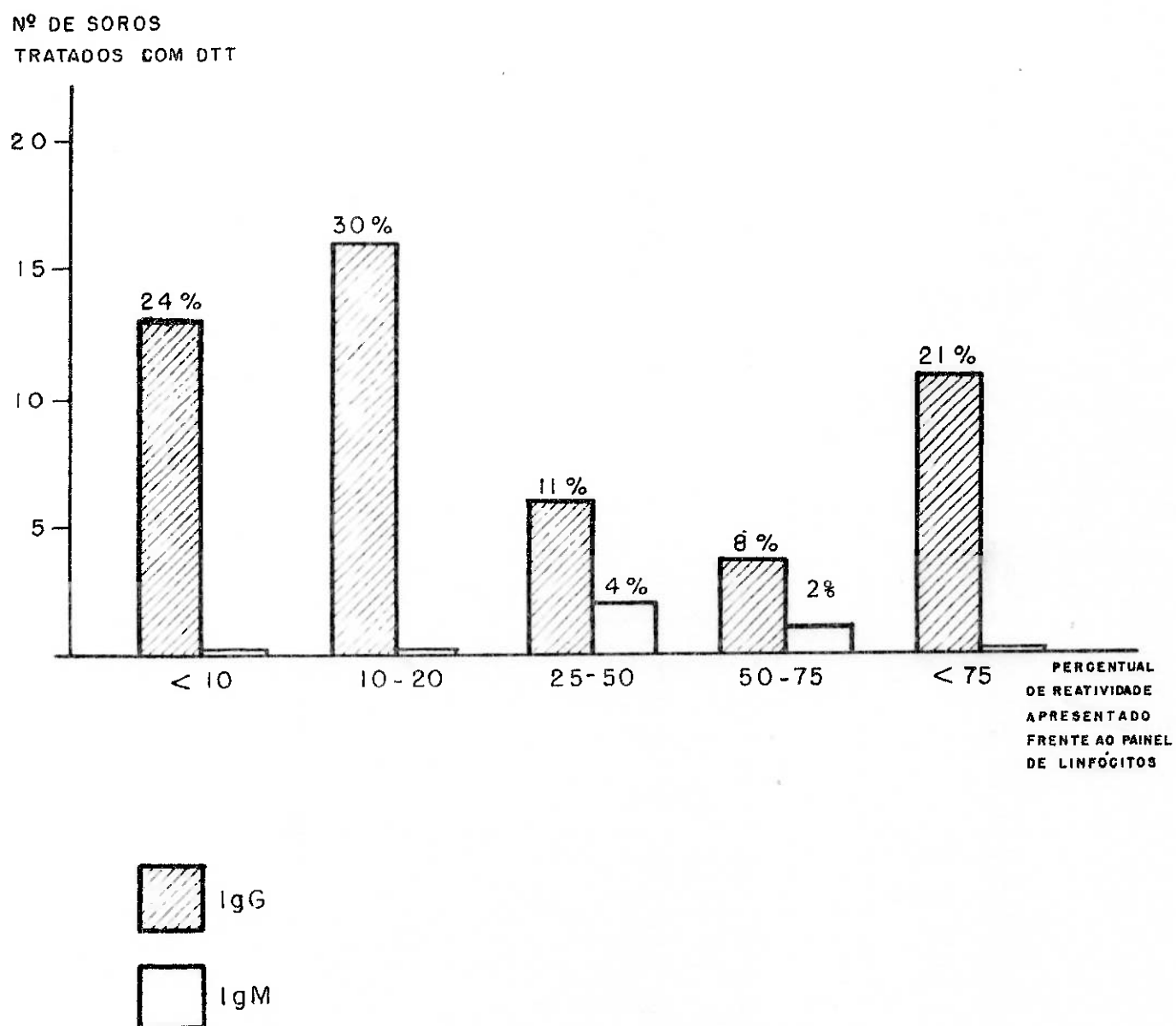
IgM

TABELA V
DISTRIBUIÇÃO DAS 53 AMOSTRAS DE SOROS, SEGUNDO
O PERCENTUAL DE REATIVIDADE APRESENTADO FRENTE
AO PAINEL DE LINFÓCITOS ANTES DO
TRATAMENTO COM DTT

DTT %			TOTAL
	SENSÍVEL	NÃO SENSÍVEL	
< 10	-	13 (24)	13 (24)
10 - 20	-	16 (30)	16 (30)
25 - 50	2 (4)	6 (11)	8 (15)
50 - 75	1 (2)	4 (8)	5 (10)
> 75	-	11 (21)	11 (21)
TOTAL	3 (6)	50 (94)	53 (100)

Obs.: OS VALORES ENTRE PARENTÊSES REPRESENTAM AS PERCENTAGENS.

PERCENTUAIS DE REATIVIDADE APRESENTADOS PELAS 53
AMOSTRAS DE SOROS, CONTRA O PAINEL DE LINFÓCITOS
ANTES DO TRATAMENTO COM DTT



IV - DISCUSSÃO

Estudos anteriores (18, 19, 30) relataram que nos indivíduos candidatos a transplante renal existia uma maior frequência de sensibilização por anticorpos de classe IgG e os anticorpos de classe IgM eram encontrados principalmente no soro daqueles pacientes menos transfundidos, idosos e que apresentavam lupus eritematoso sistêmico. Analisando nossos resultados, observamos que 94% dos soros não perderam sua reatividade quando tratados com DTT, o que demonstrou que a maioria dos pacientes estavam sensibilizados por anticorpos da classe IgG. A percentagem de anticorpos da classe IgM 6%, encontrada na população por nós estudada, provavelmente em decorrência de transfusões repetidas foi inferior àquelas descritas por Terasaki (18), T. Rudy (31) e Kalil (19) - 26%; 9,5%; 25%, respectivamente.

Em nossa investigação foi verificado que 6% dos soros, após tratamento com DTT exibiram aumento da reatividade frente ao painel de linfócitos, achado semelhante ao de Kalil em 1989 (19). Ainda não está bem definida e explicada a razão desta ocorrência. Postula-se que tal efeito ocorre porque durante o tratamento com o DTT, o mesmo age a nível de membrana celular expondo melhor os antígenos de histocompatibilidade que algumas vezes não estão bem expressos na membrana linfocitária, levando a um aumento da reatividade. (31)

A literatura mostrou (7, 18, 31) que a maior frequência de rejeição hiperaguda do enxerto é devido aos anticorpos linfocitotóxicos da classe IgG presentes no soro do receptor e dirigidos contra os antígenos de histocompatibi

lidade do doador. Esses anticorpos anti-HLA sempre levam a um resultado de "crossmatch" positivo", sendo uma forte contra-indicação para o transplante. Porém quando a sensibilização é devido a anticorpos linfocitotóxicos da classe IgM, mesmo após "crossmatch" positivo o transplante pode ser feito com segurança, pois tem sido demonstrado serem anticorpos inócuos.

Terasaki em 1988 (18) relatou treze casos de transplante de rim realizados com sucesso após "crossmatch" positivo contra linfócitos T do doador, devido a anticorpos da classe IgM.

Os anticorpos da classe IgM são considerados por muitos autores como inofensivos, porque na maioria das vezes eles reagem inespecificamente com vários antígenos, através de reações cruzadas, dando reações positivas mas que raramente são contra os antígenos HLA de classe I. (7)

Visto isso, deduzimos que é de extrema importância tomar conhecimento tanto da classe de imunoglobulina, responsável pela sensibilização do paciente como de sua especificidade. Informações como estas darão uma conotação diferente na interpretação do "corssmatch" positivo, indo influenciar definitivamente no successo do transplante daqueles pacientes que antes estavam relegados de serem transplatados.

V - CONCLUSÃO

Foi determinada a classe de imunoglobulina de anticorpos linfocitotóxicos em 53 amostras de soros pertencentes a 49 pacientes candidatos a transplante renal e que apresentaram reatividade contra o painel de linfócitos. A frequência de sensibilização por anticorpos da classe IgG encontrada foi de 94%, enquanto que a da classe IgM foi de 6%. Concluimos que a maioria dos pacientes estavam sensibilizados por anticorpos da classe IgG enquanto que uma pequena parte estavam sensibilizados por anticorpos da classe IgM.

Apesar da pequena percentagem de anticorpos da classe IgM na população em diálise, o conhecimento desse percentual em nosso serviço foi importante pois mesmo após resultado do teste "crossmatch" positivo, esses pacientes poderão ser encaminhados para submeter-se ao transplante.

Porém para se obter pleno sucesso do transplante renal nos pacientes que apresentaram sensibilização por anticorpos da classe IgM, não é suficiente apenas a constatação da classe de imunoglobulina responsável pela sensibilização, carece que o imunologista tente informar também a especificidade destes anticorpos, ou seja, determine os antígenos contra os quais estão direcionados.

VI - SUMMARY

The immunoglobulin nature of lymphocitotoxic antibodies (ACL) was performed in 53 sera samples from 49 patients potentially sensitized against HLA antigens waiting kidney transplant. Initially these samples were tested against a selecte panel of lymphocytes (PRA) and tested again, after treatment. A loss of 6% of reactivity was observed; as 94% of the sera showed reactivity demonstrating that the majority of the antibodies are of IgG nature. In this population the frequency of IgM antibodies is lower than that described in the international literatura probably due to the fact of frequent blood transfusions.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ 1. AYOUB, G.; PARK, M.S.; TERASAKI, P.I.; IWAKI, Y., OPELZ, G.B - Cell antibodies and crossmatching. Transplantation 29 (3) : 227-9, 1980.
2. AYOUB, G.M.; TERASAKI, P.I.; TONAI, R. J. Improvements in detection of sensitization. Transp. Proc., 15(1): 1202 - 7, 1983.
- ✓ 3. BENDER, K. HLA sistem. Brotest Bul., 2 : 64-116, 1984.
4. CARDELLA, C.J., FALK, P., HALLORAN, P. ROBINETTE, M.; ARBUS, G.; BEAR, R. Renal Transplantation in patients with a positive crossmatch on noncurrent sera: long - term follow-up. Transp. Proc.; 17 (1) : 626-7, 1985
- ✓ 5. CARDELLA, C.J.; NICHOLSON, M.J.; FALK, J.A.; HARDING, M.; COOK, G.T. Successful renal transplantation in patients with T-cell reactivity to donor. Lancet, 2 : 1240 - 3, 1982.
- ✓ 6. CHAPMAN, J.R.; TAYLOR, C.J., TING, A.; MORRIS, P.J. The positive cross-match: ^aAntibody class and specificity correlate with graft outcome. Transp. Proc. 19(1) : 725-6, 1987.
- ✓ 7. ——— Immunoglobulin class and specificity of antibodies causing positive T cell crossmatches. Transplantation, 42 (6): 608-12, 1986.
- ✓ 8. CICCARELLI, J. & TERASAKI, P. Sensitization patterns in transfused kidney transplant patients and their pos

sible role in kidney graft survival. Transp. Proc.,
15 (1): 1208 - 10, 1983.

9. CICCARELLI, JC., AYOUR, G.; TERASAKI, PI.; BILLING, R.
Improved HLA-DR typing of dialysis patients using
monoclonal antibodies. Transplantation : 558-60,
1982.
- ✓ 10. CLELAND, W.W. apud, PIROFSKI, B & ROSNER, E. R. DTT test:
a new method to differentiate IgM and IgG erythrocyte
antibodies. Vox Sang; 27 : 480-8, 1974.
11. CORRY, R.J.; SCHULAK, J.A.; GOEKEN, N.E.; NGIEM, D.D. The
effect of HLA A, B, and DR. matching and Blood trans-
fusion in first cadaver kidney transplantation.
Transp. Proc., 17 (1) : 756 - 7, 1985.
12. ETTINGER, R.B.; TERASAKI, P.I.; OPELZ, G. Successful re-
nal allografts across a positive cross-match for do-
nor B-Lymphocyte alloantigens. Lancet, 2 : 56-8, 1976
- ✓ 13. ETTINGER, R.B., UITTENBOGAART, C.H.; PENNISI, A.J.; MALEK
ZADEH, M.H.; FINE, R.N. Long-Term cadaver allograft
survival in the recipient with a positive B Lympho-
cyte crossmatch. Transplantation, 27 (5): 315-8, 1979
- ✓ 14. FALK, J.; CARDELLA, C.J.; HALLORAN, P.; ROBINETTE, M.;
ARBUS, G.; BEAR, R. Transplantation can be performed
with positive (noncurrent) crossmatch. Transp. Proc.
17 (1): 1530-2, 1985.
- 15 FULLER, T.C.; FORBES, J.B.; DELMONICO. Renal Transplanta-
tion with a positive historical donor crossmatch.
Transp. Proc. 17 (1): 113, 1985.
- ✓ 16. GENETET, B & MANNONI; P. Sistema HLA. In: _____. La Trans

fusion. Cuba, Edicion Revolucionaria, 1980. Cap. 13, p. 478-522.

17. GOUDEMAMAND, J. Les Groupes leucocytaires et plaquettaires
In: GOUDEMAMAND, M. & SALMON, C. Immuno-hématologie et immunogénétique. Paris, Flammarion Médecine - Sciences, 1980. Cap. 6, p. 273-304.
- ✓ 18. IWAKI, Y.; LAU, M.; TERASAKI, PI. Sucessful transplants across T warm-Positive crossmatches due to IgM antibodies. Clin Transplantation, 2: 81-4, 1988.
- ✓ 19. KALIL, J.; NEUMANN, J.; RODRIGUES H.; PANAJOTOPOULOS, N. Participation of IgM antibodies in the panel reactivity of transplant waiting recipients. Comunicação pessoal.
- ✓ 20. KISSMEYER-NIELSEN, F.; OLSEN, S.; PETERSEN, V.P.; FJELD BOR, O. Hyperacute rejection of kidney allografts, as sociated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. Lancet, 2 : 662-5, 1966.
- ✓ 21. KNIGHT, R. C. Measuring IgG anti-A/B titres using dithio threitol (DTT) J. Clin Pathol, 31 : 283-7, 1978.
- ✓ 22. LAVEENSTEIN, K. J. Lymphocytotoxicity test for using. In MALLORY, D. & FAWLETT, K. HLA Techniques for blood bankers. Arlington , S. ed., 1984. Cap. 3, p.33-76.
23. LOBO, P.I. Mature of autolymphocytotoxins presents. Trans plantation, 32 (3) : 233-7, 1981.
- ✓ 24. MOHANAKUMAR, T.; RHODES, C. L.; POSNER M.P.; GOLDMAN, M. H.; MENDEL - PICON, G.; LEE, H.M. Evidence for anti bodies to immunoglobulins in sera form B cell cross match-positive renal allograft recipients. Transp. Proc. 17 (1) : 655-6, 1985.

- ✓ 25. OKUNO, T. & KONDELIS: Evaluation of dithiothreitol (DTT) for inactivation of IgM antibodies. J. Clin Pathol., 31 : 1152-5, 1978.
- ✓ 26. OLSON, P.R.; WEIBLEN, B.J.; O'LEARV, J.J.; MOSCOWITZ, A. J.; MCCULLOUGH, J. A simple technique for the inactivation of IgM antibodies using dithiothreitol. Vox Sang., 30 : 149-59, 1976.
27. PARK, M.S.; TERASAKI, P.I.; BERNOCO, D. Autoantibody against B lymphocytes. Lancet, 2 : 465-7, 1977.
28. PATEL, R. & TERASAKI, P.I. Significance of the positive crossmatch teste in kidney transplantation. N. Engl. J. Med, 280 (14) : 735-8, 1969.
- ✓ 29. PIROFSKY, B & ROSNER, E. R. DTT test: a new method to differentiate IgM and IgG erthrocyte antibodies. Vox Sang., 27 : 480-8, 1974.
- ✓ 30. RAFFOUX; C., Comunicação Pessoal.
- ✓ 31. RUDY, T & OPELZ, G. Dithiothreitol treatmente of cross match sera in highly immunized. Transplant Proc., 19 (1) _ 800-2, 1987.
- ✓ 32. SILVA, S.F.R. Anticorpos anti-HLA influência do número de gestações na produção de anticorpos anti-HLA. Fortaleza, 1987. Trabalho apresentado ao Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia.
- ✓ 33. SILVA, S.F.R.; VIEIRA, MLC; CALVANCANTE, M.C.S.; ARRUDA, D.M.M.; CMAPOS, H.H. Caracterização de anticorpos linfocitotóxicos em candidatos a transplante renal. 1º forum internacional sobre procura de órgãos para transplante; novembro 1989.

- ✓ 34. STOCKER, J.W.; MCKENZIE, I.F.C., MORRIS, P.J. Igm activity in human lymphotoxic antisera after renal transplantation. Nature, 222, 483-4, 1969.
- ✓ 35. TÁVORA; E.R.F., Interpretation do "crossmatch" em transplantes renais. J. Bras. Nefr~~al~~^{ol}, 10(4) : 148-52.1988
- ✓ 36. TING, A. Problems of the strongly sensitized patient. Transp. Proc.- 15(1): 1198-201,1983.
- 37. WEISZ-CARRINGTON, P. the HLA sistem. In: _____ Principles of clinial immunohematology. Chicago, Year Book, 1986. Cap. 7, p. 218-35.