

Artigo / Article

## Avaliação das subclasses IgG1 e IgG3 na doença hemolítica perinatal Assessment of IgG1 and IgG3 subclasses in perinatal hemolytic disease

Maria A. Araújo<sup>1</sup>Elenice Deffune<sup>2</sup>Luciana M. B. Carlos<sup>3</sup>Sílvia M. M. Magalhães<sup>4</sup>Márjorie A. Golim<sup>5</sup>Lília M. C. Câmara<sup>6</sup>

A doença hemolítica perinatal (DHPN) ainda é um problema clínico. Nenhum teste isolado prediz, com segurança, a gravidade do quadro hemolítico. O objetivo do presente estudo foi determinar as subclasses de anticorpos IgG1 e IgG3 por citometria de fluxo no soro de 42 gestantes isoimunizadas e correlacionar os dados obtidos com a gravidade da DHPN. A distribuição dos fetos ou neonatos segundo a gravidade do quadro hemolítico evidenciou 13 casos com doença leve, 16 casos com doença moderada e 13 com doença grave. As subclasses foram detectadas em 33/42 (79%) amostras. A subclasse IgG1, isoladamente, foi evidenciada em 14/33 (42,4%) casos. Na relação entre gravidade da doença e subclasses de IgG, observou-se que IgG1 isolada foi encontrada em todos os grupos, e os valores da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) foram significativamente mais altos nas formas mais graves da DHPN ( $p < 0,01$ ). Contrariamente, os valores da MIF para IgG3 se apresentaram mais homogêneos em todas as categorias ( $p = 0,11$ ). A presença de IgG3 parece, portanto, estar mais associada à hemólise leve. A associação das subclasses IgG1 e IgG3 está relacionada à situação clínica mais grave, o que se deve, possivelmente, à presença de IgG1 associada. Apesar dos altos valores para IgG1 e a associação de IgG1 com IgG3 indicarem maior gravidade da DHPN, sugere-se que outras variáveis sejam analisadas conjuntamente, uma vez que os relatos existentes na literatura, até o momento, não dão suporte para seu uso como instrumento exclusivo de avaliação de gravidade e prognóstico da doença. Rev. bras. hematol. hemoter. 2003;25(4):201-206.

**Palavras-chave:** Subclasses de IgG; doença hemolítica perinatal; isoimunização materna; IgG1, IgG3.

<sup>1</sup> Mestranda em Patologia Tropical, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará – Fortaleza-CE.

<sup>2</sup> Professora assistente da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

<sup>3</sup> Médica do Serviço de Transfusão do Hospital Geral Dr. César Cals – Fortaleza-CE.

<sup>4</sup> Professora adjunta do Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal do Ceará – Hemoce.

<sup>5</sup> Mestranda em Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp – Botucatu-SP.

<sup>6</sup> Professora adjunta do Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará.

**Correspondência para:** Maria Annecy de Araújo  
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – Hemoce  
Laboratório de Imuno-hematologia.  
Av. José Bastos, 3390  
60436-160 – Fortaleza-CE  
Tel: (85) 9998-8651 – e-mail: manneccyaraujo@bol.com.br

## Introdução

A doença hemolítica perinatal (DHPN) está associada à presença de anticorpos maternos contra antígenos eritrocitários do feto ou recém-nascido em sua circulação, causando hemólise imuno-mediada de gravidade variável. Apesar da profilaxia relacionada à sensibilização Rho (D), a doença permanece um problema clínico devido à participação de anticorpos contra outros antígenos do sistema Rh ou mesmo de outros sistemas.<sup>1</sup>

Entre os testes laboratoriais relacionados com a gravidade da doença hemolítica, constam a titulação do anticorpo por técnicas manuais de aglutinação,<sup>2</sup> a quantificação por técnicas automatizadas,<sup>3</sup> os biotestes celulares pelas técnicas da monocamada de monócitos (MMA)<sup>4,5</sup> e da citotoxicidade celular dependente de anticorpo (CCDA), as análises de subclasses da imunoglobulina G (IgG) por técnicas de aglutinação,<sup>1</sup> a citometria de fluxo<sup>7,8,9</sup> e o gel teste.<sup>9,10</sup> A IgG consiste de quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), todas capazes de atravessar a placenta a partir da ligação com receptores Fc na membrana placentária.<sup>11</sup> Diferem entre si em estrutura, propriedades biológicas, catabolismo e, em particular, na afinidade por receptores Fc gama.

As hemácias revestidas por IgG1 e IgG3 podem reagir com sítios receptores específicos nas células fagocíticas e serem destruídas por mecanismos de eritrofagocitose ou lise citotóxica.<sup>12,13</sup> O mesmo não se pode afirmar das subclasses IgG2 e IgG4, cuja capacidade de ligação aos receptores dos macrófagos é fraca ou nula.<sup>14,15,16</sup>

A determinação das subclasses pela técnica de aglutinação, apesar de simples, tem pouca reprodutibilidade e difícil padronização.<sup>1,17</sup> Técnicas mais modernas como ELISA, gel teste e citometria de fluxo têm-se mostrado mais sensíveis, apresentando resultados reprodutíveis e precisos.<sup>8,9,10,18</sup> Os dados da literatura sobre a correlação entre as subclasses de IgG e gravidade da hemólise são controversos.<sup>13,19</sup> O objetivo do presente estudo foi avaliar a subclassificação dos anticorpos IgG por citometria de fluxo no soro de gestantes isoimunizadas correlacionando os dados obtidos com a gravidade da DHPN.

## Casuística e Métodos

Amostras de soro de gestantes isoimunizadas, cujos filhos desenvolveram DHPN, foram estuda-

das no período de março de 2001 a dezembro de 2002. O material foi processado no Hemocentro de Botucatu-SP e no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (Hemoce). O sangue da mãe e do concepto (cordão umbilical) foram colhidos durante o pré-natal, nos casos de solicitação de transfusão intra-útero, ou no pós-parto imediato.

A DHPN foi diagnosticada pela positividade do teste de antiglobulina direto (TAD) pelo método de gel centrifugação (ID-cartão LISS/Coombs - DiaMed). Os critérios de gravidade da doença foram baseados em Alie-Daran et al<sup>20</sup> modificados: conceptos com doença leve não receberam qualquer tratamento; aqueles com doença moderada apresentaram Hb=9,0 mg/dl e receberam exsangüineotransfusão; os com doença grave apresentaram Hb<9,0 mg/dl e receberam pelo menos uma transfusão intra-útero ou o concepto foi a óbito.

O teste de antiglobulina indireto (TAI), pelo método de gel centrifugação (ID-cartão LISS/Coombs - DiaMed), foi realizado em cada gestante para detecção, identificação e titulação do anticorpo. Os soros destas gestantes isoimunizadas foram utilizados para sensibilização *in vitro* de hemácias de doadores voluntários de sangue do grupo "O" com antígenos eritrocitários correspondentes ao anticorpo encontrado.

O grupo controle foi composto por oito doadores de sangue voluntários (grupo "O"), provenientes do Hemocentro de Botucatu-SP, cujas hemácias foram incubadas com soro de indivíduos de grupo AB com TAI negativo.

As subclasses de IgG foram pesquisadas nas hemácias sensibilizadas *in vitro*. Para a realização dos testes, em 100 ml de uma suspensão contendo 20.000 hemácias/mm<sup>3</sup>, foram adicionados 50 ml de anticorpo marcado com fluoresceína, (sheep anti-IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>  $\gamma$ chain -fluorescein conjugate - The Binding Site Limited - Birmingham -UK) diluído 1:10 em PBS (0,1M, pH 7,2), seguido por período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz.

Para padronização da leitura no citômetro de fluxo foram utilizados anticorpos monoclonais murinos antiglicoforinas humanas - padrão positivo e anticorpos antieritrócitos caninos - padrão negativo, ambos produzidos no Hemocentro de Botucatu-SP. Utilizamos conjugados policlonais de cabra anti-IgG total murino, marcados com FITC, para detecção da ligação dos anticorpos às hemácias.

Após o período de incubação, foram adicionados 100 µl de paraformaldeído 1% diluído em solução tampão do fabricante (Becton Dickinson, San Jose – USA) e 500 µl de Isoton II (Beckman Coulter). A leitura foi feita no FACS Escalibur Becton & Dickinson (San Jose, USA) usando o software CellQuest.

Para a determinação das subclasses de IgG adotamos o valor da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) das amostras de cada paciente, descontado o valor do controle, em duplicata. Foram considerados positivos os resultados superiores aos valores obtidos para o grupo controle.

As análises estatísticas foram realizadas com os testes de Pearson, qui-quadrado e Kruskal-Wallis.

## Resultados

Amostras de soro de 42 gestantes alo-sensibilizadas que preencheram os critérios de inclusão foram analisadas.

Tendo como base os critérios de gravidade previamente citados, 13 (30,9%) conceptos apresentaram doença leve, 16 (38,2%) doença moderada e 13 (30,9%) grave (Tabela 1). Dos treze com doença grave, nove receberam exsangüineotransfusão e transfusão intra-útero, um recebeu apenas transfusão intra-útero e três foram a óbito (dois abortos e um natimorto).

**Tabela 1**  
Distribuição do número de conceptos com doença hemolítica perinatal segundo a gravidade

Gravidade	Nº de conceptos	%
Leve	13	30,9
Moderada	16	38,2
Grave	13	30,9
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>100,0</b>

O TAD no sangue do cordão foi avaliado em 38/42 amostras. Não realizamos TAD em três casos de aborto e morte intra-útero e em um caso grave no qual a gestante não retornou ao hospital para acompanhamento pré-natal.

As especificidades dos anticorpos encontrados nas gestantes foram: 39 anti-D, dois anti-CDE e um anti-Di<sup>a</sup>. Os valores dos títulos dos anticorpos variaram de 4 a 2.048.

A mediana da intensidade de fluorescência (MIF) encontrada na população controle foi 13,8 para IgG1 e 8,67 para IgG3. As subclasses foram detectadas em 33 gestantes (Tabela 2). Na relação entre gravidade da DHPN e subclasses de IgG, foi observada IgG1 isolada em todos os grupos. Entretanto, observou-se uma correlação estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) entre os valores da MIF para IgG1 e gravidade, ou seja, os valores foram significativamente mais altos nos casos mais graves. Contrariamente, os valores de IgG3 se apresentaram mais homogêneos em todos os estados da doença ( $p = 0,11$ ) (Tabela 3).

Os testes Kruskal-Wallis e qui-quadrado mostraram que os valores de IgG1 diferiram nos três níveis de gravidade da doença ( $p < 0,01$ ). Entretanto, o mesmo não foi observado para a subclasse IgG3 [Kruskal-Wallis ( $p > 0,11$ ) e qui-quadrado ( $p > 0,63$ )] (Tabela 3).

Quando se correlacionou a gravidade da DHPN com a presença de apenas uma subclasse ou sua associação, observou-se que a frequência de IgG1 isolada foi maior nos grupos com doença moderada e grave. A presença de IgG3 foi mais frequente no grupo de doença leve e a associação das duas subclasses se correlacionou com a maior gravidade da DHPN (tabela 4).

## Discussão

O transporte de IgG pela barreira placentária pode resultar em títulos de anticorpos mais elevados no feto com relação àqueles da mãe, o que nem sempre se associa a hemólise perinatal. A influência dos diferentes isótipos IgG maternos na produção da hemólise fetal ou neonatal tem sido amplamente discutida.<sup>1,10, 11,13,17</sup> Taslimi et al e Lubenko et al destacaram a IgG1 como o subtipo produzido em maior quantidade e transportado com maior eficiência e rapidez.<sup>1,21</sup> A IgG1 atravessa a placenta por volta da 17<sup>a</sup> semana, enquanto a IgG3 o faz dois meses depois.<sup>21,22</sup>

No presente estudo, as subclasses IgG1 e IgG3 foram detectadas em 33/42 (78,6%) amostras. Esses resultados estão de acordo com os relatados por Dacie, Garraty e Nance.<sup>7,23</sup> A frequência de distribuição das subclasses nos três grupos preestabelecidos foi semelhante à de Garraty e Nance, que encontraram 39% de IgG1, 28% de IgG3 e 33% de IgG1+ IgG3 e à de Alie-Daran et al, que detectaram 43% de IgG1, 27% de IgG3 e 30% de IgG1+IgG3.<sup>7,20</sup>

**Tabela 2:**  
Distribuição dos níveis das subclasses IgG1 e IgG3 maternas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal

Gravidade da doença								
Leve			Moderada			Grave		
MIF		Isótipo > controle	MIF		Isótipo > controle	MIF		Isótipo > controle
IgG1	IgG3		IgG1	IgG3		IgG1	IgG3	
10,75	8,58	-	10,75	8,82	IgG3	69,78	8,66	IgG1
10,65	8,9	IgG3	11,55	9,73	IgG3	345,99	8,58	IgG1
10,65	9,65	IgG3	13,7	8,58	-	13,82	9,39	IgG1+3
10,18	8,66	-	14,07	8,58	IgG1	13,82	8,66	IgG1
10,65	8,22	IgG3	14,86	8,58	IgG1	114,44	nd	IgG1
10,18	9,73	IgG3	12,63	8,66	-	196,32	8,66	IgG1
10,84	9,65	IgG3	14,46	8,66	IgG1	69,16	26,9	IgG1+3
10,46	7,84	-	15,4	8,9	IgG1+3	97,34	37,18	IgG1+3
10,18	7,91	-	14,2	8,74	IgG1+3	330,77	28,64	IgG1+3
10,55	7,91	-	104,6	nd	IgG1	85,82	36,52	IgG1+3
10,76	8,82	IgG3	18,43	8,66	IgG1	57,25	9,14	IgG1+3
21,87	8,35	IgG3	14,2	8,43	IgG1	11,04	12,98	IgG3
13,46	8,51	-	37,86	58,29	IgG1+3	12,41	8,35	-
			14,46	8,51	IgG1			
			17,78	10,09	IgG1+3			
			13,82	8,2	IgG1			

**Tabela 3**  
Medidas estatísticas dos valores das subclasses IgG1 e IgG3 maternas segundo a gravidade da doença hemolítica perinatal

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

Vários autores buscaram analisar a contribuição da subclasse IgG1 na fisiopatologia da DHPN. Thomas et al mostraram que IgG1 era responsável por mais de 50% dos casos que necessitavam de fototerapia ou transfusão.<sup>24</sup> Lubenko et al determinaram as concentrações de IgG nos soros maternos e fetais com e sem risco de DHPN e observaram níveis maiores de IgG1 nos casos com maior probabilidade de DHPN.<sup>21</sup>

Meulen et al demonstraram, em pacientes com TAD positivo por auto-anticorpos IgG1, uma diferença no número de moléculas IgG nas hemácias de pacientes com e sem hemólise,<sup>25</sup> sugerindo exis-

tir um nível crítico de sensibilização acima do qual a destruição eritrocitária *in vivo* torna-se aparente. Os dados aqui apresentados mostraram que gestantes alo-sensibilizadas produzem mais anticorpos de subclasse IgG1. Observou-se uma correlação estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) entre os valores MIF para IgG1 e gravidade da hemólise.

Com relação à frequência de IgG3, os resultados do presente estudo se assemelham àqueles relatados na literatura.<sup>1,7,9,11,20</sup> Entretanto, Lynen et al, Pollock e Bowman, Zupanska et al,<sup>5,8,22</sup> na análise de respectivamente 13, 98 e 39 gestantes, mostraram frequências de IgG3 inferiores. Os valores da MIF para IgG3 observados foram em geral baixos, o que está de acordo com os relatos de Iyer et al<sup>11</sup> e Garner et al<sup>19</sup> e sugere que a IgG3 não parece essencial para o desenvolvimento da hemólise grave quando IgG1 materna se apresenta relativamente elevada.<sup>19</sup>

Um sinergismo entre IgG1 e IgG3 parece contribuir para o agravamento da doença,<sup>7,9,11,22</sup> embora presume-se que haja um efeito protetor de IgG3 neutralizando as ações de IgG1.<sup>17</sup> Garner et al demonstraram, através de testes celulares *in vitro*, que o número de predições corretas foi maior quando as amostras de soro materno apresentaram anticorpos anti-D das subclasses IgG1 e IgG3.<sup>19</sup> Pollock e Bowman observaram a ocorrência de fetos hidrópicos na 20ª semana de gestação quando o anticorpo materno envolveu uma associação das subclasses IgG1 e IgG3, fato não observado antes da 27ª semana, quando apenas a IgG1 esteve envolvida.<sup>22</sup> Estes estudos corroboram o possível

**Tabela 4**  
**Freqüência do número de conceitos segundo as subclasses IgG1 e IgG3 maternas e gravidade da doença hemolítica perinatal**

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

sinergismo entre as subclasses na destruição eritrocitária. Apesar do alto percentual (50%) de casos graves envolvendo as duas subclasses no presente estudo, a IgG1 foi a subclasse predominante, o que, de acordo com Pollock e Bowman, Alie-Daran et al, explicaria a freqüência mais alta da doença grave.<sup>20,22</sup>

A capacidade de anticorpos anti-D IgG3 se ligarem aos receptores Fc dos monócitos é maior do que IgG1.<sup>5,13</sup> Nos pacientes com TAD positivo por auto-anticorpos IgG1, entretanto, a subclasse IgG1 ultrapassa a barreira placentária mais precocemente e com mais eficiência, fazendo com que ocorra seu acúmulo e, na DHPN, desempenhe papel mais importante na gravidade da doença.<sup>21</sup> No presente estudo, dentre os nove casos em que somente a IgG3 foi demonstrada, um deles resultou em aborto, por isso foi considerado grave. Vale ressaltar que, apesar da isoimunização materna, não existem dados que comprovem ter sido o aborto produzido por doença hemolítica.

### Conclusão

Os resultados aqui apresentados sugerem que a hemólise é mais freqüente ou grave quando altos títulos de anticorpos IgG1 estão presentes no soro materno e que a associação de anticorpos IgG3 e IgG1 também implica uma situação clínica grave. Os achados se assemelham aos estudos em que se utilizaram a mesma metodologia e reagentes. No entanto, outras variáveis devem ser analisadas, pois os relatos existentes na literatura, até o momento, não dão suporte para seu uso como instrumento exclusivo para avaliar gravidade e prognóstico da doença.

### Abstract

The hemolytic disease of the newborn (HDN) continues to be a clinical problem in spite of prophylaxis. To date, none of the available tests, developed to predict the severity of HDN, has provided complete reliability. The objective of the present study was to determine the IgG1 and IgG3 subclasses in 42 isoimmunized pregnant women, and to correlate them with clinical severity of hemolytic disease. The IgG subclasses were determined employing flow cytometry. According to the clinical severity of HDN, fetuses and newborn babies were classified as 13 mild, 16 moderate and 13 severe cases. The IgG subclasses were detected in 33 of the 42 pregnant women. Of these, IgG1 was predominant in 72.7% of the cases; either isolated (42.4%) or in association with IgG3 (30.3%). IgG1 was present in all the three clinical severity categories, however, its values were significantly higher in cases with greater clinical severity of HDN ( $p < 0.01$ ). On the other hand, the distribution of IgG3 values within each group was not statistically significant ( $p = 0.11$ ). IgG3 seems to be more associated with the mild hemolytic form of the disease, whereas the association of IgG1 and IgG3 suggested a clinically more severe form of HDN. It is possible, however, that the severity in these cases is related to the presence of IgG1. These results suggest that IgG1 and IgG3 isotypes should be included in multi-parametric protocols for the evaluation of clinical severity of HDN, as International literature does not give support to the use of IgG subclass determination alone as a reliable indicator to predict severity or prognosis of the disease. Rev. bras. hematol. hemoter. 2003;25(4):201-206.

**Key words:** IgG subclasses; hemolytic disease of newborn; maternal isoimmunization; IgG1; IgG3.

### Referências Bibliográficas

1. Taslimi MM, Sibai BM, Mason JM, Dacus JV. Immunoglobulin G subclasses in isoimmunized pregnancy outcome. Am J Obstet Gynecol 1986;154: 1.326-1.332.
2. Gall SA, Miller JM. Rh Isoimmunization: a 24 year experience at Duke University Medical Center. Am J Obstet Gynecol 1981;140:902-909.
3. Bowell P, Wainscoat JS, Peto TEA, Gunson HH. Maternal anti-D concentrations and outcome in Rhesus haemolytic disease of the newborn. British Medical Journal 1982;285:327-329.
4. Wiener E, Jolliffe VM, Scott HC, Kumpel BM, Thompson KM, Melamed MD, Hughes-Jones NC. Differences between the activities of human monoclonal IgG1 and

- IgG3 anti-D antibodies of the Rh blood group system in their abilities to mediate effector functions of monocytes. *Immunology* 1988;65:159-163.
5. Zupanska B, Brojer E, McIntosh J, Seyfried, H, Howell, P. Correlation of monocyte-monolayer assay results, number of erythrocyte-bound IgG molecules, and IgG subclass composition in the study of red cell alloantibodies other than D. *Vox Sanguinis* 1990;58:276-280.
  6. Garner SF, Wiener E, Contreras M, Nicolini U, Kochenour N, Letsky E, Rodeck CH. Mononuclear phagocyte assays, autoanalyzer quantitation and IgG subclasses of maternal anti-RhD in the prediction of the severity of haemolytic disease in the fetus before 32 weeks gestation. *British J Haematol* 1992;80:97-101.
  7. Garraty G, Nance SJ. Correlation between in vivo hemolysis and the amount of red cell-bound IgG measured by flow cytometry. *Transfusion* 1990; 30:617-621.
  8. Lynen R, Neuhaus R, Schwarz DWM, Simson G, Riggert J, Mayr WR, Köhler M. Flow cytometric analyses of the subclasses of red cell IgG antibodies. *Vox Sanguinis* 1995;69:126-130.
  9. Lynen R, Krone O, Legler TJ, Köhler M, Mayr WR. A newly developed gel centrifugation test for quantification of RBC-bound IgG antibodies and their subclasses IgG1 and IgG3: comparison with flow cytometry. *Immunohematology* 2002;42:612-618.
  10. Palfi M, Hildén J-O. Application of the gel test in IgG subclassing – A comparison of two agglutination assays. *Vox Sanguinis* 1997;72:114-117.
  11. Iyer YS, Kulkarni SV, Gupte SC. Distribution of IgG subtypes in maternal anti-D sera and their prognostic value in Rh haemolytic disease of the new-born. *Acta Haematol* 1992;88:78-81.
  12. Dubarry M, Charron C, Habibi B, Bretagne Y, Lambi P. Quantification of immunoglobulin classes and subclasses of autoantibodies bound to red cells in patients with and without hemolysis. *Transfusion* 1993; 33:466-471.
  13. Wiener E, Atwal A, Thompson KM, Melamed MD, Gorick B, Hughes-Jones NC. Differences between the activities of human monoclonal IgG1 and IgG3 subclasses of anti-D (Rh) antibody in their ability to mediate red cell-binding to macrophages. *Immunology* 1987;62:401-404.
  14. von den Borne AEG, Beckers D, van der Meulen FW, Engelfriet CP. IgG<sub>4</sub> autoantibodies against erythrocytes, without increased haemolysis: a case report. *British Journal of Haematol* 1977;37:137-144.
  15. Ukita M, Takahashi A, Nunotani T, Kihana T, Watanabe S, Yamada N. IgG subclasses of anti-A and anti-B antibodies bound to the cord red cells in ABO incompatible pregnancies. *Vox Sanguinis* 1989;56:181-186.
  16. Merry AH, Brojer E, Zupanska B, Hadley AG, Kumpel BM, Hughes-Jones NC. Quantification of IgG on erythrocytes: correlation of number of IgG molecules per cell with the strength of the direct and indirect antiglobulin tests. *Vox Sanguinis* 1984;47:73-81.
  17. Parinaud J, Blanc M, Grandjean H, Fournier A, Bierme S, Pontonnier G. IgG subclasses and Gm allotypes of anti-D antibodies during pregnancy: Correlation with the gravity of the fetal disease. *Am J Obstet Gynecol* 1985;151:1.111-1.115.
  18. Kemeny DM, Urbanek R, Richards D, Greenall C. Development of a semi-quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human IgG subclasses antibodies. *Journal of immunological methods* 1987; 96:47-56.
  19. Garner SF, Gorick BD, Lai WYY, Brown D, Taverner J, Hughes-Jones NC, Contreras M, Lubenko A. Prediction of the severity of haemolytic disease of the newborn. *Vox Sang* 1995;68:169-76.
  20. Alie-Daran SJ, Dugoujon J-M; Fournie A. Gm typing, IgG subclasses of anti-Rh(D) and severity of hemolytic disease of the newborn. *Vox Sanguinis* 1992;62:127-128.
  21. Lubenko A, Contreras M, Rodeck CH, Nicolini U, Savage J, Chana H. Transplacental IgG subclass concentrations in pregnancies at risk of Haemolytic Disease of the Newborn. *Vox Sanguinis* 1994;67:291-298.
  22. Pollock JM, Bowman JM. Anti-Rh(D) IgG subclasses and severity of Rh Hemolytic Disease of the Newborn. *Vox Sanguinis* 1990;59:176-179.
  23. Dacie JV. Autoimmune Hemolytic Anemia. *Arch Intern Med* 1975;135:1.293-1.300.
  24. Thomas N, Kickler T, Shirey RS, Ness PM, Lankiewicz M. A quantitative assay for subclassing IgG antibodies implicated in Hemolytic Disease of the Newborn (HDN). *Transfusion* 1993;33:24.
  25. van der Meulen FW, Bruin HG, Goosen PCM, Bruynes ECE, Joustra-Maas CJ, Telkamp HG, von dem Borne, AEGKr Engelfriet CP. Quantitative aspects of the destruction of red cells sensitized with IgG1 autoantibodies: An application of flow cytofluorometry. *British Journal of Haematology* 1980;46:47-56.

**Avaliação:**

Editor e dois revisores externos

**Conflito de interesse:** não declarado**Recebido:** 11/07/2003**Aceito após modificações:** 15/08/2003