

**FERNANDA RIBAS ZACARIAS**

**IMUNOTERAPIA HLA PARA CASAIS COM ABORTO  
ESPONTÂNEO RECORRENTE DE CAUSA DESCONHECIDA**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas de Universidade Federal do Paraná  
para obtenção do grau de Bacharel.  
Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Maria da graça bicalho de  
Lacerda

**CURITIBA  
JUNHO – 2000**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho de Lacerda, pela amizade, incentivo, compreensão e dedicação durante todo o período em que trabalhamos juntas.

Aos meus colegas do laboratório LIGH - UFPR pelo auxílio e amizade.

À minha família, por toda minha formação, incentivo e apoio; em especial à Renata Ribas Zacarias, minha irmã, amiga e companheira, com quem tive a alegria de compartilhar todos os anos da Graduação.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Revisão da Literatura.....	2
1.1.1 Protocolos de Imunização.....	7
<b>2. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A gestação constitui um fato curioso; onde o sistema imune materno aceita ou tolera a presença do feto semialogênico. A descoberta dos mecanismos que permitem este processo reprodutivo poderiam ser de grande importância para a melhoria dos transplantes de órgãos, nos quais a incompatibilidade de genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade ( CPH ) entre doador e receptor resulta na rápida rejeição do aloenxerto.

O relacionamento materno-fetal não está bem compreendido, mas a incompatibilidade de Antígenos Leucocitários Humanos ( HLA ) parece ser necessária para o desenvolvimento de uma gestação normal. Assim acredita-se que a ocorrência de similaridade HLA entre o casal resultando na formação de fetos histocompatíveis com a mãe possa estar envolvida com a causa de abortos espontâneos recorrentes.

Apesar de muitos casos de abortos serem atribuídos às anormalidades ou alterações fisiopatológicas já conhecidas, várias mulheres não conseguem ter uma gestação ou implantação embrionária com êxito. O fator responsável por este insucesso não é conhecido ou claro, e essas pacientes são conhecidas como abortadoras espontâneas de etiologia desconhecida.

Em vários centros médicos este grupo de pacientes vêm sendo tratado através da imunoterapia HLA, que utiliza mais frequentemente infusões de leucócitos do parceiro ou de um *pool* de doadores não relacionados. Apesar da crescente utilização deste tratamento e do grande número de trabalhos e pesquisas relatando seus efeitos benéficos, ou seja, resultados de gestações bem sucedidas em mulheres tratadas, os mecanismos envolvidos não estão totalmente elucidados e geram controvérsias.

O entendimento dos mecanismos imunológicos e/ou genéticos subjacentes relacionados aos insucessos reprodutivos, é sem dúvida, de fundamental importância para o aperfeiçoamento e padronização de um protocolo imunoterápico bem como uma revisão dos mesmos, que permita uma análise criteriosa da técnica, aplicação e resultados alcançados nos tratamentos.

## 1.1 REVISÃO DA LITERATURA

No contexto dos transplantes, Kissmeyer-Nielsen et al., 1996 e Terasaki et al., 1968, citados por SINGAL et al. ( 1985, p. 595-602 ), sugeriram que transfusões sangüíneas produziam efeitos deletérios na sobrevida do aloenxerto renal. Porém estudos posteriores realizados, inclusive por Terasaki, em vários centros de transplantes confirmaram o efeito benéfico das transfusões sangüíneas pré-transplante na melhoria da sobrevida do aloenxerto renal, tanto de doador cadáver quanto de doador vivo ( TERASAKI, 1982).

O método mais eficaz foi considerado a transfusão sangüínea doador-específico, cujo sucesso teria sido comparado às situações de transplante, onde receptores receberam rins de doadores HLA idênticos ( SINGAL et al., 1985).

Atualmente, pacientes de alguns centros recebem múltiplas transfusões com o objetivo de induzir um estado de "tolerância", pois nestas circunstâncias o receptor aceitaria melhor o aloenxerto, já que tornou-se tolerante a ele através da transfusão. Apesar dos vários relatos dos efeitos benéficos da transfusão pré-transplante, a imunossupressão tem sido a principal abordagem para a prevenção e o tratamento da rejeição dos transplantes de órgãos sólidos ( ABBAS et al., 2000).

Analisando e traçando um paralelo entre transplantes e o processo reprodutivo, onde durante a fase gestacional o embrião semi-alogênico é freqüentemente visto como um transplante natural, tentou-se interpretar e comparar a possível influência benéfica de transfusões sangüíneas prévias nas situações de abortos recorrentes. Essa interpretação se fundamenta na análise de pacientes com abortos espontâneos recorrentes ( AER ) submetidas à imunoterapia de leucócitos ( KILPATRICK & LISTON, 1993).

Enquanto no transplante clínico, a probabilidade de rejeição diminui quanto maior for a similaridade HLA ( HLA-A, HLA-B, HLA-DR e HLA-DQ ) entre doador e receptor ( ABBAS et al., 2000) no contexto da reprodução pesquisas indicam exatamente para o contrário.

Existem evidências em espécies de mamíferos endogâmicos que a heterozigose de genes do CPH resultaria em superior capacidade reprodutiva, sendo que a histoincompatibilidade materno-fetal estaria indicando uma vantagem reprodutiva e uma contribuição da seleção natural para a manutenção do polimorfismo do CPH ( RISK & JOHNSON, 1991).

Abortos espontâneos recorrentes estão associados às condições como mal formações do trato reprodutivo, anormalidades cromossômicas ou hormonais e infecções, porém todas estas causas respondem por cerca de 45% dos casos. Os outros 55%, conhecidos como idiopáticos, têm sido investigados e metade deles apontam para um processo imunológico, ainda não totalmente elucidado ( TAYLOR et al., 1981; McINTYRE et al., 1989; AGRAWAL et al., 1995 ).

Em diversos estudos encontrou-se um compartilhamento ou similaridade de antígenos HLA de classe I e/ou classe II entre marido e mulher do grupo paciente ( casais que sofrem de aborto espontâneo recorrente de etiologia desconhecida ) maior do que o esperado (THOMAS et al., 1985; CHRISTIANSEN et al., 1989; KARL et al., 1989; McINTYRE et al., 1993; SBRACIA et al., 1996; SILVA et al., 1997). Ou seja, a semelhança HLA entre marido e mulher seria desfavorável para o desenvolvimento do embrião.

Também existem relatos de que certas especificidades HLA seriam mais freqüentes em casais pacientes do que em casais normais, com filhos e que conseguem levar uma gestação a termo, como por exemplo: HLA-A9 ( LEWIS et al., 1986; GERENCER et al., 1988); HLA-B7 e HLA-B35 (MATHUR et al., 1992); HLA-DR1 e/ou HLA-DR3 ( MOHAPELOA et al., 1998 ); HLA-DR3 ( CHRISTIANSEN et al., 1992); HLA-DR4 ( SASAKI et al., 1997); HLA-DR5 ( SMITH et al., 1989).

Estes dados, tanto de estudos de compartilhamento quanto de associação de antígenos HLA, revelam aparentemente resultados conflitantes, cuja significância estatística é incerta. Porém isto pode ser explicado pelas diferenças entre os centros de pesquisa quanto à metodologia utilizada para tipagem de tecidos, ao número de antígenos testados, à seleção de casais AER idiopáticos e ao número de casais controle ( WEGMANN et al., 1991; OBER & VEN, 1997 ).

Os casais AER, cuja etiologia do aborto é desconhecida, podem ser classificados em duas populações paciente distintas: o grupo de aborto primário e o de aborto secundário:

- Aborto primário: compreende mulheres com no mínimo 2 abortos consecutivos ( sendo que a maioria possui 3 ou mais ) com o mesmo parceiro e que não tenha tido nenhum sucesso gestacional. Geralmente o aborto ocorre antes da 20ª semana de gestação e a mulher não apresenta atividade citotóxica antipaterna, a qual seria revelada pela presença de anticorpos anti-HLA em seu soro. Caso haja uma troca de parceiro a mulher provavelmente terá uma gestação normal (McINTYRE et al., 1984, 1993; McINTYRE & FAULK, 1985 ). Alguns centros de estudos relacionados à reprodução humana somente admitem como pacientes para o tratamento imunoterápico, mulheres com no mínimo 3 abortos consecutivos (CHRISTIANSEN et al., 1989; SILVA et al., 1997; KARRISON & OBER, 1998;).

- Aborto secundário: as mulheres deste grupo podem ter tido uma gestação prévia bem sucedida ( COULAM et al., 1987 ). O aborto geralmente ocorre após a 20ª semana de gestação e a mulher apresenta atividade citotóxica antipaterna. Se houver troca de parceiro não significa que será alcançada uma gestação normal ou com sucesso ( McINTYRE & FAULK, 1985; McINTYRE et al., 1984, 1993 ).

Casais saudáveis que possuem pelo menos 2 filhos geralmente compõem o grupo controle. Este grupo se comparado ao de aborto primário, apresenta um grau de compartilhamento de antígenos HLA entre marido e mulher significativamente menor. O mesmo não ocorre em comparação com o grupo de aborto secundário, onde ambos ( controle x secundário ) não apresentam diferenças estatísticas significativas ( McINTYRE & FAULK, 1985 ). A homozigose total ( HLA-A, B, DR e DQ ) ou apenas dos loci HLA-DR e HLA-DQ foi encontrada significativamente aumentada entre o grupo de aborto primário se comparado ao grupo controle, mas não entre o grupo de aborto secundário ( COULAM et al., 1987 ).

Dois linhas de investigação tem orientado as pesquisas nesta área, propondo modelos que tentam explicar as alterações do desenvolvimento

embrionário ou o sucesso gestacional ( capacidade de gerar descendentes viáveis ). Uma destas linhas se orienta pelo modelo imunológico ( TAYLOR & FAULK, 1981; McINTYRE et al., 1989; BJERCKE, 1994 ) e a outra pelo modelo genético ( HO et al., 1991a; GILL, 1994; JIN et al., 1995 ) sendo que em ambos o maior compartilhamento de antígenos HLA entre casais tem sido o argumento que busca relacionar a influência dos genes do MHC com as perdas gestacionais.

O modelo imunológico, que tem Kirby como um dos precursores, propõe que casais com aborto espontâneo recorrente de causa desconhecida podem ter uma anormalidade aloimune, o que impede a mulher de desenvolver uma resposta imune que seria considerada benéfica para a implantação e sobrevivência do feto semialogênico ( MOWBRAY et al., 1983; COULAM, 1986; AGRAWAL et al., 1995; OBER & VEN, 1997). Esta anormalidade aloimune ocorreria em casais que compartilham mais freqüentemente antígenos HLA. Estes casais apresentam maior chance de produzir fetos histocompatíveis com a mãe, que nestas circunstâncias não o reconheceria como alogênico ( OBER et al., 1998 ). Imunização com células mononucleares paternas têm sido utilizada como um tratamento para AER, que deste modo mediará a resposta imunológica necessária à implantação, a qual posteriormente será suprimida por fatores bloqueadores ( OBER et al., 1999 ).

Por outro lado, o modelo genético, do qual Gill, T. J. III é um dos principais defensores, enfatiza que o compartilhamento de antígenos HLA por si só não é o mecanismo responsável por defeitos reprodutivos, mas sim é um padrão primário que sugere principalmente o compartilhamento de um outro segmento cromossômico localizado no CPH, o que resulta em homozigose de genes recessivos letais no embrião, os quais seriam responsáveis pelo controle da reprodução e desenvolvimento embrionário (SCHACTER et al., 1984; GILL et al., 1991; HO et al., 1991a; GILL, 1999). Duas condições obstétricas, AER e retardo no crescimento fetal, teriam marcadores genéticos comuns, o que sugere que genes HLA ou ligados a este causando retardo no crescimento fetal fariam parte de um complexo de genes envolvidos na patogenia de abortos recorrentes ( CHRISTIANSEN et al., 1990 ). Este segmento do CPH que possui genes



afetando a reprodução também tem genes associados com diferentes doenças autoimunes, e esta justaposição pode explicar a associação entre defeitos ou incapacidades reprodutivas e doenças autoimunes ( JIN et al., 1995; SILVA et al., 1997 ).

Os antígenos de classe I, HLA-A e HLA-B, e de classe II, HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP, todos conhecidos como antígenos clássicos, não estão presentes na interface materno-fetal (trofoblasto), portanto a expressão dos genes mais polimórficos e antigênicos, que provocariam uma resposta aloimune, é suprimida nas células que estão em direto contato com o sistema imune materno ( OBER, 1998; FAN et al., 1999; WEETMAN, 1999 ). O HLA-G, antígeno de classe I não clássico, o qual difere das moléculas HLA de classe I clássicas em dois importantes aspectos: 1) a isoforma HLA-G1 expressa-se preferencialmente em células do trofoblasto, além de se apresentar junto a outras isoformas intracelularmente e 2) possui uma cadeia  $\alpha$  de peso molecular mais baixo que a cadeia  $\alpha$  clássica e cujo polimorfismo é menor e é expresso em grande quantidade no citotrofoblasto extraviloso ( BJERCKE, 1994). Também foram observados níveis mais baixos de HLA-E, outro antígeno não clássico e de HLA-C, que surpreendentemente é um antígeno de classe I clássico ( EMMER et al., 1999).

O papel do HLA-G consistiria em inibir a atividade das células Natural Killer ( NK ) citotóxicas presentes em abundância na decídua materna, protegendo deste modo as células do trofoblasto que seriam potencialmente destruídas por sua atividade de lisar células que não expressam os HLA-A-B-C clássicos ( EMMER et al., 1999; FREISS et al., 1999 ). Devido ao fato das células NK uterinas serem numerosas no final da fase lútea e no primeiro trimestre de gestação, poderia ser considerado que um distúrbio na interação entre moléculas HLA-G e células NK prejudicaria o processo reprodutivo ( EMMER et al., 1999 ). Estudos revelaram que mulheres que abortam até a 9ª semana de gestação apresentam níveis de HLA-G mais baixos que mulheres com gestações a termo, sendo que em todos os casos a fertilização foi realizada *in vitro* ( PFEIFFER et al., 2000 ) e que a atividade de células NK periféricas é elevada em mulheres AER

( VEERHOEK et al., 1997 ). Em outra investigação observou-se a ocorrência da expressão do HLA-G no trofoblasto durante o 1º e 3º trimestre de gestação de mulheres normais ( gestação a termo e recém-nascidos saudáveis ), o que sugeriu um forte envolvimento do HLA-G na tolerância imune materno-fetal. Entretanto ao analisar o trofoblasto de pacientes AER que tinham sido tratadas com imunoterapia antes de atingirem a gravidez com sucesso, a expressão do HLA-G foi negativa. Este achado sugere que talvez a expressão do HLA-G na interface materno-fetal possa não ser essencial para uma implantação bem sucedida do embrião ( FAN et al., 1999 ).

Outro papel tem sido atribuído ao gene HLA-G, o qual estaria associado com um aumento da taxa de clivagem embrionária naqueles embriões que o expressam ( GILL, 1999 ).

A compreensão dos mecanismos imunoregulatórios que envolvem moléculas HLA-G, células NK e outros fatores do sistema imune é de fundamental importância para obter-se esclarecimentos sobre possíveis causas dos abortos espontâneos recorrentes.

### **1.1.1 PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO**

Visando um tratamento para os casais AER, cuja etiologia dos abortos é desconhecida, várias e diferentes imunoterapias têm sido propostas e aplicadas em centros médicos. Entretanto, a eficácia deste tratamento ainda não está totalmente clara e gera controvérsias. Existem tratamentos, que utilizam terapias imunológicas, para prevenção de aborto primário e secundário, mas a escolha da terapia requer diagnóstico preciso através de testes imunológicos e do histórico clínico da paciente ( McINTYRE & FAULK, 1985 ). Neste estudo serão apresentados os protocolos de imunoterapias ofertadas para casais com aborto espontâneo recorrente do tipo primário, os quais freqüentemente serão designados apenas como AER e que geralmente apresentam um alto grau de similaridade HLA ( em geral compartilham no mínimo 2 especificidades HLA ).

- PROTOCOLO 1 – TAYLOR & FAULK, 1981:

Quatro mulheres com no mínimo 3 abortos espontâneos cada uma e apresentando um alto grau de compartilhamento de antígenos HLA com seus maridos, foram submetidas à transfusões de concentrados de leucócitos obtidos de indivíduos não relacionados com 250 ml de volume em intervalos de 3 semanas. Estes concentrados foram separados a partir do sangue total de 2 a 5 doadores, os quais eram compatíveis para os grupos eritrocitários com as receptoras. Uma das pacientes, que tinha uma história de 10 abortos e tinha sido submetida a uma cirurgia de reparo de útero bicornuado, manteve a gravidez até a 28ª semana e estudos de ultrasonografia revelaram que seu feto era viável. As outras 3 pacientes tiveram gestações normais e bebês saudáveis. Estes resultados sugeriram que a transfusão múltipla de um *pool* de leucócitos foi um tratamento útil na prevenção dos abortos em 3 dos casos e que a reprodução humana parece ser parcialmente dependente da incompatibilidade HLA entre marido e mulher, sustentando que esta incompatibilidade tende a perpetuar a diversidade genética em populações humanas.

- PROTOCOLO 2 – TAYLOR et al., 1985:

Uma amostra de 44 casais foi selecionada a partir de 139 casais, nos quais as mulheres tinham todas pelo menos 3 abortos com o mesmo parceiro e nenhum sucesso gestacional. Esta seleção foi realizada após tipagem HLA dos casais e tipagem de 103 casais controle ( saudáveis ), objetivando comparar o grau ou frequência de compartilhamento de antígenos HLA. Utilizou-se como critério do grupo paciente casais com no mínimo 2 antígenos HLA em comum. Após informados sobre os riscos das infusões, apenas 28 casais continuaram o tratamento. As transfusões de células brancas de um *pool* de doadores ( 2 a 5) eritrócito compatíveis com as receptoras, tinham um volume de 250 ml e foram administradas 2 vezes com um intervalo de 3 semanas entre uma e outra, antes da mulher engravidar. Após constatada a gravidez, na 3º semana de gestação a mulher recebia nova transfusão, o que se repetia a cada 3 semanas até a 26ª semana. Em um único caso, de uma paciente que abortava pela 8ª semana, as

transfusões eram feitas semanalmente até por volta da 8ª a 12ª semana de sua gravidez. Este aumento na frequência do tratamento apresentou resultados positivos pois esta mulher teve uma gestação a termo e um bebê normal.

Das 28 mulheres submetidas à terapia, 17 tiveram gestações e bebês normais, e destas 2 tiveram um segundo bebê. Três mulheres estavam grávidas e suas gestações já haviam ultrapassado o tempo considerado crítico para o aborto, ou seja, aquele período gestacional que haviam abortado anteriormente. Sete mulheres estavam aguardando a concepção e uma, cujo tratamento não havia dado certo, foi tratada pela segunda vez e então obteve seu sucesso.

As mulheres que desejavam ter um segundo filho, não receberam mais transfusões de células brancas, pois acreditava-se que uma vez estabelecida a proteção, esta deve ser específica e duradoura.

- PROTOCOLO 3 – McINTYRE & FAULK, 1985:

Neste estudo, o grupo paciente de 34 casais com aborto primário atendiam os seguintes critérios clínicos: ocorrência do aborto até a 20ª semana de gestação e nenhum filho; ausência de imunidade antipaterna no soro da esposa; ausência de resposta proliferativa de células da mulher quando colocadas com células do marido na cultura mista de linfócitos ( CML ), mas a mulher exibe uma resposta normal quando colocada contra um *pool* de células de doadores; não é constatado fator bloqueador de CML no soro da esposa e marido e mulher compartilham mais antígenos HLA e TLX ( antígenos do trofoblasto com reação cruzada com linfócitos ) do que o esperado. O argumento favorável à utilização da imunoterapia com leucócitos HLA e TLX incompatíveis, seria o fato do sucesso reprodutivo em mamíferos e em alguns anfíbios requerer uma sinalização do trofoblasto, para que a mãe desenvolva uma resposta protetora, seja por anticorpos bloqueadores, células supressoras ou ambos. Esta evidência partiu de duas observações principais: mulheres com aborto primário compartilham especificidades HLA com seus parceiros e deste modo não fazem um reconhecimento imunológico de seus linfócitos. O programa clínico utilizado para as pacientes consistiu de transfusões com volume de 250 ml cada e com duração

de 1 a 2 horas, as quais eram preparadas a partir do sangue de 3 a 5 doadores eritrócito compatíveis com as mulheres. Do sangue total destes doadores era obtido um *pool* de leucócitos enriquecidos com plasma; o qual era aplicado na imunoterapia.

As mulheres, não grávidas, receberam inicialmente 2 transfusões com intervalo de 3 semanas. Uma vez estabelecida a gravidez recebiam transfusões a cada 3 semanas até a 27ª semana de gestação.

Dos 34 casos tratados, 20 mulheres tiveram bebês normais, 4 estavam grávidas e mantinham a gestação além da data prevista para o aborto, 7 esperavam pela concepção e 3 abortaram após o tratamento. Destas, uma teve rompimento prévio da placenta, outra não seguiu corretamente o tratamento, mas foi readmitida no mesmo, tendo uma gestação a termo e um bebê normal. Não obteve-se informações da terceira.

Concluiu-se que as mulheres AER tiveram gestações com sucesso e bebês normais, quando seguiam programas terapêuticos direcionados para seus aspectos fisiopatológicos decorrentes de problemas imunologicamente definidos .

- PROTOCOLO 4 – UNANDER & LINDHOLM, 1986:

Desde 1981, evidências têm sustentado a idéia de que alterações nos processos imunológicos podem causar abortos recorrentes. Além do compartilhamento de especificidades HLA ser significativamente mais comum entre casais com história de abortamentos do que o esperado, estudos demonstraram que o anticorpo bloqueador IgG presente no soro de mulheres durante e após uma gestação normal, está ausente no soro de mulheres que habitualmente abortam.

Este anticorpo inibe reações imunes mediadas por célula e quando direcionado para antígenos do trofoblasto poderia induzir importantes mecanismos que utilizassem células supressoras do feto, o que provavelmente seria uma defesa natural do feto contra a rejeição materna. O aumento da similaridade HLA entre marido e mulher, poderia levar a um aumento da

compatibilidade HLA materno-fetal e desse modo possibilitar um estímulo inadequado para a produção do anticorpo bloqueador.

Transfusões de concentrados de células sangüíneas, contendo tanto leucócitos quanto eritrócitos, foram oferecidas às mulheres AER. Quarenta e quatro mulheres com experiência de pelo menos 3 abortos submeteram-se às investigações imunológicas, e destas, 28 foram classificadas como abortadoras primárias. Também foi realizada CML, onde linfócitos das mulheres foram expostos aos linfócitos de seus próprios maridos tratados com mitomicina e a um *pool* de linfócitos de doadores. Determinou-se os seguintes grupos sangüíneo das mulheres: ABO, Rh ( fator Rhesus ), incluindo os subgrupos ( CcDEe ), Kell, Fy, e antígeno de alta incidência como Vell, Lu, e Yt. As que foram Kell positivas foram também testadas para K. Medidas de precaução foram tomadas com o objetivo de evitar contaminação pelo vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida humana ( HIV ) e hepatite ( HbsAg ), e os doadores foram escolhidos separadamente para cada mulher de acordo com a compatibilidade dos grupos sangüíneos citados acima.

Antes das transfusões realizou-se uma prova cruzada entre o sangue dos doadores que seria utilizado na transfusão e o soro das receptoras. Outra prova cruzada testou o soro dos doadores contra as células sangüíneas vermelhas das receptoras. Após um resultado de prova cruzada negativa, procederam-se as transfusões. Cada mulher recebeu 3 transfusões ( de um concentrado de eritrócitos rico em leucócitos ) em intervalos de 4 a 8 semanas. Nenhuma delas estava grávida durante este período. Antes de cada transfusão, uma amostra de sangue de cada mulher foi coletada, e após separado o soro, este foi armazenado em freezer.

A capacidade bloqueadora do soro das mulheres foi investigada através de várias CMLs, uma com o soro da 1ª investigação imunológica, 3 com os soros obtidos antes de cada transfusão e a última obtida com o sangue total das mulheres coletado 2 meses após a 3ª transfusão.

Calculou-se a significância da capacidade bloqueadora sérica pelo teste *Mann-Whitney U* e aplicou-se o teste de *Student* para avaliar os efeitos diferentes

das respostas nas CML exercidas pelos soros autólogos ( das pacientes ) obtidos antes e após as transfusões sangüíneas. Das 28 pacientes com aborto primário, 7 apresentaram anticorpo bloqueador em seus soros antes da transfusão e 21 não apresentaram ou sua presença no soro não era relevante. No entanto estas últimas pacientes desenvolveram significativa capacidade bloqueadora sérica após as transfusões. Entre as 7 pacientes com atividade bloqueadora antes das transfusões, 2 engravidaram e abortaram novamente. Estas revelaram presença de autoanticorpos indicando sinais de doença autoimune e 1 teve novo aborto mas engravidou outra vez. Durante esta gestação recebeu 0,25 mg de ácido acetilsalicílico diariamente e da 16ª semana em diante 30 mg de Prednisolona ( antiinflamatório ). Ela foi considerada pré-eclâmptica e submeteu-se à cesariana, tendo um bebê saudável. Esta paciente aparentemente sofre de Lúpus Eritematoso Sistêmico não diagnosticado previamente. Das outras 21 pacientes, 1 abortou novamente e após a 11ª semana de gestação não apresentava mais anticorpo bloqueador; 2 tiveram gravidez extrauterina; 9 tiveram bebês; 5 estavam grávidas e 4 não engravidaram.

Os resultados deste estudo indicam que uma população selecionada de mulheres AER, isto é, mulheres que não apresentam anticorpo bloqueador em seu soro, se beneficiam da terapia com transfusões sangüíneas de um *pool* de doadores.

- PROTOCOLO 5 – McINTYRE et al., 1989:

A imunoterapia usando supositórios vaginais de um *pool* de plasma seminal foi oferecida à mulheres AER, que foram submetidas a vários testes imunológicos, como: 3 testes para anticorpo humoral antipaterno, sendo 2 citotoxicidade complemento dependente ( CDC ) e 1 citotoxicidade celular anticorpo-dependente ( ADCC ), e CML para testar a capacidade intrínseca dos casais AER no reconhecimento e resposta a estímulos alogênicos de seus parceiros em comparação com um *pool* de indivíduos. Usando a CML, o soro materno pode ser útil como um suplemento na cultura para proteger da presença de inibidores CML no sangue materno.

As hipóteses deste trabalho propõem que o compartilhamento HLA por si só não é o fator responsável por abortos recorrentes. O sistema HLA está associado com outro sistema alotípico chamado TLX, o qual foi proposto como um mecanismo que sinaliza para desencadear a resposta materna protetora necessária durante a gestação. Investigações mostraram que antígenos TLX estão presentes no sêmen, e em decorrência disto, estímulos alogênicos seriam apresentados à mãe durante a fase de inseminação. Esta observação fundamentou o ensaio imunoterápico, que utiliza supositórios vaginais de sêmen no tratamento de mulheres AER.

Submeteram-se ao tratamento 46 mulheres, as quais tinham no mínimo 2 abortos, compartilhavam pelo menos duas especificidades HLA com seus respectivos maridos e não apresentavam atividade citotóxica antipaterna. Considerando-se que doenças infecciosas podem ser transmitidas quando são usados produtos sanguíneos, os supositórios de plasma seminal oferecem um risco mais baixo de infecção, mas mesmo assim são investigados para possível contaminação por *Chlamydia*, *Neisseria gonorrhoeae*, HIV e HbsAg.

O plasma seminal foi armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 6 meses. Após este período foi descongelado e aliquotado em cápsulas de gelatina de 1 ml e novamente resfriado até o uso. Para o grupo placebo, gel lubrificante foi utilizado ao invés do plasma seminal.

Os supositórios eram administrados nos dias 7, 14 e 21 do ciclo menstrual. Caso a mulher não menstruasse no 28º dia, recebia os supositórios na 2ª e 5ª feira da próxima semana, então no 35º dia o soro era testado para presença de gonadotrofina coriônica. Em caso positivo continuava usando os supositórios 2 vezes por semana até a 30ª semana e em caso negativo utilizava novamente os supositórios nos dias 7, 14 e 21 do próximo ciclo. Esta mesma repetição no próximo ciclo era adotada se a mulher viesse a menstruar no 28º dia.

As pacientes só ficavam sabendo se pertenciam ao grupo placebo ou ao grupo de plasma seminal caso abortassem; então se pertencessem ao grupo placebo teriam a chance de tentar a imunoterapia administrada com supositórios de plasma seminal. Das 31 pacientes que engravidaram, 13 tiveram gestações a



termo, 3 estavam grávidas ( 29 semanas, 28 semanas e 9 semanas de gestação ) e 15 abortaram, destas 7 eram do grupo placebo. Dez mulheres aguardavam a gravidez e 5 desistiram da terapia. Os autores consideram estes dados insuficientes para permitir conclusões significativas, mas estudos subseqüentes deverão ajudar a esclarecer a eficácia dos protocolos de imunoterapia.

- PROTOCOLO 6 – KOYAMA et al., 1990:

As pacientes encaminhadas para a imunoterapia, tinham todas 3 ou mais abortos e foram previamente investigadas para possíveis causas como: anormalidades anatômicas, hormonais, cromossômicas e auto-ímmunes. Tanto a mulher quanto o marido foram submetidos a tipagem HLA através do teste de microlinfocitotoxicidade. As pacientes cuja causa dos abortos não foi esclarecida, receberam mais de 2 imunizações, com concentração igual a  $1 \times 10^8$  leucócitos do marido. O intervalo entre a 1ª e a 2ª imunização foi de 4 semanas, e após este procedimento recomendou-se às pacientes que tentassem engravidar. Uma imunização final foi realizada entre a 4ª e 5ª semana de gestação. Das 55 pacientes tratadas, 11 abortaram no 1º trimestre da gestação ( grupo 1 ) e 44 tiveram gestações bem sucedidas ( grupo 2 ), portanto a taxa de sucesso foi de 80% ( 44/55 ).

A resposta imune das pacientes foi investigada pelo monitoramento da produção de anticorpos bloqueadores na CML, de anticorpos anti-célula T e de anticorpos anti-célula B, antes e após as imunizações. Através do procedimento adotado na CML foi possível comparar o efeito inibitório da imunização com a resposta produzida pelo soro da mulher antes da imunização. A análise de anticorpos anti-linfócitos foi realizada utilizando-se um painel de linfócitos com mais de 40 indivíduos não relacionados. Este painel de células B e T foi incubado com o soro das pacientes por 1 hora a 37°C ( células B e T ) ou a 4°C ( somente células B ) e então adicionou-se complemento de coelho, ficando por 2 horas a temperatura ambiente. A citotoxicidade foi avaliada pelo escore de percentagem de células mortas ( soro positivo > 40% ), coradas por *trypan blue*.

Os resultados revelaram que o efeito inibitório na CML após a 2ª imunização no grupo 2 foi significativamente maior do que no grupo 1. Não existiram diferenças significativas quanto a citotoxicidade entre os 2 grupos antes e após a imunização. Entretanto no grupo 2 houve uma conversão significativa, após a imunização, de uma resposta imune negativa para uma resposta imune positiva contra células B. Esta observação sugeriu que a resposta imune contra células B, a qual é principalmente composta por anticorpos anti-HLA de classe II, poderia estar associada com a manutenção da gestação, mas o mesmo não seria proposto para células T.

- PROTOCOLO 7 – HO et al., 1991b:

Os casais que faziam parte da população paciente foram investigados para descartar a possibilidade de anormalidades cromossômicas. As mulheres foram também investigadas para possíveis defeitos anatômicos do trato reprodutivo, irregularidades ou alterações hormonais e doenças autoimunes. Apenas os casais cujos testes estavam dentro dos limites normais foram incluídos no estudo. Todos os maridos tiveram análise de sêmen normal.

Os testes imunogenéticos realizados foram: tipagem HLA, efeito bloqueador na CML e pesquisa de anticorpos citotóxicos antipaternos.

As 75 mulheres com aborto do tipo primário que fizeram parte desta investigação tinham todas no mínimo 3 abortos, compartilhavam antígenos HLA com seus maridos ( 35 delas compartilhavam 3 ou mais ), não apresentavam excesso de anticorpos citotóxicos antipaternos e tiveram um nível de fator bloqueador na CML baixo.

O grupo controle ( 37 mulheres ) recebeu imunizações com seus próprios linfócitos, e os grupos tratados receberam linfócitos de seus maridos ( 30 mulheres ) ou um *pool* de linfócitos de doadores saudáveis ( 8 mulheres ). As 8 mulheres que receberam linfócitos de doadores, tinham maridos HbsAg positivos.

Os linfócitos foram obtidos a partir de 120 ml de sangue periférico heparinizado, o qual foi centrifugado com *Ficoll-Hypaque* sob condições estéreis, lavado 3 vezes com tampão fosfato ( pH = 7,4 ) e ressuspenso em 2 ml de PBS,

perfazendo uma concentração de 100 a 200 x 10<sup>6</sup> células. Esta suspensão de células foi injetada intradérmicamente em diferentes pontos de ambos os braços das receptoras. Mulheres que não soroconverteram após esta imunização receberam nova dose de linfócitos preparados a partir de 50 ml de sangue. Após a imunização, todas as mulheres foram aconselhadas a tentar uma nova gravidez. Caso a paciente não engravidasse dentro de 6 meses, era reexaminada e se não tivesse anticorpos contra as especificidades HLA presentes nos linfócitos utilizados na imunoterapia, ela era reimunizada.

Não houveram diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos tratados quando comparou-se dados de casais compartilhando 3 ou mais antígenos HLA ou compartilhando menos que 3 antígenos. A atividade de anticorpos citotóxicos antipaternos após a imunização foi similar entre os 2 grupos tratados, mas significativamente maior nestes grupos em relação ao grupo controle. O efeito bloqueador sérico pós-imunização aumentou nos grupos tratados, mas não no grupo controle. Entretanto não foi constatada uma relação relevante entre gravidez bem sucedida e o aumento deste efeito bloqueador.

No grupo controle, que recebeu imunização autóloga, 14 mulheres tiveram bebês, 9 estavam grávidas e 14 abortaram novamente, uma delas tinha anormalidade congênita não detectada previamente. Entre as mulheres imunizadas com os linfócitos dos próprios maridos, 13 tiveram bebês, 10 estavam grávidas e 7 abortaram novamente, sendo que uma também tinha anormalidade congênita não detectada e outra retardo no crescimento intrauterino. Cinco mulheres tratadas com um *pool* de linfócitos tiveram bebês, 2 estavam grávidas e 1 abortou. Não houveram diferenças significativas entre os 3 grupos quanto ao número de bebês nascidos ou ao número de abortos.

A resposta de anticorpos direcionados contra o embrião não seria patogênica, pelo menos na maioria das circunstâncias, e grande parte dos abortos recorrentes inexplicáveis teriam uma base genética, relacionada à anormalidade cromossômica ou homozigose de genes recessivos letais. Os resultados da imunoterapia para abortos recorrentes são controversos, mas não

se pode descartar a possibilidade de que talvez possam haver casos específicos em que este tratamento seria útil, mas eles deverão ser esclarecidos.

- PROTOCOLO 8 – KILPATRICK & LISTON, 1993:

Designou-se como AER idiopáticas, 108 mulheres com 3 ou mais abortos e sem qualquer alteração conhecida que possa prejudicar as funções reprodutivas e como AER severo, 25 destas mulheres que tinham 5 ou mais abortos. Com idade similar às pacientes, 132 mulheres saudáveis representaram o grupo controle.

A tipagem dos antígenos HLA-A, HLA-B e HLA-DR foi feita pelo teste de microlinfocitotoxicidade. A proporção de casais AER compartilhando 2 ou mais antígenos HLA foi maior do que em casais controle e a proporção entre o subgrupo AER severo e o grupo AER total foi similar.

As pacientes AER idiopáticas sem atividade de anticorpos antipaternos foram tratadas com imunoterapia de leucócitos, administrada duas vezes, uma antes da gravidez e outra no início da gestação. Algumas receberam células autólogas como placebo e outras 6 receberam imunoglobulina intravenosa, as quais ou eram anticorpo antipaterno positivas ou a atividade da imunoterapia parceiro-específica tinha falhado. Quatro pacientes com atividade de anticorpos antipaterno foram tratadas com imunoterapia de leucócitos.

Um total de 54 mulheres AER engravidaram e a taxa de sucesso ( gestação a termo ou que atingiu o 3º trimestre ) foi similar entre os casais que compartilhavam antígenos HLA (  $16/26 = 62\%$  ) e aqueles que não compartilhavam (  $19/28 = 68\%$  ). Das 15 pacientes AER severo que engravidaram 29% compartilhavam antígenos HLA com seus parceiros e 25% não.

Das 50 pacientes tratadas com imunoterapia de leucócitos, 19 responderam produzindo anticorpos antipaterno após a 1ª imunização. A atividade antipaterna foi afetada pelo número de células inoculadas e pelo grau de incompatibilidade HLA. Uma análise da frequência das especificidades HLA no grupo que desenvolveu atividade antipaterna e no grupo que não desenvolveu, revelou apenas uma diferença significativa para a especificidade HLA-B8, que

apareceu em apenas 1 das 19 que desenvolveram, e em 9 das 31 que não desenvolveram atividade antipaterna.

As definições de AER idiopáticas provavelmente incluem um grupo heterogêneo de pacientes, sendo comum uma divisão entre aborto primário ( nenhum bebê e vários abortos ) e secundário ( um bebê e vários abortos ), a qual provavelmente não seria útil, já que em caso de troca de parceiro, abortadoras primárias eventualmente tornam-se secundárias e estas por sua vez tornam-se primárias. A tipagem HLA dos casais não tem fornecido informações diagnosticas ou prognosticas úteis para seus subseqüentes tratamentos, pois ela não é capaz de separar um subgrupo de pacientes, no qual o tratamento através da imunoterapia seria relevante.

• PROTOCOLO 9 – CHRISTIANSEN et al., 1994:

Fatores imunológicos têm sido sugeridos como a causa de abortos recorrentes inexplicáveis. Esta sugestão está, em parte, baseada no conceito de que o feto seria um aloenxerto para a mãe. Também, muitos autoanticorpos e certos tipos HLA são encontrados mais freqüentemente nestas mulheres que sofrem de perdas gestacionais consecutivas, do que em mulheres normais com filhos. A imunoterapia de leucócitos para prevenir abortos, tem sido praticada desde os primeiros relatos da utilização deste procedimento em mulheres AER. As pacientes que fizeram parte deste estudo deveriam ter no mínimo 3 abortos consecutivos, sendo no máximo 1 após a 14ª semana de gestação; não terem anormalidades nos parâmetros imunológicos investigados; não serem consangüíneas com seus maridos; serem negativas para anticorpos linfocitotóxicos e para anticoagulante lúpico e não terem título de anticorpos antinucleares superior a 80 ou níveis de anti-DNA superiores a 80 mg/l.

As imunizações foram feitas usando infusões intravenosas com *buffycoat* ( sangue enriquecido com leucócitos ) de doadores eritrócito compatíveis e como um grupo placebo usou-se o sangue autólogo em certas mulheres. Duas imunizações iniciais foram feitas antes da concepção, com intervalo de 1 mês entre elas, sendo coletado 200 ml de sangue das mulheres antes de cada uma

delas. Cada infusão continha aproximadamente 150 ml de *buffycoat* de 2 doadores ou 150 ml de sangue da própria mulher. Se a mulher não engravidasse após as imunizações iniciais, ela recebia nova imunização a cada 5 meses, até ser constatada a gravidez.

Receberam imunização ativa ( de doadores ) 30 mulheres com aborto primário, das quais 22 tiveram bebês, 7 abortaram novamente e 1 teve gravidez ectópica.

Quinze mulheres integraram o grupo placebo, 5 delas tiveram bebês, 8 abortaram e 2 tiveram gravidez ectópica. Portanto a taxa de sucesso ( gestação a termo ) foi mais alta no grupo de imunização ativa, 81% se comparado aos 33% do grupo placebo. Ressalta-se que não houve diferença significativa quanto ao intervalo de tempo da última imunização até o 1º dia do último período menstrual entre os 2 grupos. O peso médio dos nascidos de mães imunizadas ativamente foi mais alto do que o peso dos nascidos das mães do grupo placebo.

Investigações imunológicas, realizadas no 1º trimestre da gestação, sugeriram que as mulheres abortando novamente tiveram um nível de células NK no sangue significativamente mais alto do que aquelas obtendo sucesso gestacional. Também mais mulheres do grupo imunizado desenvolveram anticorpos anti-linfócitos dependentes de complemento se comparado com o grupo placebo.

Os casais haviam sido tipados para os *loci* HLA-DR e HLA-DQ, e constatou-se que o tratamento resultar ou não em gravidez era independente do grau de compartilhamento alélico entre o casal.

A percentagem de células NK ligeiramente mais baixa, em mulheres que obtiveram uma gestação a termo, pode consistir em um importante achado. Porém, o papel destas células na gestação não está bem elucidado. Estudos sugerem um envolvimento de células decíduais com fenótipos NK na interação entre o implante trofoblástico e o sistema imune materno. Também, a média dos pesos dos recém natos significativamente maior nas pacientes imunizadas ativamente, poderia ser consequência de uma melhora na função placentária após a imunização.

A razão para utilizar-se a imunoterapia de leucócitos como um tratamento para mulheres com abortos espontâneos recorrentes seria que, mudanças necessárias no sistema imune materno como, formação de anticorpos bloqueadores poderiam ocorrer quando elas fossem expostas à uma forte carga antigênica na forma de injeções de leucócitos.

- PROTOCOLO 10 – AGRAWAL et al., 1995:

Um total de 115 mulheres com 3 ou mais abortos consecutivos foram submetidas às seguintes investigações: cariótipo do casal; sorologia para toxoplasmose; teste de tolerância a glicose; histerossalpingografia; teste para função de tireóide; concentração de progesterona no plasma durante a fase lútea e presença de anticorpos citotóxicos antipaternos ( ACAP ) através de prova cruzada entre o soro materno e leucócitos do sangue periférico paterno. Somente as mulheres com parâmetros normais e/ou negativos para todos os testes foram selecionadas para o tratamento imunoterápico.

Os linfócitos usados nas imunizações foram obtidos a partir de 10 ml de sangue periférico coletado com heparina, sendo isolados com o uso de *Ficoll-Hypaque* e lavados 3 vezes com o meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* ( RPMI ). A concentração final foi ajustada para  $5 \times 10^6$  células/ml e uma alíquota deste preparado foi enviada para análise microbiológica. Um total de  $5 \times 10^6$  células foram injetadas intradérmicamente em 3 diferentes locais do antebraço das mulheres. As imunizações foram repetidas até um máximo de 6, em intervalos de 4 semanas e concomitante a elas realizou-se análises de presença de ACAP. Quando o título de ACAP fosse  $\geq 1:16$ , cessavam-se as imunizações. Os maridos , no caso doadores dos linfócitos, foram testados para o fator Rh e para os vírus HbsAg e HIV.

Uma amostra de 64 mulheres AER fizeram parte deste estudo, sendo que 26 delas preferiram ser integrantes do grupo controle. Entre as 38 que aceitaram participar da imunoterapia, 7 desistiram no período que compreendia as 3 primeiras imunizações, e segundo testes realizados todas foram negativas para ACAP.

Das 31 mulheres restantes, 9 não desenvolveram um título de ACAP  $\geq 1:16$  e 22 desenvolveram, após terem recebido de 2 a 6 imunizações. Destas 22 mulheres, 21 engravidaram dentro de 6 meses de imunoterapia, 16 tiveram gestações a termo e bebês saudáveis e 5 abortaram no 1º trimestre, resultando numa taxa de sucesso observada de 76%.

Dezoito mulheres do grupo controle engravidaram, porém apenas 4 tiveram bebês saudáveis, enquanto as outras 14 abortaram. Entre as 7 mulheres que desistiram durante o início do tratamento, 4 engravidaram, tendo 2 bebês normais e 2 novos abortos e 7 daquelas 9 mulheres que não desenvolveram ACAP  $\geq 1:16$  engravidaram, havendo 5 novos abortos e 2 nascimentos de bebês saudáveis.

O grupo de 22 mulheres imunizadas que desenvolveram ACAP, tiveram uma taxa de gestações bem sucedida significativamente maior que o grupo controle, e maior também que as mulheres que não desenvolveram anticorpos citotóxicos antipaternos.

Os resultados deste estudo confirmam os benefícios da imunoterapia com linfócitos alogênicos em mulheres que sofrem de abortos do tipo primário, as quais conseguem tornar-se ACAP positivas através das imunizações. Como o grupo controle recebeu suportes e cuidados similares durante o estudo, a contribuição de fatores psicológicos resultando em uma gestação normal não são confirmados por este estudo.

As interações entre o sistema imune materno e o embrião não estão bem caracterizadas. Enquanto o desenvolvimento de ACAP pode ser um marcador apropriado para o reconhecimento materno de antígenos fetais, sua ausência é questionável, já que apenas 20 a 50% de mulheres multíparas desenvolvem anticorpos citotóxicos contra linfócitos de seus maridos. O papel de anticorpos bloqueadores também não está bem estabelecido, sendo necessárias mais informações sobre as respostas imune celulares e maior precisão da metodologia usada para mensurar fatores como ACAP e fator bloqueador da cultura mista de linfócitos.



- PROTOCOLO 11 – BARINI et al., 1998:

Dados de 182 pacientes com 3 ou mais abortos consecutivos ou 2 abortos e idade acima de 35 anos foram avaliados. Todas as pacientes foram investigadas para excluir possíveis causas dos abortos.

Foram feitas tipagem HLA dos casais, CML e reação de prova cruzada por microlinfocitotoxicidade. Considerou-se como causa aloimune quando em CML a capacidade do soro da paciente em inibir a resposta autóloga aos linfócitos do parceiro foi menor que 50% e/ou quando a prova cruzada entre o soro da paciente e linfócitos do parceiro foi negativa. Neste casos, o parceiro foi submetido a sorologias para hepatite B e C e para o vírus HIV .

Cada imunização continha um concentrado de  $80 \times 10^6$  linfócitos/ml e era aplicada intradérmicamente no antebraço das mulheres 2 vezes com intervalos de 4 a 6 semanas entre uma e outra. Seis semanas após a última imunização colheu-se nova amostra de sangue para verificar se a capacidade inibitória do soro da mulher na CML estava superior a 50% e se a prova cruzada seria positiva. Caso tais indicativos imunológicos não fossem observados a mulher era reimunizada.

As pacientes que não responderam ao 2º tratamento foram imunizadas com células de doador não relacionado associadas às células do marido, obedecendo o mesmo intervalo que o esquema inicial.

Após constatado resultados positivos para os exames de CML e prova cruzada, as pacientes eram liberadas para engravidar. Foi administrado ácido fólico ( 5 mg/dia ) a partir da 2ª fase do ciclo menstrual até a 12ª semana de amenorréia e de progesterona ( 100 mg/dia ) durante a 2ª fase do ciclo menstrual, a qual foi aumentada para 200 mg/dia com a confirmação da gravidez e mantida até a 16ª semana de amenorréia. Durante a gravidez realizaram-se 4 imunizações, iniciadas após a 6ª semana de amenorréia e em intervalos de 6 semanas cada.

Durante o período de seguimento ocorreram 116 gestações dentre as 182 mulheres tratadas. Ressalta-se neste ponto que 84,1% destas mulheres tratadas foram classificadas como abortadoras primárias. Vinte e três gestações

terminaram em aborto, 26 estavam grávidas ( gestação > 20 semanas ) e 67 tiveram gestações a termo.

Nenhuma mulher permaneceu com prova cruzada negativa após a imunoterapia e apenas 3 mantiveram resposta de inibição autóloga na CML abaixo dos 50%; o que demonstrou a alta eficácia deste protocolo imunoterápico em induzir resposta imune celular nas pacientes em relação aos seus companheiros.

Dados indicam que o sucesso da imunoterapia depende, tanto do tamanho do inóculo, como do grau de compatibilidade HLA e que a soroconversão é menos freqüente em casais que compartilham mais de 1 antígeno HLA. No grupo paciente analisado nesta pesquisa, esta dificuldade foi vencida pelo uso de um coadjuvante da imunização, no caso o doador não relacionado. Quanto ao inóculo, há dados sustentando a hipótese de que a via intradérmica resulta em soro conversão com inóculos menores e menos desconfortáveis. Considerando estes resultados satisfatórios, o tratamento imunoterápico com células paternas estaria favorecendo o processo gestacional.

- PROTOCOLO 12 – PFEIFFER et al., 1998:

Neste programa imunoterápico foram incluídos 2 grupos distintos de pacientes. As pacientes do grupo 1 ( n = 20 ) com 2 ou mais abortos consecutivos, não apresentavam nenhuma anormalidade detectável como causa possível dos abortos e foram tratadas com sangue autólogo ativado, por um período de 3 meses. Foram então, aconselhadas a engravidar, sendo que 2 pacientes ficaram grávidas antes da recomendação. Três pacientes, por razões próprias decidiram não tentar engravidar no período em que realizava-se o estudo. Durante a gestação, as mulheres foram tratadas 1 ou 2 vezes por semana até pelo menos as últimas semanas de gestação.

No grupo 2 ( n = 16 ) foram incluídas mulheres com 2 ou mais abortos, mas que estavam grávidas quando o tratamento foi iniciado. Cinco delas não apresentavam sinais de aborto, 8 apresentavam sinais, tais como, hemorragia vaginal ou gonadotrofina coriônica humana elevada e 3 tornaram-se grávidas

durante procedimentos diagnósticos. Estas mulheres também receberam terapia com sangue autólogo ativado 1 vez por semana; caso ocorressem complicações, recebiam 2 vezes por semana. O tratamento foi iniciado próximo da 4ª semana de gestação, sempre antes do período gestacional em que elas comumente abortavam.

Os parâmetros imunológicos foram mensurados antes, após 4 semanas e após 3 meses da terapia, com o objetivo de investigar possíveis impactos desta imunoterapia no sistema imune.

As injeções eram aplicadas via intramuscular e o sangue das próprias mulheres ( autólogo ), era preparado a partir de uma amostra de 2 ml com 1 ml de água bidestilada, 20 ml de NaCl ( 0,9% ) e 0,5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( 3% ), então tratava-se com radiação ultravioleta ( 253,7 nm ) e eletrólises ( 10 mA/20V ) por 15 minutos em um *Hämoactivator N*. Cinco ml deste sangue ativado era usado para cada injeção.

Das 36 mulheres tratadas , 22 apresentaram gravidez intrauterina, das quais 7 pertenciam do grupo 1 e 15 do grupo 2. Todas as 7 mulheres do grupo 1 sofriam de aborto primário e 2 delas abortaram novamente. No grupo 2, todas as mulheres tiveram gestações a termo e bebês nascidos vivos, 5 delas sofriam de aborto secundário e 10 de aborto primário. Uma mulher teve gestação ectópica.

O grupo controle consistia de 198 mulheres admitidas no centro de pesquisa antes do uso desta terapia, portanto estas mulheres não foram tratadas e 119 delas engravidaram. Analisando os subgrupos deste controle, a taxa de sucesso foi: 79% em mulheres com 2 abortos, 62% em mulheres com 3 abortos e 59% em mulheres com 4 ou mais abortos. A taxa de nascidos vivos foi de 86% no grupo imunizado e 64% no grupo não imunizado.

A investigação imunológica revelou mudanças significativas nas subpopulações de linfócitos, nos níveis de complemento no plasma, na estimulação mitógena e nos níveis de imunoglobulina durante o período de tratamento, concluindo que esta terapia produziu efeitos no sistema imune materno, podendo ser um tratamento promissor para AER idiopáticos, mas que necessita de investigações futuras.

- PROTOCOLO 13 – DUPONT et al., 1998:

Desde 1985, são realizadas imunoterapias como tratamento de AER no Hospital Erasme na França. Submeteram-se a este tipo de tratamento um total de 117 pacientes, 56 tratadas com transfusões de leucócitos paternos ( do marido ) e 61 receberam infusões de imunoglobulina intravenosa. A escolha destes 2 tratamentos não foi ao acaso.

Gestações normais foram alcançadas por 74% das mulheres tratadas com leucócitos paternos. Em 2 casos notou-se o aparecimento de aloanticorpos anti-eritrócitos. Entre as pacientes tratadas com imunoglobulina 71% obtiveram sucesso em suas gestações, e observou-se reações alérgicas ( urticária ) em 2 pacientes. Das 5 pacientes que haviam apresentado aborto espontâneo após a fertilização *in vitro*, 4 tiveram gestações normais.

O uso de imunoglobulina intravenosa como uma terapia para AER se torna inviável devido ao seu alto custo, enquanto que a imunização com leucócitos paternos constitui uma adequada alternativa desde que uma seleção imunológica cuidadosa dos doadores de leucócitos seja realizada.

- PROTOCOLO 14 – OBER et al., 1999:

Os critérios para que as mulheres fossem aceitas neste programa foram: 3 ou mais abortos ( não necessariamente consecutivos ), cuja causa não fosse atribuída às anormalidades cromossômicas do feto ou à gravidez ectópica; não ter tido mais que 1 filho viável com seu parceiro; no máximo 40 anos de idade; não estar grávida no início do tratamento; ausência de anticorpos anti-HLA; não ter contra indicações para a imunização com células mononucleares paternas e nenhuma causa identificada para os abortos prévios.

As células mononucleares foram removidas do sangue total dos parceiros com o uso de *Ficoll-Hypaque*, e foram armazenadas durante a noite a uma temperatura de 1 - 6°C. No dia seguinte 5 ml da preparação de células foi colocado nas seringas. Administrou-se 3 ml intravenosamente e em 2 locais do antebraço administrou-se 0,5 ml ( em cada ) subcutâneamente e mais 0,5 ml ( em cada ) intradérmicamente.

Para o grupo de mulheres que receberam o placebo, utilizou-se 5 ml de solução salina estéril administrada da mesma forma citada acima. Todas as mulheres, tratadas ativamente ou placebo, foram imunizadas durante as 2 primeiras semanas de seu ciclo menstrual, após detectado resultado negativo de gravidez. Aquelas que não haviam engravidado dentro de 6 meses foram reimunizadas seguindo o mesmo protocolo inicial.

Oitenta e seis mulheres do grupo tratado e 85 do grupo placebo completaram o tratamento imunoterápico. No grupo tratado 36% das mulheres tiveram gestação bem sucedida (  $\geq 28$  semanas ) e em 64% o tratamento falhou ( não engravidou ou abortou antes da 28ª semana de gestação ). No grupo placebo 48% tiveram gestação bem sucedida e em 52% o tratamento falhou.

Uma outra análise incluindo apenas as pacientes que engravidaram durante o tratamento mostrou que a taxa de sucesso ( gestação  $\geq 28$  semanas ) no grupo tratado foi de 46% ( 31/68 ) e no grupo placebo, 65% ( 41/63 ); portanto o tratamento falhou ( aborto antes da 28ª semana de gestação ) em 54% e 35% das pacientes de cada grupo, respectivamente.

A taxa de sucesso foi maior no grupo placebo e não houve evidência de associação entre desenvolvimento de anticorpos anti-HLA após a imunização e sucesso gestacional, já que 31% e 30% das pacientes com e sem anticorpos anti-HLA tiveram gestações bem sucedidas.

Estes resultados sugerem que a imunização com células mononucleares paternas não traria benefícios para mulheres AER e portanto não deveria ser oferecida como um tratamento para perdas gestacionais.

## 2. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As imunoterapias que utilizam transfusões de leucócitos de doadores não relacionados ( protocolos 1, 2, 3, 4, 9 ) mostraram-se eficientes, ou seja, a maior parte das mulheres tratadas conseguiram ter gestações bem sucedidas. Os parâmetros imunológicos mensurados no protocolo 4 indicam que apenas mulheres com atividade bloqueadora negativa na CML antes de realizadas as transfusões e positiva após estas, se beneficiaram deste tipo de tratamento. Já no protocolo 9 duas observações foram enfatizadas: o nível de células NK estava mais alto no sangue de mulheres que abortaram após o tratamento, e obtiveram uma frequência maior de sucesso mulheres que desenvolveram anticorpos anti-linfócitos.

Nos tratamentos baseados em transfusões de leucócitos paternos ( protocolos 6, 8, 10, 11, 14 ) os resultados foram conflitantes. Os protocolos 6 e 11 enfatizaram a importância do desenvolvimento de atividade bloqueadora na CML. Em relação à produção de anticorpos anti-linfócitos paternos, nos protocolos 10 e 11 houve uma taxa maior de sucesso gestacional entre as pacientes que tiveram prova cruzada positiva ( soro da mulher X linfócitos do marido ), porém no protocolo 14, onde o tratamento imunoterápico falhou, não houve associação entre gestações bem sucedidas e produção de anticorpos anti-linfócitos paternos. Neste ponto, é importante ressaltar o fato de que as pacientes admitidas neste último protocolo citado podiam ter tido uma gestação prévia bem sucedida, parâmetro não aceito nos demais protocolos para integrar a amostra paciente.

Geralmente o grau de compatibilidade ou similaridade de antígenos HLA entre o casal influencia o sucesso reprodutivo do mesmo, o que não foi confirmado pelo protocolo 8.

Apesar das mulheres do protocolo 7 exibirem o mesmo perfil imunológico, o que lhes garantiria o mesmo tratamento imunoterápico, optou-se por oferecer às mesmas três tipos de imunizações distintas. Algumas pacientes receberam linfócitos de doadores não relacionados, outras receberam linfócitos paternos e aquelas que representaram o grupo controle foram imunizadas com seus próprios

linfócitos. Mesmo que o efeito bloqueador na CML e a atividade citotóxica antipaterna tenham sido maiores nos grupos imunizados ativamente do que no grupo controle, não houveram diferenças entre as taxas de aborto e de gestações bem sucedidas entre os 3 grupos.

Tanto imunizações com leucócitos paternos quanto a aplicação de imunoglobulina intravenosa, a qual é pouco descrita como um tratamento para AER, foram terapias eficazes relatadas no protocolo 13.

As metodologias empregadas nos protocolos 5 ( supositórios vaginais de sêmen ) e 12 ( sangue autólogo ativado ) são incomuns e atípicas, portanto seus resultados caracterizam-se como insuficientes para obter informações esclarecedoras.

Apesar das terapias com leucócitos de doadores não relacionados terem se mostrado mais homogêneas quanto à sua eficácia, muitas diferenças metodológicas, tais como critério de seleção de pacientes, parâmetros imunológicos avaliados e número de transfusões administradas, podem ser visualizadas entre todos os protocolos apresentados, dificultando a proposta ou sugestão do protocolo imunoterápico mais eficiente.

Em 1997, Malinowski e colaboradores realizaram um estudo investigativo sobre as condições clínicas dos recém nascidos de mães AER que receberam tratamento imunoterápico com linfócitos paternos. Parâmetros como: condições gerais do recém nascido, desenvolvimento físico, peso, tempo do período de adaptação e valor de parâmetros hematológicos e imunológicos do sangue umbilical; foram mensurados tanto em bebês nascidos de mulheres AER tratadas quanto em bebês nascidos de mulheres saudáveis. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os dois grupos de bebês, sugerindo que a imunização com linfócitos paternos em mulheres AER seria segura para o feto ( MALINOWSKI et al., 1997 ).

Em 2000, Tanaka e colaboradores observaram um caso raro de trombocitopenia neonatal, em um recém nascido de mãe AER. Esta mãe havia sido tratada com leucócitos do marido, e investigações imunológicas mostraram a presença de anticorpos anti-HLA contra antígenos paternos e fetais em seu soro.

Também foi revelada a presença de IgGs contra antígenos de plaquetas extraídos do pai e do feto. Diante de tais observações, acredita-se que este caso de trombocitopenia foi causado por perfusão transplacentária de anticorpos anti-HLA. A produção destes anticorpos teria sido induzida e aumentada pela imunização de linfócitos recebida pela mãe ( TANAKA et al., 2000 ).

Os resultados obtidos nos diferentes protocolos imunoterápicos só poderão ser melhor avaliados quando os mecanismos envolvidos na tolerância materno-fetal forem esclarecidos, permitindo que um grupo de pacientes bem definido seja selecionado para a aplicação de uma imunoterapia baseada em seus parâmetros imunológicos conhecidos e em seu histórico clínico.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Respostas Imunes aos Transplantes de Tecidos. In:----. **Imunologia Celular & Molecular**. 3º ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda., 2000, p. 371-390.
- AGRAWAL, S.; KISHORE, R.; HALDER, A.; SHARMA, A.; SHARMA, R.K.; DAS, V.; SHUKLA, B.R.K.; AGRAWAL, S.S. Outcome of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion following immunotherapy with allogenic lymphocytes. **Human Reproduction**, v. 10, p. 2280-2284, 1995.
- BARINI, R.; COUTO, E.; RIBEIRO, S.T.; LEIBER, S.R.; BATISTA, S.C.; SILVA, J.L.P. Abortamento recorrente de causa imunológica: avaliação de um protocolo de investigação e tratamento. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 20, p. 83-89, 1998.
- BJERCKE, S. Recurrent abortions and lymphocyte transfusions. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 73, p. 373-376, 1994.
- CHRISTIANSEN, O.B.; RIISOM, K.; LAURITSEN, J.G.; GRUNNET, N.; JERSILD, C. Association of maternal HLA haplotypes with recurrent spontaneous abortions. **Tissue Antigens**, v. 34, p. 190-199, 1989.
- CHRISTIANSEN, O.B.; MATHIESEN, O.; RIISOM, K.; LAURITSEN, J.G.; GRUNNET, N.; JERSILD, C. HLA or HLA – Linked Genes Reduce Birth – Weight in Families Affected by Idiopathic Recurrent Abortion. **Tissue Antigens**, v. 36, p. 156-163, 1990.

- CHRISTIANSEN, O.B.; MATHIESEN, O.; HUSTH, M.; JERSILD, C.; GRUNNET, N. Studies of RFLP- inferred HLA-DR-DQ haplotypes in Danish women with recurrent fetal losses. **Tissue Antigens**, v. 40, p. 134-139, 1992.
- CHRISTIANSEN, O.B.; MATHIENSEN, O.; HUSTH, M.; LAURITSEN, J.G.; GRUNNET, N. Placebo – controlled trial of active immunization with third party leukocytes in recurrent miscarriage. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 73, p. 261-268, 1994.
- COULAM, C.B. Unexplained recurrent pregnancy loss: Epilogue. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 29, p. 999-1004, 1986.
- COULAM, C.B.; MOORE, S.B.; O'FALLON, W.M. Association between major histocompatibility antigen and reproductive performance. **American Journal of Reproductive Immunology Microbiology**, v. 14, p. 54-58, 1987.
- DUPONT, E.; MORIAUX, M.; LAMBERMONT, M.; ENGLERT, Y. Re – evaluation of immunomodulator treatments for recurrent abortions. **Rev. Med. Brux.**, v. 19, p. 69-72, 1998.
- EMMER, P.M.; VEERHOEK, M.; NELEN, W.L.D.M.; STEEGERS, E.A.P.; JOOSTEN, I. Natural Killer Cell Reactivity and HLA-G in Recurrent Spontaneous Abortion. **Transplantation Proceedings**, v. 31, p. 1838-1840, 1999.
- FAN, L.; ZHANG, X.; XU, L.; YANG, J.; LI, W.; LIU, B. Preliminary Study on the Expression of HLA-G mRNA in Normal Placenta and Placenta with RSA After Immunotherapy. **Transplantation Proceedings**, v. 31, p. 1854-1856, 1999.

FREISS, N.R.; DAHER, I.K.; GONÇALVES, M.B.; MENIER, C.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Role of HLA-G in Maternal – Fetal Immune Tolerance. **Transplantation Proceedings**, v. 31, p. 724-725, 1999.

GERENCER, M.; SINGER, Z.; PFEIFER, S.; TOMASKOVIC, M.; HUMAR, I.; MUSULIC, V.; KUVACIC, I.; ZEPIC, L.; KASTELAN, A. HLA and red blood group antigens in pregnancy disorders. **Tissue Antigens**, v. 32, p. 130-138, 1988.

GILL, T.J.III. Reproductive immunology and immunogenetics. **The Physiology of Reproduction**. 2<sup>a</sup>ed. Eds: KNOBILE, E.; NEILL, J.D. New York: Raven Press Ltda., 1994.

GILL, T.J.III. Mechanisms of action of major-histocompatibility-complex-linked genes affecting reproduction. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 41, p. 23-33, 1999.

GILL, T.J.III; HO, N.H.; HSIEH, Y.C.; YANG, S.Y.; LEE, Y.T. The prevalence of recurrent spontaneous abortions, cancer, and congenital anomalies in the families of couples with recurrent spontaneous abortion or gestacional trophoblastic tumors. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, v. 165, p. 461-466, 1991.

HO, H.N.; GILL, T.J.III; HSIEH, C.Y.; YANG, Y.S.; LEE, T.Y. The prevalence of recurrent spontaneous abortions, cancer, and congenital anomalies in the families of couples with recurrent spontaneous abortions or gestacional trophoblastic tumors. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 165, p. 461-466, 1991a.

HO, H.N.; GILL III, T.J.; HSIEH, H.J.; JIANG, J.J.; LEE, T.Y.; HSIEH, C.Y. Immunotherapy for Recurrent Spontaneous Abortions in a Chinese Population. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 25, p. 10-15, 1991b.

JIN, K.; HO, H.N.; SPEED, T.P.; GILL, T.J.III. Reproductive failure and the major histocompatibility complex. **American Journal of Human Genetics**, v. 56, p. 1456-1467, 1995.

KARL, A.; METZNER, G.; SEEWALD, H.J.; KARL, M.; BORN, U.; TILCH, G. HLA compatibility and susceptibility to habitual abortion. Results of histocompatibility testing of couples with frequent miscarriages. **Allerg. Immunol.**, v. 35, p. 133-140, 1989.

KARRISON, T.G. & OBER, C. Recurrent miscarriage (REMIS) study: how should data from women who do not become pregnant be handled? **Control Clinical Trial**, v. 19, p. 430-439, 1998.

KILPATRICK, D.C. & LISTON, W.A. Influence of histocompatibility antigens in recurrent spontaneous abortion and its relevance to leukocyte immunotherapy. **Human Reproduction**, v. 8, p. 1645-1649, 1993.

KOYAMA, M.; KIKUCHI, T.; NISHIKIORI, N.; TAKEMURA, M.; SAJI, F.; HASHIMOTO, M.; FUKUNISHI, T.; TANIZAWA, O. Prognostic evaluation of mixed lymphocyte reaction (MLR) – blocking antibodies and antilymphocyte antibodies in women with recurrent spontaneous abortions immunized with their partner's leucocytes. **Disease and reproduction studies**, p. 562-564, 1990.

LEWIS, J.E.; COULAM, C.B.; MOORE, B. Immunologic Mechanisms in the Maternal – Fetal Relationship. **Mayo Clin. Proc.**, v. 61, p. 655-665, 1986.

- MALINOWSKI, A.; PROCHOWSKA, A.; BANASIK, M.; WILCZYNSKI, J.; SZPAKOWSKI, M.; ZEMAN, K.; OSZUKOWSKI, P.; LERCH, E. Clinical and immunological condition of newborns of mothers treated for recurrent spontaneous abortions with paternal lymphocytes immunization. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 73, p. 55-61, 1997.
- MATHUR, S.; NEFF, M.R.; WILLIAMSON, H.O.; GENCO, P.V.; RUST, P.F.; GLASSMAN, A.B. Sperm Antibodies and Human Leukocyte Antigens in Couples with Early Spontaneous Abortion. **Int. J. Fertil.**, v. 32, p. 59-65, 1992.
- McINTYRE, J.A.; McCONNACHIE, P.R.; TAYLOR, C.G.; FAULK, W.P. Clinical, immunologic, and genetic definitions of primary and secondary recurrent spontaneous abortions. **Fertility and Sterility**, v. 42, p. 849-855, 1984.
- McINTYRE, J.A. & FAULK, W.P. Laboratory and Clinical Aspects of Research in Chronic Spontaneous Abortion. **Diagnostic Immunology**, v. 3, p. 163-170, 1985.
- McINTYRE, J.A.; COULAM, C.B.; FAULK, W.P. Recurrent Spontaneous Abortion. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 21, p. 100-104, 1989.
- McINTYRE, J.A.; TAYLOR, C.G.; TORRY, D.S.; WAGENKNECHT, D.R.; WILSON, J.; FAULK, W.P. Heparin and Pregnancy in Women with a History of Repeated Miscarriages. **Haemostasis**, v. 23, p. 202-211, 1993.
- MOHAPELOA, H.; CHRISTIANSEN, O.B.; GRUNNET, N. HLA-DR typing of women with recurrent late spontaneous abortion and unsuccessful cervical cerclage. **Human Reproduction**, v. 13, p. 1079-1082, 1998.

- MOWBRAY, J.F.; GIBBINGS, C.R.; SIDGWICK, A.S.; RUSZKIEWICZ, M.; BEARD, R. Effects of transfusion in women with recurrent spontaneous abortion. **Transplantation Proceedings**, v. 15, p. 896-899, 1983.
- OBER, C. HLA and Pregnancy: The Paradox of the Fetal Allograft. **American Journal of Human Genetics**, v. 62, p. 1-5, 1998.
- OBER, C. & VEM, van der. Immunogenetics of Reproduction: An Overview. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 222, p. 1-23, 1997.
- OBER, C.; HYSLOP, T.; ELIAS, S.; WEITKAMP, L.R.; HAUCK, W.W. Human leukocyte antigen matching and fetal loss: results of a 10 year prospective study. **Human Reproduction**, v. 13, p. 33-38, 1998.
- OBER, C.; KARRISON, T.; ODEM, R.R.; BARNES, R.B.; BRANCH, D.W.; STEPHENSON, M.D.; BARON, B.; WALKER, M.A.; SCOTT, J.R.; SCHREIBER, J.R. Mononuclear-cell immunisation in prevention of recurrent miscarriages: a randomised trial. **The Lancet**, v. 354(9176), p. 365-369, 1999.
- PFEIFFER, K.A.; REBMANN, V.; PÄSSLER, M.; VEN, K. van der; VEN, H. van der; KREBSA, D.; GROSSE-WILDE, H. Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization. **Human Immunology**, v. 61, p. 559-564, 2000.
- PFEIFFER, K.A.; SILLEM, M.; DANIEL, V.; KIRSCHFINK, M.; SÜSAL, C.; RUNNEBAUM, B.; GERHARD, I. Activated autologous blood therapy in recurrent spontaneous abortion – results of a pilot study. **Human Reproduction**, v. 13, p. 491-497, 1998.

- RISK, J.M.; JOHNSON, P.M. Genetic Studies of the MHC Region in Human Recurrent Spontaneous Abortion. In: WEGMANN, T.G.; GILL, T.J.III; NISBET-BROWN, E. **Molecular and Cellular Immunobiology of the Maternal Fetal Interface**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 39-57.
- SASAKI, T.; YAMADA, H.; KATO, E.H.; SUDO, S.; KISHIDA, T.; SASAKI, T.; NISHIGAKI, F.; FUJIMOTO, S. Increased frequency of HLA-DR4 allele in women with unexplained recurrent spontaneous abortion, detected by the method of PCR-SSP. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 32:3, p. 273-279, 1997.
- SBRACIA, M.; MASTRONE, M.; SCARPELLINI, F.; GRASSO, J.A. Influence of histocompatibility antigens in recurrent spontaneous abortion couples and on their reproductive performances. **American Journal Reproductive Immunology**, v. 35, p. 85, 1996.
- SCHACTER, B.; WEITKAMP, L.R.; JOHNSON, W.E. Parental HLA compatibility, fetal wastage and neural tube defects: evidence for a T/t – like locus in humans. **American Journal of Human Genetic**, v. 36, p. 1082-1091, 1984.
- SILVA, B.; YAMAMOTO-FURUSHO, J.K.; GREYER, P.; VARGAS-ALARCÓN, G.; KOFMAN, S.; GRANADOS, J. Estudio inmunogenético em parejas mexicanas com abortos espontáneos recurrentes. **Rev. Invest. Clin.**, v. 49, p. 183-187, 1997.
- SINGAL, D.P.; LUDWIN, D.; BLAJCHMON, M.A. Blood transfusion and renal transplantation. **British Journal Haematology**, v. 61, p. 595-602, 1985.

- SMITH, J.B.; COWCHOCK, F.S.; HANKINSON, B.; IFTEKHAR, A. Association of HLA-DR5 with recurrent spontaneous abortion in women treated with paternal leukocytes. **Arthritis Rheumathoid**, v. 32, p. 1572-1576, 1989.
- TANAKA, T.; UMESAKI, N.; NISHIO, J.; MAEDA, K.; KAWAMURA, T.; ARAKI, N.; OGITA, S. Neonatal thrombocytopenia induced by maternal anti-HLA antibodies a potencial side effect of allogenic leukocyte immunization for unexplained recurrent aborters. **J. Reprod. Immunol.**, v. 46, p. 51-57, 2000.
- TAYLOR, C. & FAULK, W.P. Prevention of Recurrent Abortion with Leucocyte Transfusions. **The Lancet**, July, p. 68-69, 1981.
- TAYLOR, C.G.; FAULK, W.P.; McINTYRE, J.A. Prevention of recurrent spontaneous abortions by leukocyte transfusions. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 78, p. 623-627, 1985.
- TERASAKI, P.I. First international symposium on the role of blood transfusion and transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 14, p. 247-433, 1982.
- THOMAS, M.L.; HARGER, J.H.; WAGNER, D.K.; RABIN, B.S.; GILL, T.J.III. HLA sharing and spontaneous abortion in humans. **American Journal Obstet. Gynecol.**, v. 151, p. 1053-1058, 1985.
- UNANDER, A.M. & LINDHOLM, A. Transfusions of leukocyte - rich erythrocyte concentrates: A successful treatment in selected cases of habitual abortion. **Am. J. Abstet Gynecol.**, v. 154, p. 516-520, 1986.
- VEERHOEK, M.; NELEN, W.L.D.M.; EMMER, P.M.; STEEGERS, E.A.P.; JOOSTEN, I. Increased natural killer cell ativity due to HLA-G in RSA? **Immunology Letters**, v. 56, p. 388, 1997.



WEETMAN, A.P. The immunology of pregnancy. **Thyroid**, v. 9, p. 643-646, 1999.