

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

PRESENÇA DE ALOANTICORPOS ERITROCITÁRIOS EM
GESTANTES Rh NEGATIVO, ATENDIDAS NA FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
(HEMOAM).

FRANCIMARY DE OLIVEIRA CAVALCANTE

MANAUS
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

FRANCIMARY DE OLIVEIRA CAVALCANTE

PRESENÇA DE ALOANTICORPOS ERITROCITÁRIOS EM GESTANTES
Rh NEGATIVO, ATENDIDAS NA FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO AMAZONAS (HEMOAM).

Dissertação apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia, da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Doutora Maria Cristina dos Santos

MANAUS
2005

À minha família e a todos que me apoiaram,
me ajudaram e compreenderam a minha
ausência em alguns momentos.

Agradecimentos

À Deus, pela oportunidade de estar aqui;

À minha orientadora, Prof^a Doutora Maria Cristina dos Santos, que me ajudou não somente no meu trabalho, com seu conhecimento científico, mas em todos os aspectos, para a minha formação profissional e pessoal;

Ao amigo José Alfredo Sobreira de Sampaio pela dedicação e paciência em revisar todo o meu trabalho e pelos ensinamentos dados a minha pessoa acerca de assuntos extracurriculares;

Aos meus familiares, principalmente minha mãe, Ana Gomes de Oliveira, por acreditar em mim como profissional;

Ao Rogério Luiz Araújo Carminé, meu noivo, pelas contribuições ao trabalho, e pela compreensão da minha ausência, principalmente na reta final;

A todos os meus amigos que me apoiaram e colaboraram para a leitura de alguns trabalhos e correções de parte do meu trabalho;

Ao HEMOAM, pela permissão da realização da minha pesquisa nas suas dependências e utilização dos seus equipamentos e materiais;

Ao MSc Sérgio Albuquerque, gerente do laboratório de Imuno-Hematologia do HEMOAM, por todas as contribuições, desde o início até a finalização deste trabalho, além das várias concessões dadas, à minha pessoa, para a elaboração, realização e finalização deste trabalho;

Aos colegas do HEMOAM, que sempre deram apoio e contribuições para a realização da metodologia;

À Prof^a Doutora Maria de Lourdes Castro (UNICAMP), pela contribuição tanto na qualificação, quanto na dissertação, com sugestões e correções;

Aos estatísticos Felicien Vasquez, pela formatação do banco de dados no programa Epi InfoTM, Edson Lira, por contribuições em algumas análises estatísticas, à Gilmara Guimarães, pela contribuição e revisão das análises estatísticas e ao prof^o Doutor Celso Cabral, pela sua contribuição com as análises estatísticas;

Aos Doutores, Fernando Barcellos e Izeni Farias, pelas sugestões e contribuições dadas na qualificação;

Ao aluno Paulo Gabriel Brandão e, ao MSc Eduardo Ono pela sua colaboração com a tradução do resumo;

Resumo

A presença de aloanticorpos irregulares eritrocitários da classe G, na circulação materna, pode causar sérias conseqüências ao neonato. A aloimunização pode ocorrer em diversas situações, consideradas de risco, como partos com incompatibilidade sangüínea, aborto, amniocentese, transfusões sangüíneas, dentre outras. Neste estudo foi verificada a presença de aloanticorpos circulantes regulares e irregulares, em mulheres atendidas no Programa de Gestantes Rh Negativo (PGRhN) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). Foi realizado um estudo retrospectivo e para o qual, foram levantados os registros de gestantes atendidas durante o ano de 2003, como também, os dados de seus recém-nascidos. Outro estudo, prospectivo, foi realizado e foram analisadas amostras de sangue de gestantes, atendidas no PGRhN entre os meses de abril a novembro de 2004, como também de seus recém-nascidos. Todos os testes utilizados foram preconizados pelo Manual Técnico da American Association of Blood Bank (2005). A freqüência de aloimunização no estudo Retrospectivo (5,6%) não apresentou diferença significativa com a do estudo Prospectivo (3,5%). A freqüência de anticorpos fixados às hemácias, nos recém-nascidos de mães aloimunizadas, foi bastante alta, de 67% no estudo prospectivo e de 72,7% no estudo retrospectivo. A freqüência de aloanticorpos regulares da classe G foi de 87% nas gestantes do estudo prospectivo e a incompatibilidade ABO materno-fetal foi de 17% para as mães O, com filhos A ou B. O índice de aloimunização irregular no PGRhN ainda é muito alto, quando comparado aos trabalhos de outros autores, mostrando que devem estar ocorrendo falhas na prevenção e possíveis erros na administração da soroterapia, em situações de risco. Ressalte-se ainda, a alta freqüência de aloanticorpos regulares da classe G, que podem induzir a Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN) por incompatibilidade ABO.

Palavras-chave: aloimunização; aloanticorpos, gestante, Rh negativo; doença hemolítica do recém-nascido.

Abstract

The presence of G class irregular erythrocyte alloantibodies in the blood circulation during pregnancy may cause a series of consequences to the newborn. The alloimmunization can occur under different situations, such as: blood incompatibility during delivery, miscarriage, amniocentese, blood transfusion, among others, all considered being risky. This study investigated the occurrence of regular and irregular circulating alloantibodies in women under the care of the Program of RhD-negative Expecting Mothers (PGRhN) of the Amazonas Hematology and Hemotherapy Foundation (HEMOAM). A retrospective study was carried out compiling the data of all expecting mothers under care during 2003, as well as the information regarding their newborns. A second study, prospective, was done by analyzing the blood samples of expecting mothers under the care of the PGRhN between April and November 2004, as well as the information on their respective babies. All tests were carried out following the methodology presented in the American Association of Blood Bank Technical Manual (2005). The comparison of the alloimmunization frequency between the first (5.6%) and the second (3.5%) studies showed no significant difference. The frequency of antibodies attached to the erythrocytes in the newborns of alloimmunized mothers were high, 67% in the retrospective study and 72.7% in the prospective study. The frequency of G class regular alloantibodies was 87% in the prospective study and the ABO maternal-fetal incompatibility was 17% in O type mothers with A or B type progeny. The occurrence of irregular alloimmunization in the PGRhN is still high, comparing with the numbers of other authors, indicating that the Program may be failing in preventing the problem to occur or errors may have been made during the sorotherapy of patients under risk. Also, it was observed a high frequency of G class regular alloantibodies which can cause the Hemolytic Disease of the Newborn (HDN) due to ABO incompatibility.

Keywords: alloimmunization; alloantibodies; pregnant; RhD-negative; Hemolytic Disease of the Newborn (HDN).

Lista de Ilustrações

Gráfico 1: Freqüência das gestantes do Estudo Prospectivo, distribuídas por faixa etária.....	53
Gráfico 2: Freqüência do grau de escolaridade das gestantes do Estudo Prospectivo.....	53
Gráfico 3: Freqüência de profissão das gestantes do Estudo Prospectivo.....	54
Gráfico 4: Freqüência de números de gestações distribuídas por faixa etária.....	55
Gráfico 5: Freqüência de números de gestações para as gestantes que cursaram o Ensino Fundamental.....	55
Gráfico 6: Freqüência de números de gestações para as gestantes que cursaram o Ensino Médio.....	56
Gráfico 7: Freqüência de números de gestações para as gestantes que cursaram o Ensino Superior.....	57
Figura 1: Mapa de distribuição das gestantes Rh negativo por microrregiões do Estado do Amazonas.....	57
Gráfico 8: Freqüência dos grupos sanguíneos das gestantes do Estudo Prospectivo.....	58
Gráfico 9: Freqüência dos grupos sanguíneos das gestantes do Estudo Retrospectivo.....	59
Gráfico 10: Freqüência dos grupos sanguíneos dos recém-nascidos dos Estudos Prospectivo e Retrospectivo.....	59
Tabela I: Freqüência da classe de aloanticorpos irregulares identificados nas gestantes do Estudo Prospectivo.....	60
Tabela II: Freqüência da classe de aloanticorpos irregulares identificados nas gestantes do Estudo Retrospectivo.....	61
Tabela III: Freqüência de titulação de aloanticorpos nas gestantes dos estudos Prospectivo e Retrospectivo.....	61
Gráfico 11: Freqüência do resultado do Teste de Antiglobulina Direto (TAD) dos recém-nascidos do Estudo Prospectivo.....	62
Gráfico 12: Freqüência do resultado do Teste de Antiglobulina Direto (TAD) dos recém-nascidos do Estudo Retrospectivo.....	62
Gráfico 13: Freqüência do grupo sanguíneo Rh dos recém-nascidos de mães aloimunizadas, do Estudo Prospectivo.....	63
Gráfico 14: Freqüência do grupo sanguíneo Rh de recém-nascidos de mães aloimunizadas, do Estudo Retrospectivo.....	64
Gráfico 15: Freqüência de recém-nascidos com TAD positivo em mães aloimunizadas do Estudo Prospectivo.....	64

Gráfico 16: Frequência de recém-nascidos com TAD positivo em mães aloimunizadas do Estudo Retrospectivo.....	64
Tabela IV: Presença e ausência de aloanticorpos irregulares distribuídos por situação indutora de aloimunização.....	65
Tabela V: Frequência de gestantes com aloanticorpos distribuída por grupos sanguíneos.....	66
Tabela VI: Presença de aloanticorpos em gestantes que sofreram aborto e fizeram uso da soroterapia.....	66
Tabela VII: Correlação entre situações indutoras de aloimunização com especificidade, classe e titulação de anticorpos das gestantes aloimunizadas do Estudo Prospectivo.....	67
Tabela VIII: Frequência de Aloanticorpos Regulares da classe G nas gestantes do Estudo Prospectivo.....	68
Gráfico 17: Frequência de grupos sanguíneos dos recém-nascidos de mães do grupo sanguíneo A, com anticorpos regulares IgG.....	69
Gráfico 18: Frequência de grupos sanguíneos dos recém-nascidos de mães do grupo sanguíneo B, com anticorpos regulares IgG.....	69
Gráfico 19: Frequência de grupos sanguíneos dos recém-nascidos de mães do grupo sanguíneo O, com anticorpos regulares IgG.....	70
Tabela IX: Presença e ausência de aloanticorpos regulares distribuídos por situação indutora de aloimunização.....	71

Lista de Abreviaturas e Siglas

AABB – “American Association of Blood Banks”.

ABO – Sistema de grupo sanguíneo.

ADCC – Citotoxicidade Mediada por Anticorpos

AGH – Soro de Antiglobulina Humana

C1 – Primeiro componente da via Clássica do Sistema Complemento.

C1q – Subunidade do componente C1 do Sistema Complemento.

D – proteína do sistema sanguíneo Rh.

Diego – Sistema de grupo sanguíneo.

DHRN – Doença Hemolítica do Recém- Nascido.

DTT – “Dithiotreitol”.

Du – D fraco - Antígeno D que reage fracamente quando testado com o reagente anti-D.

Duffy - Sistema de grupo sanguíneo.

EDTA – “ethylenodiaminotetraacetic acid”.

Fc – Fragmento cristalizável das Imunoglobulinas.

FcRn – Receptor de Fc de imunoglobulina da classe G presentes nas células placentárias e intestinais do feto.

FcγRI, FcγRII – Receptores de imunoglobulinas da classe G presentes em células fagocíticas.

FcγRIII – Receptor de imunoglobulinas da classe G presentes em células exterminadoras naturais (*Natural Killer*).

HEMOAM - Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

IAI – Identificação de Anticorpos Irregulares.

IgG – Imunoglobulina da Classe G.

IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 – subclasses da imunoglobulina G.

IgM – Imunoglobulina da Classe M.

Imunoglobulina anti-D - soroterapia profilática.

IVIG - Imunoglobulina intravenosa.

Kell - Sistema de grupo sangüíneo.

Kidd - Sistema de grupo sangüíneo.

Lutheran - Sistema de grupo sangüíneo.

LW – Sistema de Grupo Sangüíneo.

MNS - Sistema de grupo sangüíneo.

PAI – Pesquisa de Anticorpos Irregulares.

PAR – Pesquisa de Anticorpos Regulares.

PGRhN - Programa de Gestantes Rh Negativo.

Rh – Sistema de grupo sangüíneo.

SOGC - “Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada”.

TAD – Teste de Antiglobulina Direto.

TAI – Teste de Antiglobulina Indireto.

Lista de Símbolos

α - Alfa

β - Beta

χ - Qui

γ - Gama

μ - Micro

μL - Microlitro

TM - Trade Mark

® - Marca Registrada

SUMÁRIO

Introdução.....	15
1 Levantamento Bibliográfico.....	19
1.1 Sistemas Sangüíneos.....	19
1.1.1 ABO.....	19
1.1.2 Rh.....	21
1.1.3 Antígenos Eritrocitários.....	23
1.2 Linfócitos B e Imunoglobulinas.....	24
1.2.1 Linfócitos B.....	24
1.2.2Imunoglobulinas.....	26
1.2.3Classificação dos anticorpos.....	28
1.3 Doença Hemolítica do Recém-Nascido.....	29
1.3.1 DHRN - ABO.....	29
1.3.2 DHRN - Rh.....	31
1.3.3DHRN - Outros Sistemas Sangüíneos.....	33
1.4 Exames de Pré-natal para o Acompanhamento de Gestantes Rh negativo e Medidas Profiláticas para a DHRN.....	34
1.4.1Exames.....	34
1.4.2Imunoglobulina Anti-Rh (D).....	36
1.5 Tratamentos para a Doença Hemolítica do Recém-Nascido.....	37
2 Objetivos.....	40
2.1 Objetivos Específicos.....	40
3 Métodos.....	41
3.1 Comitê de Ética em Pesquisa.....	41
3.2 Casuística.....	41
3.3 Coleta das Amostras de Sangue.....	43
3.4 Exames Imuno-hematológicos.....	43
3.4.1 Tipagem sangüínea ABO/Rh.....	43
3.4.2 Pesquisa de D fraco.....	45
3.4.3 Teste de Antiglobulina Indireto (TAI).....	47
3.4.4 Tratamento do plasma com Dithiotreitol (DTT).....	48
3.4.5 Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI).....	49
3.4.6 Titulação de Anticorpos.....	50
3.4.7 Classificação dos Anticorpos Regulares (prova reversa).....	51
3.4.8 Teste de Antiglobulina Direto (TAD).....	51
3.5 Análise dos Dados.....	52
4 Resultados.....	54
4.1 Análise Epidemiológica.....	54
4.2 Identificação de Grupos Sangüíneos.....	60
4.3 Identificação de Aloanticorpos Irregulares.....	62
4.4 Situações que podem induzir a Aloimunização Irregular.....	67
4.4.1 Análise das situações indutoras de aloimunização irregular.....	67
Grupos Sangüíneos ABO.....	68
4.4.2 Análise das gestantes com aloanticorpos irregulares.....	68
4.5 Identificação de Aloanticorpos Regulares (IgG).....	69
A.....	70
B.....	70
4.6 Situações que podem induzir à aloimunização por antígenos do sistema ABO.....	73
4.6.1 Análise das situações indutoras de aloimunização regular.....	73

<u>5 Discussão.....</u>	<u>74</u>
<u>6 Conclusão.....</u>	<u>88</u>
<u>Referências Bibliográficas.....</u>	<u>90</u>
<u>APÊNDICES.....</u>	<u>98</u>
A – Formulário de entrevista com as Gestantes Rh negativo do Programa.....	99
B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Para Pesquisa Clínica.....	100
.....	101
<u>ANEXOS.....</u>	<u>102</u>

Introdução

Desde a descoberta dos primeiros grupos sanguíneos do sistema ABO por Landsteiner, em 1900, até hoje foram descritos 29 sistemas sanguíneos diferentes (REID; MOHANDAS, 2004; YAMAMOTO, 2004; DANIELS, 2005). Alguns desses, com antígenos altamente imunogênicos, gerando a produção de imunoglobulinas consideradas clinicamente importantes, por causarem hemólise e reações transfusionais graves (DANIELS et al., 2004).

Exemplo disto é a Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN) que é classicamente atribuída a presença de imunoglobulinas da classe G (IgG) maternas, contra o antígeno D eritrocitário, do feto. As mulheres Rh negativo podem ser aloimunizadas pelo antígeno D durante o parto do filho com incompatibilidade sanguínea, ou ainda, em caso de aborto, em transfusão sanguínea incompatível e após alguns procedimentos obstétricos invasivos, como cordocentese e amniocentese, dentre outras situações (MURRAY et al., 1983; LEE et al., 1999; FUNG; EASON, 2003). A DHRN, por ser mediada por anticorpos, é classificada como hipersensibilidade do tipo II (DIAS DA SILVA; MOTA, 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Durante a gestação, de mulheres aloimunizadas, em que ocorre incompatibilidade sanguínea materno-fetal, os aloanticorpos irregulares maternos atravessam a barreira placentária, através da ligação da porção Fc da imunoglobulina G com o receptor FcRn, presente nas membranas das células placentárias. Após atravessarem a placenta, as imunoglobulinas atingem a circulação fetal e ligam-se aos antígenos D, presentes nas membranas eritrocitárias (AHADED et al., 1999; HADLEY, 2002).

Os aloanticorpos irregulares anti-D, que revestem as hemácias, com raríssimas exceções, são incapazes de ativar a via Clássica do Sistema Complemento, devido à conformação estereoquímica da proteína Rh. Esta proteína apresenta seis voltas, na membrana

externa dos eritrócitos e, mesmo que todos os epítomos da proteína Rh estejam ligados às imunoglobulinas, a distância entre eles, impede que ocorra o acoplamento da porção C1q, do componente C1, com as regiões Fc de duas IgG. Portanto, na DHRN causada pelo antígeno D, não ocorre lise intravascular das hemácias e sim a extravascular, pela ação dos macrófagos presentes no baço fetal (DANIELS, 1995).

Após a lise das hemácias fetais, a medula óssea libera hemácias jovens, imaturas, ainda com núcleos, os eritroblastos. Por esse motivo a DHRN é, também, conhecida como Eritroblastose Fetal (HARMENING, 1999; BOWMAN, 2003). Com a liberação de hemoglobina no baço, substância cujo produto final é a bilirrubina indireta, o fígado do feto não consegue conjugar toda a bilirrubina, para então excretá-la como urobilinogênio e/ou estercobilinogênio. Então, ocorre uma impregnação de bilirrubina nos tecidos do recém-nascido, ocasionando a icterícia. Dependendo da sua concentração, pode atravessar a barreira hematoencefálica, provocando sérias lesões neurológicas e desencadeando uma síndrome chamada *kernicterus*. As regiões possivelmente atingidas são: os núcleos da base, áreas do córtex cerebral e do tronco cerebral. Nos locais afetados os neurônios são lesionados, ficando seqüelas permanentes (SCHWOEBEL et al., 2004). Portanto, as manifestações clínicas mais freqüentes associadas à Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN) são: anemia, icterícia, hepatoesplenomegalia, hidropsia, hiperbilirrubinemia e em casos mais graves, *kernicterus* (BOWMAN, 2003).

Há 50 anos atrás, a DHRN era a maior causa de morte perinatal. A letalidade atingia cerca de 50% dos filhos de mães D (-) aloimunizadas pelo antígeno D (QUEENAN, 2002). Nos últimos quarenta anos, com o uso profilático do soro “Imunoglobulina Anti-D”, foi reduzido em muito a morbidade e a mortalidade infantil (MIYADAHIRA, 2000; CANNON et al., 2003). O soro é constituído por imunoglobulina Anti-D da classe G, que deve ser administrado até três dias após o parto de recém-nascido, Rh positivo, em mães D (-), que

ainda não produziram o anti-D. O soro tem por finalidade neutralizar as possíveis hemácias fetais, D (+), que passaram para a circulação durante o parto, evitando, desta forma, a aloimunização materna (MICTHELL et al., 1996). Com a evolução das técnicas neonatais, como a transfusão exsangüíneo, o número de óbitos caiu para 25% e o risco de morte para 4%, após o desenvolvimento da medicina fetal, em 2002 (QUEENAN, 2002).

Outros antígenos de sistemas sangüíneos estão, também, associados à ocorrência da DHRN, como: ABO, Kell, Duffy, MNS, Diego, Kidd, Lutheran e as proteínas C, c, E, e, do sistema Rh (GEIFMAN-HOLTZMAN et al., 1997; HADLEY, 2002).

De acordo com KORNSTAD (1983), foram encontrados anticorpos contra os sistemas Kell e Duffy, em cerca de 40% das gestantes D (+), durante o período de 1975 a 1980. No mesmo ano, 1983, foram relatados casos de DHRN causada por Anti-D, em gestantes com tipo sangüíneo D fraco positivo. Em algumas situações pode ocorrer a expressão fraca do antígeno D, devido: 1) a variações quantitativas que são transmitidas geneticamente; 2) ao efeito de posição, sendo o mais conhecido o enfraquecimento do antígeno D quando o gene C está na posição trans em relação ao gene D e, 3) a expressão parcial por ausência de um dos múltiplos componentes do antígeno D. Estes casos são chamados na prática de D fraco, e se refere ao que era conhecido anteriormente como Du (URBANIAK; GREISS, 2000).

As imunoglobulinas secretadas contra os polissacarídeos do sistema sangüíneo ABO, são normalmente da classe M, porém, a maioria das mulheres de grupo sangüíneo “O”, produzem imunoglobulinas IgG₂ anti-A, anti-B e anti-AB, que podem causar a DHRN (BROUWERS et al., 1988a; ARAUJO et al., 2003; COOK, 2004; AABB, 2005). No entanto, há registros de que mulheres dos grupos sangüíneos “A” e “B” também podem produzir, em menor quantidade, anticorpos regulares IgG (CIANCIARULLO et al., 2003).

Os anticorpos naturais e os imunes, da classe G, produzidos contra os antígenos do sistema ABO, têm a capacidade de ativar a via Clássica do Sistema Complemento e causar lise extravascular das hemácias. No entanto, Brouwers e colaboradores (1988b) observaram que o sistema complemento não foi ativado, in vivo, nos recém-nascidos do grupo sanguíneo A, de mães O.

Estudo realizado no Hospital e Maternidade Santa Joana e Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo, SP, mostrou que 20% dos casos de DHRN eram causadas pela incompatibilidade ABO, materno-fetal (CIANCIARULLO et al., 2003).

Com a finalidade de prevenir a DHRN, o HEMOAM (Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, AM, Brasil), desenvolveu o Programa de Prevenção à Doença Hemolítica do Recém-Nascido, que desde 1991, presta assistência as gestantes Rh negativo, com o objetivo de detectar aloanticorpos eritrocitários. Esse programa atende cerca de 265 gestantes por mês (Dados obtidos no Núcleo de Estatística do HEMOAM, 2003), além de orientar e esclarecer às gestantes sobre a importância deste acompanhamento, contribuindo, assim para a diminuição da morbidade e mortalidade infantil, associada a essa doença.

Este trabalho teve por objetivo estudar o perfil imuno-hematológico das gestantes Rh negativo, atendidas no HEMOAM (Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, AM, Brasil), visando observar a frequência e classes de imunoglobulinas, regulares e irregulares, e suas correlações com os fatores de risco para a aloimunização e como indicativo para a DHRN.

1 Levantamento Bibliográfico

1.1 SISTEMAS SANGÜÍNEOS

1.1.1 ABO

Em Viena, no ano de 1900, Karl Landsteiner realizou experimentos que dariam origem a um novo ramo da ciência, a Imuno-hematologia. Landsteiner coletou amostras de seu próprio sangue e de seus colegas e, das amostras, separou o soro e os elementos celulares. Após deixar reagir entre si, às hemácias e os soros, observou, em algumas misturas, reação de aglutinação visível a olho nu. A partir desses experimentos, passou a investigar qual seria a “substância” indutora da aglutinação e que poderia ser a responsável pelo insucesso de algumas transfusões sangüíneas, realizadas naquela época. Um ano mais tarde, Landsteiner, dando continuidade aos seus experimentos, acabou por descobrir a existência de dois antígenos - A e B -, onde a presença ou ausência de um ou dos dois, era suficiente para explicar a existência dos três grupos sangüíneos: A, B e O. Landsteiner classificou os três grupos com base no padrão de aglutinação, além de predizer a existência do quarto grupo sangüíneo, o AB, que foi mais tarde confirmada por De Costello e Stürli, seus discípulos, em 1902 (DANIELS, 1995; BATISSOCO; NOVARETTI, 2003; FIGL; PELINKA, 2004; AABB, 2005).

O sistema ABO é considerado, até hoje, o mais importante na clínica transfusional. No entanto, o interesse por esse sistema sangüíneo não se restringe apenas a essa área do conhecimento, mas também, a uma variedade de campos da ciência, como Genética, Antropologia, Biologia Molecular, Evolução, Imunologia, dentre outros (YAMAMOTO, 2004).

Além dos quatro principais grupos sanguíneos, A, B, AB e O, foram encontrados subgrupos, A_2 , A_3 , A_x , A_{el} , B_3 , B_x e B_{el} , que exibem diferentes padrões e graus de aglutinação. Os antígenos A e B inicialmente identificados sobre as hemácias foram, posteriormente, encontrados sobre a superfície de outros tipos celulares como, linfócitos, plaquetas, células sinusoidais do baço, medula óssea, mucosa gástrica, endotélio capilar venular e arterial, além de secreções e de outros fluidos como saliva, urina e leite. Portanto, o sistema ABO é considerado, por alguns autores, sistema histo-sanguíneo. Devido a essa característica, é de extrema importância a determinação do grupo ABO, não apenas para as transfusões sanguíneas, como também, para o transplante de outros órgãos (SPALTER et al., 1999; YAMAMOTO, 2004; DANIELS, 2005).

Os determinantes antigênicos A, B e H são carboidratos presentes em algumas glicoproteínas e glicolípídeos nas superfícies das hemácias. São sintetizados por uma série de reações catalisadas pelas enzimas denominadas *glicosiltransferases*. Essas enzimas são responsáveis pela transferência dos carboidratos específicos, α -D-acetilgalactosamina e α -D-galactose, para uma substância de base, na membrana da hemácia, formando os antígenos A e B, respectivamente (GAMBERO et al., 2004; DANIELS, 2005).

A caracterização genética dos principais alelos do sistema ABO foi primeiramente descrita, em 1990, por Yamamoto e colaboradores. Os genes ABO estão localizados em três loci diferentes. O locus *ABO* está localizado no cromossomo 9 e os outros loci, *Hh* e *Se* estão localizados no cromossomo 19. Esses genes não codificam diretamente seus antígenos específicos, e sim, as enzimas que fazem o transporte dos açúcares, para a produção dos antígenos ABO. O passo final da biossíntese desses antígenos é catalisado pelas enzimas A e B transferases, codificadas, respectivamente, pelos alelos funcionais A e B, do locus gênico *ABO* (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003; MATTOS; MOREIRA, 2004; YAMAMOTO, 2004). O gene *H* regula a formação de uma enzima, α -2-L-fucosiltransferase, que adiciona

um resíduo de fucose à posição C-2 do resíduo galactose terminal da cadeia, levando à formação do antígeno H. O gene *Se* é diretamente responsável pela expressão do H, e, indiretamente, pelas expressões de A e B, nas glicoproteínas presentes em secreções epiteliais, como a saliva (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003).

1.1.2 Rh

Levine e Stetson, em 1939, observaram reação transfusional em uma parturiente que havia recebido uma bolsa de sangue de seu marido e cujo filho havia nascido morto, devido à doença hemolítica do recém-nascido. Este foi o primeiro caso relatado sobre incompatibilidade do sistema sangüíneo Rh (DANIELS, 1995; AABB, 2005).

Em 1940, Landsteiner e Wiener, após a imunização de cobaias e coelhos com hemácias de macacos (na época *Macacus rhesus* – hoje *Macaca mulatta*), observaram que o soro dessas cobaias imunes aglutinava cerca de 85% de amostras de sangue humano. Como os anticorpos causadores da aglutinação foram produzidos contra hemácias de *Macacus rhesus* o antígeno eritrocitário foi denominado de fator Rh. No mesmo ano, Levine e Katzin observaram reação de aglutinação similar com soro de algumas parturientes. Também, em 1940, Levine e Peters observaram anticorpos com a mesma especificidade em pessoas que haviam recebido transfusão ABO compatível, porém, suas hemácias eram desprovidas do antígeno, detectado pelos anticorpos de cobaias imunes. Um ano mais tarde, esses pesquisadores demonstraram que a reação transfusional observada era causada pelo mesmo anticorpo, o anti-Rh. Em 1942, Fisk e Foord demonstraram que o anticorpo produzido em cobaias não reagia com o mesmo antígeno que os anticorpos humanos. Somente, em 1963, Levine e colaboradores descobriram que os anticorpos produzidos em cobaias reconheciam antígeno de um novo sistema sangüíneo, o LW, homenagem dada aos pesquisadores Landsteiner e Wiener. Neste momento, sugeriram a mudança de nomenclatura do

heteroanticorpo para anti-LW (VERRASTRO et al., 1996; AVENT; REID, 2000; AABB, 2005).

Desde 1941 foi verificado que o Sistema Rh não se restringe apenas ao antígeno descoberto, em 1939, por Levine e Stetson. Atualmente, são conhecidos mais de 45 antígenos desse sistema. Os antígenos principais continuam sendo os cinco descritos até o final da década de 40, que são: *D*, *C*, *c*, *E* e *e* (BEIGUELMAN, 2003; AABB, 2005).

A partir daí, então, vários pesquisadores deram início a estudos, para conhecer a estrutura genética do sistema Rhesus. Fisher e Race propuseram uma teoria, a qual afirmava que o sistema Rhesus era constituído de três genes localizados em três loci diferentes os quais nomearam de *D*, *C* e *E*. Rosenfield e colaboradores propuseram que o sistema era um complexo gênico denominado de Rh e que estava localizado em um único locus. Já em 1986, Tippet definiu que o sistema Rhesus era composto por dois genes situados em dois loci diferentes, o RhD, que codificava o antígeno D e o RhCE que induzia a expressão dos antígenos C e E (DANIELS, 1995).

Atualmente sabe-se que os antígenos Rh são codificados por dois genes, RHD e RHCE, localizados no cromossomo 1. O RHD codifica os epítomos do antígeno D e o RHCE, não somente os antígenos C/c e E/e, mas também, outros antígenos como, C^w, C^x e o VS. Os produtos dos genes Rh são proteínas que contém ácido palmítico, porém diferem da maioria das outras proteínas de superfície celular, pois não carregam oligossacarídeos. O antígeno D é composto por 417 aminoácidos, com peso molecular de $\cong 46$ kDa, atravessa 12 vezes a membrana da hemácia e expõe seis voltas na superfície celular. Os antígenos Rh são expressos na superfície das hemácias somente associados a glicoproteína RHAG. O fenótipo D negativo é devido a ausência de parte dos epítomos ou da proteína RhD. Por ser um complexo protéico, o antígeno D, o qual é expresso exclusivamente na membrana de hemácias, é altamente imunogênico, comparado com outros antígenos do sistema Rh. A

resposta imune induzida é T dependente, o que difere dos antígenos do sistema ABO que são carboidratos e promovem resposta imunológica independente de T CD4. Ao contrário do sistema ABO, os indivíduos “D negativo” não produzem naturalmente anticorpos anti-D. A produção de imunoglobulinas anti-D é resultado de transfusão sangüínea ou gravidez incompatíveis. Cerca de 80% de indivíduos D negativos, os quais receberam transfusões sangüíneas D positivo, desenvolveram anti-D e esses anticorpos são direcionados predominantemente contra seis ou sete epítomos da proteína D (DANIELS, 1995; AVENT; REID, 2000; URBANIAK; GREISS, 2000; KUMPEL, 2002; BEIGUELMAN, 2003; DANIELS, 2005; LE VAN KIM et al., 2005; AABB, 2005).

1.1.3 Antígenos Eritrocitários

A importância clínica de qualquer antígeno eritrocitário depende basicamente de três fatores: 1) a freqüência de indivíduos negativos para determinado antígeno e, portanto, com possibilidade de serem imunizados na população; 2) a imunogenicidade do antígeno em questão; e 3) a capacidade dos anticorpos em induzir a destruição, *in vitro*, de eritrócitos incompatíveis (NOVARETTI, 1998).

Atualmente, estão descritos mais de 250 antígenos diferentes associados à 29 sistemas de grupos sangüíneos. Alguns desses, com antígenos altamente imunogênicos gerando a produção de aloanticorpos considerados clinicamente importantes, por causarem hemólise e reações transfusionais graves (DANIELS et al., 2004; DANIELS, 2005).

O antígeno eritrocitário D, considerado um dos mais imunogênicos, é responsável por 50% dos casos de aloimunização materna, o restante deve-se à incompatibilidade por antígenos pertencentes a outros sistemas sangüíneos, entre eles, ABO, Kell, Duffy, MNS, Kidd, Lutheran e Diego (HEDDLE et al., 1993; HOELTGE et al., 1995; GEIFMAN-HOLTZMAN et al., 1997; HADLEY, 2002).

1.2 LINFÓCITOS B E IMUNOGLOBULINAS

1.2.1 Linfócitos B

Os linfócitos B expressam, na superfície de membrana, imunoglobulinas que atuam como receptores de antígenos (BCR). O rearranjo dos genes das imunoglobulinas é feito durante o desenvolvimento ontogenético do linfócito B. Portanto, cada linfócito B constrói, na linhagem somática, seu próprio sítio de reconhecimento do epítipo, o qual estará presente em todas as imunoglobulinas produzidas pelas células B oriundas de um mesmo clone (OLLILA; VIHINEN, 2005).

Atualmente, existem descritas três subpopulações de células B: B1, B2 e MZ B (MARTIN; KEARNEY, 2001; COOK, 2004). As subpopulações diferem na expressão de moléculas de superfície de membrana e na localização anatômica. A maioria dos linfócitos B1 apresenta os marcadores celulares CD5, CD23⁻ e B43⁺ e expressa, ainda, na membrana, concentrações altas de IgM e baixas de IgD. As células B1 constituem a maior população de linfócitos em neonatos. Durante o início da vida, as células B1 são substituídas nos compartimentos periféricos pelas células B2, mas permanecem confinadas nas superfícies serosas. Nos adultos, a população de células B1 representa cerca de 5 a 10% dos linfócitos B e está localizada nas cavidades peritoneal e pleural. A população de linfócitos B1 é mantida, principalmente, pelo mecanismo de auto-renovação do que por reposição realizada pela medula óssea. A ontogenia e as funções desempenhadas pelos linfócitos B1 ainda são controversas. Os receptores de antígenos dos linfócitos B1 são formados por recombinação somática, porém, possuem uma diversidade limitada e reconhecem principalmente polissacarídeos. Essas células estão envolvidas no reconhecimento de padrões antigênicos presentes em patógenos e desenvolvem resposta imunológica, independente TCD4⁺, e, por estes motivos, pertencem ao Sistema Imune Inato que é considerado a primeira linha de defesa do organismo. As células B1 são as principais responsáveis pela produção de

anticorpos naturais ou regulares contra os antígenos do sistema sanguíneo ABO (MARTIN; KEARNEY, 2001; ANSEL et al., 2002; COOK, 2004).

Os linfócitos B2, conhecidos como linfócitos B, expressam em suas membranas concentrações baixas ou intermediárias de IgM e altas, de IgD. Localizados em órgãos linfóides secundários e na circulação sanguínea, podem recircular entre os folículos do baço e dos nódulos linfáticos. Os linfócitos B2 expressam receptores, também formados por recombinação somática, porém apresentam enorme diversidade. Os linfócitos B2 desenvolvem resposta imunológica aos antígenos protéicos e, por isso, são dependentes das citocinas liberadas pelos linfócitos TCD4⁺ (MARTIN, KEARNEY, 2001; ANSEL et al, 2002; COOK, 2004). As células B2 ativadas sofrem expansão clonal, diferenciando-se em plasmócitos e células de memória. Os plasmócitos produzem e secretam as imunoglobulinas, que auxiliam na neutralização do antígeno. Os *anticorpos irregulares* são produzidos pelos linfócitos B2, pois os antígenos do sistema Rh são proteínas (DIAS DA SILVA; MOTA, 2003).

Os linfócitos MZ B exibem fenótipo relativamente homogêneo (IgM⁺⁺⁺, IgD^{+/+}, CD23⁻, CD9⁺, altas concentrações de CD21 e baixas de CD5) e são encontrados predominantemente na zona marginal (MZ) do baço. Os linfócitos B1 e MZ B apresentam semelhanças como: diversidade limitada de receptores de antígenos e resposta aos antígenos polissacarídeos, presentes nas cápsulas de patógenos. Por exemplo: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* do tipo b. Os linfócitos MZ B desempenham papel importante na remoção de células senescentes, debris apoptóticos e complexos imunes (MARTIN; KEARNEY, 2001; COOK, 2004).

1.2.2 *Imunoglobulinas*

Imunoglobulinas são proteínas globulares produzidas a partir da ativação e diferenciação de linfócitos B, em plasmócitos. As classes e subclasses de imunoglobulinas descritas para espécie humana são: IgA (IgA₁ e IgA₂), IgD, IgE, IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄) e IgM (GIRELLO; KÜHN, 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Para a imuno-hematologia, as classes de imunoglobulinas mais importantes são a IgM e a IgG. A IgM é a primeira imunoglobulina a ser secretada nas respostas imunológicas. Devido a sua estrutura pentamérica, a IgM é potente ativadora do componente C1 da via Clássica do Sistema Complemento, porém, incapaz de atravessar a barreira placentária. A maioria dos *anticorpos naturais* pertence a essa classe de imunoglobulina. Muitos desses anticorpos são geralmente anticarboidratos, possuem baixa afinidade e amplo espectro. As células B1 e MZ B secretam os *anticorpos naturais* após serem estimuladas, principalmente, pelos polissacarídeos de bactérias que colonizam o trato gastrintestinal. A produção de *anticorpos naturais* também pode ser estimulada por alimentos, grãos de pólen e bactérias presentes na natureza. As reações transfusionais do sistema ABO ocorrem devido a ligação cruzada desses *anticorpos naturais* com os resíduos de açúcar presentes nas superfícies dos eritrócitos dos tipos sanguíneos A, B e AB (MARTIN; KEARNEY, 2001; COOK, 2004).

Outra imunoglobulina muito importante para a imuno-hematologia é a IgG, a principal imunoglobulina sérica. A classe G está dividida em quatro subclasses: IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. O indicador numérico, das subclasses, foi atribuído de acordo com suas concentrações séricas. Algumas subclasses de IgG têm maior capacidade de ativar o sistema complemento, sendo a IgG₃ a mais potente, seguida por IgG₁ e IgG₂. A IgG₄ não desempenha essa função (DIAS DA SILVA; MOTA, 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A IgG é a única imunoglobulina que ultrapassa a barreira placentária. O transporte materno-fetal de IgG é mediado pelo receptor FcRn, presente no sinciciotrofoblasto.

Recentemente, o receptor FcRn foi, também, identificado no intestino de fetos humanos (SHAH et al., 2003). O receptor FcRn intestinal transporta IgG do líquido amniótico para a circulação fetal. A produção de IgG no feto é reduzida. A maioria das imunoglobulinas circulantes nos recém-nascidos é de origem materna. Shah e colaboradores (2003) detectaram níveis baixos de IgG no plasma de fetos com 12 semanas de vida. As imunoglobulinas fetais atingiram concentrações semelhantes às maternas, na 26^a semana de gestação. A elevação das concentrações de IgG no soro fetal, observada entre a 15^a e 33^a semanas de gestação, coincidiu com o aumento de imunoglobulinas no líquido amniótico e, também, com o momento em que o feto começou a ingerir. Os autores sugerem que a transferência das imunoglobulinas, no início da gravidez, deve ser realizada via FcRn intestinal, através da ingestão do líquido amniótico, pois a transferência de IgG, via FcRn placentária, só ocorre após a 22^a semana de gestação. O receptor FcRn é semelhante à molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da classe I por conter uma cadeia transmembrânica associada a β_2 microglobulina. Porém, a ligação da IgG com o FcRn não é igual a que ocorre com os peptídeos na apresentação aos linfócitos T CD8⁺. Todas as subclasses ultrapassam a barreira placentária, sendo que a IgG₁ é transportada com maior eficiência e a IgG₂, com menor (RAVETCH; BOLLAND, 2001; RADAEV; SUN, 2001; SHAH et al., 2003; SIMISTER, 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A IgG desempenha função de opsonina, pois as células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos possuem receptores de alta afinidade (Fc γ RI) e de baixa afinidade (Fc γ RII) para a porção Fc. Das subclasses de IgG, as melhores opsoninas são a IgG₁ e a IgG₃ (RAVETCH; BOLLAND, 2001; RADAEV; SUN, 2001).

Outra atividade auxiliada pela IgG é a citotoxicidade mediada por anticorpos (ADCC). As células exterminadoras naturais (NK) possuem receptores para Fc, o Fc γ RIII, que se ligam às imunoglobulinas presentes na membrana das células-alvo. O receptor Fc γ RIII

por possuir baixa afinidade reconhece apenas as IgG agrupadas nas superfícies celulares. As subclasses IgG₁ e IgG₃ apresentam maior afinidade pelo receptor FcγRIII e, portanto, são mais eficazes na ADCC (RAVETCH; BOLLAND, 2001; RADAEV; SUN, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Alguns antígenos não-protêicos são capazes de induzir a produção de *anticorpos naturais* da classe G, principalmente IgG₂, além de IgM, porém o mecanismo de mudança de isótipo, na ausência de linfócitos T auxiliares, ainda não é conhecido (MARTIN; KEARNEY, 2001; COOK, 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005). Anticorpos, contra os antígenos glicolipídicos A e B do Sistema sangüíneo ABO, são exemplos desses *anticorpos naturais* da classe G, que são capazes de causar a Doença Hemolítica do Recém-Nascido em filhos de mães com grupos sangüíneos incompatíveis (BROUWERS et al., 1988a).

A IgG₁ foi encontrada em amostra do cordão umbilical a partir da 20^a semana e a IgG₃ a partir da 28^a semana de gestação. Anemia severa, observada em casos de DHRN, foi atribuída a presença de IgG₁, presumidamente por ultrapassar a barreira placentária antes da IgG₃ e permanecer por mais tempo na circulação fetal. No entanto, quando as duas subclasses de imunoglobulina foram testadas, a IgG₃ induziu maior aumento no nível de bilirrubina (URBANIAK; GREISS, 2000).

1.2.3 Classificação dos anticorpos

Os anticorpos podem ser agrupados, na Imuno-hematologia, segundo Girello e Kühn (2003), de acordo com a origem e estímulo do antígeno:

- a) *heteroanticorpos* - são produzidos contra antígenos de espécies diferentes e os *isoanticorpos* são produzidos contra antígenos da mesma espécie;
- b) *aloanticorpos* - são resultantes da imunização acidental ou planejada, com antígenos diferentes aos do receptor, mas encontrados em indivíduos da mesma espécie. Os aloanticorpos podem ser denominados *regulares*, como aqueles

produzidos contra os antígenos do sistema sangüíneo ABO; e *irregulares*, para os anticorpos secretados contra os antígenos dos sistemas Rh, Kell etc;

c) *anticorpos naturais* – são produzidos principalmente contra carboidratos, surgem naturalmente nos primeiros meses de vida. Os antígenos do sistema ABO induzem a produção de *anticorpos naturais regulares*. Os anticorpos produzidos, por exemplo, para os antígenos dos sistemas sangüíneos I, P, MNS e Le são denominados de *naturais irregulares*;

d) *auto-anticorpos* – são aqueles produzidos contra constituintes do próprio organismo, que passaram a ser reconhecidos como antígenos “não-próprios” pelo sistema imunológico do indivíduo.

Entre os anticorpos produzidos contra os antígenos do sistema ABO, temos também os denominados: *naturais* e *imunes*. Os primeiros são produzidos a partir do terceiro mês de vida, quando em contato com substâncias, como bactérias ubiqüitárias, que apresentam semelhança com os antígenos ABO ausentes nas células do indivíduo. Já os anticorpos *imunes* podem ser produzidos a partir de heteroimunização por substâncias de origem animal ou bacteriana, como na soroterapia antidiftérica ou antitetânica, como também, por aloimunização, por gestação ou transfusão ABO incompatível (GAMBERO et al., 2004).

1.3 DOENÇA HEMOLÍTICA DO RECÉM-NASCIDO

1.3.1 DHRN - ABO

A Doença Hemolítica do Recém-Nascido causada pela incompatibilidade ABO foi descrita, pela primeira vez, em 1944 por Halbrecht (BROUWERS et al., 1988a).

Dentre os grupos sangüíneos, o sistema ABO induz a incompatibilidade materno-fetal mais freqüente e, difere da incompatibilidade Rh, por causar mais complicações em neonatos do que nos fetos (MCDONNELL et al., 1998).

A DHRN causada pela incompatibilidade ABO é tipicamente caracterizada por icterícia, sem anemia significativa e usualmente segue um curso benigno. Este tipo de incompatibilidade ocorre em 20 a 25% das gestações e as crianças mais afetadas são aquelas

pertencentes aos grupos sanguíneos A e B, nascidas de mães do grupo O (ZIPRIN et al., 2005).

A incidência de DHRN causada pela incompatibilidade ABO, no Reino Unido, foi de 2% para todos os nascimentos, mas para doença hemolítica severa a frequência foi de 0,03%. A hidropsia fetal associada à incompatibilidade ABO é extremamente rara (MCDONNELL et al., 1998). Apenas em nove casos de DHRN, causada por incompatibilidade ABO, foi relatada hidropsia. Em nenhum desses casos foi necessária transfusão intra-uterina. Dentre os neonatos, que desenvolveram hidropsia, foi observada maior incidência nos da etnia negra, ou mestiça, do que nos da etnia branca. A maior frequência de hidropsia foi observada, também, em crianças do grupo sanguíneo B (ZIPRIN et al., 2005).

A severidade da DHRN causada por anticorpos anti-A e anti-B deve-se também à subclasse a qual a IgG pertence. As subclasses consideradas imunes são IgG₁ e IgG₃. No entanto, a IgG₂ é a subclasse mais frequente nos casos de incompatibilidade ABO materno-fetal e não confere lise celular, pois ativa fracamente a via clássica do Sistema Complemento. Outro fator que ameniza a severidade da DHRN-ABO é a localização dos antígenos correspondentes, os quais estão distribuídos por várias células e tecidos do organismo do recém-nascido e, por esse motivo, poucos anticorpos naturais maternos ficam disponíveis para se ligarem aos sítios antigênicos A e B das hemácias nos neonatos (BROUWERS et al., 1988a).

Em Amsterdã, no laboratório da Cruz Vermelha, foi observado que as hemácias do cordão umbilical não eram lisadas quando em contato com anticorpos IgG anti-A e anti-B, in vitro. Os pesquisadores observaram também que apesar do resultado positivo para o teste de antiglobulina direto (TAD), não foram encontrados fragmentos de componentes do sistema complemento e deduziram, desta forma, que os anticorpos não eram capazes de ativar a via Clássica do complemento, in vivo (BROUWERS et al., 1988b).

Em outro estudo similar, realizado em Okayama, no Japão, Ukita e colaboradores (1989) observaram grupos de neonatos com DHRN causada por anticorpos ABO. Testes realizados em neonatos com resultado de TAD positivo, sem sinais e sintomas de DHRN, apresentaram baixas concentrações de IgG₁ e altas, de IgG₂. Em outros neonatos com TAD positivo e sintomas de DHRN, a quantidade de IgG₁ era suficiente para causar hemólise. Outro grupo estudado foi o de neonatos que apresentaram resultado de TAD negativo e sintomas de DHRN. Neste grupo, os pesquisadores detectaram, por eluição, IgG₃ fixadas às hemácias, em concentrações suficientes para causarem hemólise e, no entanto, os resultados para o teste de antiglobulina direto foram negativos (UKITA et al., 1989).

1.3.2 DHRN - Rh

O primeiro relato de hidropsia fetal foi descrito por Hipócrates, em 400 a.C. Porém, em 1609, uma parteira da corte francesa descreveu hidropsia em um recém-nascido, no qual seu irmão gêmeo havia falecido dias antes, com severa icterícia. Este caso pode ter sido o primeiro relato de DHRN, apesar de na época não se ter conhecimento da existência dos grupos sanguíneos (BASKETT, 1998; URBANIAK; GREISS, 2000).

Hidropsia é o acúmulo de líquido no feto que apresenta desde edema dos tecidos frouxos até derrame pericárdico, ascite e derrame pleural (COUTO et al., 1994).

Diamond e colaboradores, em 1932, observaram que a anemia congênita, icterícia grave e hidropsia fetal eram manifestações da mesma doença, cujo nome era eritroblastose fetal. Essa descoberta foi confirmada, em 1934, por Hawksley e Lightwood. Tempos depois, essa enfermidade passou a ser conhecida universalmente como Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN). Em 1938, Darrow relatou que a hemólise era causada por anticorpos maternos que ultrapassavam a barreira placentária e atingiam a circulação fetal (URBANIAK; GREISS, 2000).

Em 1943, Levine observou que a doença hemolítica, causada pelo fator Rh, era menos severa quando a mãe possuía tipo sanguíneo do Sistema ABO incompatível com o do recém-nascido. Sugeriu que essa incompatibilidade poderia impedir com que a mãe produzisse anti-D. Atualmente, esse mecanismo de proteção é conhecido. Durante a gestação e, no parto, ocorre a passagem de hemácias fetais para a circulação materna. No caso de incompatibilidade materno-fetal do sistema ABO, os *anticorpos naturais*, anti-A e (ou) anti-B, da gestante, ligam-se, imediatamente, ao eritrócito do concepto e, após ativação da via clássica do sistema complemento, ocorre a lise das hemácias fetais. Essa destruição intravascular das hemácias fetais D (+), na circulação materna, impede que a resposta imunológica, contra o antígeno D, seja iniciada (MOLLISON et al., 1997; BEIGUELMAN, 2003). De acordo com Hadley (2002) a proteção de aloimunização conferida por anticorpos anti-A foi de 90% e de 55% para o anti-B.

Em 1954, Chown associou a hemorragia feto-materna com a produção de anticorpos maternos (URBANIAK; GREISS, 2000).

No estudo realizado por Mollison e colaboradores (1997) foi observada resposta imunológica em diferentes haplótipos para o sistema Rh. Os haplótipos R2 (DcE) desenvolveram resposta imunológica mais exacerbada do que R1 (DCe). Os haplótipos R1 possuem entre 9000 a 14600 números de sítios antigênicos D por hemácia, enquanto os R2, entre 14000 a 16000. Tal afirmação foi comprovada, pois os fetos que possuíam haplótipos R2 desenvolveram anemia mais severa que os fetos com haplótipos R1 (AABB, 2005). Existem também evidências de que fetos do sexo masculino desenvolvem anemia mais severa que fetos femininos (ULM et al., 1998).

A DHRN causada pelo antígeno D é um exemplo clássico de Hipersensibilidade do Tipo II mediada, principalmente, pelas imunoglobulinas IgG₁ e IgG₃, que ultrapassam a

barreira placentária (ARAUJO et al., 2003; DIAS DA SILVA; MOTA, 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

1.3.3 DHRN - Outros Sistemas Sangüíneos

Em 1960, foi relatada a importância de aloanticorpos menos freqüentes, contra antígenos de outros sistemas sangüíneos, como causa de doença hemolítica do recém-nascido (DHRN) (GEIFMAN-HOLTZMAN et al., 1997).

Mais de 43 antígenos diferentes foram associados a DHRN (MOISE Jr, 2000).

Bowman e pesquisadores, em 1992, relataram que cerca de 5% dos neonatos, de mulheres fenotipadas como Kell negativo, eram acometidos pela doença hemolítica do recém-nascido (SCHUMACHER; MOISE, 1996).

De acordo com o trabalho de Kornstad (1983), os anticorpos irregulares mais freqüentes em gestantes D (+) foram contra os antígenos dos sistemas Kell e Duffy, em 40% dos casos.

Em um estudo de caso, realizado no Banco de Sangue de Nova York, Cash e colaboradores (1999) atribuíram, às imunoglobulinas Anti-G maternas, a causa da DHRN do recém-nascido, o qual apresentou anticorpos fixados às suas hemácias.

Novaretti e colaboradores, em 2003, identificaram e observaram alta freqüência do aloanticorpo anti-U em grávidas negras. Os aloanticorpos Anti-U são capazes de causar DHRN e, por esse motivo deve ser realizado, durante a gestação, a pesquisa de anticorpos irregulares, Anti-U, principalmente entre mulheres negras.

1.4 EXAMES DE PRÉ-NATAL PARA O ACOMPANHAMENTO DE GESTANTES RH NEGATIVO E MEDIDAS PROFILÁTICAS PARA A DHRN.

1.4.1 Exames

Em 1945, Coombs, Mourant e Race descreveram procedimentos para detectar anticorpos incapazes de produzir aglutinação. Nesse teste foram utilizados anticorpos contra globulinas humanas e foi chamado de “Teste de Antiglobulina Humana” (AABB, 2005).

Desde então foi aplicado o “Teste de Antiglobulina Indireto” (TAI) (também conhecido como Coombs Indireto) para a Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI). Esse teste também é utilizado para detectar a presença de aloanticorpos eritrocitários em gestantes frente a suspensão de hemácias de triagem (AABB, 2005).

Para o recém-nascido é utilizado o “Teste de Antiglobulina Direto” (TAD) (também conhecido como Coombs Direto), para detectar imunoglobulinas ou fragmentos de componentes do Sistema Complemento fixados às superfícies das hemácias. O TAD é considerado apenas um entre vários indicadores da Doença Hemolítica do Recém-Nascido. O diagnóstico de hemólise imune é baseado nos sinais clínicos, biológicos e pela demonstração dos anticorpos fixados às hemácias através do TAD. Então, o diagnóstico de DHRN é comprovado pela presença de icterícia, exame de bilirrubina, hematócrito e contagem de reticulócitos do recém-nascido, além da pesquisa de anticorpos irregulares maternos e o TAD do recém-nascido (HARMENING, 1999).

A titulação dos anticorpos maternos deve ser realizada quando o Teste de Antiglobulina Indireto for positivo. No Reino Unido, a quantidade de Anti-D é comparada pela medida padrão internacional, IU/mL. Se uma titulação tem resultado acima de 15 IU/mL, é recomendado o uso de testes mais invasivos para confirmação da gravidade da DHRN. Dentre os métodos invasivos destacam-se amniocentese, cordocentese, dentre outros (MOISE Jr, 2002).

Kleihauer e colaboradores descreveram o teste da eluição ácida, em 1957, para confirmar a ocorrência da hemorragia feto-materna. Esta transferência de sangue fetal para o compartimento intravascular materno ocorre, devido à ruptura na membrana vículo-sincicial da placenta. Após o advento da citometria de fluxo, Medearis e colaboradores, em 1984, referiram a hemorragia feto-materna como fenômeno de ocorrência universal (BAIOCHI et al., 2005). Cianciarullo e colaboradores (2003) afirmam que a hemorragia feto-materna ocorre com frequências de 7%, 16% e 29%, respectivamente no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional.

A amniocentese é um procedimento obstétrico considerado invasivo no qual pode ocorrer hemorragia feto-materna e, conseqüentemente, nos casos de incompatibilidade sangüínea, a aloimunização. Em estudo realizado por Murray e colaboradores (1983) foi observada a frequência de aloimunização, em 3,4% de mães Rh negativo, após amniocentese, o que foi considerada alta quando comparada com a de gestantes que não haviam utilizado esse procedimento (1,5%). Os autores sugerem que o acompanhamento em mulheres Rh negativo, que necessitam de amniocentese no segundo trimestre gestacional, seja aprimorado (MURRAY et al., 1983).

Em estudo realizado também no Reino Unido foi possível detectar o genótipo Rh do feto, por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando o DNA fetal circulante, no plasma de gestantes aloimunizadas pelo antígeno D. Comparada com os testes sorológicos, essa técnica apresentou 100% de confiabilidade para detectar o RhD do feto, além de reduzir em 42% a necessidade da utilização de técnicas mais invasivas de teste pré-natal (HARPER et al., 2004).

1.4.2 Imunoglobulina Anti-Rh (D)

Em 1960 foi desenvolvida por Ronald Finn uma medida profilática, “Imunoglobulina Anti-D”, para impedir a aloimunização de mães Rh negativo, quando em contato com o antígeno D fetal (WRIGHT, 2004). Em 1968, a administração da Imunoglobulina anti-D era indicada, somente, no período pós-parto. Antes da descoberta desse método profilático, a DHRN era a maior causa de morte perinatal. A letalidade atingia cerca de 50% dos filhos de mães D (-) imunizadas pelo antígeno D (QUEENAN, 2002). Após a introdução do uso da “Imunoglobulina anti-D”, foi reduzida em muito a morbidade e a mortalidade infantil (CANNON et al, 2003; MIYADAHIRA, 2000). O soro é composto por altos títulos de anticorpos anti-D, da classe IgG, produzidos em doadores masculinos voluntários Rh negativo, que são sensibilizados com pequenas quantidades de hemácias D (+). Esse soro deve ser aplicado, em mães D (-), que não possuem aloanticorpos anti-D, até três dias após o parto, com a finalidade de neutralizar as possíveis hemácias fetais, D (+), que penetraram na circulação materna durante o parto (MICTHELL et al., 1996). Mesmo com essa medida profilática, ainda hoje, ocorre a DHRN devido: a falta de administração do soro anti-D pós-parto; a falha na administração da dose adequada, em episódios com risco de sensibilização, por exemplo, aborto, amniocentese, ou, ainda, falha na proteção da “Imunoglobulina Anti-D”, mesmo quando administrada corretamente. Em estudo realizado no Reino Unido, de 900 casos em situações de riscos de aloimunização, apenas 59% das mulheres foram tratadas com a “Imunoglobulina Anti-D” (MIYADAHIRA, 2000). A aloimunização pode ocorrer também nos casos onde não há indicação de risco (URBANIACK; GREISS, 2000).

A partir de 1976, a imunoprofilaxia anti-D foi estendida para casos de aborto, em mulheres Rh negativo e, em 1981, para outros procedimentos considerados de risco para sensibilização materna (LEE et al., 2003).

Ainda na década de 70, a imunoprofilaxia anti-D foi recomendada para todas as gestantes Rh negativo, não aloimunizadas, com feto Rh positivo ou tipo sanguíneo desconhecido, que estavam no período gestacional entre a 28^a e 29^a semanas. Essa medida foi preconizada pela “Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada” – SOGC e pelo “American College of Obstetricians and Gynecologists” entre outras instituições e autores (LEE et al., 1999). A dose de Imunoglobulina anti-D recomendada foi de 300µg (1.500 UI), quantidade suficiente para inativar 30mL de sangue Rh positivo. Portanto, são necessários 10µg de Imunoglobulina anti-D para inativação de cada mililitro de sangue fetal (MIYADAHIRA, 2000). A SOGC recomenda a utilização de duas doses de 100µg ou de 120µg, a primeira na 28^a semana de gestação e a segunda na 34^a, como alternativa para a dose única de 300µg (LEE et al., 1999).

1.5 TRATAMENTOS PARA A DOENÇA HEMOLÍTICA DO RECÉM-NASCIDO

Liley descreveu, em 1963, a transfusão intraperitoneal como tratamento para a anemia severa causada pela aloimunização materna (SCHUMACHER; MOISE, 1996). Em 1981, Rodeck e colaboradores descreveram o uso da transfusão fetal intravascular e logo depois foi inserido o uso da ultra-sonografia para monitoramento da transfusão intrauterina (van KAMP et al., 2004).

ULM e colaboradores (1999) utilizaram Imunoglobulina intravenosa (IVIG) em fetos com DHRN por incompatibilidade Rh. Esta IVIG é usada como terapia em pacientes com anemia auto-imune severa e em gestantes aloimunizadas com complicações durante a gravidez. Um dos mecanismos de ação dessa imunoglobulina é bloquear o sistema retículo-endotelial devido à ocupação dos receptores Fcγ de fagócitos. No estudo foram administradas doses de IVIG nos fetos, após a segunda transfusão sanguínea intra-uterina, sendo observada diminuição do número de transfusões sanguíneas usadas no tratamento.

Facchini e colaboradores (2000) realizaram estudo com bebês que desenvolveram anemia severa devido à incompatibilidade Rh. Os autores concluíram que o uso concomitante de medicamentos e fototerapia intensiva pode ser um tratamento vantajoso, antes de iniciar tratamentos mais agressivos, como a transfusão exsanguínea.

Cabral e colaboradores (2001) mostraram que a transfusão intra-uterina foi eficaz em 80% dos fetos acometidos por DHRN, causada pela ação de aloanticorpos Anti-D maternos. Os autores ressaltam, ainda, que para reduzir a aloimunização materna, seria ideal a utilização correta da imunoprofilaxia. Nos casos inevitáveis, reconhecidos precocemente pela detecção da anemia fetal, seria utilizado o tratamento de transfusão intra-uterina. Grab e colaboradores (1999) também afirmam que o tratamento com a transfusão intravascular está associado com alta taxa de sobrevivência e com bom prognóstico neurológico.

A plasmaférese pode ser uma medida profilática por diminuir a concentração de aloanticorpos como foi visto em estudo de caso realizado, em Madri, na Espanha, quando utilizaram plasmaférese como forma de terapia em mães aloimunizadas por Anti-K e Anti-PP₁-P^k. Neste procedimento foi usada uma máquina que separou as células sanguíneas do plasma. O plasma materno contendo aloanticorpos foi descartado e as células sanguíneas foram infundidas novamente na mãe em uma solução de albumina ou de plasma. O resultado esperado dessa terapia é a diminuição dos títulos dos aloanticorpos. Nesse estudo, os títulos de anticorpos, antes da plasmaférese, foram de 256 e 521, tendo baixado para 8 e 64, após o procedimento (FERNÁNDEZ-JIMÉNEZ et al., 2001).

Em estudo realizado no Reino Unido, foi utilizada a ultra-sonografia Doppler para mensurar a velocidade do fluxo sanguíneo nos vasos fetais, com a finalidade de prever o grau da anemia fetal. Esse tipo de exame não-invasivo é importante para avaliar a necessidade e a indicação de tratamentos mais invasivos (DIVAKARAN et al., 2001).

Nos casos de DHRN pelo sistema sangüíneo ABO é utilizado com freqüência o tratamento fototerápico. Estudo realizado, no Hospital e Maternidade Santa Joana e Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo, SP, entre os anos de 1996 a 1998, foram observados dois grupos que apresentaram tipos diferentes de incompatibilidades e que desenvolveram a DHRN. No grupo com incompatibilidade do tipo Rh, a freqüência de DHRN com tratamento de transfusão exsangüíneo foi de 33,56%; e no segundo grupo, com incompatibilidade para o sistema ABO, a freqüência de DHRN, com tratamento de fototerapia, foi de 44,43% (CIANCIARULLO et al., 2003).

Com a evolução das técnicas neonatais, como a transfusão exsangüíneo, o número de óbitos caiu de 50% para 25% e, após o desenvolvimento da medicina fetal (2002) e da transfusão intra-uterina, o risco de morte atingiu 4% (QUEENAN, 2002).

2 Objetivos

Verificar a presença de aloanticorpos eritrocitários, regulares e irregulares, em gestantes Rh Negativo;

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a frequência de grupos sanguíneos em gestantes e recém-nascidos dos Estudos Prospectivo e Retrospectivo;
- b) Verificar a presença, especificidade e classe dos aloanticorpos eritrocitários irregulares nas gestantes dos Estudos Prospectivo e Retrospectivo;
- c) Verificar os títulos dos aloanticorpos eritrocitários irregulares dos Estudos Prospectivo e Retrospectivo;
- d) Verificar a presença, especificidade e classe dos aloanticorpos eritrocitários regulares nas gestantes do Estudo Prospectivo;
- e) Verificar a presença de imunoglobulinas fixadas às hemácias fetais nos Estudos Prospectivo e Retrospectivo;
- f) Associar situações que possam apresentar risco para a aloimunização (transfusão, aborto, gestações de pais diferentes e números de gestações) com a aloimunização regular e irregular no Estudo Prospectivo;

3 Métodos

3.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O presente trabalho foi submetido e aprovado sob o número 0031-03, no dia 18 de março de 2004, pelo Comitê de Ética em pesquisa da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM, Manaus, AM, Brasil).

3.2 CASUÍSTICA

O Estudo Retrospectivo foi realizado com os registros de gestantes e de seus recém-nascidos, atendidos no Programa de Gestantes Rh Negativo (PGRhN), da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM, Manaus, AM, Brasil), no período de 1º de janeiro de 2003 a 31 de dezembro de 2003. Os dados obtidos dos registros foram os resultados dos exames imuno-hematológicos de mães e de seus recém-nascidos. Neste período foram atendidas 483 mães, no PGRhN. Porém, neste estudo foram incluídos 479 registros por possuírem dados completos das gestantes e este foi o critério de inclusão adotado nesta pesquisa. Dos 479 prontuários, 471 possuíam dados dos recém-nascidos.

Para o Estudo Prospectivo foram convidadas a participar mães maiores de 18 anos, no 8º mês de gestação, cadastradas no PGRhN. Todas as mães, que aceitaram o convite, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndice A) e responderam às perguntas da entrevista (apêndice B). Neste estudo foram realizadas as análises: dos dados obtidos nas entrevistas e dos resultados dos exames imuno-hematológicos das mães e de seus recém-nascidos. Dentre as 347 mães que foram atendidas no HEMOAM, 341 gestantes participaram do nosso estudo, pois estavam dentro dos critérios de inclusão. E destas, apenas 186 dados foram obtidos de seus respectivos recém-nascidos.

Nas entrevistas foram coletados os seguintes dados: idade, naturalidade, nível de escolaridade, profissão, número de gestações, aborto, tratamento soroterápico com a “Imunoglobulina Anti-D”, transfusão sanguínea prévia e gestações anteriores com pais diferentes.

Critérios de inclusão:

- a) Gestante, com tipo sanguíneo Rh negativo;
- b) Com idade igual ou superior a 18 anos;
- c) Cadastrada no Programa de Gestante Rh negativo (PGRhN), antes do 8º mês de gestação;
- d) Consentir a realização de testes imuno-hematológicos com a amostra de sangue, coletada do cordão umbilical de seu recém-nascido.

Critérios de exclusão:

- a) Gestante com idade inferior a de 18 anos;
- b) Gestante com anemia falciforme, leucemia, entre outras doenças hematológicas;
- c) Gestantes cadastradas apenas no 8º mês de gestação, no PGRhN.

3.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Para a realização dos exames imuno-hematológicos foram coletados, no HEMOAM, cinco mililitros de sangue das mães, com EDTA, por via periférica e, dez mililitros de sangue do cordão umbilical dos recém-nascidos, também com EDTA, nas Maternidades onde as gestantes foram atendidas. Todos os exames imuno-hematológicos foram realizados no laboratório do Programa de Gestantes Rh Negativo, no HEMOAM.

Os exames descritos abaixo foram realizados com as amostras de sangue das gestantes e de seus recém-nascidos, dos Estudos Retrospectivo e Prospectivo. Todos os exames imuno-hematológicos foram realizados de acordo com os testes preconizados pelo Manual Técnico da *American Association of Blood Banks*, de 2005 (AABB, 2005).

3.4 EXAMES IMUNO-HEMATOLÓGICOS

3.4.1 Tipagem sangüínea ABO/Rh

O teste de tipagem sangüínea foi realizado em todas as amostras de sangue das gestantes do PGRhN e de seus respectivos recém-nascidos.

Esse método foi utilizado para detectar os antígenos do sistema ABO e seus anticorpos regulares.

Para o teste de tipagem sangüínea, foram realizadas duas provas, uma direta e outra reversa. Na prova direta foram identificados os antígenos eritrocitários de gestantes e de seus recém-nascidos com os reagentes compostos por anticorpos do sistema ABO: Anti-A, Anti-B e Anti-AB e do Sistema Rh: Anti-D. Juntamente com esses soros também foi utilizado o Controle de Rh, reagente usado para confirmar a reação de aglutinação no tubo D. Todos os reagentes deste método foram fabricados pela Soroclone®. Esta prova foi realizada pelo método "em tubo" e caracterizada pela presença ou ausência de aglutinação. A aglutinação,

ou hemaglutinação é baseada na capacidade da ligação do anticorpo de alterar o estado físico do antígeno ao qual se liga (JANEWAY et al., 2002).

Os reagentes Anti-A, Anti-B e Anti-AB foram produzidos a partir de sobrenadantes de culturas celulares contendo anticorpos monoclonais de origem murina, por meio da técnica de hibridização celular adaptada à produção de anticorpos monoclonais de Köhler e Milstein, em 1975.

O reagente Anti-D, monoclonal humano, utilizado na pesquisa, foi produzido a partir de uma mistura de anticorpos IgM e IgG, desenvolvido por meio de culturas de linfócitos humanos imortalizados e adicionado em meio macromolecular, como PEG, Albumina e etc. O Controle de Rh possui formulação idêntica à do reagente Anti-D, exceto pela presença de anticorpos específicos anti-D, sendo o Controle de Rh composto apenas, pelos mesmos aditivos macromoleculares que potencializam a reatividade de anticorpos não-aglutinantes.

Na prova reversa, foram testados os anticorpos regulares presentes no plasma das gestantes e dos recém nascidos, com reagentes preparados a partir de concentrados de hemácias de doadores dos tipos sanguíneos A e B (Hemácias A e B), que são produzidos no laboratório do HEMOAM.

A prova direta consistiu em identificar cinco tubos de hemólise (tubos de vidro de 10x75mm ou 12x75mm) com as letras correspondentes aos reagentes utilizados. Em cada tubo correspondente, foram adicionados 50 microlitros (μL) de Anti-A, 50 μL de Anti-B, 50 μL de Anti-AB, 100 μL de Anti-D e 100 μL de Controle de Rh. Uma suspensão de 3 a 5% de hemácias, de cada gestante ou recém-nascido, foi preparada em soro fisiológico 0,9% e, logo após, foram adicionados 100 μL dessa suspensão a cada tubo correspondente. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados por cerca de 15 segundos, em velocidade de 3500 rpm. Após

a centrifugação, os botões de hemácias, formados nos tubos, foram ressuspensos levemente e a reação de aglutinação foi observada.

É importante ressaltar que a prova reversa foi realizada como confirmação da prova direta, somente para as gestantes. Nos recém-nascidos esta prova não é necessária, pois a maioria dos anticorpos encontrados é de origem materna.

Para realizar a prova reversa foram identificados dois tubos de hemólise, com as letras *a* e *b* e, em cada tubo, foram adicionados 100 µL de plasma da gestante. Nos tubos correspondentes foram adicionados 50 µL de hemácias A e 50 µL de hemácias B. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados por cerca de quinze segundos, em velocidade de 3500 rpm. Após a centrifugação, os tubos foram homogeneizados levemente e foi, então, observada a reação de aglutinação.

3.4.2 Pesquisa de D fraco

Algumas hemácias expressam o antígeno D tão fracamente que não são aglutinadas diretamente pela maioria dos reagentes Anti-D. A expressão fraca de D pode ser identificada por adição de Soro de Antiglobulina Humana (AGH), após incubação das hemácias com Anti-D, em banho-maria à 37°C, por 15 a 30 minutos e lavagem das mesmas com soro fisiológico a 0,9%, por três vezes. Todas as amostras Rh (D) negativo das gestantes e dos recém-nascidos foram submetidas ao teste de D fraco.

Os reagentes utilizados nesta técnica foram: Anti-D, Controle de Rh, Soro de AGH (fabricados pela Soroclone® e Controle de AGH (produzido pelo HEMOAM).

O Soro de AGH (Soro Anti-IgG) foi preparado a partir de soros de coelho ou de cabra previamente imunizados com a fração gamaglobulina do soro humano. O Controle do Soro de Antiglobulina Humana é uma suspensão de hemácias adsorvidas com Anti-D, preparada no laboratório de Imuno-hematologia do HEMOAM. O método consistiu na

lavagem das hemácias das amostras das gestantes ou dos recém-nascidos, por três vezes com soro fisiológico (0,9%). Uma suspensão de 3 a 5% foi preparada com as hemácias lavadas. Após identificar dois tubos, D e C, foram adicionados 100 µL de Anti-D e 100 µL de Controle de Rh (D) nos tubos correspondentes. Em cada tubo foram adicionados 50 µL da suspensão de hemácias lavadas. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados por cerca de 15 segundos, em velocidade de 3500 rotações por minuto. Após a centrifugação, os tubos foram novamente homogeneizados levemente e, então, observada a aglutinação.

Nos casos em que houve aglutinação, somente no tubo D, o teste foi considerado Rh positivo fraco e não foi necessário continuar a técnica. Já nos casos em que não houve aglutinação, a técnica foi seguida para outra fase.

Os tubos foram homogeneizados manualmente e incubados à 37°C por 30 minutos. Após a incubação, novamente, foram homogeneizados e centrifugados por 15 segundos, em velocidade de 3500 rpm. Após a centrifugação, os tubos foram homogeneizados levemente e observada a aglutinação.

Nos casos em que ocorreu aglutinação, somente no tubo D, o teste foi considerado Rh positivo fraco, caso contrário, a técnica foi seguida.

Os tubos foram lavados com soro fisiológico (0,9%), três vezes a 3500 rpm e o tempo de cada lavagem foi de um minuto. Após o final da terceira lavagem, o soro fisiológico foi decantado completamente e, a cada tubo, foram adicionados 100 µL de Soro de AGH. Depois de homogeneizados, os tubos foram centrifugados por cerca de 15 segundos, em velocidade de 3500 rotações por minuto. Após a centrifugação, os tubos foram homogeneizados levemente e observada a aglutinação.

Nos tubos, que não apresentaram aglutinação com Soro de AGH, foram adicionados 50 µL de Controle de AGH, homogeneizados e centrifugados por 15 segundos em velocidade

de 3500 rpm. Após a centrifugação, os tubos foram homogeneizados levemente e a aglutinação, observada. Os tubos que apresentaram aglutinação, após a adição do Controle de AGH, a amostra foi considerada Rh negativo.

3.4.3 Teste de Antiglobulina Indireto (TAI)

Este teste foi utilizado para detectar aloanticorpos eritrocitários presentes no plasma das gestantes. O método usado neste estudo foi “Gel centrifugação”. Para este método foram utilizados os seguintes reagentes: o Cartão LISS/Coombs da DiaMed®, a solução de baixa força iônica a LISS da DiaMed® e as suspensões Imunocel I e II, preparadas a partir de concentrados de hemácias fenotipadas para os sistemas sanguíneos Rh, Kell, Duffy, Kidd, Lewis, P, MNS, Lutheran e Diego, triadas de doadores, no laboratório de imuno-hematologia, do HEMOAM.

O cartão LISS/Coombs contém microtubos com antiglobulina humana poliespecífica (anti-IgG de coelho e anti-C3d monoclonal da linhagem celular C139-9) suspensa em gel Sephadex.

Dois tubos de hemólise foram numerados, I e II, e suspensões de hemácias a 1% foram preparadas em LISS de cada Imunocel I e II. Para cada suspensão foram utilizados 500 µL de cada Imunocel (I e II) a 3%, previamente preparado, diluído em soro fisiológico 0,9% e, 1000 µL de LISS. No cartão LISS/Coombs foram identificados dois microtubos com as iniciais I e II, além das iniciais do nome da gestante. A cada microtubo foram colocados 25 µL do plasma da gestante e adicionados 50 µL das suspensões preparadas de Imunocel I e II. Este cartão foi incubado à 37°C, durante dez minutos e, logo após, centrifugado, por dez minutos, a 3500 rpm.

O teste foi considerado negativo nos casos em que as hemácias foram sedimentadas, não ocorrendo à aglutinação, indicando ausência de aloanticorpos. Porém, nos casos onde as

hemácias não foram sedimentadas, ou seja, apresentaram aglutinação, o teste foi considerado positivo para a presença de aloanticorpos.

Para este teste foram utilizados controles, positivo e negativo, nos quais foram testadas as suspensões de Imunocel I e II. O controle positivo foi preparado a partir de uma amostra de plasma de doador ou paciente com aloanticorpos anteriormente detectados pelo laboratório de controle de qualidade interno (HEMOAM), como também a amostra utilizada como controle negativo, a qual estava negativa para aloanticorpos. Todos os controles reagiram conforme esperado, validando as suspensões utilizadas no teste em questão.

3.4.4 Tratamento do plasma com Dithiotreitol (DTT)

Esse teste foi realizado em todas as amostras de sangue das gestantes com aloanticorpos detectados. Para confirmar a classe (IgG ou IgM) dos aloanticorpos, o plasma foi tratado com Dithiotreitol 0,01M (DTT) para ser utilizado no Teste de Antiglobulina Indireto.

O DTT 0,01M é um reagente sulfidril que desnatura as ligações dissulfeto da cadeia J (juncional) das moléculas de IgM, interferindo na sua capacidade de aglutinação. Este reagente foi preparado no laboratório de química do HEMOAM. O método foi realizado “em tubo”, descrito no Manual Técnico da *American Association of Blood Banks* (AABB, 2005).

Para o teste, um tubo foi identificado com as iniciais DTT e as iniciais da gestante. Nesse tubo foram adicionados 100 µL do plasma da gestante e 100 µL de DTT 0,1M. Logo após, o tubo foi incubado por 30 minutos a 37°C e, em seguida, foi repetido o Teste de Antiglobulina Indireto (TAI). Após o teste foi verificada a presença ou não de aglutinação nos microtubos. Quando as hemácias estavam sedimentadas, ou seja, com ausência de aglutinação, o resultado indicava a presença de IgM. E quando as hemácias aglutinavam, os aloanticorpos presentes pertenciam à classe IgG.

Para averiguar se houve redução das pontes dissulfeto das moléculas de IgM com DTT, foram usadas duas amostras de plasmas, uma com IgM e outra com IgG, como amostras-controle negativo e positivo, respectivamente. Todos os testes com DTT foram devidamente validados com esses controles.

3.4.5 Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI)

Para a identificação dos aloanticorpos detectados nas amostras de sangue das gestantes foi utilizado o painel de identificação de anticorpos eritrocitários.

O método utilizado foi “gel centrifugação”, utilizando o cartão LISS/Coombs Painel de Hemácias-teste (kit com 11 frascos), LISS e Bromelina, produzidos pela DiaMed®.

Dois cartões LISS/Coombs foram identificados com as iniciais da gestante, cada microtubo foi numerado de 1 a 11, e o último microtubo (12) foi identificado como AC (auto-controle). O auto-controle foi realizado para validar a reação de identificação dos aloanticorpos. Em cada microtubo (de 1 a 11 e AC) foram colocados 25 µL do plasma da gestante. Foram adicionados 50 µL de cada suspensão de hemácias, do painel de identificação, correspondente ao número do frasco. Para o auto-controle, foram adicionados, no microtubo correspondente, 50 µL da suspensão de hemácias, anteriormente preparada em LISS, e adicionados 25 µL de Bromelina. Os cartões foram incubados durante dez minutos à 37°C, e após, centrifugados em rotação 3500 rpm, durante dez minutos.

Em cada microtubo foi observada a aglutinação, ou não, das hemácias e o resultado foi anotado, em uma planilha, utilizando cruzes como valores (de “+” a “++++”). Nos microtubos em que as hemácias estavam completamente sedimentadas, o resultado foi anotado como negativo. Nos microtubos em que as hemácias estavam aglutinadas, o resultado foi anotado como positivo, em cruzes, por graus de aglutinação. Após, a planilha do teste foi comparada com a de identificação, onde foram anotados todos os antígenos encontrados nas

hemácias do painel. Dessa forma, os aloanticorpos irregulares foram identificados, de acordo com a planilha do painel de identificação de anticorpos da DiaMed®.

3.4.6 Titulação de Anticorpos

Os títulos foram determinados para as amostras de sangue das gestantes que possuíam aloanticorpos identificados.

As Hemácias de triagem (Imunocel I ou II) usadas foram as que expressavam o antígeno correspondente à especificidade do aloanticorpo irregular detectado. Além das hemácias de triagem (Imunocel I ou II), foi usado o Soro de AGH da DiaMed®.

Para a titulação dos aloanticorpos o plasma foi diluído seriadamente em solução salina 0,9% (por exemplo, 1:2 até 1:2048). Para isso, 11 tubos foram identificados de acordo com a diluição do plasma. Em cada tubo foram colocados 100 µL de soro fisiológico 0,9%. No primeiro tubo foram adicionados 100 µL de plasma da gestante. E com auxílio da pipeta, a mistura foi levemente homogeneizada e foram retirados, do tubo, 100 µL para adicionar no tubo seguinte e assim, sucessivamente. Ao final, do primeiro ao penúltimo tubo foram adicionados 50 µL da suspensão de hemácias selecionadas para a titulação. O tubo 11 foi reservado para ser utilizado nos casos onde ocorreu aglutinação até o tubo 10, para dar continuidade às diluições. Os tubos foram levemente homogeneizados e incubados por 30 minutos, à 37°C. Após, foram lavados com soro fisiológico 0,9% por três vezes. Após a terceira lavagem, o sobrenadante foi decantado e pipetado 100 µL de Soro de AGH, em cada tubo. Novamente os tubos foram centrifugados com rotação de 3500 rpm, durante 15 segundos. Após a centrifugação, cada tubo foi levemente homogeneizado para ser observada a aglutinação. Para cada reação, encontrada nas diferentes diluições, foi atribuído valor em “cruzes”. Os resultados foram anotados na mesma planilha de identificação de anticorpos. O

título de cada aloanticorpo foi obtido de acordo com a diluição, onde foi observada a última reação (“ponto final”).

3.4.7 Classificação dos Anticorpos Regulares (prova reversa)

O plasma das gestantes foi tratado com DTT para detectar os anticorpos regulares, da classe G, para o Sistema ABO.

Para esse teste foram utilizados o DTT 0,01M e as Hemácias A e B (reagentes produzidos nos laboratórios do HEMOAM).

Dois tubos de hemólise foram identificados como *a* e *b*. A cada tubo foram pipetados 100 µL de plasma da gestante, tratado com DTT (como previamente descrito). Adicionando 50 µL de hemácias A e 50 µL de hemácias B, em cada tubo correspondente. Esses tubos foram homogeneizados levemente e centrifugados com rotação de 3500 rpm durante 15 segundos. Após a centrifugação, os tubos foram homogeneizados para observar a aglutinação. Nos tubos que havia aglutinação, foi confirmada a presença de anticorpos regulares IgG no plasma testado. Do contrário, o resultado foi considerado negativo para a presença de anticorpos regulares IgG.

Para esse teste também foram utilizados controles positivos e negativos, da mesma forma que no tratamento do plasma com DTT, descrito anteriormente. E todos os testes foram validados por esses controles.

3.4.8 Teste de Antiglobulina Direto (TAD)

O teste de antiglobulina direto (TAD) foi utilizado para detectar anticorpos maternos ou fragmentos de componentes do Sistema Complemento fixados às membranas das hemácias dos recém-nascidos.

O método utilizado foi “gel centrifugação”, com o cartão LISS/Coombs e o LISS, produzidos pela DiaMed®.

Um microtubo do cartão foi identificado com as iniciais da mãe do recém-nascido e as iniciais TAD. Em um tubo de hemólise foi preparada uma suspensão de hemácias do recém-nascido em LISS a 1%, na proporção de 1000 µL de LISS com 10 µL de sedimento de hemácias do recém-nascido. Dessa suspensão foram pipetados 50 µL no microtubo identificado, e centrifugado por 10 minutos, em 3500 rpm.

Quando as hemácias foram totalmente sedimentadas, sem aglutinação, o resultado foi negativo, o que indicou a ausência de anticorpos maternos ou fragmentos dos componentes do Sistema Complemento fixados à membrana das hemácias do recém-nascido. Do contrário, o resultado foi positivo.

3.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados obtidos foram inseridos em um banco de dados no programa Epi Info™ versão 3.3.2 (versão Windows) e deste, foram obtidas análises de frequências descritivas. Também foram utilizados os programas de análise estatística “R” e o “SAS”, para as análises de comparação. Nestas análises usamos o Teste Qui-quadrado, (sem correção e com correção de Yates) e o Teste exato de Fisher, todos com nível de confiança de 95%.

Os locais de naturalidade das gestantes foram classificados de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (www.ibge.gov.br), para as microrregiões do Estado do Amazonas, como descrito abaixo:

- a) Alto Solimões: Amaturá, Atalaia do Norte, Benjamin Constant, Fonte Boa, Jutai, Santo Antônio do Içá, São Paulo de Olivença, Tabatinga e Tonantins;
- b) Boca do Acre: Boca do Acre e Pauini;
- c) Coari: Anamã, Anori, Beruri, Caapiranga, Coari e Codajás;

- d) Itacoatiara: Itacoatiara, Itapiranga, Nova Olinda do Norte, Silves e Urucurituba;
- e) Japurá: Japurá e Maraã;
- f) Juruá: Carauari, Eirunepé, Envira, Guaiará, Ipixuna, Itamarati e Juruá;
- g) Madeira: Apuí, Borba, Humaitá, Manicoré e Novo Aripuanã;
- h) Manaus: Autazes, Careiro, Careiro da Várzea, Iranduba, Manacapuru, Manaquiri e Manaus;
- i) Parintins: Barreirinha, Boa Vista dos Ramos, Maués, Nhamundá, Parintins, São Sebastião do Uatumã, Urucará;
- j) Purus: Canutama, Lábrea e Tapauá;
- k) Rio Negro: Barcelos, Novo Airão, Santa Isabel do Rio Negro e São Gabriel da Cachoeira;
- l) Rio Preto da Eva: Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva;
- m) Tefé: Alvarães, Tefé e Urini.

As localidades de outros estados e outros países foram classificadas como *outros*.

4 Resultados

No Estudo Retrospectivo foram levantados os registros de 483 gestantes atendidas no Programa de Gestantes Rh Negativo, durante o ano de 2003. No entanto, foram utilizados por possuírem todos os dados para análise, 479 registros de gestantes e 471 registros de seus recém-nascidos.

Durante o período de abril a novembro de 2004 foram atendidas, no PGRhN do Hemoam, 347 gestantes Rh negativo, que estavam no oitavo mês de gestação. Dentre essas, 340 gestantes fizeram parte do Estudo Prospectivo pois atendiam aos critérios de inclusão deste trabalho e aceitaram participar da pesquisa. Dentre os recém-nascidos dessas mães, apenas 186 tiveram suas amostras de sangue coletadas do cordão umbilical e enviadas ao Hemoam para análise.

4.1 ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA

Esta análise foi realizada somente com as gestantes que participaram do Estudo Prospectivo, pois durante a entrevista foi possível obter os seus dados pessoais.

O gráfico 1 expressa a frequência das faixas etárias das gestantes. A faixa etária mais freqüente foi entre: 23 e 27 anos, com 37% das gestantes, seguida pela faixa entre 18 e 22 anos, com 32% e 28 e 32 anos, com 17%. Apenas duas gestantes pertenciam à faixa etária entre 43 e 47 anos. As gestantes apresentaram idade média de 26,1 anos.

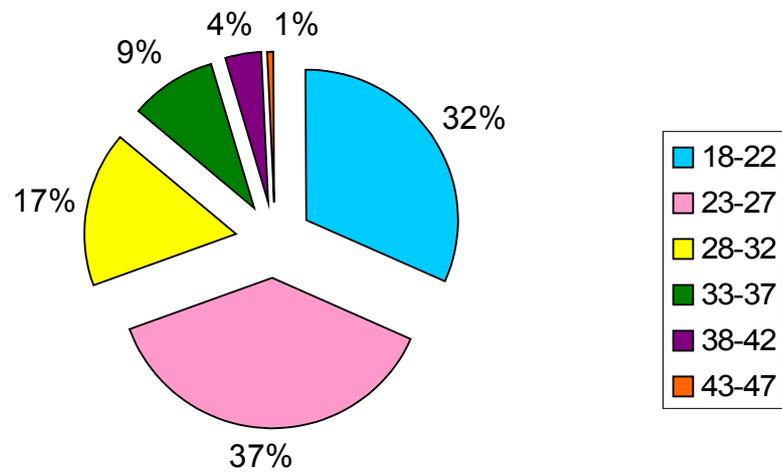


Gráfico 1: Frequência das gestantes do Estudo Prospectivo, distribuídas por faixa etária.

O gráfico 2 expressa a frequência do grau de escolaridade das gestantes do Estudo Prospectivo. O ensino médio foi o grau de escolaridade mais frequente entre as gestantes, com 57%.

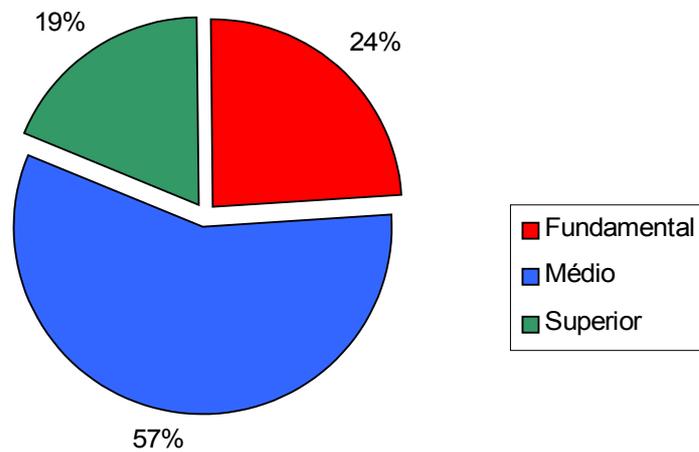


Gráfico 2: Frequência do grau de escolaridade das gestantes do Estudo Prospectivo.

O gráfico 3 apresenta a frequência de profissão das gestantes Rh negativo do Estudo Prospectivo. Entre as várias profissões exercidas pelas gestantes, as mais frequentes foram: dona de casa (49%), estudante (22%) e outras* (18%).

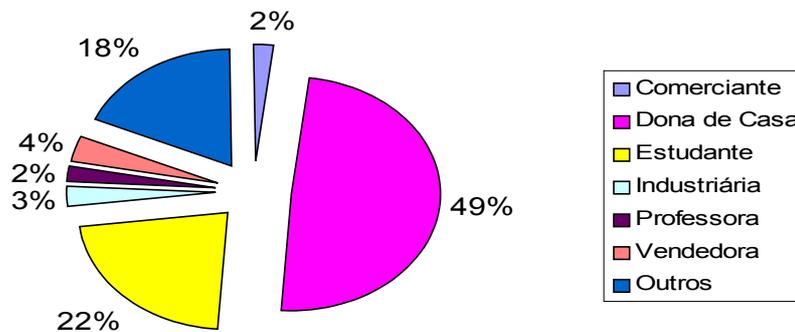


Gráfico 3: Frequência de profissão das gestantes do Estudo Prospectivo.

* Outras - Inclui as seguintes profissões: administradora de empresas, advogada, agente de saúde, agricultora, analista, analista de materiais, assistente social, autônoma, auxiliar administrativo, auxiliar contábil, auxiliar de biblioteca, cabeleireira, caixa, contadora, costureira, doméstica, engenheira eletrônica, executiva, frentista, funcionária pública, médica, policial militar, secretária, serviços gerais, técnica em enfermagem e telemarketing.

No gráfico 4 estão expressas as frequências sobre o número de gestações distribuído por faixa etária. A primeira e segunda gestações foram mais frequentes para as gestantes pertencentes a faixa etária entre 18 e 22 anos. A idade média para as primigestas foi de 24,1 anos. A terceira e a quarta gestação foram mais frequentes nas gestantes com idade entre 23 e 27 anos. As duas gestantes da faixa etária entre 43 e 47 anos estavam na segunda gestação.

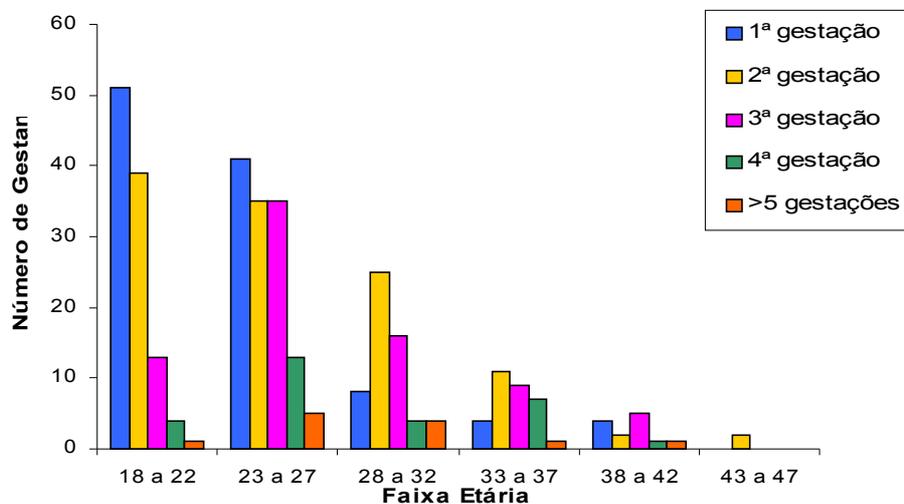


Gráfico 4: Frequência de números de gestações distribuídas por faixa etária, para o Estudo Prospectivo.

O gráfico 5 expressa a frequência de gestações entre as mães que cursaram o ensino fundamental. A maior frequência observada foi para a terceira gestação. A idade média para as primigestas desse nível de ensino foi de 21,4 anos.

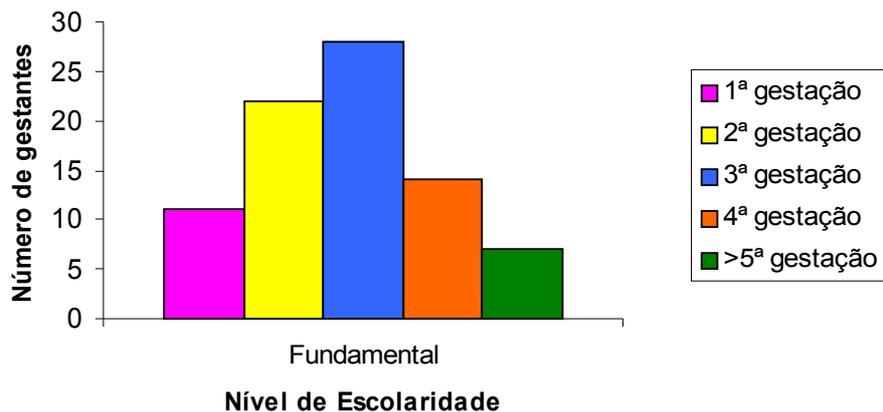


Gráfico 5: Frequência de números de gestações para as gestantes do Estudo Prospectivo que cursaram o Ensino Fundamental.

A frequência de gestações, entre as mães que cursaram o ensino médio, está expressa no gráfico 6. Das mães desse nível de ensino, 38% estavam na primeira gestação e 36%, na segunda gestação. A idade média para as primigestas do nível médio foi de 23,3 anos.

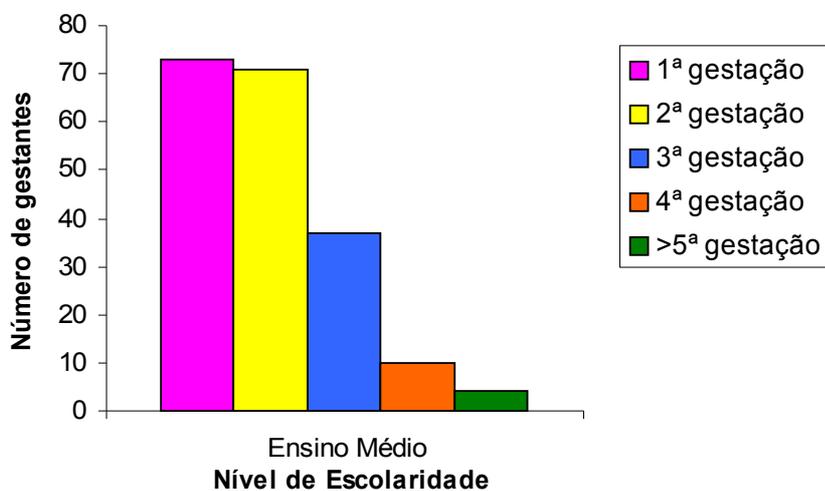


Gráfico 6: Frequência de números de gestações para as gestantes que cursaram o Ensino Médio.

Das mães que cursaram o ensino superior 37% eram primigestas e 33% estavam na segunda gestação (Gráfico 7). A idade média entre as primigestas foi de 27,6 anos para o nível superior.

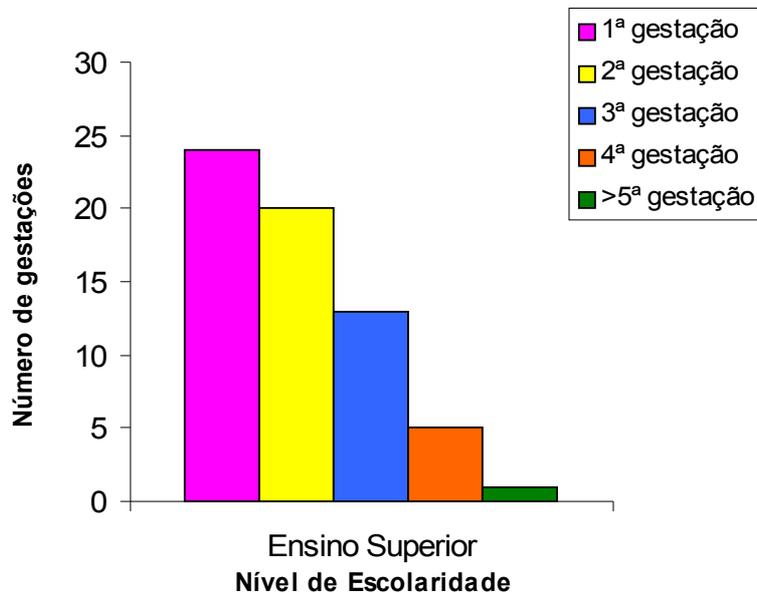


Gráfico 7: Frequência de números de gestações para as mulheres que cursaram o Ensino Superior.

Pelo Teste Qui-quadrado, no nível de 95% de confiança, foi observado que existe associação entre o grau de escolaridade e a quantidade de gestações ($p\text{-valor} < 0,0001$).

Dentre as gestantes que participaram do Estudo Prospectivo, 62,9% eram naturais da região de Manaus, 23,2% procedentes de outros Estados do Brasil, 0,6% oriundas de outros países e 13,3% nascidas em outros Municípios do Estado do Amazonas, como representado no mapa (Figura 1).



Figura 1: Mapa da distribuição das gestantes Rh negativo por microrregiões do Estado do Amazonas.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS SANGÜÍNEOS

Esta análise foi realizada para as gestantes dos dois Estudos, o Retrospectivo e o Prospectivo.

No Gráfico 8 estão expressas as frequências dos grupos sanguíneos das 340 gestantes que participaram do Estudo Prospectivo.

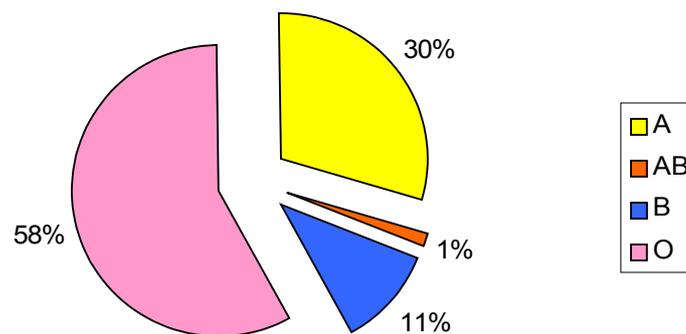


Gráfico 8: Frequência dos grupos sanguíneos das gestantes do Estudo Prospectivo.

O gráfico 9 apresenta as frequências dos grupos sanguíneos das 479 gestantes que participaram do Estudo Retrospectivo.

Para os dois Estudos o grupo sanguíneo “O” apresentou a mesma frequência de 58% e o grupo sanguíneo A foi também similar 30% no Estudo Prospectivo e 32% no Estudo Retrospectivo. (Gráficos 8 e 9).

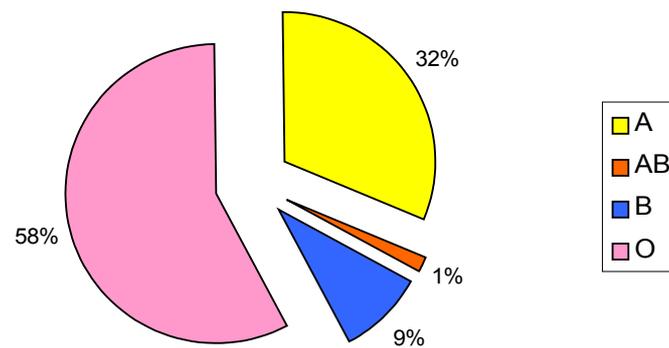


Gráfico 9: Frequência dos grupos sanguíneos das gestantes do Estudo Retrospectivo.

Dentre os 186 recém-nascidos do Estudo Prospectivo, 116 (63%) pertenciam ao grupo sanguíneo “O”, assim como 286 (61%) dos recém-nascidos do Estudo Retrospectivo (Gráfico 10). O grupo “A” também foi o segundo mais freqüente entre os recém-nascidos com 45 (24,2%) no Estudo Prospectivo e 142 (30,1%) no Estudo Retrospectivo.

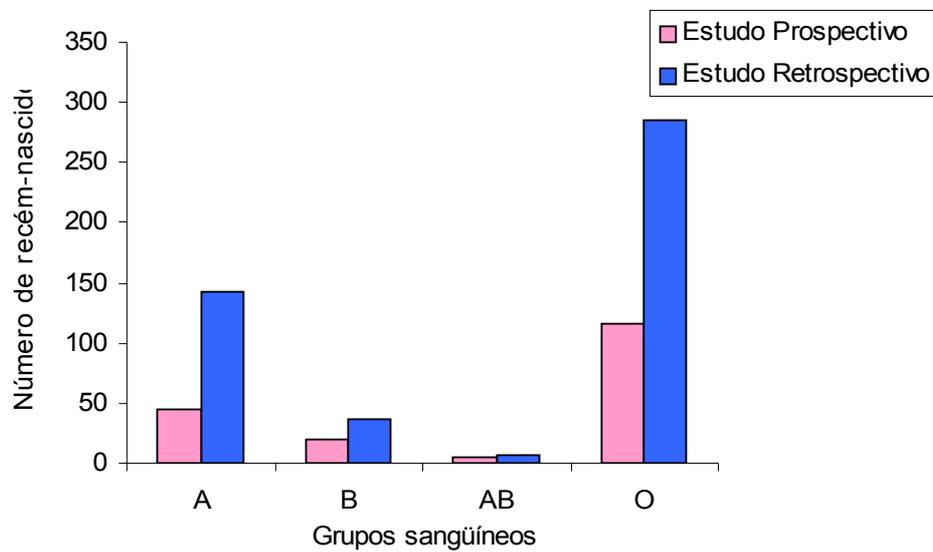


Gráfico 10: Distribuição de recém-nascidos dos Estudos Prospectivo e Retrospectivo por grupo sanguíneo do sistema ABO.

A freqüência de Rh positivo para os recém-nascidos dos Estudos Prospectivo e Retrospectivo foi de 77% e 87%, respectivamente.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DE ALOANTICORPOS IRREGULARES

A identificação de aloanticorpos irregulares foi realizada para as gestantes dos dois Estudos, o Prospectivo e o Retrospectivo.

Dentre as 340 gestantes do Estudo Prospectivo, 12 (3,5%) apresentaram aloanticorpos irregulares para antígenos eritrocitários, no oitavo mês de gestação.

Na Tabela I estão expressas as frequências destes aloanticorpos, quanto à especificidade e a classe da imunoglobulina. Entre os aloanticorpos identificados, o Anti-D foi o mais freqüente entre as gestantes aloimunizadas, 75%. Dentre esses, 89% foram classificados como IgG. Todos os aloanticorpos não-identificados pertenciam à classe M.

<i>IAI</i>	<i>IgG</i>	<i>IgM</i>	<i>Total</i>
<i>Anti-D</i>	8 (89%)	1 (11%)	9 (75%)
<i>Anti-DC</i>	1 (100%)	-	1 (8%)
<i>NI</i>	-	2 (100%)	2 (17%)
Total	9 (75%)	3 (25%)	12 (100%)

Tabela I: Frequência da classe de aloanticorpos irregulares identificados nas gestantes do Estudo Prospectivo.

IAI – Identificação de anticorpos irregulares.

NI - Anticorpos não-identificados.

(-) sem reação.

Das 479 gestantes do Estudo Retrospectivo, 27 (5,6%) possuíam aloanticorpos irregulares. Dentre essas, 22 gestantes tiveram os anticorpos identificados e foram classificados como IgG. Setenta e três por cento apresentaram resultado positivo para Anti-D e 27% apresentaram resultados positivos para os dois antígenos: D e C (Tabela II).

<i>IAI</i>	<i>IgG</i>	<i>IgM</i>	<i>Total</i>
<i>Anti-D</i>	16 (73%)	-	16 (100%)
<i>Anti-DC</i>	6 (27%)	-	6 (100%)
Total	22 (100%)	-	22 (100%)

Tabela II: Frequência da classe de aloanticorpos irregulares identificados nas gestantes do Estudo Retrospectivo.

IAI – Identificação de anticorpos irregulares.
(-) sem reação.

Os títulos de anticorpos para 67% das gestantes aloimunizadas do Estudo Prospectivo estavam na faixa entre 128 a 1024. Para as gestantes do Estudo Retrospectivo foram observadas as frequências de títulos de aloanticorpos irregulares de 45% e 30% para as faixas entre 32 e 64 e 512 e 1024, respectivamente (Tabela III).

<i>Titulação de Aloanticorpos Anti-D (IgG)</i>	<i>Estudo Prospectivo</i>	<i>Estudo Retrospectivo</i>
4 – 16	1 (11%)	2 (10%)
32 – 64	1 (11%)	9 (45%)
128 - 256	3 (33%)	2 (10%)
512 - 1024	3 (33%)	6 (30%)
2048 - 8192	1 (11%)	1 (5%)
Total	9 (100%)	20 (100%)

Tabela III: Frequência de titulação de aloanticorpos nas gestantes dos estudos Prospectivo e Retrospectivo.

Nos gráficos 11 e 12 estão expressos os resultados do Teste de Antiglobulina Direto (TAD) dos recém-nascidos dos Estudos Prospectivo e Retrospectivo, respectivamente. A frequência de recém-nascidos com hemácias revestidas pelos aloanticorpos (TAD positivo) foi de 3% (6/186) para o Estudo Prospectivo e 2% (10/471) para o Estudo Retrospectivo.

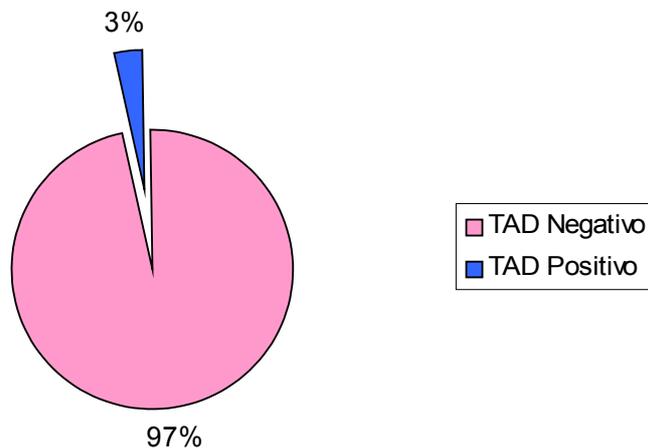


Gráfico 11: Frequência do resultado do Teste de Antiglobulina Direto (TAD) dos recém-nascidos do Estudo Prospectivo.

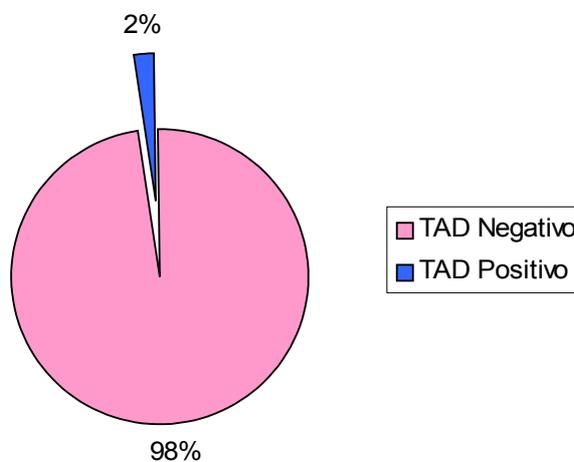


Gráfico 12: Frequência do resultado do Teste de Antiglobulina Direto (TAD) dos recém-nascidos do Estudo Retrospectivo.

Porém dos seis recém-nascidos de mães aloimunizadas do Estudo Prospectivo, que possuíam dados completos, quatro, 67%, nasceram Rh positivo e apresentaram aloanticorpos irregulares fixados às suas hemácias (TAD positivo) (Gráficos 13 e 15). As outras duas crianças nasceram Rh negativo (Gráfico 13). Vale ressaltar que uma das gestantes aloimunizadas deu a luz a gêmeos.

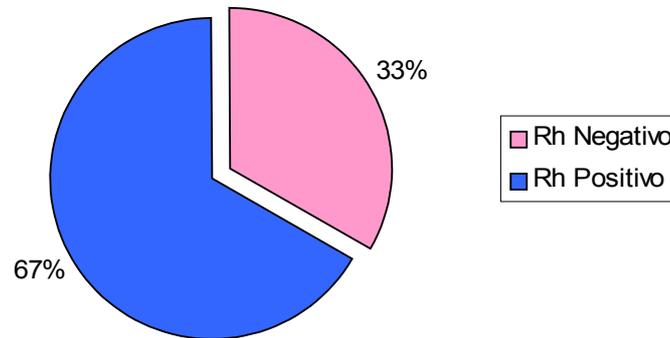


Gráfico 13: Frequência de grupo sanguíneo Rh dos recém-nascidos de mães aloimunizadas, do Estudo Prospectivo.

Das 27 gestantes com anticorpos irregulares do Estudo Retrospectivo foram encontrados 15 registros, sobre o grupo sanguíneo Rh de seus recém-nascidos. Dessas, 14 crianças nasceram Rh positivo e uma Rh negativo (Gráfico 14). Onze registros com dados completos foram encontrados para a especificidade do aloanticorpo irregular das mães e o Teste de Antiglobulina Direto de seus recém-nascidos. Dentre as cinco mães que possuíam anti-D, quatro crianças apresentaram TAD positivo. Das seis mães aloimunizadas para os antígenos D e C, quatro tiveram recém-nascidos com TAD positivo (Gráfico 16). Todos os recém-nascidos com TAD positivo possuíam o antígeno D em suas hemácias. Apenas dois recém-nascidos Rh positivo apresentaram o resultado do TAD negativo e, o outro, recém-nascido não possuía o antígeno D. Portanto oito crianças, 72,7%, apresentaram aloanticorpos irregulares ligados às suas hemácias.

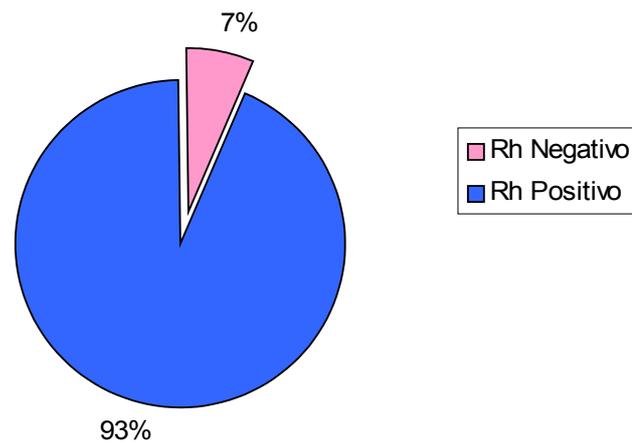


Gráfico 14: Frequência de grupo sanguíneo Rh de recém-nascidos de mães aloimunizadas, do Estudo Retrospectivo.

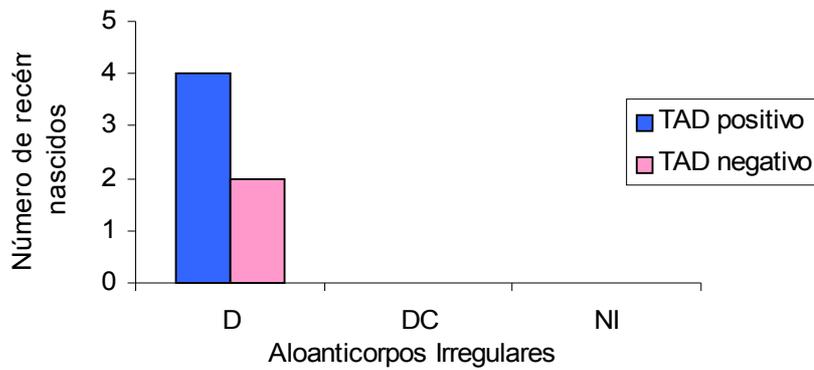


Gráfico 15: Frequência de recém-nascidos com TAD positivo de mães aloimunizadas do Estudo Prospectivo.

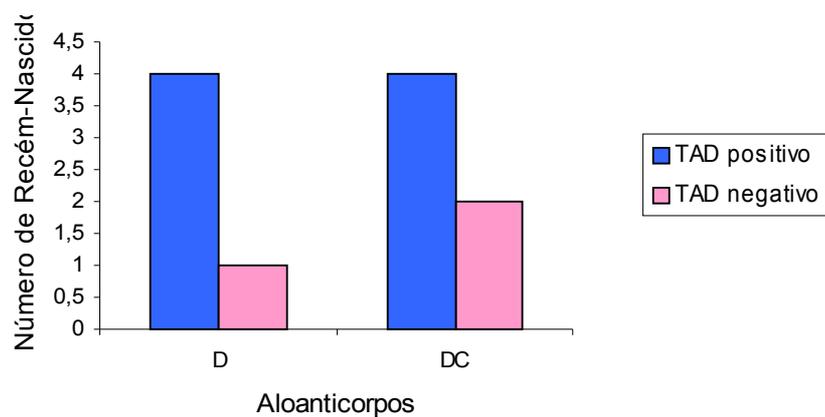


Gráfico 16: Frequência de recém-nascidos com TAD positivo de mães aloimunizadas do Estudo Retrospectivo.

4.4 SITUAÇÕES QUE PODEM INDUZIR A ALOIMUNIZAÇÃO IRREGULAR

Alguns eventos, como: número de gestações, transfusão sanguínea, aborto, entre outros, podem ser potencialmente considerados de risco para aloimunização.

4.4.1 Análise das situações indutoras de aloimunização irregular

Situações		Aloanticorpos Irregulares		Total	P-valor
		Sim	Não		
Transfusão	Sim	2	8	10	0,44
	Não	10	320	330	
Aborto	Sim	3	93	96	0,547
	Não	9	235	244	
Pai diferente	Sim	8	81	89	0,003
	Não	4	247	251	
2 ou mais gestações	Sim	12	220	232	0,009
	Não	0	108	108	

Tabela IV: Presença e ausência de aloanticorpos irregulares distribuídos por situação indutora de aloimunização.

A análise para as diferentes situações foi realizada com as 340 gestantes que participaram do Estudo Prospectivo (Tabela IV).

Observando cada situação foi verificado, com 95% de confiança, pelo teste exato de Fisher, que existe associação da produção de aloanticorpos irregulares com o fato da gestante ter tido duas ou mais gestações e de pais diferentes (Tabela IV).

A Tabela V expressa as frequências de gestantes que produziram aloanticorpos irregulares, distribuídas nos quatro grupos sanguíneos. Dentre as doze mães aloimunizadas quatro pertenciam ao grupo sanguíneo A, três ao B e cinco ao O. A análise mostra que não existe correlação entre os grupos sanguíneos do sistema ABO com a aloimunização irregular.

Presença de Aloanticorpos	<i>Grupos Sangüíneos ABO</i>			
	<i>A</i>	<i>AB</i>	<i>B</i>	<i>O</i>
<i>Não</i>	97 (29%)	5 (2%)	34 (10%)	192 (59%)
<i>Sim</i>	4 (33%)	0	3 (25%)	5 (42%)

Tabela V: Frequência de gestantes com aloanticorpos distribuída por grupos sangüíneos.

Entre as 340 mães do Estudo Prospectivo, 96 (28%) afirmaram ter sofrido aborto, seja espontâneo ou provocado. Dentre as gestantes que sofreram aborto, 49 (51%) não foram tratadas com o soro “Imunoglobulina anti-D” e três dessas gestantes (6%) produziram aloanticorpos irregulares. No entanto, não houve aloimunização entre as 47 gestantes que receberam o tratamento profilático (Tabela VI). Esses dados mostram que o soro Anti-D conferiu proteção para 100% das gestantes tratadas.

Uso da Soroterapia	Aloanticorpos Irregulares		<i>Total</i>
	<i>Não</i>	<i>Sim</i>	
<i>Não</i>	46 (94%)	3 (6%)	49
<i>Sim</i>	47 (100%)	0	47
<i>Total</i>	93	3	96

Tabela VI: Presença de aloanticorpos em gestantes que sofreram aborto e fizeram uso da soroterapia.

4.4.2 Análise das gestantes com aloanticorpos irregulares

As situações indutoras de aloimunização foram analisadas para as 12 gestantes aloimunizadas do Estudo Prospectivo.

A Tabela VII expressa os dados obtidos das doze gestantes com anticorpos irregulares. As gestantes que possuíam títulos de anticorpos acima de 256 foram expostas a pelo menos três situações indutoras. As gestantes aloimunizadas, que foram tratadas com o soro Anti-D, apresentaram títulos de IgG igual ou inferior a 512.

Tipagem Sangüínea	IgG	IgM	Nºde gestação	Pais Diferentes	Aborto	Transfusão	Soroterapia	Título IgG
B	DC		4	Sim	Sim	-	-	256
O	D		3	-	-	-	Sim	64
A	D		2	Sim	-	Sim	-	1024
O		NI	2	Sim	Sim	-	-	
A		D	2	Sim	-	-	Sim	
O	D		3	Sim	Sim	-	-	2048
B	D		3	-	-	-	-	512
A	D		3	Sim	-	-	-	128
B	D		3	Sim	-	-	Sim	16
A	D		2	-	-	-	Sim	128
O		NI	2	-	-	-	Sim	
O	D		2	Sim	-	Sim	Sim	512

Tabela VII: Correlação entre situações indutoras de aloimunização com especificidade, classe e titulação de anticorpos das gestantes aloimunizadas do Estudo Prospectivo.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DE ALOANTICORPOS REGULARES (IgG)

A Pesquisa de Aloanticorpos Regulares (PAR) da classe G foi realizada nas 340 gestantes do Estudo Prospectivo e os resultados foram relacionados com os grupos sangüíneos ao qual cada gestante pertencia (Tabela VIII).

Nas cinco gestantes do grupo sangüíneo “AB”, como esperado, não foram detectados aloanticorpos regulares das classes M e G.

Das gestantes que produziram aloanticorpos regulares da classe G, 65,2% pertenciam ao grupo sangüíneo O, 24% ao grupo sangüíneo A e 10,8% ao grupo sangüíneo B. Mostrando que as gestantes do grupo O apresentam maior susceptibilidade para aloimunização regular.

Grupos Sangüíneos	Aloanticorpos Regulares IgG				Total
	<i>Anti-A</i>	<i>Anti-B</i>	<i>Anti-A e Anti-B</i>	<i>Sem Reação</i>	
<i>A</i>	-	71	-	30	101
<i>B</i>	32	-	-	5	37
<i>AB</i>	-	-	-	5	5
<i>O</i>	13	2	178	4	197

Tabela VIII: Frequência de Aloanticorpos Regulares da classe G nas gestantes do Estudo Prospectivo.

Para a análise da incompatibilidade materno-fetal para o sistema ABO, as gestantes do Estudo Prospectivo foram separadas de acordo com seu grupo sangüíneo e presença de aloanticorpos regulares da classe G. Para evitar que os aloanticorpos irregulares interferissem nos resultados, as mães aloimunizadas foram excluídas dessa análise.

Não foram registrados recém-nascidos do grupo sangüíneo B para as mães pertencentes ao grupo sangüíneo “A”. No entanto, 9% de seus recém-nascidos eram incompatíveis, pois apresentavam tipo sangüíneo AB (Gráfico 17). Entre os recém-nascidos, desse grupo de mães, não houve resultado positivo para o Teste de Antiglobulina Direto (TAD).

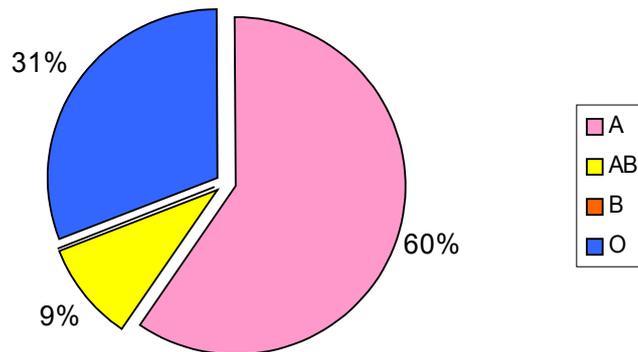


Gráfico 17: Frequência de grupos sangüíneos dos recém-nascidos de mães do grupo sangüíneo A, com aloanticorpos regulares IgG.

Dentre as mães do grupo sangüíneo “B”, 5% de seus recém-nascidos eram incompatíveis, pois pertenciam ao grupo sangüíneo A (Gráfico 18). Dentre esses recém-nascidos, não houve resultado positivo para o TAD.

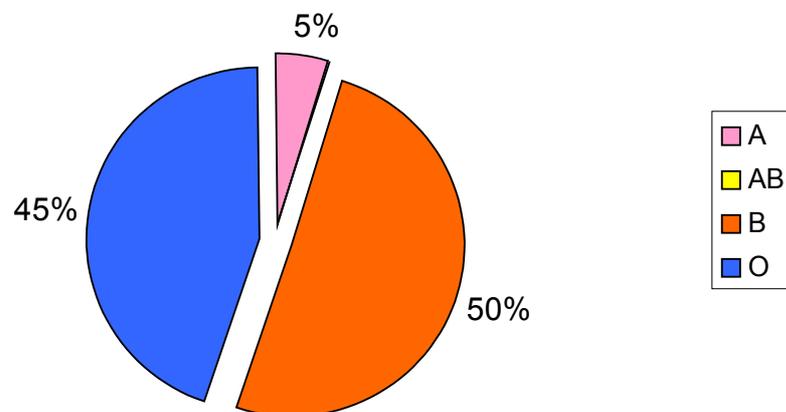


Gráfico 18: Frequência de grupos sangüíneos dos recém-nascidos de mães do grupo sangüíneo B, com aloanticorpos regulares IgG.

Dentre as mães do grupo sangüíneo “AB”, não houve, como esperado, resultados reativos para aloanticorpos regulares IgG. De cinco mães do grupo sangüíneo “AB”, dois recém-nascidos (67%) eram do grupo sangüíneo “A” e os outros 33%, pertenciam ao grupo

sangüíneo “B”. Entre os recém-nascidos desse grupo, também como esperado, não houve resultado de TAD positivo.

Dentre as mães do grupo sangüíneo “O”, 12% de seus recém-nascidos pertenciam ao grupo sangüíneo A e 5%, ao grupo sangüíneo B. Portanto 17% dos recém-nascidos eram incompatíveis para o sistema ABO (Gráfico 19). Desses recém-nascidos, dois pertenciam ao grupo sangüíneo “A” (15%) e apresentaram TAD positivo. Importante ressaltar que a mãe de um desses recém-nascidos era primigesta.

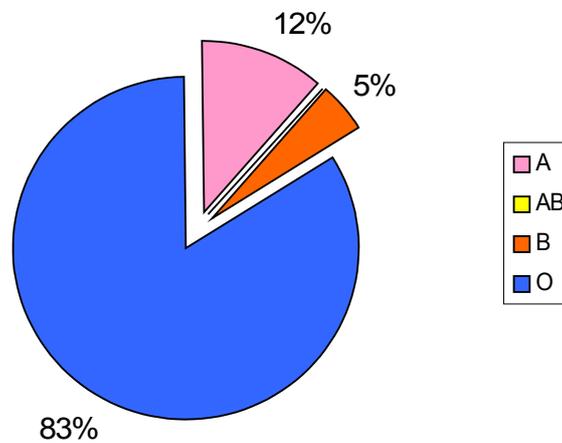


Gráfico 19: Freqüência de grupos sangüíneos dos recém-nascidos de mães do grupo sangüíneo O, com aloanticorpos regulares IgG.

4.6 SITUAÇÕES QUE PODEM INDUZIR À ALOIMUNIZAÇÃO POR ANTÍGENOS DO SISTEMA ABO

4.6.1 Análise das situações indutoras de aloimunização regular

As 340 gestantes do Estudo Prospectivo foram analisadas quanto à exposição aos fatores de risco obtidos na entrevista.

Observando cada fator foi verificado, com 95% de confiança, pelo teste exato de Fisher, que o aborto contribuiu para a produção de aloanticorpos regulares IgG (Tabela IX).

Situações		Aloanticorpos Regulares		Total	P-valor
		Sim	Não		
Transfusão	Sim	8	2	10	0,379
	Não	288	42	330	
Aborto	Sim	77	19	96	0,017
	Não	219	25	244	
Pai diferente	Sim	75	14	89	0,230
	Não	221	30	251	
2 ou mais gestações	Sim	199	33	232	0,196
	Não	97	11	108	

Tabela IX: Presença e ausência de aloanticorpos regulares distribuídos por situação indutora de aloimunização.

Dentre as 296 mulheres que haviam produzido aloanticorpos regulares IgG, 97 (33%) eram primigestas e, não foram expostas às situações indutoras de aloimunização analisadas nesse estudo. No entanto, de uma dessas mulheres, nasceu uma criança incompatível para o sistema ABO, que apresentou aloanticorpos fixados às hemácias, no TAD.

5 Discussão

No Estudo Retrospectivo foram levantados e analisados 479 dados de gestantes e 471 dados de recém-nascidos. No Estudo Prospectivo foram analisadas as informações obtidas nas entrevistas e os resultados dos exames imuno-hematológicos de 340 mulheres, que estavam no 8º mês de gestação. Dos recém-nascidos dessas gestantes, apenas 186 amostras de sangue do cordão umbilical foram enviadas para análise no HEMOAM.

Das gestantes que participaram do Estudo Prospectivo, a faixa etária mais freqüente foi entre 23 e 27 anos (Gráfico 1). As gestantes apresentaram idade média de 26,1 anos e as primigestas de 24,1 anos. A freqüência de mães que estavam na primeira gestação foi de 38%, seguida pelas de segunda gestação, com 36%. O número médio de gestações, neste estudo, foi 2,2. O estudo realizado pela Secretaria de Vigilância em Saúde de Mato Grosso do Sul (2004), sobre as taxas de fecundidade no Brasil, demonstrou redução para a Região Norte, a qual passou de 8,2 filhos por mulher na década de 70, para 3,2 em 2000. Em relação às gestantes do Programa de Gestantes Rh Negativo (PGRhN), o número médio de gestações encontrado foi menor que o do trabalho acima citado, de onde podemos inferir que dentre a população que estudamos, as mulheres, por apresentarem tipo sanguíneo Rh negativo, demonstram receio em ter muitos filhos. O grau de escolaridade mais freqüente entre as gestantes foi o nível médio, com 57% (Gráfico 2). A idade média das primigestas variou para os diferentes graus de escolaridade: 21,4 anos para o nível fundamental, 23,3 anos para o nível médio e 27,6 anos para o nível superior. Dentre as gestantes que haviam cursado o ensino fundamental, a maioria estava na terceira gestação (Gráfico 5), enquanto as que cursaram os ensinos, médio e superior, estavam na primeira e segunda gestação (Gráficos 6 e 7). De acordo com o teste Qui-quadrado, há fortes evidências de que haja associação do número de gestações com o nível de escolaridade das gestantes (p -valor $< 0,0001$). Comparando esses resultados com os obtidos por Nascimento (2003), encontramos valores

similares para médias de idade, grau de escolaridade e número de gestações. O autor relata que o maior número de gravidez está relacionado com o desconhecimento de métodos contraceptivos bem como com o baixo nível de instrução (NASCIMENTO, 2003). Também, no trabalho de Haidar e colaboradores (2001), ficou demonstrado que mulheres com menor escolaridade têm maior probabilidade de serem multigestas. Duarte et al. (2003) citam que a escolaridade elevada da mulher produz resultados efetivos na regulação da fecundidade pois possuem maior conhecimento sobre os métodos anticoncepcionais e sua correta utilização, levando à redução no número de filhos. A profissão mais freqüente, em nosso estudo, foi “dona de casa”, com 49% (Gráfico 3). Dentre as gestantes que participaram desse estudo, a maioria era procedente da região de Manaus (Figura 1).

Nos estudos Prospectivo e Retrospectivo, o grupo sanguíneo mais freqüente foi o “O”, tanto para as gestantes, quanto para os recém-nascidos (Gráficos 8, 9 e 10). Esta freqüência está de acordo com a encontrada entre os doadores cadastrados no HEMOAM, desde a década de 90 até os dias atuais (Dados obtidos na Coordenação de Processamento de Dados do HEMOAM, 2005). Outros autores também mostraram freqüências similares às encontradas, para a população dos Estados Unidos da América (EUA). Já a freqüência em outras populações foi diferente nos: índios da América do Sul, 100% da população estudada, pertencia ao grupo “O”; Vietnamitas, com prevalência do grupo sanguíneo “O”, seguida do “B” (www.hemoterapia9dejulho.com.br/info_medico1). Para o grupo sanguíneo Rh positivo, foram encontradas freqüências de respectivamente, 77% e 87%, para os recém-nascidos do Estudo Prospectivo e Retrospectivo. Esta freqüência está abaixo da encontrada para os doadores do HEMOAM, cuja média de Rh positivo é de 94,8% (Dados obtidos na Coordenação de Processamento de Dados do HEMOAM, 2005). Estudo realizado no Hemocentro de São Paulo mostrou que a freqüência de Rh positivo foi de 90%, entre doadores caucasóides e negróides (NOVARETTI et al., 2000). A baixa freqüência pode ser

explicada pelo fato dos recém-nascidos, de nosso estudo, serem filhos de mães Rh negativo. Isso favorece o aumento de descendentes Rh negativo, principalmente, quando os pais são homocigotos para a ausência do antígeno D ou heterocigotos para essa proteína do sistema sanguíneo Rh.

No Estudo Prospectivo foram analisadas 340 amostras de sangue de gestantes para verificar a presença de aloanticorpos irregulares. Destas, 3,5% apresentaram resultados positivo para o Teste de Antiglobulina Indireto (TAI). Após identificação e classificação dos aloanticorpos, foi verificado que nove amostras apresentaram anti-D, das quais, 88,9% pertenciam à classe G; uma amostra possuía anticorpos anti-C+D, os quais pertenciam à classe G e outros dois aloanticorpos não foram identificados (Tabela I), pois os plasmas testados não reagiram com as hemácias fenotipadas, para os seguintes sistemas sanguíneos: Rh, Kell, Duffy, Kidd, Lewis, P, MNS, Lutheran e Diego (Painel de Identificação da DiaMed®). Várias possibilidades podem explicar o ocorrido, dentre as quais salientamos a existência de antígenos, ainda desconhecidos, que possam ter estimulado a produção destes aloanticorpos. Outra possibilidade seria a existência de polimorfismos para os grupos sanguíneos, resultando na formação de proteínas com epítomos diferentes. O painel utilizado em nosso trabalho para a identificação dos aloanticorpos foi produzido com hemácias de doadores da Região Sudeste, as quais poderiam apresentar antígenos com determinantes antigênicos diferentes, dos expressos nas hemácias de indivíduos da Região Norte. Esses fatos poderiam explicar o não-reconhecimento dos antígenos pelos aloanticorpos detectados. Uma provável solução para essas intercorrências seria a produção de um painel de identificação de aloanticorpos, preparado com hemácias fenotipadas de doadores da Região Norte.

No Estudo Retrospectivo foram encontrados 27 registros (5,6%) de gestantes com resultado positivo para o TAI. No entanto, foram analisados 22 registros, os quais continham os dados completos quanto à especificidade, classificação e titulação dos aloanticorpos

irregulares. Dentre esses, foi constatado que 16 amostras continham aloanticorpos anti-D e seis anti-C+D e, ainda, que todos os aloanticorpos pertenciam à classe G (Tabela II).

As titulações dos aloanticorpos irregulares foram agrupadas por faixas de títulos, nos estudos Prospectivo e Retrospectivo. Os títulos dos aloanticorpos foram mais elevados no Estudo Prospectivo (128 a 1024, 67%) do que no Estudo Retrospectivo (32 a 64, 45% e 512 a 1024, 30%) (Tabela III). No Estudo Prospectivo não foi verificada correlação entre os títulos de aloanticorpos maternos e os resultados do Teste de Antiglobulina Direto (TAD), dos recém-nascidos. No Retrospectivo, foi observada uma leve tendência para essa correlação, apesar de o número de amostras ser pequeno para fazer qualquer inferência estatística. De acordo com as recomendações do British Committee for Standards in Haematology (BCSH), de 1996, o título de anticorpos obtido pelo método de aglutinação não foi diretamente associado com a ocorrência de DHRN. Porém, correlação foi encontrada quando a quantificação do anti-D foi obtida de acordo com o padrão internacional (IU mL^{-1}) (MICTHELL et al., 1996).

Neste estudo, não foram encontrados aloanticorpos contra antígenos dos outros sistemas sangüíneos, presentes no painel de hemácias. Tal fato, provavelmente, deveu-se a baixa freqüência desses antígenos eritrocitários na população Amazônica e ao tempo da coleta de dados ter sido relativamente curto (sete meses), resultando em uma amostragem pequena quando comparada com trabalhos similares a este, como o de Filbey e colaboradores, em 1995, na Suíça (ANDERSEN et al., 2002) e Bowman (1990), citado por Moise, em 2000.

Após comparação entre as freqüências de mães aloimunizadas dos dois estudos (Prospectivo e Retrospectivo), o teste χ^2 apresentou valor de $p = 0,16$, demonstrando que não houve diferença significativa. No entanto, estas freqüências foram altas, principalmente, quando comparadas com freqüências observadas de 0,24% na Suíça e em outros trabalhos, como citado por Andersen e colaboradores, em 2002.

A Society of Obstetricians and Gynecologists of Canada (SOGC) e American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), além de outros autores, preconizam o uso da Imunoglobulina anti-D também em mulheres Rh negativo, na 28ª e 29ª semanas de gestação (LEE et al., 1999). Essas medidas, talvez contribuam, em muito, para a diminuição da taxa de aloimunização materna observada em alguns países (NARANG; JAIN, 2001).

Fung e Eason observaram, em 2003, que a frequência de aloimunização, na gravidez subsequente, foi diferente em mulheres que haviam recebido a profilaxia pós-parto (1,6% a 1,9%) das mulheres que não haviam recebido o anti-D (12% a 16%). Dentre as 340 gestantes que participaram do presente estudo, não houve diferença quanto ao uso da profilaxia pós-parto. As mulheres que não haviam utilizado essa medida profilática (6%), desenvolveram aloanticorpos irregulares e as mulheres que haviam recebido o soro anti-D, pós-parto, (4%) foram aloimunizadas. Vale ressaltar que estes dados foram obtidos nas entrevistas e com frequência, as gestantes ficavam em dúvida quanto a essa informação. A partir desses dados não obtivemos os resultados esperados quanto à proteção da Imunoglobulina anti-D. No entanto, estudos mais específicos devem ser realizados para verificar sua eficácia e as possíveis falhas quanto à administração dessa medida profilática no Estado do Amazonas.

Dentre as 47/96 gestantes que sofreram aborto e fizeram a profilaxia anti-D, 100% foi protegida por essa medida. No entanto, das 49/96 que sofreram aborto mas não utilizaram o soro, 6% foram aloimunizadas para o antígeno D (Tabela VI). Esses dados mostram que o soro Anti-D conferiu proteção para as gestantes tratadas. No entanto, observou-se que 94% das mulheres que não receberam o soro anti-D, não foram aloimunizadas. A frequência de aloimunização causada pelo aborto espontâneo foi de 1,5% a 2% e de 4% a 5% para aborto induzido (FUNG; EASON, 2003). De acordo com Harmening (1999) algumas mulheres são consideradas como má respondedoras e, não produzem anticorpos com facilidade.

O Programa de Gestantes Rh Negativo, do HEMOAM, tem como objetivo acompanhar a gestação de mulheres Rh negativo, quanto à presença ou ausência de aloanticorpos irregulares. Esse atendimento é encerrado no 8º mês gestacional, com a entrega de uma carta à gestante, encaminhada ao profissional de saúde que irá atuar no parto. Esta carta contém os resultados dos exames imuno-hematológicos da gestante, indicando, ou não, a presença de aloanticorpos, bem como sua identificação, classificação e titulação. No caso de ausência de aloanticorpos deve ser indicado o uso da profilaxia anti-D na mãe, caso o recém-nascido seja Rh positivo, em até 72 horas após o parto. No caso de presença de anti-D a profilaxia não deve ser recomendada. Na verdade, este Programa não está atuando na prevenção da DHRN, mas sim, no monitoramento e orientação dessas gestantes.

Muitos casos de aloimunização ocorrem devido a erros na aplicação de protocolos, entre os quais: imunoprofilaxia com doses inadequadas pós-parto; em episódios com risco de sensibilização (exemplo: aborto, amniocentese, etc), falha no mecanismo de proteção da imunoglobulina anti-D (MIYADAHIRA, 2000).

A gravidade da aloimunização pode ser explicada pelo fato do antígeno D ser uma proteína situada intramembrana, apenas nas hemácias, além de sua alta frequência na população. Esse antígeno estimula resposta imune T CD4⁺ dependente, desencadeando a expansão clonal das células B₂, que se diferenciam em células de memória e em plasmócitos os quais são responsáveis pela secreção de IgG₁ e IgG₃, predominantes nesse caso. Estas subclasses são ótimas opsoninas pois sua porção Fc tem alta afinidade pelo receptor FcγRI, presente em células fagocíticas. Além de possuírem afinidade pelo receptor FcRn das células placentárias, o que justifica a facilidade de ultrapassarem a barreira placentária (RADAEV; SUN, 2001; RAVETCH; BOLLAND, 2001; OLLILA; VIHINEN, 2005; DANIELS, 2005). Araújo e colaboradores (2003) observaram presença de IgG₁ por volta da 17ª semana gestacional, enquanto, IgG₃ foi encontrada somente após a 25ª semana. Observaram, também,

que a severidade da DHRN estava relacionada com as subclasses de IgG, onde recém-nascidos que apresentaram somente IgG₁ desenvolveram DHRN de moderada à grave, enquanto, a maioria dos recém-nascidos que desenvolveu DHRN leve à moderada apresentou somente IgG₃. Nos casos em que foi observada a presença das duas subclasses a DHRN manifestou-se com maior gravidade.

Na DHRN secundária à incompatibilidade Rh, a hemólise ocorre devido a eritrofagocitose ou citotoxicidade mediada por anticorpos (ADCC) (ARAUJO et al., 2003). Este último ocorre, principalmente, pela afinidade das IgG pelos receptores FcγRIII presentes nas células *Natural Killer* (NK). Por possuir baixa afinidade, esse receptor, reconhece apenas as IgG agrupadas nas superfícies celulares. As IgG₁ e IgG₃ são também mais eficazes na ADCC, por apresentarem maior afinidade pelo receptor FcγRIII que a IgG₂ e a IgG₄ (RAVETCH; BOLLAN, 2001). Portanto, a IgG₁ e a IgG₃ são imunoglobulinas associadas à ocorrência de DHRN. Apesar de serem potentes ativadoras do Sistema Complemento, não há estudos que tenham confirmado esse mecanismo na DHRN desencadeada pelo antígeno D (RAVETCH; BOLLAND, 2001; AABB, 2005).

Um dos indicadores de DHRN é o Teste de Antiglobulina Direto (TAD), o qual verifica a presença de imunoglobulinas fixadas na superfície das hemácias fetais. Para conclusão do diagnóstico de DHRN faz-se necessário analisar vários parâmetros clínicos e biológicos do recém-nascido (RN), além da presença de anticorpos IgG na circulação materna (CIANCIARULLO et al., 2003). Como não obtivemos todos estes dados, associamos a presença de aloanticorpos maternos dentre os recém-nascidos que apresentaram anticorpos fixados às hemácias e, utilizamos esses resultados, como indicadores da ocorrência de DHRN.

Neste trabalho, observamos as frequências de TAD positivo nos recém-nascidos do Estudo Prospectivo (3%) e do Estudo Retrospectivo (2%) (Gráficos 11 e 12). Devido à falta de retorno das amostras de cordão umbilical dos recém-nascidos, de mães participantes desta

pesquisa, obtivemos resultados de 6/13 RN de mães aloimunizadas, onde 67% destes neonatos apresentaram TAD positivo (Gráfico 15). Também no Estudo Retrospectivo não foram encontrados todos os dados de RN e mães aloimunizadas. Dentre as 22 mães com resultados completos, de identificação, classificação e titulação, de aloanticorpos irregulares, foram encontrados apenas 11 resultados de RN, dos quais, 72,7% apresentaram anticorpos fixados às hemácias (Gráfico16). Um dado importante observado, nestes casos, foi que 100% dos recém-nascidos do Estudo Prospectivo eram Rh positivo e apresentaram TAD positivo. No Estudo Retrospectivo, essa frequência foi de 81,8%. Esses resultados mostram a alta probabilidade de recém-nascidos, Rh positivo, de mães aloimunizadas, desenvolverem a doença hemolítica devida à capacidade das subclasses de imunoglobulinas envolvidas nesse processo (IgG₁ e IgG₃) induzirem hemólise.

Atualmente, mesmo com os avanços nas pesquisas envolvendo métodos para predição da severidade da Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN) e de tratamentos para a anemia severa, torna-se, ainda, imprescindível o uso correto da imunoprofilaxia para prevenção da aloimunização materna.

A alta frequência de aloimunização das gestantes do PGRhN pode ser diminuída com a inclusão de métodos preconizados por órgãos competentes, já utilizados em outros países. Tais como a aplicação da soroterapia na 28^a semana de gestação e a utilização correta do anti-D após o parto de filho Rh positivo (LEE et al., 1999).

A DHRN causada pela incompatibilidade ABO é bastante comum. No entanto, difere da incompatibilidade Rh por causar complicações mais leves e com mais frequência em neonatos, do que em fetos (BROUWERS et al., 1988a). A anemia leve é o quadro mais frequente da DHRN causada pelo sistema ABO. Porém, um recém-nascido em cada 150 é acometido por icterícia moderada e, um entre 3000 neonatos, apresenta hemólise severa (ZIPRIN et al., 2005).

Neste trabalho, verificamos a presença de aloanticorpos regulares da classe G nas mães que participaram do Estudo Prospectivo. Dentre as gestantes estudadas, (87%) 296/340 apresentaram aloanticorpos regulares (IgG) (Tabela V). A incompatibilidade ABO materno-fetal foi verificada para as 296 gestantes, onde encontramos freqüência de 9% nas mães do grupo sanguíneo A (Gráfico 17) e 5% para as mães do grupo B (Gráfico 18). A maior freqüência de incompatibilidade ABO encontrada foi para as mães do grupo sanguíneo O, de 17% (Gráfico 19). Valores similares a este foram encontrados nos estudos de Cariani e colaboradores (1995), com 16%; Han e colaboradores (1998), com 15,6%; Kumlien e colaboradores (2000) e Andersen e colaboradores (2002), ambos com 15%. Cianciarullo e colaboradores (2003) mostraram que a incompatibilidade ABO foi ocorrência quase exclusiva nas mães do grupo sanguíneo O, com filhos A ou B. Os autores atribuem a ocorrência desse fato, devido as mulheres do grupo sanguíneo O apresentarem maior capacidade de produzir anticorpos anti-A e anti-B, da classe G.

Nos casos de incompatibilidade ABO em mães dos grupos sanguíneos A e B não foram encontrados resultados de Teste de Antiglobulina Direto (TAD) positivo entre os recém-nascidos. Porém, no grupo de mães O foram encontrados 2/19 (10%) de casos de recém-nascidos com anticorpos fixados às hemácias. Estudos mostraram freqüências de TAD positivo de 32%, 0,52% e 0%, em recém-nascidos de mães dos grupos O, A e B, respectivamente (CIANCIARULLO et al., 2003).

Sabe-se que os anticorpos contra os antígenos do sistema ABO são produzidos, principalmente, pelos linfócitos B₁ e MZ B. Naturalmente, estes anticorpos são formados nos primeiros meses de vida, a partir de estímulos de polissacarídeos encontrados em bactérias e alimentos. A maioria pertence à classe M, no entanto, Cook (2005) afirmou a existência de anticorpos naturais da classe G, IgG₂.

Em quase todos os casos de DHRN por incompatibilidade ABO, a subclasse responsável é a IgG₂ (BROUWERS et al., 1988a). Como esta imunoglobulina tem pouca capacidade de induzir lise celular, provavelmente por possuir baixa afinidade com os receptores de células fagocíticas, a DHRN é apresentada de forma leve (UKITA et al., 1989; ABBAS; LICHTMAN, 2005). Entretanto, foram relatados casos graves de DHRN por incompatibilidade ABO (MCDONNELL et al., 1998), onde supõe-se a presença de imunoglobulinas IgG₁ e IgG₃, as quais, induzem lise celular, citotoxicidade mediada por anticorpos e ativam a via clássica do Sistema Complemento. Como citado anteriormente, essas subclasses de imunoglobulinas têm alta afinidade com receptores FcγRI de células fagocíticas e, por isso, são opsoninas bastante eficientes (ARAUJO et al., 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2005; COOK, 2005).

Outros estudos mostram que a severidade da DHRN-ABO foi associada com anticorpos anti-B da classe G, miscigenação de etnias e efeito lítico de determinadas subclasses de IgG (IgG₁ e IgG₃) (MACDONNELL et al., 1998; ZIPRIN et al., 2005). O título dos aloanticorpos regulares também pode ser um fator importante para a gravidade da DHRN-ABO (USHA; SULOCHANA, 1998). Neste trabalho não foram verificados os títulos dos aloanticorpos regulares, todavia, futuros estudos devem ser realizados com esta finalidade.

A ativação ou não do Sistema Complemento in vivo ainda não está totalmente esclarecida. Alguns autores constataram a sua ocorrência em casos de DHRN-ABO e outros negaram esta possibilidade. Brouwers e colaboradores (1988a) afirmam que a presença de antígenos A e B distribuídos no plasma e em tecidos, previne a ativação do sistema complemento in vivo. Afirmam, ainda, que se os antígenos do sistema ABO estivessem presentes somente nas hemácias, como o antígeno D, do sistema Rh, a severidade da DHRN-ABO seria comparada com as DHRN causadas pelas incompatibilidades Rh ou Kell. Brouwers e colaboradores (1988b) também afirmaram que o sistema complemento não é

ativado in vivo, nos casos de DHRN causada por mães do grupo sanguíneo O, com filhos do grupo sanguíneo A. Outros autores afirmam que os antígenos A e B estão expressos em baixa densidade na membrana das hemácias dos recém-nascidos (DANIELS, 1995; HERSCHEL et al., 2002; ZIPRIN et al., 2005). Provavelmente, o sistema complemento não seja ativado por esse motivo pois, para que haja inserção do componente C1 da via Clássica do sistema complemento, faz-se necessário a proximidade de duas moléculas de IgG. No entanto, a provável distância entre os sítios antigênicos poderia explicar a deficiência na ativação do sistema complemento nos casos de incompatibilidade ABO.

O Teste de Antiglobulina Direto (TAD) também pode ser usado como indicador de outras patologias, e ainda assim, apresentar resultado negativo, mesmo utilizando técnicas mais sensíveis, como o gel. Nos casos de icterícia presente e hiperbilirrubinemia, é importante pesquisar outros possíveis motivos, como a deficiência de G6PD, por exemplo, (HERSCHEL et al., 2002). Kaplan e Hammerman (2005) também observaram que um terço de crianças do grupo sanguíneo A e B, de mães do grupo O, podem apresentar TAD positivo, porém, não necessariamente, ocorrer a DHRN, anemia ou icterícia.

A partir dos dados obtidos nesse trabalho e dos estudos relatados, observamos a alta frequência de incompatibilidades ABO, materno-fetal e a alta frequência de imunoglobulinas anti-A e anti-B, da classe G, nas mulheres do Programa de Gestantes Rh Negativo (PGRhN). Propomos que seja realizado um estudo para verificar a classificação e subclassificação dessas imunoglobulinas, em todas as grávidas, independente de grupo sanguíneo Rh. Essa proposição visa a utilização, no futuro, desses testes imuno-hematológicos como rotina nos exames de pré-natal, visto que no Brasil existe uma miscigenação de etnias, favorecendo a ocorrência de DHRN na forma grave, inclusive com hidropsia.

Atualmente, na cidade de Manaus, não existem dados na literatura especializada, acerca da incidência da DHRN causada pela incompatibilidade ABO. Isto ocorre devido ao

diagnóstico inconclusivo, no que diz respeito aos sintomas comuns a outras patologias e, também, a ausência de testes confirmatórios sobre essas imunoglobulinas. Devido à alta aloimunização regular, torna-se importante a realização de estudos na Região Norte, referentes a essas incompatibilidades e à implantação de testes laboratoriais que auxiliem na obtenção de diagnósticos mais precisos sobre essa patologia.

De acordo com Lee e colaboradores (1999), alguns eventos podem ser considerados como potencialmente de risco para aloimunização materna. Dentre os eventos estão: parto (normal ou cesárea) de criança Rh positivo; aborto; testes de diagnóstico pré-natal invasivos (amniocentese, cordocentese e amostra da vilosidade coriônica); hemorragia durante a gestação (feto-materna); gravidez ectópica; natimorto etc.

No estudo Prospectivo foram realizadas entrevistas com as gestantes e obtivemos dados importantes para análise de eventos, possíveis indutores de aloimunização, nos quais estavam: aborto, número de gestações, transfusão sangüínea e filhos (gestações) de pais diferentes (Tabela IV). Essas situações foram analisadas em relação aos aloanticorpos, regulares e irregulares.

A freqüência de aloanticorpos distribuídos por grupos sangüíneos, também foi observada. De acordo com os valores encontrados, os grupos sangüíneos “O” e “A” apresentaram maior “susceptibilidade” para a produção de aloanticorpos, do que o “B” e “AB” (Tabela V). No entanto, não pudemos inferir a existência de correlação com a aloimunização e os grupos sangüíneos ABO.

Observando cada situação constatamos que, com 95% de confiança, pelo teste exato de Fisher, de que existe associação, entre o fato da gestante ter tido duas ou mais gestações e de pais diferentes, com a produção de aloanticorpos irregulares (Tabela IV). Essas duas situações podem ser redundantes, visto que mulheres que tiveram filhos de pais diferentes, já haviam tido mais de uma gestação.

Como pudemos observar, transfusão sangüínea não foi considerado um evento em potencial para a indução de aloimunização. Isto pode ser justificado pela realização das provas de compatibilidade pré-transfusionais, além da fenotipagem eritrocitária dos concentrados de hemácias para os pacientes politransfundidos. Schonewille e colaboradores (1999) observaram uma freqüência de 30% para aloimunização nos pacientes politransfundidos.

A análise dos aloanticorpos regulares apresentou resultado significativo quando associada com os grupos sangüíneos. As mães do grupo "O" foram as que mais apresentaram aloanticorpos IgG anti-A e anti-B (Tabela VIII).

Observando cada situação verificamos, com 95% de confiança, pelo teste exato de Fisher, que o aborto contribuiu para a produção de aloanticorpos regulares IgG (Tabela IX).

Também foi verificado a condição múltipara e pais diferentes. Entretanto, pelo Teste Qui-quadrado (correção de Yates), ao nível de 95% de confiança, observamos que não houve associação entre o fato da mãe ser múltipara do mesmo pai ou de pais diferentes, com a produção de aloanticorpos regulares (IgG) (p-valor=0,7452).

Noventa por cento das mulheres primigestas apresentaram aloanticorpos regulares IgG e, no entanto, não haviam sido expostas a nenhuma situação indutora de aloimunização. Dentre essas, uma mãe do grupo sangüíneo "O" teve um filho do grupo "A" com TAD positivo (Tabela VIII).

Em contraste a imunização Rh, na qual o título de anticorpos aumenta progressivamente seguindo uma relação gravidez-imunização, altos títulos de anticorpos anti-A e anti-B podem, muitas vezes, ser encontrados em mulheres até antes de sua primeira gestação (KAPLAN; HAMMERMAN, 2005).

Brouwers et al. (1988a) sugeriram que a imunização por antígenos A ou B não foi induzida somente por antígenos eritrocitários de prévias gestações, mas também por antígenos

presentes nos alimentos, em bactérias e vacinas. Essa informação foi suportada pela frequência de 50% das mães que tiveram lise induzida por anticorpos, estarem na primeira gestação.

6 Conclusão

No presente estudo, foram realizadas análises descritivas, comparativas e associações dos resultados obtidos nos estudos Prospectivo e Retrospectivo. A partir dessas análises, podemos concluir que:

- não houve diferença significativa, entre as frequências dos grupos sanguíneos das mães e dos recém-nascidos, entre os dois estudos;

- também não houve diferença significativa, nas frequências de aloimunização irregular, nas gestantes participantes dos dois estudos. No entanto, essas frequências foram comparadas com as obtidas por outros autores e desta comparação, constatamos que ainda é alta a aloimunização irregular, no Programa de Gestantes Rh Negativo. O objetivo deste programa é a prevenção da doença hemolítica do recém-nascido. Porém, devido à sua ação limitada, não foi alcançada a meta proposta. Sugerimos que o programa seja reformulado para chegar a uma frequência mínima de aloimunizações maternas, morbidade e mortalidade neonatal. Entre outras falhas de protocolos que continuam ocorrendo estão: doses inadequadas de imunoglobulinas, a não indicação da profilaxia em casos de abortos, natimortos e prevenção e tratamento dos erros transfusionais, amniocentese, cordocentese, entre outros (CIANCIARULLO et al., 2003).

Observamos, ainda, a alta frequência de aloanticorpos regulares da classe G nas gestantes do Estudo Prospectivo. Sabe-se que existe grande possibilidade de mães do grupo O produzirem anticorpos anti-A e anti-B da classe G. Apesar de não ter sido identificadas as subclasses neste estudo, Brouwers e colaboradores (1988a) demonstraram que a maioria dos anticorpos regulares IgG pertence à subclasse G₂. Este dado pode explicar porque a DHRN causada pela incompatibilidade ABO, geralmente, manifesta-se de forma leve. No entanto, quando os antígenos do sistema ABO penetram no organismo, por meio de vacinas como a

antidiftérica e a antitetânica, induzem resposta T CD4⁺ dependente e ativam os linfócitos B₂, os quais produzem imunoglobulinas IgG₁ e IgG₃. A severidade da DHRN foi associada com a presença dessas subclasses de IgG, além da miscigenação de etnias, onde as etnias negra e mestiça apresentaram maiores frequências de hidropsia fetal, que a branca. Os mesmos autores relataram, ainda, maior frequência da gravidade da DHRN encontrada em crianças do grupo sanguíneo B (ZIPRIN et al., 2005). Tendo em vista que na Região Norte observa-se uma tendência ao aumento da mistura de etnias, devido ao alto índice de imigração, pressupõe-se que a DHRN com sintomas graves pode vir a ocorrer com mais frequência, em nossa população. A partir dessa suposição, recomendamos que sejam realizados estudos para investigação da situação real acerca da DHRN, causada pela incompatibilidade ABO, para a Região Norte.

Para a prevenção da DHRN causada pela incompatibilidade ABO não é possível introduzir a profilaxia com anticorpos anti-A e anti-B, como o Soro anti-D, usado na prevenção da DHRN causada pela incompatibilidade Rh. A produção de aloanticorpos regulares IgG é difícil de ser impedida, visto que esses anticorpos podem ser formados por estímulos a diversas substâncias (por exemplo: vacinas). Entretanto, uma solução seria a administração da Imunoglobulina G Intravenosa, que se ligaria aos receptores das células fagocíticas no baço. Esse procedimento impede que as hemácias revestidas pelos aloanticorpos regulares se liguem aos receptores das células fagocíticas evitando, dessa forma, a hemólise.

Referências Bibliográficas

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS Technical Manual. 15ª Edição, USA, 2005.

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

AHADED, A.; DEBBIA, M.; BEOLET, M.; LE PENNEC, P.Y.; LAMBIN, P. Evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay of IgG anti-D and IgG subclass concentrations in immunoglobulin preparations. **Transfusion**. v. 39, p. 515-521, 1999.

ANDERSEN, Anita S.; PRAETORIUS, Lisbeth; JORGENSEN, Henrik L.; LYLLOFF, Kirsten; LARSEN, Kim T. Prognostic value of screening for irregular antibodies late in pregnancy in rhesus positive women. **Acta Obstet Gynecol. Scand**. v. 81, p. 407-411, 2002.

ANSEL, K. Mark; HARRIS, Ruth B.S. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production and body cavity immunity. **Immunity**. v. 16, p.67-76, 2002.

ARAÚJO, Maria A.; DEFFUNE, Elenice; CARLOS, Luciana M.B.; MAGALHÃES, Silvia M.M.; GOLIM, Márjorie A.; CÂMARA, Lília M.C. Avaliação das subclasses IgG1 e IgG3 na doença hemolítica perinatal. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**. V. 25, n.4, p. 201-206, 2003.

AVENT, Neil D.; REID, Marion E. The Rh blood group system: a review. **Blood**. USA, v.95, n. 2, p. 375-87, 2000.

BAIOCHI, Eduardo; CAMANO, Luiz; BORDIN, José Orlando. Avaliação da hemorragia feto-materna em puérperas com indicação para ministração de imunoglobulina anti-D. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 5, p. 1357-1365, 2005.

BATISSOCO, Ana Carla; NOVARETTI, Márcia Cristina Zago. Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**. v.25, n.1, p.47-58, 2003.

BASKETT, T. F. Historical Perspective. The first neonatal exchange transfusion for haemolytic disease of the newborn by Dr. Alfred Hart of Toronto. **ACOG Clinical Review**. p. 16, 1998.

BEIGUELMAN, B. Os sistemas sangüíneos eritrocitários. 3ª Edição. FUNPEC Editora. Ribeirão Preto, SP, 2003.

BOWMAN, John. Thirty-five years of Rh prophylaxis. **Transfusion**. v. 43, p. 1661-1666, 2003.

BROUWERS, H. A.; OVERBEEKE, M. A. M.; van ERTBRUGGEN, I.; SCHAASBERG, W.; ALSBACH, G. P. J.; van der HEIDEN, C.; van LEEUWEN, E. F.; STOOP, J. W.; ENGELFRIET, C. P. What is the best predictor of the severity of ABO-haemolytic disease of the newborn? **The Lancet**. September 17, p. 641-644, 1988a.

BROUWERS, H. A.; OVERBEEKE, M. A.; HUISKES, E.; BOS, M. J.; OUWEHAND, W. H.; ENGELFRIET, C. P. Complement is not activated in ABO-haemolytic disease of the newborn. **Br. J. Haematol.** v. 68, n. 3, p. 363-366, 1988b. Resumo PubMed.

CABRAL, A.C.V; TAVEIRA, M.R; LOPES, A.P.B.M; PEREIRA, A.K; LEITE, H.V: Transfusão Intra-uterina na Isoimunização Materna pelo Fator Rh. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**. Vol. 23, n. 5, p. 299-303, 2001.

CANNON, Michael; PIERCE, Richard; TABER, Evan Beth; SCHUCKER, Jodi. Fatal Hidrops fetalis caused by anti-D in a mother with partial D. **Obstetrics & Gynecology**. v. 102, n.5, parte 2, p. 1143-1145, 2003.

CARIANI, L.; ROMANO, E. L.; MARTINEZ N.; MONTANO, R.; SUAREZ, G.; RUIZ, I.; SOYANO, A. ABO-haemolytic disease of the newborn (ABO-HDN): factors influencing its severity and incidence in Venezuela. **J. Trop. Pediatr.** v. 4, n. 1, p. 14-21, 1995. Resumo PubMed.

CASH, Kevin L.; BROWN, T.; STRUPP, A.; UEHLINGER, J. Anti-G in a pregnant patient. **Transfusion**. V. 39, p. 531-533, 1999.

CIANCIARULLO, Marco Antonio; ECCON, Maria Esther; VAZ, Flavio Adolfo Costa. Prevalência de marcadores imuno-hematológicos em recém-nascidos ao nascimento e em suas respectivas mães e incidência de doença hemolítica numa maternidade de São Paulo. **Revista Assoc. Med. Brasileira**. v. 49, n.1, p. 45-53, 2003.

COOK, Matthew C. B cell biology, apoptosis, and autoantibodies to phospholipids. **Thrombosis Research**. v. 114, p.307-319, 2004.

DANIELS, Geoff; FLETCHER, A; GARRATTY, G; HENRY, S; JØRGENSEN, J; JUDD, WJ; LEVENE, C; LOMAS-FRANCIS, C; MOULDS, JJ; MOULDS, JM; MOULDS, M; OVERBEEKE, M; REID, ME; ROUGER, P; SCOTT, M; SISTONEN, P; SMART, E; TANI, Y; WENDEL, S; ZELINSKI, T. Blood group terminology 2004. **From the ISBT Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens**. p. 1-37, 2004.

DANIELS, Geoff. The molecular genetics of blood group polymorphism. **Transplant Immunology**. v. 14, p. 143-153, 2005.

DANIELS, Geoff. **Human blood groups**. 1ª ed. Cambridge. Blackwell Science Ltd., 1995.

DIAS-DA-SILVA, Wilmar; MOTA, Ivan. **Bier- Imunologia Básica e Aplicada**.5ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A., 2003.

DIVAKARAN, T. G.; WAUGH, J.; CLARK, T. J.; KHAN, K. S.; WHITTLE, M. J.; KILBY, M.D. Noninvasive techniques to detect fetal anemia due to red blood cell alloimmunization: a systematic review. **Obstetrics & Gynecology**. v. 98, n. 3, p. 509-517, 2001.

DUARTE, Graciana Alves; de ALVARENGA, Augusta Thereza; OSIS, Maria José Duarte; FAÚNDES, Aníbal; SOUSA, Maria Helena. Participação masculina no uso de métodos contraceptivos. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 19, n. 1, p. 207-216, 2003.

FACCHINI, Fernando P.; BIANCHI, Maria Otilia; BRASILEIRO-SILVA, Beatriz A. Intensive phototherapy treatment for severe haemolytic disease of the newborn. **Jornal de Pediatria**. v. 76, n. 5, p. 387-390, 2000.

FERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, M. C.; JIMÉNEZ-MARCO, M. T.; HERNÁNDEZ, D.; GONZÁLEZ, A.; OMEÑACA, F.; CÁMARA, C. de la. Treatment with plasmapheresis and intravenous immunoglobulin in pregnancies complicated with anti-PP₁ P^K or anti-K immunization: a report of two patients. **Vox Sanguinis**. v. 80, p. 117-120, 2001.

FIGL, Markus; PELINKA, Linda E. Karl Landsteiner, the discoverer of blood groups. **Resuscitation**. Irlanda. v. 63, p. 251-254, 2004.

FUNG, Karen Fung Kee; EASON, Erica. Prvention of Rh alloimmunization. **SOGC Clinical Practice Guidelines**. v. 133, p.1-9, 2003.

GAMBERO, Sheley; SECCO, Valéria N. D. P.; FERREIRA, Rosana R.; DEFFINE, Elenice; MACHADO, Paulo, E. A. Frequência de hemolisinas anti-A e anti-B em doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu. **Revista Bras. Hematol. Hemoter**. v. 26, n. 1, p. 28-34, 2004.

GEIFMAN-HOLTZMAN, Ossie; WOJTOWYCZ, Martha; KOSMAS, Elleni; ARTAL, Raul. Female alloimmunization with antibodies know to cause hemolytic disease. **Obstetrics & Gynecology**. v. 89, n. 2, p. 272-275, 1997.

GIRELLO, A. L; KÜHN, T.I.B.B: **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. Editora SENAC São Paulo, SP, 2003.

GRAB, Dieter; PAULUS, Wolfgang E.; BOMMER, Anita; BUCK, Gabriele; TERINDE, Rainer. Treatment of fetal erythroblastosis by intravascular transfusions: outcome at 6 years. **Obstetrics & Gynecology**. v. 93, n. 2, p. 165-168, 1999.

GREEN, Thomas P. 50 Years ago in the Journal of Pediatrics. The treatment of erythroblastosis fetalis with replacement transfusion. **The Journal of Pediatrics**. p. 357, 2003.

H Aidar, Fátima Hussein; OLIVEIRA, Urânia Fernandes; NASCIMENTO, Luiz Fernando Costa. Escolaridade materna: correlação com os indicadores obstétricos. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro. v. 17, n. 4, p. 1025-1029, 2001.

HADLEY, Andrew G. Laboratory assays for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. **Transplant Immunology**. v. 10, p. 191-198, 2002.

HARMENING, D.M.: Modern Blood banking and transfusion practices. F. A. Davis Company. 4th edition. USA, P. 90-127, 1999.

HAN, P.; KIRUBA, R.; ONG, R.; JOSEPH, R.; TAN, K. L.; WONG, H. B. Haemolytic disease due to ABO incompatibility: incidence and value of screening in an Asian population. **Aust. Paediatr. J.** v. 24, n. 1, p. 35-38, 1988. Resumo PubMed.

HARPER, Terry C.; FINNING, Kirstin M.; MARTIN, Pete; MOISE Jr, Kenneth J. Use of maternal plasma for noninvasive determination of fetal RhD status. **American Journal of Obstetrics and Gynecology.** v. 191, p. 1730-1732, 2004.

HEDDLE, N.M; KLAMA, L; FRASSETTO, R; O'HOSKI, P; LEAMAN, B.A. A retrospective study to determine the risk of red cell alloimmunization and transfusion during pregnancy. **Transfusion**, v.33, p. 217-220, 1993.

HERSCHEL, Marguerite; KARRISON, Theodore; WEN, Ming; CALDARELLI, Leslie; BARON, Beverly. Isoimmunization is unlikely to be the cause of hemolysis in ABO-incompatible but direct antiglobulin test-negative neonates. **Pediatrics.** v. 110, n. 1, p. 127-130, 2002.

HOELTGE, G.A; DOMEN, R.E; RYBICKI, L.A; SCHAFFER, P.A: Multiple red cell transfusions and alloimmunization: experience with 6996 antibodies detected in a total of 159.262 patients from 1985 to 1993. **Arch Pathol Lab Med**, v. 119, p. 42-45, 1995.

JABARA, Sami; BARNHART, Kurt T. Is Rh immune globulin needed in early first-trimester abortion? A review. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 188, n. 3, p.623-627, 2003.

JANEWAY, C.A; TRAVERS, P; WALPORT, M; SHLOMCHIK, M: **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença** – 5ª edição – Artmed editora. Porto Alegre, 2002.

KAPLAN, Michael; HAMMERMAN, Cathy. Understanding severe hyperbilirubinemia and preventing kernicterus: adjuncts in the interpretation of neonatal serum bilirubin. **Clinica Chimica Acta.** v. 356, p. 9-21, 2005.

KORNSTAD, L. New cases of irregular blood group antibodies other than anti-D in pregnancy. Frequency and clinical significance. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.** v. 62, n. 5, p. 431-436, 1983. Resumo PubMed.

KUMLIEN, G.; SARMAN, I.; SHANWELL, A. A case of neonatal ABO immunization which was difficult to diagnose. The mother with blood group A2 and the infant with negative direct antiglobulin test. **Lakartidningen.** v. 97, n. 38, p. 4138-4140, 2000. Resumo PubMed.

KUMPEL, Belinda M. Monoclonal anti-D development programme. **Transplant Immunology.** v. 10, p. 199-204, 2002.

LEE, D.; CONTREAS, M.; ROBSON, S. C.; RODECK, C. H.; WHITTLE, M. J. Recommendations for the use of anti-D immunoglobulin for Rh prophylaxis. **Transfusion Medicine.** v. 9, p. 93-97, 1999.

LE VAN KIM, Caroline; COLIN, Yves; CARTRON, Jean-Pierre. Rh proreins: Key structural and functional components of the red cell membrane. **Blood Reviews**. No prelo, 2005.

MARTIN, Flavius; KEARNEY, John, F. B1 cell: similarities and differences with other B cell subsets. **Current Opinion in Immunology**. v. 13, p. 195-201, 2001.

MATTOS, Luiz C. de; MOREIRA, Haroldo W. Genetic of the ABO blood system and its link with the immune system. **Revista Brasileira Hematol. Hemoter.** v. 26, n. 1, p.60-63, 2004.

McDONNELL, Maura; HANNAM, Simon; DEVANE, S.P. Hydrops fetalis due to ABO incompatibility. **Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.** v. 78, p. F220- F221, 1998.

MITCHELL, R.; BOWELL, P.; LETSKY, E.; SILVA, M.; WHITTLE, M. Guidelines for blood grouping and red cell antibody testing during pregnancy. **Transfusion Medicine**. v. 6, p. 71-74, 1996.

MIYADAHIRA, Seizo. Prevenção da aloimunização Rh. **Ver. Ass. Med. Brasil**. v. 46, n. 4, p. 308-309, 2000.

MOISE Jr, Kenneth J. Non-anti-D antibodies in red-cell alloimmunization. **European Journal of Obstetrics & Gynecology**. v. 92, p. 75-81, 2000.

MOISE Jr, Kenneth J. Management of Rhesus alloimmunization in pregnancy. **Obstetrics & Gynecology**. v. 100, n. 3, p. 600-611., 2002.

MOLLISON, P.L; ENGELFRIET, C.P; CONTRERAS, M: Blood transfusion in clinical medicine. **Blackwell Science**. Oxford, England, 1997.

MURRAY, J.C.; KARP, L. E.; WILLIAMSON, R. A.; CHENG, E. Y.; LUTHY, D. A. Rh isoimmunization related to amniocentesis. **Am. J. Med. Genet.** v. 16, n. 4, p. 527-534, 1983. Resumo PubMed.

NARANG, A.; JAIN, N. Haemolytic disease of newborn. **Indian J. Pediatr.** v. 68, n. 2, p. 167-172, 2001. Resumo PubMed.

NASCIMENTO, Luiz Fernando C. Perfil de gestantes atendidas nos períodos pré-natal e perinatal: estudo comparativo entre os serviços público e privado em Guaratinguetá, São Paulo. **Ver. Brás. Saúde Matern. Infant.**, Recife (PE), v. 3, n. 2, p. 187-194, 2003.

NOVARETTI, Márcia Cristina Zago. Fenotipagem eritrocitária e identificação de anticorpos irregulares. **Série de Monografias**. SP, v.5, p. 20-33, 1998.

NOVARETTI, Márcia Cristina Zago; DORLHIAC-LLACER, Pedro Henrique; CHAMONE, Dalton de Alencar Fischer. Estudo de grupos sangüíneos em doadores de sangue caucásóides e negróides na cidade de São Paulo. **Revista bras. hematol. hemoter.** v. 22, n. 1, p. 23-32, 2000.

NOVARETTI, Márcia Cristina Zago; JENS, Eduardo; PAGLIARINI, Thiago; BONIFÁCIO, Silvia Leão; DORLHIAC-LLACER, Pedro Henrique; CHAMONE, Dalton de Alencar Fischer. Hemolytic disease of the newborn due to anti-U. **Revista Hosp. Clín. Fac. Med. São Paulo**. v. 58, n. 6, p. 320-323, 2003.

OLLILA, Juha; VIHINEN, Mauno B Cells. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**. v. 37, p. 518-523, 2005.

QUEENAN, John T. Rh-disease: a perinatal success story. **Obstetrics & Gynecology**. v. 100, n. 3, p. 405- 406, 2002.

RADAEV, Sergei; SUN, Peter. Recognition of immunoglobulins by Fc γ receptors. **Molecular Immunology**. v. 38, p. 1073-1083, 2001.

RAVETCH, Jeffrey V.; BOLLAND, Silvia. IgG Fc Receptors. **Annual Reviews Immunology**. v. 19, p. 275-290, 2001.

REID, Marion E.; MOHANDAS, Narla. Red blood cell blood group antigens: structure and function. **Seminars in Hematology**. v.41, n. 2, p. 93-117, 2004.

SCHUMACHER, Bernd; MOISE Jr., Kenneth J. Fetal Transfusion for red blood cell alloimmunization in pregnancy. **Obstetrics & Gynecology**. v. 88, n. 1, p. 137-150,1996.

SCHONEWILLE, H.; HAAK, H.L.; van ZIJL, A.M. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. **Transfusion**. v. 39, p. 763-771,1999.

SCHWOEBEL, Ann; BHUTÁN, Vinod K.; JOHNSTON, Lois. Kernicterus: a “never-event” in healthy term and near-term newborns. **Newborn and Infant Nursing Reviews**. v. 4, n. 4, p. 201-210, 2004.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MATO GROSSO DO SUL. Saúde Brasil – Uma análise da situação de Saúde. Saúde reprodutiva: gravidez, assistência pré-natal, parto e baixo peso ao nascer. p. 71-83, 2004.

SHAH, Uzma; DICKINSON, Bonny L.; BLUMBERG, Richard S.; SIMISTER, Neil E.; LENCER, Wayne I.; WALKER, W. Allan. Distribution of the IgG Fc receptor, FcRn, in the human fetal intestine. **Pediatric Research**. v. 53, n. 2, p. 295-301, 2003.

SIMISTER, Neil E. Placental transport of immunoglobulin. **Vaccine**. v. 21, n. 24, p. 3365-3369, 2003.

SPALTER, Sergio H.; KAVERI, Srinu V.; BONNIN, Emmanuelle; MANI, Jean-Claude; CARTRON, Jean-Pierre; KAZATCHKINE, Michael D. Normal human serum contains natural antibodies reactive with autologous ABO blood group antigens. **Transfusion Medicine**. v. 93, n. 12, p. 4418-4424, 1999.

UKITA, M.; TAKHASHI, 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, Resumo PubMed.

ULM, B.; SVOLBA, G.; ULM, M.R.; BERNASCHEK, G.; PANZER, S. Male fetuses are particularly affected by maternal alloimmunization to antigen D. **Transfusion.** v. 39, p. 169-173, 1998.

ULM, B.; KIRCHNER, L.; SVOLBA, G.; JILMA, B.; DEUTINGER, J.; BERNASCHEK, G.; PANZE, S. Immunoglobulin administration to fetuses with anemia due to alloimmunization to D. **Transfusion.** v. 39, p. 1235-1238, 1999.

URBANIAK, Stanislaw J.; GREISS, Michel A. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. **Blood Reviews.** v. 14, p. 44-61, 2000.

USHA, K. K.; SULOCHANA, P.V. Detection of high risk pregnancies with relation to ABO haemolytic disease of newborn. **Indian J. Pediatr.** v. 65, n. 6, p. 863-865, 1998. Resumo PubMed.

van KAMP, Inge; KLUMPER, Frans J. C. M.; MEERMAN, Robertjan H.; OEPKES, Dick; SCHERJON, Sicco A.; KANHAI, Humphrey H. H. Treatment of fetal anemia due to red-cell alloimmunization with intrauterine transfusions in the Netherlands, 1988-1999. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.** v. 83, p. 731-737, 2004.

VERRASTRO, T; LORENZI, T.F; NETO, S.W: **Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica.** Editora Atheneu, São Paulo, 1996.

WRIGTH, Pearce. Ronal Finn. **The Lancet.** v. 363, p. 2195, 2004.

YAMAMOTO, E. Review: ABO blood group system-ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. **Immunohematology.** v. 20 n:1, p. 3-22, 2004.

ZIPRIN, J. H.; PAYNE, E.; HAMIDI, L.; ROBERTS, I.; REGAN, F. ABO incompatibility due to immunoglobulin G anti-B antibodies presenting with severe fetal anaemia. **Tranfusion Medicine.** v. 15, p. 57-60, 2005.

Sites na Internet:

Tipos sanguíneos. <<http://www.hemoterapia9dejulho.com.br>> Acesso em: 06 de outubro de 2005.

COUTO, Egle; BARINI, Ricardo; AMARAL, Eliana; MILANEZ, Helaine; PINTO SILVA, João Luiz. Hidropsia Fetal (HF) – Diagnóstico e evolução perinatal. <<http://www.barini.méd.Br/trabalhos/hidropsia>>, 1994. Acesso em 23 de setembro de 2005.

Microrregiões do Amazonas. <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em 27 de julho de 2005.

APÊNDICES

A – FORMULÁRIO DE ENTREVISTA COM AS GESTANTES RH NEGATIVO DO PROGRAMA

PRESENÇA DE ALOANTICORPOS ERITROCITÁRIOS EM GESTANTES Rh
NEGATIVO ATENDIDAS NA FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA
DO AMAZONAS (FHMOAM)

Dados pessoais:

Nome: _____

Data de nascimento: _____

Naturalidade: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Profissão: _____

Nível de escolaridade:

Sem Escolaridade

Ensino fundamental

Ensino Médio

Ensino Superior

Incompleto

Incompleto

Incompleto

Completo

Completo

Completo

Histórico de vida gestacional e transfusional:

Nº de gestação: _____

Programa de Prevenção à DHRN: _____

Nº de aborto: _____

Administração da soroterapia: _____

Nº de filhos: _____

Histórico de transfusão sanguínea: _____

Pais diferentes: _____

Algum filho nasceu com complicações pós-parto? Quais? Como foi tratado?

B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA CLÍNICA

Nome do voluntário(a): _____

1. Título do trabalho Experimental

Presença de Aloanticorpos Eritrocitários em Gestantes Rh Negativo Atendidas na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

2. Objetivo

Identificar anticorpos eritrocitários regulares e irregulares e correlacionar com o surgimento da Doença Hemolítica do Recém-Nascido.

3. Justificativa

A doença hemolítica do recém-nascido é causada principalmente pelo anticorpo materno Anti-D, do sistema Rh. Apesar de pouco divulgado, essa doença também pode ocorrer pela presença de outros anticorpos maternos regulares e irregulares contra diferentes antígenos dos sistemas sangüíneos, do recém-nascido. Tais anticorpos desencadeiam a destruição das hemácias (glóbulos vermelhos) do feto causando anemia. A criança apresenta cor amarelada e se não for tratada pode causar seqüelas graves (inclusive problemas neurológicos) ou até mesmo, a morte.

Neste trabalho pretende-se estudar as mães Rh negativo e seus recém-nascidos, com a finalidade de observar a presença de anticorpos maternos regulares e irregulares, contra antígenos eritrocitários fetais, possíveis causadores da doença hemolítica. Este estudo poderá dar subsídios para o HEMOAM ampliar o seu programa de atendimento as gestantes, incluindo as gestantes Rh positivo.

4. Procedimento

Serão coletadas amostras de sangue, para a realização dos seguintes exames:

Em gestantes Rh negativo:

- Tipagem Sangüínea;
- Teste de Antiglobulina Indireto;
- Classificação, identificação e titulação dos anticorpos

Em recém-nascidos, de mães cadastradas no programa:

- Tipagem Sangüínea;
- Teste de Antiglobulina Direto;

Nos recém-nascidos que não for possível coletar o sangue do cordão umbilical, não será solicitado a amostra por punção venosa do mesmo.

Após o término do estudo, as amostras utilizadas serão desprezadas, de acordo com as normas técnicas do laboratório de imuno-hematologia.

5. Informações

Serão incluídas no estudo todas as maternidades onde se encontrarem as mães Rh negativo com anticorpos regulares e irregulares, as quais assinaram o termo de consentimento. As pessoas responsáveis pela coleta da amostra de sangue do cordão umbilical do recém-nascido serão os técnicos que estiverem presentes na hora do parto em cada maternidade.

O HEMOAM não poderá ser responsabilizado por qualquer dano que possa ocorrer aos pacientes, quando estiverem sendo atendidos na maternidade.

6. Riscos e benefícios

O presente estudo não apresenta riscos aos voluntários.

O voluntário tem a garantia de que receberá respostas para qualquer pergunta ou dúvida quanto aos procedimentos relacionados com a pesquisa. Os pesquisadores assumem o compromisso de fornecer informações atualizadas obtidas durante o estudo, ainda que estas possam afetar a vontade do indivíduo em continuar participando do estudo em questão. Informamos também que os resultados obtidos nesse trabalho poderão ser publicados em jornais ou revistas científicas. Em casos de dúvidas, o voluntário deverá entrar em contato com **Francimary de Oliveira Cavalcante**, pelo telefone: 655-0100 ramal: 0129 ou 0134.

O voluntário deverá estar ciente de que não haverá remuneração por sua participação nesse estudo. Porém, estará contribuindo para a pesquisa científica, que poderá beneficiar as futuras gestantes.

7. Retirada do consentimento

O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem prejuízo de ordem pessoal-profissional com os responsáveis pela pesquisa.

8. Aspecto legal

Elaborados de acordo com as diretrizes e normas que regulamentam pesquisas envolvendo seres humanos, atendendo à Resolução n.º 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde – Brasília – DF.

9. Garantia de sigilo

Os pesquisadores asseguram a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

10. Local da Pesquisa

A pesquisa será realizada no laboratório de Imuno-hematologia da Fundação Hemocentro do Amazonas (HEMOAM), localizada à Avenida Constantino Nery, n.º 4397, Chapada; CEP: 69050-002 – Manaus-AM.

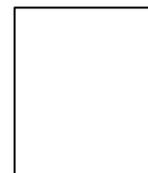
11. Consentimento

Eu, _____ certifico que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pela pessoa responsável pela pesquisa, estou de pleno acordo com a realização dos experimentos. Assim, eu autorizo a execução do trabalho de pesquisa, exposto acima, com a minha amostra de sangue e do meu recém-nascido coletadas.

Manaus, ___ de _____ de _____.

Nome (por extenso): _____

Assinatura do voluntário ou representante legal: _____



1ª via: Instituição

Impressão datiloscópica

2ª via: Voluntário

ANEXOS