



AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA DETERMINAÇÃO DO GRUPO FETAL RHD NA PROFILAXIA DA ALOIMUNIZAÇÃO NA GRAVIDEZ

**Monografia realizada no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências
Farmacêuticas**

Aluna:

Maria Eduarda Ribeiro Fernandes Valente

Estudante nº micf08016 Inscrito à UC Monografia no ano lectivo 2008/2009

Orientadora:

Prof. Doutora Alice Santos Silva

Porto, Junho 2009

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Alice Santos Silva por toda a orientação científica, empenho, disponibilidade, conselhos preciosos demonstrados desde o início deste projecto e que se tornaram factores imprescindíveis para a realização do mesmo.

Ao Centro Hospitalar do Porto, E.P.E. na pessoa do Dr. Manuel Campos, director do serviço de Hematologia Clínica e Imunohemoterapia, pelo interesse, incentivo e tempo dispensado na elaboração desta monografia. Ao serviço de Imunohemoterapia da Maternidade de Júlio Dinis, pela oportunidade de poder utilizar neste trabalho todos os ensinamentos que adquiri ao longo dos anos na área materno-fetal.

À Dr.^a Maria de Lourdes Lima e à Dr.^a Ana Cristina Cunha pela ajuda na escolha do tema, pela motivação e apoio durante o processo de preparação deste trabalho, pela correcção, pelas críticas sempre fundamentadas e oportunas e por fazerem o favor de serem minhas amigas.

Ao meu filho André, por ser o cérebro da materialização da minha ideia, pela sua sabedoria e sólidos conhecimentos de economia e informática; sem ele este trabalho não teria sido possível. É e será sempre o meu “génio”.

Ao meu filho Francisco, futuro médico, pela ajuda na escolha e selecção da bibliografia, pelo carinho e interesse que sempre demonstrou durante todos os passos do desenvolvimento deste trabalho. É e será sempre o meu “anjo”.

A toda a minha família, amigos e colegas de trabalho pelo prazer de os ter por perto e por estarem sempre presentes, mesmo quando ausentes.

Pelo amor, paciência e apoio, dedico todo este esforço ao meu marido Alfredo com um carinho especial por ser o meu melhor amigo.

Obrigada a todos.

RESUMO

Nos últimos 40 anos, os avanços no controlo da aloimunização permitiram que a doença hemolítica perinatal passasse a ser de prognóstico controlável e com fisiopatologia clara, tendo a profilaxia com imunoglobulina anti-D levado a que a doença se tornasse rara. No entanto, após a constatação do aparecimento de novos casos, decidiu-se pela implementação da administração de imunoglobulina anti-D às mulheres RhD negativas às 28 semanas de gestação.

A partir de uma amostra de plasma materno, utilizando a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), é possível determinar o grupo RhD fetal numa fase precoce da gravidez. A genotipagem fetal é particularmente útil em grávidas RhD negativas não sensibilizadas, em que é determinada a negatividade do feto ao antígeno D, uma vez que evita a imunoprofilaxia por recurso a um derivado do plasma humano – um bem escasso, finito, dispendioso e não isento de riscos.

A implementação da determinação do grupo RhD fetal antes da imunoprofilaxia na gravidez implica um investimento a nível económico que é importante quantificar e avaliar em todas as vertentes. Embora a imunoprofilaxia a todas as mulheres RhD negativo seja actualmente a estratégia mais rentável, depreende-se que uma das principais vantagens da genotipagem fetal consiste na sua capacidade de aliar um custo efectivo expectavelmente decrescente com uma redução de riscos desnecessários para a saúde pública.

Palavras-chave: Aloimunização RhD; Imunoprofilaxia; Genotipagem fetal; Plasma materno; Impacto económico

ABSTRACT

In the last 40 years, progress in alloimmunization control was so great that haemolytic disease of the newborn (perinatal) has become a disease with a controllable prognostic and a clear physiopathology, having the prophylaxis with anti D immunoglobulin made it also a rare disease. However, after new cases of haemolytic disease of the newborn appeared, it was decided that anti-D immunoglobulin would be given to RhD negative women at 28 weeks of gestation. By using a maternal plasma sample, it is possible to apply a Polymerase Chain Reaction technique (PCR) to determine the fetal RhD blood group at an early stage of the pregnancy. Fetal genotyping is particularly useful with unsensitized RhD negative pregnant women; fetal negativity to the D antigen is determined, thus avoiding immunoprophylaxis with a human plasma derivative – a scarce, limited, expensive and not entirely risk free product.

The determination of the RhD fetal group before immunoprophylaxis in pregnancy requires an economical investment which is important to quantify and evaluate in all its aspects. Although immunoprophylaxis to all RhD negative women is currently the most profitable strategy, it is understood that one of the main advantages of fetal genotyping is the capacity to ally a foreseeable decreasing cost with a reduction of unnecessary public health risk exposure.

Keywords: Alloimmunization RhD; Haemolytic Disease of the Newborn; Immunoprophylaxis; Fetal Genotyping; Maternal plasma; Economical impact.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ac – Anticorpo

Ag – Antígeno

AGH – Antiglobulina Humana

BVC – Biópsia das Vilosidades Coriônicas

DHP – Doença Hemolítica Perinatal

DO – Densidade Óptica

DP – Desvio Padrão

EV – Endovenosa

GV – Glóbulos Vermelhos

Hb A – Hb adulto

Hb F – Hb fetal

HFM – Hemorragia Feto Materna

Ig – Imunoglobulina

IgG – Imunoglobulina G

IGIF – Instituto de Gestão Informática e Financeira da Saúde

IM – Intramuscular

LA – Líquido Amniótico

PAD – Prova de Antiglobulina Directa

PAI – Prova de Antiglobulina Indirecta

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PHD – *Perinatal Haemolytic Disease*

Rh – *Rhesus*

RhD – *Rhesus D*

RT-PCR – *Polymerase Chain Reaction* em tempo real

ÍNDICE GERAL

1 - Introdução	1
2 - Aloimunização RHD	4
2.1 - Retrospectiva Histórica	5
2.2 – Etiologia	7
2.3 - Sistema RH	8
2.4 - Resposta Imune	13
2.5 - Imunização Materna	16
2.5.1 - Resposta Imune Primária	19
2.5.2 - Resposta Imune Secundária	20
2.6 - Avaliação Pré – Natal da Aloimunização	21
2.6.1. - Métodos não Invasivos	21
2.6.2 - Métodos Invasivos	31
2.7 - Doença Hemolítica Perinatal (DHP)	37
2.7.1 – Incidência	41
2.7.2 - Características Clínicas	42
2.8 - Profilaxia da Aloimunização	46
2.8.1 - Imunoglobulina Anti-D	46
2.8.2 - Esquema de conduta de profilaxia ao longo da gravidez	53
3 - Determinação do genótipo fetal por métodos não invasivos <i>versus</i> profilaxia da aloimunização	56
4 - Análise económica da determinação do genótipo fetal RHD por métodos não invasivos, utilizando amostras de plasma materno <i>versus</i> profilaxia da aloimunização	58
5 – Conclusão	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estimulação Imunitária, exposição a células estranhas	5
Figura 2 – Diagrama do RHD e RHCE	9
Figura 3 – Esquema do RhD, fraco e variante	11
Figura 4 – Níveis de imunoglobulinas IgG, IgM, e IgA no feto, no recém-nascido e durante o primeiro ano de vida	16
Figura 5 – Kleihauer-Betke num caso de HFM massiva	17
Figura 6 – Placenta	18
Figura 7 – Resposta Imune Primária	19
Figura 8 – Resposta Imune Secundária	20
Figura 9 – Ultrassonografia	22
Figura 10 – Reacção antigénio anticorpo	24
Figura 11 – PCR em Tempo Real: gráfico representativo de amplificação	29
Figura 12 – Algumas das Técnicas invasivas usadas no diagnóstico perinatal	31
Figura 13 – Curva de Liley	32
Figura 14 – Curva de Queenan	34
Figura 15 – Amostra de Vilosidades Coriônicas	36
Figura 16 – Transfusão Intrauterina	37
Figura 17 – Esfregaço sanguíneo na DHP, apresentando GV normais; GV com alterações morfológicas e eritroblastos	38
Figura 18 – Etiopatogenia da DHP	44
Figura 19 – Imunização passiva	47

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Expressão do Antígeno D e sua Classificação	11
Quadro 2 – Função e distribuição das diferentes classes de imunoglobulinas	15
Quadro 3 – Associação da DHP com antígenos sanguíneos Maternos	39

1 - INTRODUÇÃO

Em Portugal, tal como a nível mundial, cerca de 15% das grávidas são RhD negativas. Mesmo na ausência de interferências, cerca de 2% dessas grávidas são sensibilizadas para o RhD antes do parto e cerca de 16% vão sê-lo durante o parto se não houver profilaxia (Circular Normativa; 2007).

A doença Hemolítica Perinatal (DHP) é uma doença que afecta o feto e o recém-nascido devido à passagem transplacentária de anticorpos (Ac) específicos, de origem materna, que reagem contra antigénios (Ag) da membrana eritrocitária fetal, tendo como consequência o desenvolvimento de uma anemia hemolítica (Baia, 2006). A DHP apresenta uma taxa muito significativa de morbilidade e mortalidade fetal e neonatal (Daniels *et al.*, 2004).

Os glóbulos vermelhos (GV) recobertos por Imunoglobulina G (IgG) sofrem uma destruição acelerada, condicionando uma situação clínica de gravidade bastante variável, que oscila entre a morte intra-uterina e uma forma apenas detectável através de provas serológicas no sangue do recém-nascido aparentemente são.

A DHP provocada por Ac do sistema Rh é muitas vezes grave devido à imunogenicidade dos Ag que constituem este sistema, sendo o Anti-D o Ac de maior incidência (cerca de 95% dos casos) e o que se associa formas clínicas de maior gravidade (Baia, 2006).

A administração profilática da Imunoglobulina (Ig) anti-D desde 1968 reduziu drasticamente a incidência da aloimunização pelo Ag D e subsequentemente a incidência da DHP (Liley, 2003).

A administração da Ig anti-D a mulheres RhD negativas, até 72 horas após o parto de recém-nascidos RhD positivo, contribuiu para uma redução de 90% da mortalidade infantil nos países em que esta medida foi implementada (Wadron, 2005).

Os estudos existentes na literatura são unânimes em considerar que a administração de Ig anti-D às 28 semanas de gestação a mulheres RhD negativas é uma intervenção eficaz na prevenção da DHP, reduzindo o risco de aloimunização de 2 para 0,1% (Koenig, 2000; Crowther *et al.*, 2000).

A administração da Ig é condicionada pelo prévio consentimento livre e esclarecido por parte da grávida. Este esclarecimento deve abranger informação

relativa ao eventual risco associado à administração de hemoderivados e à possibilidade de não administração, se o pai biológico for RhD negativo (Circular Normativa, DGS; 2007).

Não é possível falar deste tema sem abordar a questão económica que em termos de Saúde Pública implica a profilaxia pré-natal sistemática às 28 semanas a todas as grávidas RhD negativas. De facto, tem sido proposto que os gastos envolvidos poderão não justificar os benefícios reais desta medida. Há estudos que mostram uma diminuição estatisticamente significativa do número de aloimunizações nas populações em que é feito este tipo de profilaxia sistemática. Estima-se ser economicamente rentável a aplicação da profilaxia pré-natal universal das mulheres RhD negativas quando comparada com o custo adicional de vigiar e tratar os casos de aloimunização que o mesmo programa previne (Vicente *et al.*, 2003).

Nos anos 90 apareceram os primeiros testes pré-natais de determinação do genótipo fetal RHD utilizando a técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do DNA a partir de células do liquido amniótico (amniócitos) ou amostra das vilosidades coriónicas (células trofoblásticas) (Rouillac *et al.*, 2007). Estes testes foram inicialmente utilizados em mulheres previamente sensibilizadas para o RhD. Em 1997, Lo *et al.* demonstraram a presença de DNA fetal livre no plasma ou soro de mulheres grávidas em quantidades suficientes para permitir a determinação do genótipo RHD fetal (Nelson *et al.*, 2001), a partir de uma amostra de plasma materno, tornando possível o diagnóstico precoce da DHP mesmo antes do nascimento (as técnicas de hemaglutinação clássicas fornecem uma informação indirecta do risco e da gravidade da DHP). É particularmente útil na genotipagem RHD do feto de uma mãe RhD negativa. Se o feto for RhD positivo, a profilaxia anti-D precoce e uma maior vigilância podem evitar DHP (Waldron, 2005). A possibilidade da sua utilização em grávidas RhD negativas não sensibilizadas, em que é determinada a negatividade do Ag RhD no feto, evitaria a administração de Ig anti-D que é um bem escasso e finito (Pereira *et al.*, 2007; Finning *et al.*, 2008; Valdês, 2008).

O risco de transmissão de infecções virais em hemoderivados é hoje em dia muito reduzido, atendendo aos cuidados na sua preparação. Alguns autores consideram este risco quase nulo. Em certeza, pode dizer-se que o risco de infecção é igual

ao da utilização de qualquer outro hemoderivado.

Apesar destas medidas, quando são administrados medicamentos preparados com plasma ou sangue humano, não se pode excluir totalmente a possibilidade de transmissão de infecções. Isto também se aplica a vírus desconhecidos ou emergentes e a outros agentes patogénicos (Scott, 2001; Infarmed, 2008).

Como é impossível avaliar o impacto económico, social e emocional das consequências da administração deste medicamento, seria desejável que todas as hipóteses alternativas ao nosso alcance pudessem ser utilizadas, no sentido de minorar a exposição das mulheres RhD negativas com fetos também RhD negativo a um medicamento hemoderivado.

Com este trabalho pretendo fazer a

“Avaliação do impacto da determinação do grupo fetal RhD na profilaxia da Aloimunização na gravidez”.

Objectivo: Discutir a implementação da determinação do genótipo fetal antes da administração da Imunoglobulina Anti-D, no sentido de se optar pela melhor metodologia do ponto de vista económico e social na profilaxia da Aloimunização.

2 - ALOIMUNIZAÇÃO RHD

A aloimunização é um fenómeno resultante da sensibilização dos eritrócitos do receptor com antígenos presentes nos eritrócitos alogénicos do dador e aos quais o sistema imunitário responde com a produção de anticorpos (Norte *et al.*, 2007). A mais frequente e de maior significado clínico é a aloimunização com o Ag Rh_o, ou D.

A presença deste antígeno D nos eritrócitos classifica estas células como “RhD positivas” a sua ausência caracteriza-as como “RhD negativas” (Liley, 2003).

Dos indivíduos caucasianos, 85% são RhD positivos, sendo 45% homocigotos - D/D (dois alelos iguais) e 55% heterocigotos - D/d (dois alelos diferentes) (Bischoff *et al.*, 1999).

Numa mãe RhD negativa, é a zigotia do pai que determina a probabilidade de uma criança ser RhD positivo ou negativo. Será RhD positivo se o pai for homocigoto para o D (D/D) e há 50% de probabilidade de ser RhD negativo se o pai for heterocigoto para o D (D/d) (Koenig, 2000).

Uma grávida, classificada no sistema Rh como RhD negativo, pode facilmente ser sensibilizada pelos eritrócitos do feto se estes possuírem o antígeno D (Roitt *et al.*, 2001).

A passagem placentária de eritrócitos fetais para a circulação materna, portadores de antígenos de superfície diferentes dos maternos, pode provocar a doença hemolítica perinatal (DHP) numa futura gravidez. Após a exposição inicial a um antígeno eritrocitário, o sistema imune materno produz anticorpos do tipo IgM, que devido ao seu elevado peso molecular não atravessam a placenta. Quando ocorre uma segunda exposição a esse antígeno, é desencadeada uma produção rápida e maciça de anticorpos do tipo IgG, de baixo peso molecular, que atravessam a barreira placentária e se ligam aos eritrócitos fetais (Fig.1).

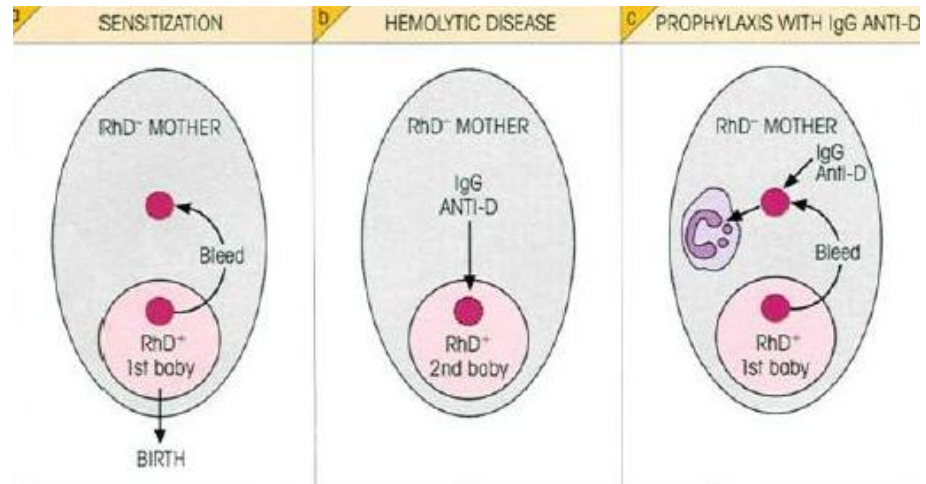


Figura 1. Estimulação imunitária, exposição a células estranhas

A aloimunização anti-D não provoca qualquer quadro clínico materno. As consequências, inteiramente fetais, devem-se à hemólise extravascular dos eritrócitos fetais (Vicente *et al.*, 2003).

A gravidade da doença pode variar entre uma ligeira anemia e a morte fetal ou neonatal por insuficiência cardíaca, associada a anemia severa e icterícia (Scott, 2001; Araújo, 2003).

Podemos encontrar a expressão de alguns grupos sanguíneos, tais como ABH, num espectro alargado de tecidos, incluindo a linhagem eritroide. A expressão do antígeno Rh é restrita aos eritrócitos, com um aumento da densidade antigénica durante o seu desenvolvimento até atingirem o estado maduro (Koenig, 2000).

2.1 - RETROSPECTIVA HISTÓRICA

Embora muitas das complicações verificadas na gravidez sejam conhecidas desde há muito tempo, a incompatibilidade materno-fetal é um assunto recente. Muito do que se conhece da doença desenvolveu-se entre os anos 30 e 70, tendo sido revelado no fim dos anos 80 a base molecular dos genótipos e fenótipos do sistema Rh e de outros sistemas sanguíneos.

Uma parteira francesa, Louyse Bourgeois, descreveu em 1609 pela primeira vez a doença hemolítica do feto e recém-nascido (HDN). Tratava-se de gémeos: o

primeiro, apresentava hidropsia fetal, morrendo nas primeiras horas de vida. O outro gêmeo, nasceu aparentemente bem, mas rapidamente apresentou icterícia intensa, acabando por morrer (Liley, 2003).

Em 1932, Diamond *et al.* referem pela primeira vez que a relação entre anemia, icterícia, hidropsia fetal e eritroblastos na circulação eram manifestações da mesma doença, mais tarde chamada “*Erythroblastosis fetalis*” (Koenig, 2000).

Em 1938, Darrow verifica que a doença era causada por Ac maternos contra Ag fetais desenvolvidos como resultado de hemorragia feto materna transplacentar.

Em 1939, Levine e Stetson, relataram uma reacção pós transfusional numa mulher que foi transfundida com sangue do marido, depois do parto de uma criança com hidropsia que nasceu morta. Levine demonstrou que a mãe tinha um Ac que aglutinava os GV do marido, concluindo que se tinha sensibilizado contra um Ag que o feto herdara do pai.

Em 1940, Landsteiner e Wiener identificaram esse Ag responsável, realizando experiências que consistiam na inoculação de coelhos com GV de macacos Rhesus. Referem que o soro proveniente destes coelhos apresentava um Ac que aglutinava (85%) os eritrócitos de indivíduos caucasianos. Tais indivíduos foram chamados de Rhesus positivo (Rh positivo).

Os eritrócitos dos restantes indivíduos (15%) não aglutinaram na presença do dito soro, sendo chamados, por isso, de Rhesus negativo (Rh negativo). Esta experiência constitui um marco na imunohematologia moderna.

Mais tarde, Levine e outros, usando o soro anti-Rh de Landsteiner e Wiener, comprovaram que as pacientes reportadas em 1939 eram Rh negativo, que tinham um Ac anti-Rh que aglutinava os eritrócitos dos seus maridos e filhos, demonstrando, assim a etiologia da doença.

No fim dos anos 60 o tratamento com Ig anti-RhD, no parto, foi considerado para administração em mães RhD negativas com filhos RhD positivos no sentido de prevenir a doença em futuras gravidezes.

O desenvolvimento da ecografia obstétrica, no fim dos anos 70, foi uma grande ajuda no controlo e identificação da aloimunização materna.

Nos anos 80, com o aparecimento da ecografia de alta resolução foi possível a colheita de sangue fetal por via percutânea na artéria umbilical, para determinação do grupo sanguíneo fetal, avaliação da anemia e acidose fetal.

Os avanços em biologia e bioquímica molecular permitiram a identificação de polipeptídeos Rh em 1982 e o gene Rh em 1991 (Liley, 2003).

A primeira aplicação da tipagem do gene Rh por PCR foi efectuada em 1993 (Araújo, 2003).

Desde 1995 *International Blood Group Reference Laboratory of the English National Blood Service* providenciou a determinação do genótipo fetal RHD nas mulheres aloimunizadas cujos fetos apresentavam alto risco de desenvolver DHP (Finning *et al.*, 2008).

Em 1997, Lo *et al.* descreveram pela primeira vez a presença de DNA fetal no plasma materno (Lo *et al.*, 1997).

Em 2001 foi disponibilizada a determinação do genótipo fetal RHD, a partir do plasma materno a todas as grávidas (Finning *et al.*, 2008).

Ainda assim, a doença não desapareceu e casos de DHP devido a anticorpos dirigidos directamente a antigénios que não os do sistema sanguíneo Rh começam a aparecer e a ser reconhecido o seu aumento (Ramasethu, 2001).

2.2 - ETIOLOGIA

Quando consideramos a especificidade dos aloanticorpos que causam aloimunização materna, podemos agrupá-los em 3 categorias

- Ac dirigidos contra o antigénio D no sistema sanguíneo Rh;
- Ac dirigidos contra os antigénios A e B;
- Ac dirigidos contra os restantes antigénios dos eritrócitos

Entre os factores que influenciam a aloimunização materna contra o antigénio RhD fetal, encontram-se:

- A quantidade de eritrócitos fetais que entram na circulação materna por hemorragia fetoplacentária determina a intensidade da aloimunização materna.

- O fenótipo Rh do sangue fetal. Os eritrócitos cDE/cde são mais imunogênicos que os Cde/cde, já que nos primeiros existe uma maior quantidade do antígeno RhD (14000-16000 vs 9900-14600).
- A incompatibilidade ABO materno fetal. Esta incompatibilidade exerce um efeito protector contra a aloimunização pelo antígeno RhD.
- O haplotipo HLA materno. Hiden *et al.*, 1995 encontraram o alelo HLA-DQB1* 0201 em 18% das mulheres com títulos de anti-D entre 16 e 256, e em 85% de mulheres com títulos de anti-D maiores que 512, o que sugere uma forte associação entre este alelo e a predisposição para formar níveis relativamente altos de anti-RhD.
- O sexo fetal. Alguns autores observaram uma maior frequência de aloimunização em gravidezes de fetos machos (Valdês, 2006).

2.3 - SISTEMA RH

Os Ag Rh estão bem desenvolvidos entre os 30 e 45 dias de gestação (Clóvis, 1992) e, dos cerca de 50 Ag Rh, o “D” é o que está envolvido num maior número de incompatibilidades Rh. É um Ag de alta-frequência e fortemente imunogénico, 50 vezes mais do que os outros Ag Rh (AABB, 1999b).

Embora os antígenos Rh estejam completamente expressos ao nascimento, com detecção possível às 8 semanas de gestação, estão apenas presentes nos eritrócitos e não são detectáveis nas plaquetas, linfócitos, monócitos, neutrófilos ou outros tecidos (Duran., 2007).

O *locus* Rh é composto por dois genes homólogos RHD, que inclui o antígeno D e RHCE, que inclui os antígenos Cc e Ee (com 94% de identidade entre proteínas), que se encontram localizados no cromossoma 1 (1p34-p36), mas com uma orientação oposta (5´RHD3´- 3´RHCE5´) (Daniels *et al.*, 2007).

Ambos são compostos por 10 exões e possuem uma organização de exões/intrões similar (Daniels *et al.*, 2009). Os seus alelos são RHCE, RHCE, RhcE e Rhce. Os dois genes são separados apenas por 30 Kb (Liley., 2003).

Por outro lado, o gene RHD encontra-se flanqueado por duas sequências altamente homólogas “caixas Rhesus” (*Rh boxes*) 5' e 3' com cerca de 9 Kb (98,6% de identidade) e que são críticas nos fenômenos de deleção do gene RHD, dando origem à maior parte dos fenótipos RhD negativos nos Caucásianos (Wagner, 2004; Daniels *et al.*, 2007). Um outro gene *SMP1*, que codifica uma pequena membrana de proteína, está localizado entre os genes Rh (Daniels *et al.*, 2007) (Fig.2).

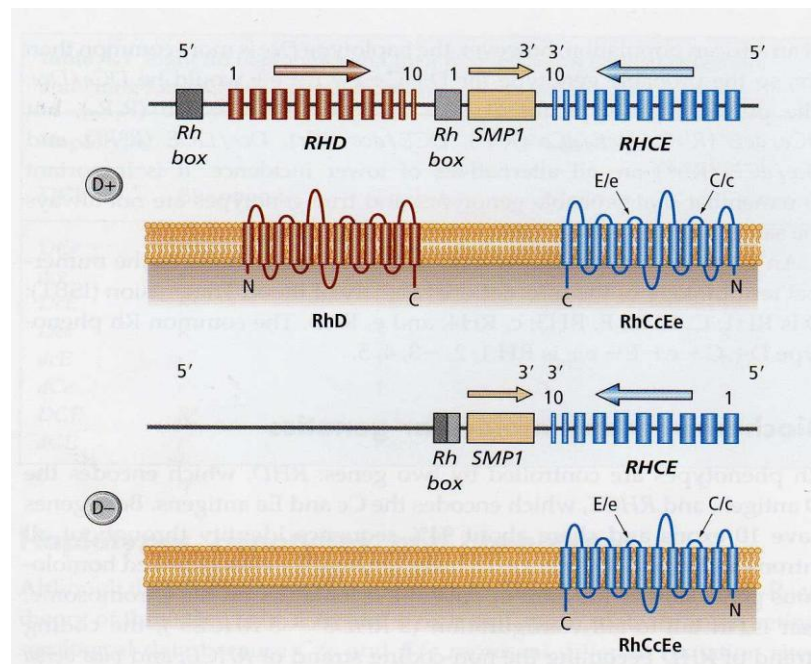


Figura 2

Diagrama representando os 10 exões dos genes RHD e RHCE em orientações opostas, as regiões *Rh boxes* (regiões de identidade), e o gene *SMP1*. Por baixo estão representadas as proteínas evidenciando o N- e C-terminal os domínios das 12 membranas e as 6 espirais extracelulares. Os polimorfismos C/c e E/e são determinados principalmente por substituições de aminoácidos no segunda e quarta (a partir N-terminal) espirais extracelulares na proteína RhCcEe.

Em cima: caracterização D+

Em baixo: caracterização D – (têm uma completa deleção de RHD)

Os antígenos Rh (D e CcEe) são transportados por proteínas não glicosiladas da membrana do GV, com 30-32 kDa.

Dentro da membrana dos eritrócitos, as proteínas Rh estão associadas a uma glicoproteína denominada glicoproteína Rh-associada (RhAG). RhAG apresenta 33% de identidade com as proteínas Rh e tem uma distribuição muito similar na membrana. É produzida pelo gene RHAG no cromossoma 6. Embora RhAG não transporte nenhum antigénio Rh, a sua presença é essencial na expressão do antigénio Rh e quando está ausente nenhum antigénio Rh é expresso.

As proteínas Rh existem na membrana eritrocitária na forma de um complexo não-covalente com outras proteínas incluindo banda 3 (AE1), glicoforinas (GPA e GPB), LW e CD47 as quais se encontram colectivamente ausentes (ou profundamente reduzidas) nos indivíduos Rh_{null}. (Araújo, 2005; Daniels *et al.*, 2007).

Foi descrito o gene RHD inactivo ou pseudo-gene (RHD ψ), que contem 37 pb na região intrão 3/exão 4 dando origem a um codão stop; gene híbrido RHD-CE-D, cde, responsável pelo fenótipo D negativo em alguns africanos (Singleton, 2000). A descoberta da estrutura e organização do gene Rh, tornou possível o desenvolvimento de ensaios de PCR para detecção do genótipo fetal. (Bennet *et al.*, 1993).

Antigénio D e Variantes

O RHD é um complexo antigénico, que contem 37 determinantes antigénicos (epítopes) (Waldron, 2005).

O elevado grau de polimorfismo da proteína RHD origina fenótipos D variantes, divididos em D fraco e D parcial, consoante a localização das mutações seja intra ou extracelular (Moser *et al.* 2008).

A expressão em termos de qualidade e quantidade do antigénio D vai determinar e classificar um antigénio D fraco ou parcial (Fig.3).

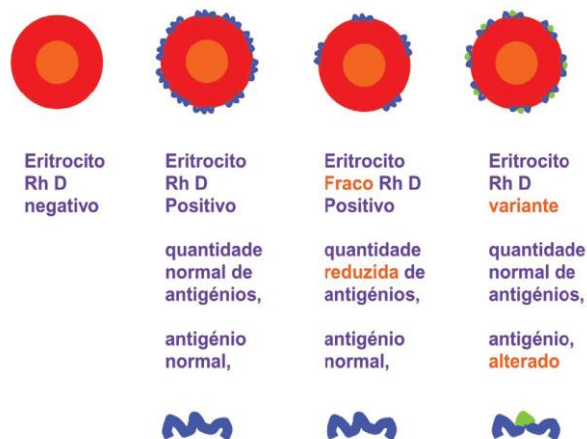


Figura 3 – Esquema do RhD, fraco e variante

Um D fraco vai ter os epítomos completos mas vai exprimir-se na superfície das células com menos frequência (Quadro 1).

Expressão D	Qualitativo	Quantitativo
D (Normal)	Todos os epítomos	Normal
D _w (fraco)	Todos os epítomos	Reduzido
D parcial	Falta 1 ou mais epítomos	~ Normal
D Parcial fraco	Falta 1 ou mais epítomos	Reduzido
D elevado	Todos epítomos	Aumentados

Quadro 1 - Expressão do Antígeno D e sua classificação

O Antígeno D parcial não possui os epítomos completos; a classificação dos D parciais é realizada em função dos epítomos que faltam no antígeno D; o D parcial pode ainda ter uma expressão reduzida (D parcial fraco).

Os indivíduos que apresentam este fenótipo podem produzir Ac anti-D contra as subunidades ausentes. A classificação dos D parciais foi obtida através de Ac monoclonais contra cada epítomo do mosaico (Ramos, 2007).

D fraco

O D fraco observa-se em aproximadamente 0,2 a 1% da população Caucasiana.

A expressão D fraca resulta principalmente de uma mutação num único ponto na estrutura RHD, que codifica mudanças nos aminoácidos previstos para serem incorporados na região intracelular ou nas regiões transmembranares do gene RHD. Estas mudanças afectam a eficiência da inserção e, portanto, a quantidade de proteína RHD na membrana, que se reflecte na diminuição da quantidade de antígeno D nos eritrócitos.

Os D fracos tipos 1, 2, e 3, compreendem 90 por cento dos indivíduos D fraco, não determinam o desenvolvimento de Ac anti-D e podem receber sangue D positivo (Connie *et al.*, 2007).

Para demonstrar a presença do Ag é necessário proceder, laboratorialmente a uma prova de antiglobulina humana (AGH) indirecta (Baia, 2006). No passado estes D fracos eram classificados como D^u, designação que já não se usa. Indivíduos que possuem formas de expressão fraca do Ag D são classificados como D positivo e devem ser descritos como RhD fraco (AABB, 1999b).

As gestantes que apresentem uma variante fraca dos Ag D não são candidatas a uma profilaxia pré ou pós-natal com Ig anti-D, desde que se exclua a hipótese de D parcial (Baia, 2006).

D parcial

Indivíduos com D parcial podem ser classificados como D positivo (uns em testes directos outros por teste antiglobulina indirecta) e habitualmente produzem Ac anti-D quando estimulados por transfusão ou gravidez.

Alguns D parciais, à semelhança dos D fracos, resultam de mutações em alguns pontos do gene RHD, causando mudanças nos aminoácidos.

Em contraste com os D fracos estas alterações estão localizadas nas regiões extracelulares alterando ou criando novos epítomos.

D^{VI} é o D parcial mais comum nos caucasianos e os Ac anti-D por eles produzidos causam DHP (Connie *et al.*, 2007), é formado pelos exões 1-3 e 7-10 do gene RHD, mas os exões 4-6 são do gene RHCE (Daniels *et al.*, 2009). Estima-se a frequência de D^{VI} entre 0.02 e 0,4% (Ramos, 2007).

Na maior parte dos casos, estes D parciais reagem fortemente na presença de soros anti-D; no entanto, alguns apresentam uma expressão fraca.

Um D^{VI} será classificado D positivo no caso de um dador, e como D negativo no caso de doente (AABB, 1999b).

Todos os D^{VI} conhecidos são dCe ou dcE (Ramos, 2007).

Os doentes classificados como D parciais, devem receber sangue D negativo e serem considerados candidatos para profilaxia Ig anti-D (Connie *et al.*, 2007).

Os indivíduos cujo fenótipo é D parcial podem imunizar-se por contacto com epítomos ausentes.

A confirmação do grupo sanguíneo RhD, feita através de técnicas de biologia molecular, permite diferenciar as duas variantes (Moser *et al.*, 2008).

2.4 - RESPOSTA IMUNE

Para que os Ac maternos causem DHP, precisam de ter a capacidade de atravessar a placenta, reagir com os Ag dos GV fetais e iniciar a destruição destas células.

Das imunoglobulinas produzidas no organismo – IgM, IgG, IgA, IgD e IgE – apenas as IgG são capazes de atravessar a placenta e causar DHP. As IgG passam activamente através do trofoblasto para a circulação fetal, visto este tecido possuir receptores para a fracção Fc desta imunoglobulina.

A eficácia com que se realiza esta transferência pode influenciar notavelmente o grau de hemólise e a gravidade da doença.

Pode estabelecer-se uma protecção temporária administrando Ac pré-formados de um indivíduo para outro da mesma espécie ou de espécies diferentes. Os Ac adquiridos podem combinar-se com os respectivos antigénios determinando a remoção dos GV do complexo Ag-Ac e bloqueando a resposta imune (Roitt, 2001).

IgM

A IgM é uma imunoglobulina pentamérica e é a primeira imunoglobulina produzida por maturação das células B. É a primeira a aparecer no sangue dos recém-nascidos, e a primeira a ser detectada na resposta imune primária. Correspondem, normalmente a 5-10% das imunoglobulinas no soro normal.

O mais importante efeito biológico da IgM é a sua capacidade de activar o complemento nas reacções inflamatórias e no mecanismo de defesa fagocítica, produzindo a lise das células ligadas aos Ag (AABB, 1999a). A concentração pós natal aumenta rapidamente no primeiro mês de vida e depois gradualmente, presumivelmente em resposta à estimulação antigénica (Remington, 2006).

IgG

A IgG é um monómero e corresponde a 80% das imunoglobulinas presentes no soro, estando também presente no fluido extravascular. Como é uma molécula de anticorpo divalente relativamente pequena, raramente aglutina partículas em suspensão em meio salino. Tem tendência a combinar-se e permanecer ligada com antígenos existentes na superfície das células, podendo detectar-se a sua presença *in vitro* pelo teste de antiglobulina. *In vivo*, células ou partículas cobertas com IgG desenvolvem interacções com células que têm receptores para a porção Fc das cadeias gama, especialmente neutrófilos e macrófagos.

As moléculas de IgG podem ser classificadas em 4 subclasses, designadas por: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Estruturalmente, diferem principalmente nas características da região das dobradiças e no número das ligações bissulfito das cadeias pesadas; biologicamente têm diferenças significativas nas propriedades *in vivo*. A IgG3 tem grande capacidade para activar o complemento, seguida pela IgG1 e em menor escala a IgG2. A IgG4 é incapaz de activar o complemento.

A IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 não têm a mesma capacidade para atravessar a placenta. A IgG1 e IgG3 facilmente interagem com os receptores Fc das células fagocíticas, a IgG4 e IgG2 não o fazem tão facilmente (AABB, 1999a) (Quadro 2).

Actividade funcional	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Neutralização	+	-	++	++	++	++	++	-
Opsonização	-	-	+++	*	++	+	+	-
Sensibilização de células NK	-	-	++	-	++	-	-	-
Sensibilização dos mastócitos	-	-	+	-	+	-	-	+++
Activação do complemento	+++	-	++	+	+++	-	+	-
Distribuição	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Transporte através do epitélio	+	-	-	-	-	-	+++ dímero	-
Transporte através da placenta	-	-	+++	+	++	+/-	-	-
Difusão para locais extravasculares	+/-	-	+++	+++	+++	+++	++ monómero	+
Concentração média no soro (mg/mL)	1.5	0.04	9	3	1	0.5	2.1	3×10^{-5}

Quadro 2 – Função e distribuição das diferentes classes de imunoglobulinas

No 1º trimestre da gravidez, o feto já tem na sua circulação IgG que são produzidas pela mãe e atravessam a barreira placentária. Lentamente atingem uma concentração detectável no feto às 17 semanas de gestação, aumentando de forma exponencial, até atingir o máximo às 30 semanas e igualando a concentração da mãe em IgG às 38 semanas. Em alguns casos, a concentração fetal de IgG pode exceder a concentração materna (Remington, 2006).

As IgGs passam de forma activa da mãe para o feto através dos trofoblasto, por um mecanismo de pinocitose (Mannessier, 2007). As IgG2 e IgG4, embora sensibilizem os eritrócitos fetais, não são capazes de os destruir, devido à pouca ou nenhuma união aos receptores Fc dos macrófagos e à incapacidade de activação do complemento (Clóvis, 1992).

Por volta dos 6 meses intrauterinos, o feto começa a produzir IgM, cuja concentração vai aumentando de forma estável.

Ao nascimento, a concentração de IgG de origem materna é máxima, e diminui bruscamente até aos 3 meses de idade, continuando depois a diminuir de forma

mais lenta, até que deixa de ser doseável aos 8 meses de idade. Também na altura do nascimento, o feto começa a produzir IgG (que iguala a concentração de IgG materna aos 2 meses) e IgA.

Aos 12 meses de idade, as concentrações totais dos anticorpos já perfazem 60% das do adulto sendo que a IgG é 80% da do adulto, a IgM 75% e a IgA 20% (Remington, 2006) (Fig. 4).

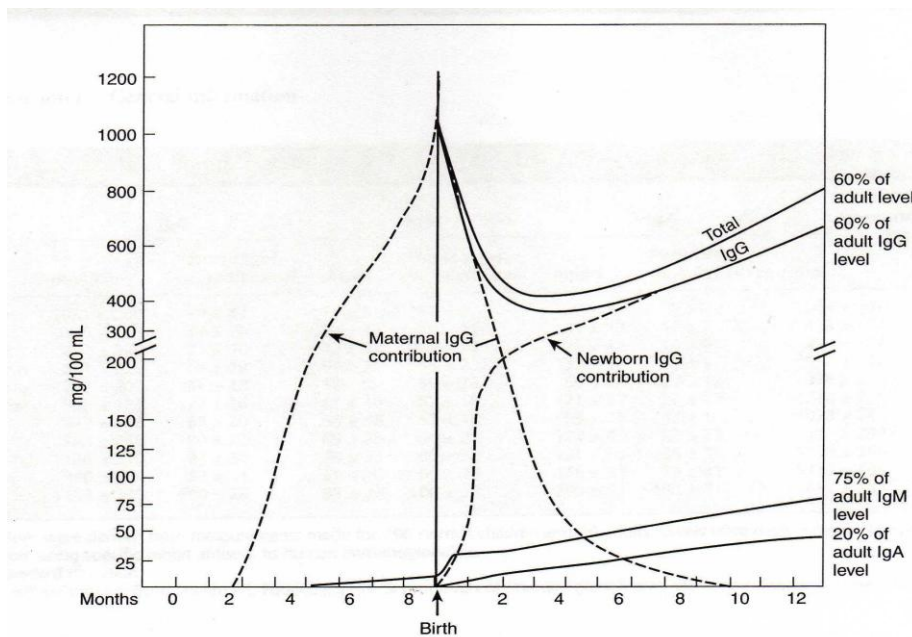


Figura 4 – Níveis de imunoglobulinas IgG, IgM, e IgA no feto, no recém-nascido e durante o primeiro ano de vida

2.5 - IMUNIZAÇÃO MATERNA

Desde que foi instituída a determinação da compatibilidade sanguínea nas transfusões entre o dador e o receptor, a aloimunização de mulheres Rh negativas por transfusões com sangue Rh positivo é agora muito rara (Koenig, 2000).

Presentemente, a aloimunização ocorre quase exclusivamente na gravidez de mulheres RhD negativo em que o feto é RhD positivo. Esta imunização resulta da passagem de células fetais, que expressam à sua superfície o antigénio D, para a circulação materna cujas células sanguíneas não possuem esse antigénio. Esta

passagem do antígeno D para a circulação materna dá-se principalmente por hemorragia feto materna (HFM).

Bowman e associados usando o teste de eluição ácida Kleihauer-Betke (prova da eluição ácida da hemoglobina fetal), detectou 1 célula fetal em 200.000 células da mãe, correspondendo a uma fração de 1 mililitro do volume sanguíneo materno (Liley, 2003) (Fig. 5).

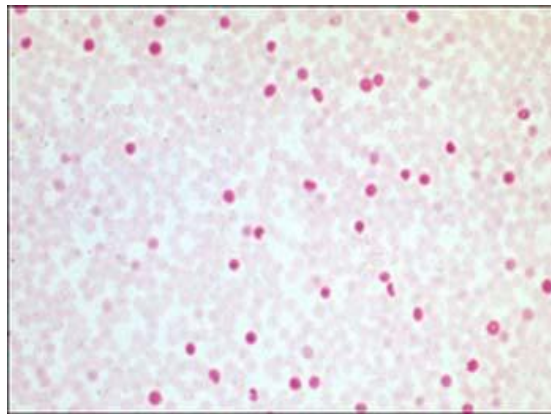


Figura 5 - Kleihauer-Betke num caso de HFM massiva
(eritrócitos corados = eritrócitos fetais)

O teste de Kleihauer-Betke, baseia-se na diferente resistência entre a Hb fetal (Hb F) e a Hb adulta (Hb A) à eluição ácida. As células que contêm Hb F são resistentes à eluição ácida e incorporam corante, enquanto que as células que contêm a Hb A aparecem pálidas.

Através do cálculo da relação entre eritrócitos fetais e maternos obtemos a % de eritrócitos fetais.

$$\text{O volume de sangue fetal (ml)} = \% \text{ de eritrócitos fetais} / 100 \times 5000 \text{ ml.}$$

Em 60% das gravidezes, a passagem de sangue fetal é de cerca de 0,1 ml. Mais do que 5 ml e mais do que 30 ml foram encontradas em 1% e 0,25% destas mulheres, respectivamente (Koenig, 2000; AABB;1999d).

A passagem assintomática transplacentar de GV fetais ocorre em 75% das mulheres grávidas durante a gravidez, durante o trabalho de parto ou durante o parto.

A incidência e a gravidade da HFM aumentam ao longo da gravidez: 3% no primeiro trimestre da gravidez, 12% no segundo, 45% no terceiro e 64% no parto (Ramasethu, 2001; AABB, 1999d).

O uso de técnicas de Citometria de Fluxo e de amplificação do DNA fetal confirmam que as células fetais podem ser detectadas no sangue materno durante todos os trimestres da gravidez (Liley, 2003).

A placenta é uma membrana activa e selectiva, cujas características dinâmicas condicionam a circulação nos dois sentidos. O ponto de contacto directo entre as circulações útero-feto-placentário é o trofoblasto, unidade funcional composta pelo espaço inter-viloso onde circula o sangue materno e pelos capilares vilositários onde circula o sangue fetal (Fig. 6).

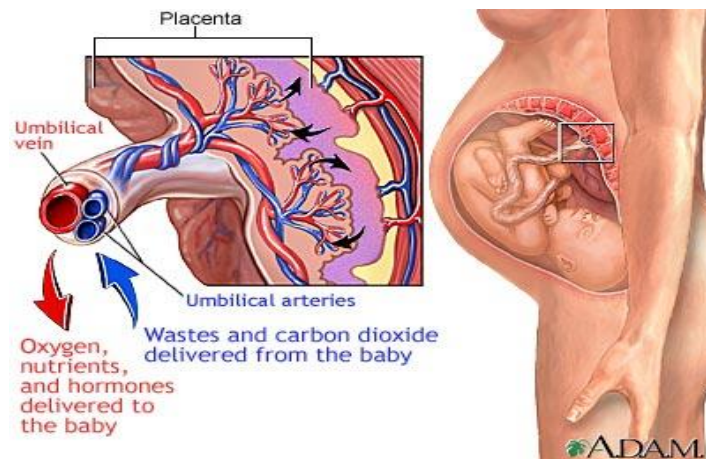


Figura 6 – Placenta

Nutrientes, líquidos e gases são trocados entre o sangue da mãe e o do feto através da placenta.

Embora não se conheça a pressão nos capilares das vilosidades, pensa-se que é menor do lado materno, o que pode explicar a passagem dos GV fetais para a circulação materna, mesmo em condições normais (Baia, 2006).

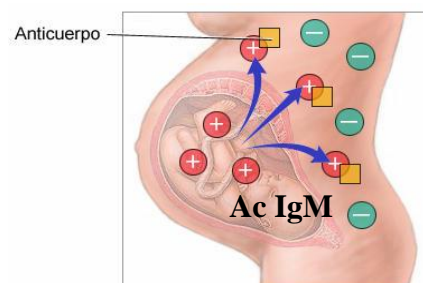
O valor da hemorragia feto-materna pode ser afectado sempre que existam: descolamento do trofoblasto ou da placenta, cesariana e curetagem uterina (Vicente *et al.*, 2003).

O risco de HFM está aumentado em certas situações obstétricas, tais como: toxemia; aborto espontâneo ou terapêutico, gravidez ectópica (Koenig, 2000), utilização de fórceps, remoção manual da placenta e trauma abdominal.

Este risco aumenta também em caso de utilização de técnicas invasivas da circulação feto-materna, como amniocentese, cordocentese, biopsia das vilosidades coriônicas. (Vicente *et al.*, 2003). Mesmo usando a ultrassonografia como auxiliar, HFM ocorre em cerca de 2,5 a 8,4% das doentes que fazem amniocentese (Liley, 2003).

2.5.1 - Resposta Imune Primária

Após a exposição inicial ou primária ao antígeno que entra na circulação materna, o sistema imune materno produz Ac do tipo IgM, que não atravessam a placenta. Trata-se da resposta imune primária (Fig 7).



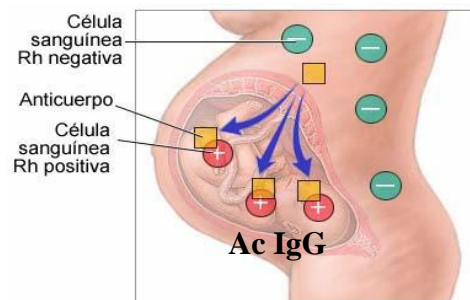
adam.com

Figura 7 - Resposta Imune Primária

A existência de incompatibilidade feto materna ABO tem um efeito protector substancial, mas não absoluto, contra a imunização materna, pelo aumento da destruição das células do feto na circulação materna, diminuindo a oportunidade ao antígeno D de induzir uma resposta imune. A incompatibilidade ABO não oferece, no entanto, protecção na resposta imune secundária (Koenig, 2000).

2.5.2 - Resposta Imune Secundária

Progressiva e lentamente os Ac IgM são substituídos por Ac tipo IgG, que atravessam a placenta. Uma segunda exposição a células fetais RhD, numa segunda gravidez de uma mulher RhD negativo sensibilizada, produz uma resposta imune secundária que é marcada por uma rápida e grande produção de Ac anti-D IgG (Fig. 8).



adam.com

Figura 8 - Resposta Imune Secundária

O volume de sangue requerido para que ocorra a primeira sensibilização é de 0,5 ml de células RhD; a resposta imune secundária ocorre com 0,03 ml de células RhD (Ramasethu *et al.*, 2001).

Uma vez ocorrida a imunização materna, a placenta transporta activamente Ac IgG para a circulação fetal, estes Ac unem-se especificamente aos eritrócitos fetais, que serão destruídos pelo sistema mononuclear fagocítico (Liley, 2003).

O grau de sensibilização pelo antígeno D do feto no sistema imune materno é proporcional à dose de antígeno a que é exposto (Koenig, 2000).

O risco de hemorragia transplacentar depende do volume de sangue envolvido na circulação placentar e da integridade do sistema circulatório materno-fetal.

O volume sanguíneo da circulação feto-materna aumenta progressivamente ao longo da gravidez. A este aumento de volume está associado um aumento de risco de hemorragias feto maternas espontâneas, nem sempre associados a episódios clinicamente identificáveis (hemorragias silenciosas) (Bowman *et al.*, 1986).

Se a hemorragia é prolongada ou repetida durante a gravidez, a anemia desenvolve-se lentamente, dando ao feto a oportunidade de se adaptar,

desenvolvendo compensações hemodinâmicas. Neste caso, os recém-nascidos apenas manifestam palidez ao nascimento.

Se se trata de hemorragia aguda, principalmente ao nascimento, os recém-nascidos podem apresentar palidez, fraca resposta a estímulos, respiração ofegante com manifestações de choque circulatório (Liley, 2003).

2.6 - AVALIAÇÃO PRÉ – NATAL DA ALOIMUNIZAÇÃO

Sempre que se diagnostica uma aloimunização ou há grandes suspeitas de tal diagnóstico, a vigilância materna embora apresente inconvenientes para a mãe e alguns riscos para o feto, tem que ser feita de imediato. A forma de avaliar esta patologia e identificar os fetos RhD positivos, passa pela utilização de métodos não invasivos e métodos invasivos (Araújo *et al.*, 2003).

2.6.1. - MÉTODOS NÃO INVASIVOS

História Obstétrica

Vários factores pré-natais são importantes para o diagnóstico e controlo da aloimunização, para determinar a severidade da doença hemolítica perinatal. O conhecimento da história gestacional materna é também importante (Koenig, 2000).

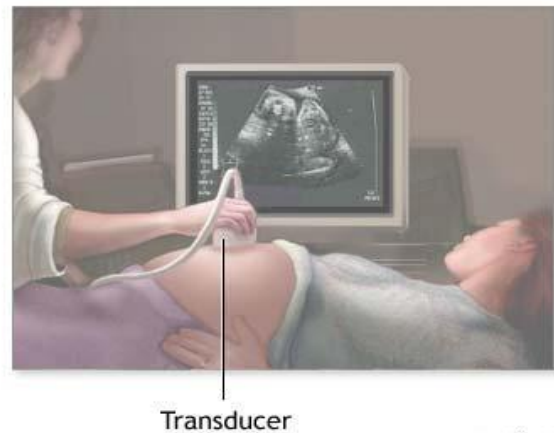
Ainda que habitualmente a severidade da DHP se deva a gravidezes anteriores de fetos afectados, a doença manifesta-se por vezes na primeira gravidez, devido a hemorragia feto-materna.

Se a mãe tem uma história anterior de um feto com hidropsia e o pai apresenta heterozigotia para o RhD, o feto pode ser RhD negativo e não ser afectado ou ser RhD positivo e ser severamente afectado. Se um filho anterior desenvolveu hidropsia, o actual tem 90% de probabilidade de também ter (Liley, 2003).

É importante investigar se há história de transfusões de sangue anteriores, não só para avaliar a aloimunização em relação ao Ag D, como a outros antigénios, particularmente o antigénio Kell (Ramasethu *et al.*, 2001).

Ultrassonografia

A ultrassonografia fetal de alta resolução constitui um dos maiores avanços no diagnóstico fetal precoce (Fig. 9).



ADAM.

i
Figura 9 – Ultrassonografia

A ultrassonografia em tempo real gera imagens bidimensionais, que mostram a anatomia fetal e também características como o peso e movimentos fetais, volume de líquido amniótico e anomalias estruturais. A ultrassonografia tridimensional acrescenta a dimensão de volume, que ajuda a detectar certas anomalias anatómicas. Pode ser programada seriadamente, e ser avaliada com outros parâmetros de diagnóstico. Dá-nos informações sobre o nº de fetos, apresentação, comprovação da viabilidade fetal, localização da placenta e avaliação da idade gestacional (Jonathan *et al.*, 2005). O uso de ultrassonografias seriadas pode ajudar a detectar sinais iminentes de hidropsia fetal.

Quando estamos perante um caso de hidropsia, a hemoglobina fetal apresenta habitualmente valores de cerca de 7 g/dl, valor muito abaixo da média para a idade gestacional (Kenneth, 2001).

Permite-nos ainda, avaliar se estamos perante casos de: hepatoesplenomegalia (hematopoiese extramedular, em resposta à anemia fetal), ascite (sinal de duplo contorno da bexiga fetal), edema (espessamento e perda da estrutura placentária), derrame pericárdico (um dos sintomas mais precoces de doença fetal ou hidropsia). No feto anémico, o fluxo sanguíneo fetal é desviado

preferencialmente para o cérebro, para assegurar a oxigenação adequada, e a sua velocidade máxima na artéria cerebral média aumenta em casos de anemia moderada e grave (Ramasethu *et al.*, 2001; Baia, 2006).

A ultrassonografia, permitiu aumentar a segurança quando se efectua uma amniocentese e é essencial quando se efectua uma colheita arterial de sangue fetal numa transfusão intrauterina. É o método escolhido para fazer a monitorização das grávidas aloimunizadas e permite planear quando se deve efectuar colheita de amostras fetais por métodos invasivos, tratamentos fetais e programar o parto (Liley, 2003).

Estudo serológico

No início da gravidez, ou de preferência numa consulta pré-concepcional, todas as mulheres devem realizar uma tipagem do grupo sanguíneo e pesquisa de anticorpos irregulares ou prova de antiglobulina indirecta (PAI).

Nas grávidas RhD negativo a PAI deve ser repetida mensalmente a partir do 2º trimestre (Vicente *et al.*, 2003). Quando no teste de rastreio é detectada a presença de um Ac, deve determinar-se a especificidade do Ag, isto é avaliar contra que Ag é dirigido esse Ac (Waldron, 2005).

Numa aloimunização materna e sem risco, mesmo que o anticorpo seja forte, se o feto é compatível, é conveniente determinar o fenótipo do progenitor para saber se ele possui o antigénio correspondente e se na sua expressão é homozigoto ou heterozigoto. No caso de aloimunização anti-D, o fenótipo Rh paterno deve ser conhecido, podendo fornecer informações úteis sobre a probabilidade de o feto ter herdado o antigénio D e, conseqüentemente, do risco de ser exposto à DHP (Minon *et al.*, 2006).

A fixação de Ac do tipo IgM aos eritrócitos produz normalmente aglutinação. Pelo contrário, os Ac IgG fixam-se aos eritrócitos, mas geralmente não produzem aglutinação. A sensibilização dos eritrócitos por IgG pode detectar-se através da prova de antiglobulina directa (PAD).

A prova de antiglobulina indirecta - PAI (Teste Coombs Indirecto) detecta Ac irregulares no sangue materno através de uma técnica de sensibilização *in vitro*. O soro de mães RhD negativas é incubado com eritrócitos RhD positivo

(sensibilização *in vitro*). Obtemos um teste positivo se se verificar que há aglutinação após a adição do soro antiglobulina humana (Soro Coombs) (Fig 10).

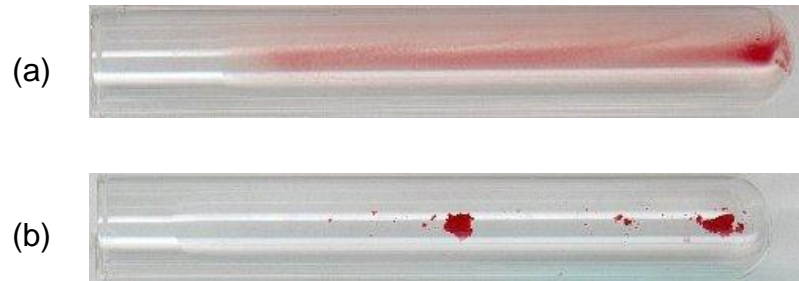


Figura 10 - Reacção antigénio anticorpo

(a) Aspecto de uma reacção negativa Ag – Ac (ausência de aglutinação)

(b) Aspecto de uma reacção positiva Ag – Ac (presença de aglutinação)

A aglutinação produz-se porque o anti-IgG e o anti-C3 que compõem o soro de Coombs, se unem à IgG e C3 humano, que por sua vez estão unidas aos eritrócitos, actuando assim como ponte intercelular (Koenig, 2000).

O soro de Coombs é uma antiglobulina humana produzida por imunização de outras espécies (Liley, 2003).

No caso de uma PAI positiva, a determinação do título de Ac, deve ser programada seriadamente a intervalos regulares, normalmente cada 2 a 4 semanas de intervalo no 2º trimestre de gestação e todas as semanas ou de 2 em 2 semanas no 3º trimestre (Waldron, 2005). Para esta determinação utiliza-se um método semiquantitativo, que usa uma serie de diluições do soro em estudo contra amostras de eritrócitos seleccionados e conhecida a sua expressão antigénica. O resultado é expresso como o inverso da mais alta diluição do soro onde é visível aglutinação macroscópica (AABB, 1999c).

São citados como valores críticos, os títulos anti RhD entre 16 e 32 (diluição: 1/16 e 1/32), valores a partir dos quais é indicada a utilização de técnicas invasivas (amniocentese, cordocentese, biópsia das vilosidades coriônicas e recolha de sangue fetal). Um critério adicional, que pode ser também usado, é o valor do aumento sequencial do título de Ac de duas diluições, p. ex. 1/4 aumentar para 1/32 (Waldron, 2005).

O título de anticorpos anti-D não dá informação precisa da severidade da hemólise fetal (Calhoun; 2000). O fraco valor preditivo do título de Ac materno tem sido, mais recentemente, questionado. Este exame que deve ser realizado a partir da décima segunda semana de gestação, depende de vários parâmetros, como: a concentração de Ac e Ag; reagentes e métodos de leitura e, sobretudo, da constante afinidade dos Ac. A titulação é, portanto, um método inadequado e ineficaz, uma vez que não mede mais do que a quantidade de anticorpos capazes de se fixarem *in vitro* sobre os eritrócitos teste (quantidade que depende da constante de afinidade) e não a quantidade total do anticorpo.

Acima de tudo, é pouco reprodutível de um laboratório para outro. Por isso, a avaliação da evolução de um título de Ac deve ser estimada em condições muito rigorosas, reportando a um soro com título de anticorpos conhecido anteriormente, analisado em paralelo com a amostra de sangue a testar (Mannessier, 2007).

Deverá ser interpretado considerando a história obstétrica da doente, podendo ajudar na decisão da opção ou não por métodos invasivos (Minon *et al.*, 2006).

Genótipo fetal no sangue materno

Numa abordagem sistemática para determinar se um feto tem o risco de expressar o Ag D, inclui também a determinação do fenótipo do pai. Se não há dúvidas em relação à paternidade ou o pai é homozigoto para o antigénio D (d/d), sendo a mãe RhD negativo (Waldron, 2005), podemos concluir que o feto não tem risco de desenvolver DHP (Liley, 2003) e não há necessidade de recorrer a métodos invasivos (Daniels *et al.*, 2004). Se o pai é heterozigoto para o antigénio D (D/d) ou se não há certeza em relação à paternidade, teremos que recorrer a uma amostra fetal para se efectuar a pesquisa do antigénio D nas suas células.

Métodos não invasivos, de modo a obter amostras do feto sem risco de sensibilizar ainda mais a mãe, têm sido avaliados, tais como a colheita de células fetais do canal endocervical, ou de células fetais que circulam no sangue periférico da mãe (Flegel *et al.*, 1998).

O sangue materno pode usar-se como uma fonte directa de material genético de células fetais separadas por fluorescência (células fluorescentes activadas)

(Waldron, 2005) substituindo a colheita de células fetais do líquido amniótico por amniocentese ou a colheita de amostras das vilosidades coriônicas, como fonte de DNA fetal. Esta técnica elimina, portanto, a necessidade de recorrer a técnicas invasivas (Daniels *et al.*, 2006).

A análise molecular do plasma materno abriu novas possibilidades para o diagnóstico pré-natal não invasivo, onde a genotipagem RHD fetal é uma das aplicações técnicas mais relevantes até o momento (Avent, 2008).

A concentração de DNA fetal aumenta no plasma materno ao longo da gravidez, sendo estimado que corresponde a aproximadamente 3,4% (intervalo entre 0,4-12%) no 1º trimestre e a cerca de 6,2% (intervalo 2,3-11,5%) no 3º trimestre (Van *et al.*, 2006). Este facto serviu de base para o desenvolvimento de um método melhor, quer em termos de quantidade de amostra quer em tempo de realização do mesmo para a determinação do genótipo fetal (Daniels *et al.*, 2004). Lo *et al.* desenvolveram a técnica de PCR (*polymerase chain reaction* - reacção de polimerização em cadeia) em tempo real (RT-PCR), fluorogénica, que permite quantificar com precisão o DNA fetal no plasma materno. Utilizaram esta técnica para identificar uma sequência específica do cromossoma Y, do gene *SRY*, em grávidas de fetos do sexo masculino e o gene RHD em grávidas de fetos RhD positivo.

O DNA fetal está presente no plasma das grávidas desde o início gravidez e durante algumas horas ou dias após o parto. A análise do DNA fetal parece não ser afectada pela presença de células fetais provenientes de gravidezes anteriores (Nelson *et al.*, 2001). Os mecanismo de libertação e remoção do DNA fetal do plasma materno não são conhecidos, embora tenha sido sugerido que o fígado, baço e rim sejam os órgãos implicados na sua eliminação do organismo materno (Lo *et al.*, 1999).

A tipagem do DNA por PCR, requer a preparação das amostras, a extracção dos ácidos nucleicos, amplificação dos fragmentos de DNA que pretendemos analisar e a detecção específica dos fragmentos amplificados.

Métodos robustos, desde a preparação das amostras até ao final da interpretação dos resultados, são obrigatórios para qualquer estratégia de genotipagem.

A utilização de procedimentos correctos e equipamentos adaptados são necessários a um bom desempenho. O número total de pipetagens e passos de

transferência devem ser minimizados de modo a evitar contaminações ou trocas de amostras. A extração do DNA de amostras biológicas deve revestir-se de especial atenção, de modo a assegurar uma pureza adequada (incluindo a remoção eficiente de inibidores tais como a hemoglobina) e uma quantidade adequada para prosseguir com a técnica de PCR (Flegel *et al.*, 1998).

Em 2001 o “*International Blood Group Reference Laboratory of the English National Blood Service*”, padronizou a determinação do genótipo fetal RHD a partir de DNA fetal em circulação no sangue materno. Inicialmente o método era extremamente trabalhoso e caro e, portanto, não aplicável como método de rastreio para todas as mulheres RhD negativas. Desenvolvimentos tecnológicos, recentes com introdução de técnicas automatizadas, permitiram uma diminuição de custos e um aumento da produtividade. Validou-se a alta eficácia das técnicas de genotipagem RHD, comparando os resultados com os obtidos através da determinação serológica RhD em amostras do sangue do cordão, obtidas na altura do parto (Finning *et al.*, 2008) e com os resultados obtidos com amostras de LA (Rouillac *et al.*, 2007).

A detecção da fluorescência em sistemas modulares foi testada nesta área já em 1997, demonstrando possuir maior sensibilidade. Além disso, a conjugação da fluorescência com os 5 *primers* específicos para o gene RHD permitiu uma detecção altamente sensível dos produtos por PCR (Tonn *et al.*, 1997).

Inicialmente os testes da reacção de PCR foram criados para caracterizar o DNA fetal no plasma ou soro materno e o genótipo RHD foi utilizado como um ensaio prático para desenvolver esta nova tecnologia, porque a precisão dos testes poderia ser facilmente confirmada após a simples fenotipagem RhD fetal de células do cordão umbilical após o nascimento. A primeira geração de testes para determinação do genótipo RHD eram baseados no conceito incorrecto de que todos os fenótipos RhD negativos eram causados pela completa deleção do gene RHD (Avent, 2008). Baseavam-se apenas na amplificação de uma região do gene RHD nomeadamente os exões 4,7 ou a região 10/3'UTR (sequência não traduzida, presente na região 3', do exão 10 do gene RHD) (Rouillac *et al.*, 2007; Daniels *et al.*, 2004; Schoot *et al.*, 2008). Assim, foi necessário desenvolver estratégias de diagnóstico por PCR baseadas na detecção de RHD nos genomas

de indivíduos RhD negativos que têm um gene suprimido RHD (Neil D *et al.*, 2000).

Posteriormente, a investigação sobre a base molecular de fenótipos RhD negativo revelou que um número significativo de indivíduos possuem fragmentos de genomas, ou genes RHD mutantes, sendo o mais notável o RHD pseudogene encontrado nos africanos.

Testes de genotipagem RHD mais abrangentes foram evoluindo para diferenciar esses alelos e são os mais adequados para o diagnóstico da população multi-étnica (Avent, 2008). Testes de 2ª geração, essencialmente baseados no uso de diferentes pares de primers para a amplificação de várias regiões (exões e intrões) do gene RHD, foram sendo implementados por vários laboratórios (Rouillac *et al.*, 2007). A demonstração de um número elevado de falsos positivos e falsos negativos, quando se detectava uma única porção da sequência do gene RHD, levou à utilização de pelo menos dois pares de *primers* que iriam amplificar regiões distintas do gene RHD, de modo a diminuir o risco de genotipagem incorrecta (Flegel *et al.*, 1998).

Com a evolução tecnológica, novas abordagens têm sido adoptadas nomeadamente a PCR em Tempo Real quantitativa (RT-PCR) que utiliza a tecnologia *Taqman* em que uma sonda fluorogénica hibridiza com o alvo pretendido e resulta na geração de um sinal de fluorescência proporcional à quantidade de produto presente.

A maior vantagem da RT-PCR em relação à PCR convencional é o facto de ser quantitativa, permitir distinguir facilmente o material fetal do material materno e, ainda, o facto de a amplificação e análise ser realizada em tubos fechados, reduzindo o risco de contaminações (Daniels *et al.*, 2009). É um método robusto e fiável, de fácil execução, necessitando de reduzidos procedimentos manuais, o que diminui potenciais erros. É uma alternativa que oferece mais confiança do que os métodos clássicos, utiliza pequenos volumes de reagentes, é rápida (demora menos de uma hora na amplificação e detecção), tornando-se um método de eleição para se usar como método de rotina, especialmente quando o tempo é um factor crítico (Araújo *et al.*, 2003).

A fig. 11 representa a fase de amplificação em RT-PCR. Para cada grupo de amostras, foi determinado o número de ciclos em que a fluorescência da amostra aumenta acima da fluorescência de base, sendo este o início da fase exponencial.

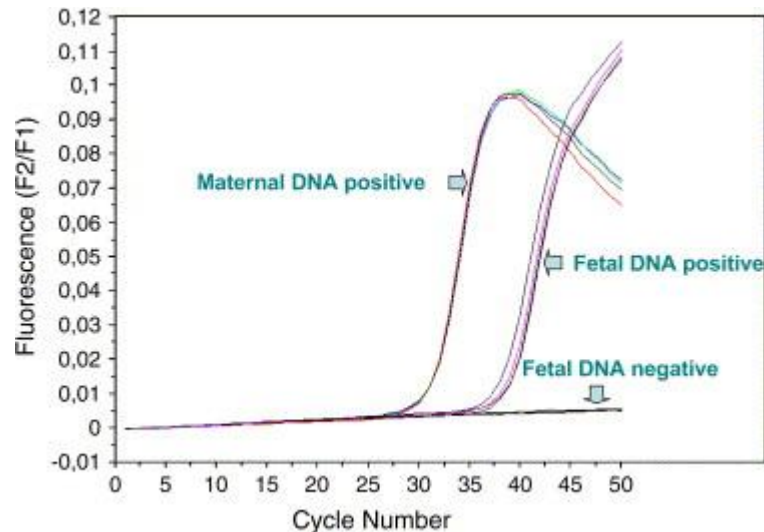


Figura 11 – RT-PCR: gráfico representativo de amplificação.

Observação de resultados típicos em amostras de doentes representando um resultado positivo para o DNA fetal; um resultado negativo para o DNA fetal e um resultado de uma grávida RhD negativo mas que possui no seu genoma um pseudogene.

A amplificação do DNA numa ou mais regiões do gene RHD pode fornecer o genótipo fetal correcto com uma probabilidade aproximada de 99% (Kumar, 2008).

A escolha dos *primers* e das regiões seleccionadas varia com os autores, os protocolos escolhidos e as populações a serem testadas, não existindo um consenso sobre a abordagem mais fiável para cada população (Araújo *et al.*, 2003).

Uma análise recente a 37 publicações Inglesas refere que até à data, existem 44 protocolos diferentes usados na genotipagem RHD fetal a partir de sangue materno. Todos apresentam como valor de precisão uma média de 94,8%. No entanto, as precisões individuais variam entre 31,8 a 100%, dependendo do protocolo, da estratégia de genotipagem e diferentes especificidades para a determinação do gene D fetal (Muller *et al.* 2008).

O DNA é habitualmente isolado do plasma materno, após centrifugação de uma amostra de sangue periférico materno colhido com o anticoagulante EDTA, (Chiu *et al.*, 2001). Sempre que possível, este procedimento deve ser executado logo a seguir à colheita da amostra, com a finalidade de evitar o aumento de DNA materno por degradação dos glóbulos brancos (Daniels *et al.*, 2009).

Recentemente, foi apresentado pelo SAFE NoE (*Special Non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation Network of Excellence*) o mais promissor protocolo para extracção de células fetais livres a partir do plasma materno. O DNA foi extraído usando dois diferentes métodos: um utiliza o método de colunas em espiral (*QIAamp DSP vírus kit, Qiagen, Hilden, Germany*); o outro utiliza esferas magnéticas (*Chemagen, Baesweiler, Germany*) Com base nesse protocolo foi efectuado um estudo que permitiu concluir que a determinação do genótipo fetal RHD a partir do sangue materno pode ser considerada tão sensível como o tradicional teste serológico fetal que se realiza no período pós natal.

A sensibilidade do genótipo RHD é de 99,7% usando para a extracção do DNA, colunas em espiral e de 99,8%, usando para a extracção do DNA, esferas magnéticas comparável portanto com a técnica serológica que tem uma sensibilidade de 99,5%. A especificidade do genótipo RHD é de 99,2% usando colunas em espiral e 98,1% usando esferas magnéticas, ou seja, levemente mais baixa do que a da serologia, > 99,7 (Muller *et al.*, 2008).

Os testes de DNA requerem uma interpretação cuidadosa e o resultado dos testes efectuados ao pai devem ser consistentes com os do feto (Waldron, 2005).

A tipagem fetal D tornou-se um padrão de cuidados médicos na Inglaterra, em mulheres grávidas com um nível significativo de anticorpos anti-D (Finning *et al.*, 2009).

É de todo o interesse determinar o genótipo fetal no caso de grávidas aloimunizadas para o Ag D. Se o feto é identificado como RhD positivo, o risco de desenvolver DHP é muito elevado e a gravidez deve ter um seguimento numa consulta de alto risco com vista à vigilância da DHP. Se o feto for RhD negativo, não corre risco de desenvolver DHP e a gravidez pode decorrer de forma normal (Daniels, 2007).

Este método não invasivo de determinação genótipo RHD fetal poderá ser sistematicamente proposto a todas as grávidas RhD negativas, para uma melhor

orientação no seguimento pré-natal e para um aumento da eficácia da profilaxia RhD (Minon *et al.*, 2006).

2.6.2 - MÉTODOS INVASIVOS

As mais importantes técnicas de diagnóstico pré-natal são a ultrassonografia detalhada, amniocentese, biópsia das vilosidades coriônicas e colheita de sangue fetal por cordocentese. O diagnóstico pré-natal pode permitir: a opção de interrupção da gravidez por detecção de doença severa; administração de terapia limitada a um certo número de condições; confirmação se alguma doença não foi detectada, controle obstétrico do bom estado fetal e planeamento de controlo neonatal no futuro (Lissauer, 1999) (Fig.12).

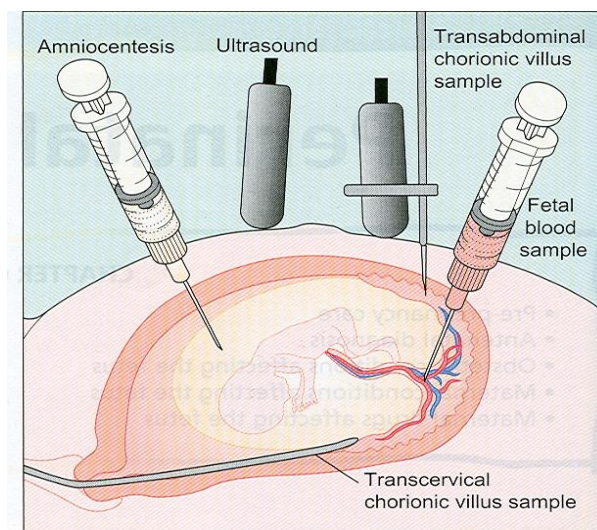


Figura 12 - Algumas das técnicas invasivas usadas no diagnóstico perinatal

Amniocentese

A amniocentese é usualmente efectuada em grávidas aloimunizadas com história prévia de fetos afectados, em que o pai é heterozigoto para o gene que codifica o Ag e que apresentem um título de Ac elevado ou com um valor crítico.

O líquido amniótico (LA) é obtido introduzindo uma agulha através da parede abdominal da grávida e do útero, até atingir a cavidade uterina (AABB, 1999d).

O procedimento deve ser realizado sob orientação ultrasonográfica para reduzir o risco de HFM (Roman *et al.*, 2005).

A análise espectrofotométrica do LA, em densidade óptica (DO), permite, representar graficamente, utilizando uma escala semilogarítmica, a relação entre os produtos da decomposição do sangue e a gravidade da doença em relação à idade gestacional (Gráfico de Liley) (Roman *et al.*, 2005).

A avaliação da concentração da bilirrubina no LA dá-nos uma indicação indirecta do grau de hemólise fetal. A concentração da bilirrubina é lida em DO e a linearidade no comprimento de onda de 450 nm (ΔOD_{450}) (Nicolaides *et al.*, 1998). São feitas, leituras espectrofotométricas do LA nos comprimentos de onda entre 375-700nm. O aumento da densidade óptica desde a linha de base projectada aos 450 nm dá-nos a concentração da bilirrubina. (Hoffbrand, 2005).

As leituras obtidas são inscritas num gráfico semilogarítmico, estabelecendo-se a relação entre a diferença de DO obtida (ΔDO_{450}) e a idade gestacional, permitindo elaborar a actuação específica para cada caso., uma vez que tem um significado clínico diferente para as diferentes semanas de gestação.

A análise do LA usando os gráficos de Liley na previsão da severidade da DHP tem sido usada há décadas (AABB, 1999d) (Fig. 13).

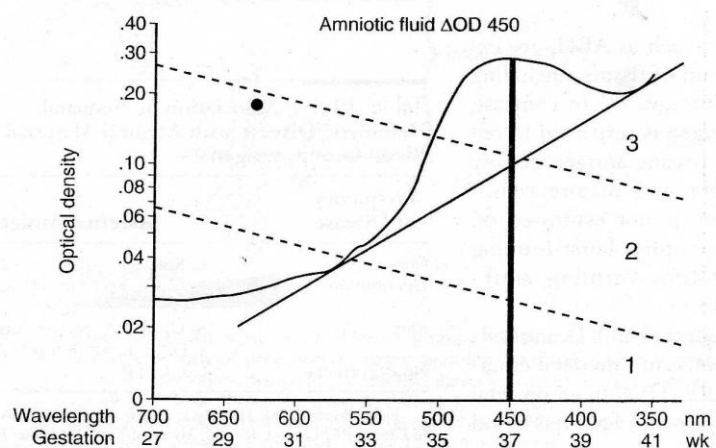


Figura 13 – Curva de Liley.

A linha curva indica as leituras obtidas em DO a partir da amostra do LA da doente. A linha recta indica a linha de base das leituras em DO (une o valor da 1ª e da última leitura). A diferença observada a 450nm dá-nos o valor da bilirrubina. No exemplo apresentado na figura, às 29 semanas de gestação a diferença entre a linha de base e a DO observada a 450nm, apresenta um valor de 0,200, caindo perto da zona 3, indicando DHP.

Leituras que caiam na zona 1 do gráfico de Liley indicam a não existência de doença hemolítica ou anemia na altura em que é realizado o teste (Liley, 2003).

A amniocentese deve ser repetida a cada 2-3 semanas e o parto deve ocorrer perto do termo da gravidez altura em que o feto deve apresentar maturidade pulmonar (Roman *et al.*, 2005).

Leituras que caiam na zona 2 do gráfico de Liley indicam risco moderado de doença hemolítica, tornando-se mais severa quanto mais perto a leitura estiver da zona 3 (Liley, 2003) A amniocentese deve ser repetida a cada 1-2 semanas. O feto deve ser retirado logo que tenha atingido a maturidade pulmonar (Roman *et al.*, 2005).

Leituras que caiam na zona 3 do gráfico de Liley ou na parte alta da zona 2 indicam risco severo de doença hemolítica (Liley, 2003). Em geral, é necessário intervir para permitir que o feto chegue a uma idade gestacional em que os riscos associados ao nascimento e ao período neonatal sejam menores do que os riscos associados ao tratamento intrauterino. Em geral, a amniocentese precisa ser repetida semanalmente. A ecografia é usada para avaliar se há ascite ou edema. A transfusão intrauterina pode ser necessária para evitar a morte do feto, usando-se concentrados de eritrócitos, lavados e irradiados O Rh negativo e negativo para Citomegalovirus (CMV). Quando o feto tiver maturidade pulmonar suficiente para sobreviver, o parto deve ser feito (Roman *et al.*, 2005).

A amniocentese seriada, realizada para medir a bilirrubina no líquido amniótico, não distingue um feto RhD negativo e RhD positivo moderadamente afectado, expõe a mãe a múltiplos procedimentos invasivos (Bennet *et al.* 1993) e não pode ser realizada antes das 27 semanas de gestação (AABB, 1999d).

Queenan's *et al.* fizeram um estudo a partir das 14 semanas de gestação até ao termo e construíram um gráfico com 4 zonas.

Normalmente a concentração da bilirrubina no LA, é medida pela ΔDO_{450} e

aumenta a partir das 14 semanas até atingir um *plateau*, aproximadamente às 18-22 semanas. A partir daí a concentração começa a baixar até ao termo da gestação, devido ao aumento do volume do LA (Waldron, 2005).

Neste estudo que incluiu 520 gravidezes não afectadas, Queenan's *et al.* calcularam valores ΔDO_{450} entre as 14 e as 40 semanas de gestação. A análise de 163 amostras LA em 75 gravidezes aloimunizadas resultou na definição de 4 novas zonas de controlo:

Zona Rh negativo, não afectados;

Zona indeterminada;

Zona Rh positivo, afectados

Zona de risco de morte intrauterina. (Kenneth, 2001) (Fig. 14).

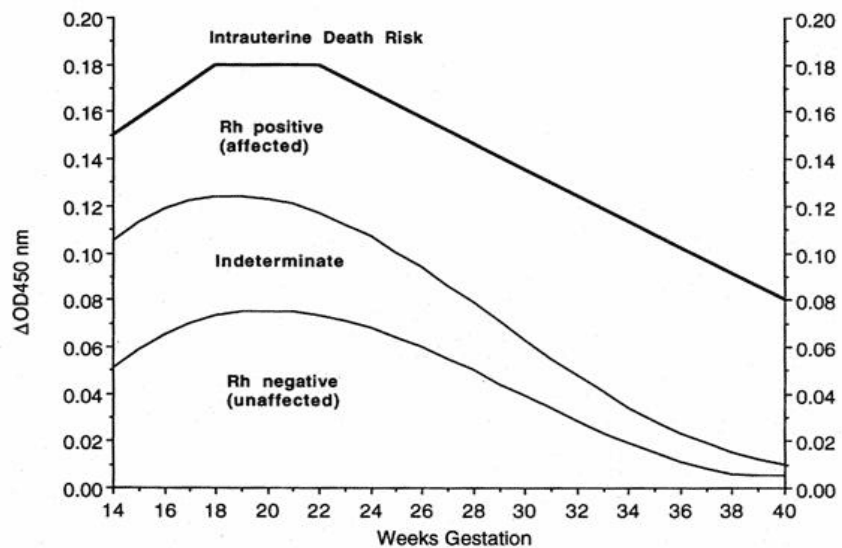


Figura 14 - – Curva de Queenan.

Zonas de valores de controlo do LA baseados na ΔDO_{450} e na idade gestacional entre as 14 e as 40 semanas

Nas gravidezes em que se verifica hemólise fetal, a concentração de bilirrubina no LA é detectável ou aumenta a partir das 22 semanas. O aumento progressivo da concentração de bilirrubina acima dos valores normais está associado com o agravamento do estado de hemólise, com um potencial agravamento das condições do feto no útero, uma alta probabilidade de morte *in útero*, anemia severa ou alto risco de falha cardíaca até ao parto.

Comparando os gráficos de Queenan e os gráficos de Liley para a interpretação dos ΔDO_{450} conclui-se que, apesar de nenhuma das abordagens apresentar valores falsos positivos na classificação dos fetos normais, o método Queenan tem mais probabilidade de identificar fetos com necessidade de transfusão *in útero* quando tal não era esperado (Waldron, 2005).

Como técnica invasiva que é, a amniocentese tem um risco de 0,5-1% de perda fetal e está associada a um risco de 17% de hemorragia feto materna, o que, se o feto for RhD positivo, pode aumentar o risco de desenvolvimento de DHP (Daniels *et al.*, 2009), sendo este o seu maior inconveniente.

O conhecimento da estrutura e organização do gene RH possibilitou a determinação do grupo sanguíneo fetal nos amniócitos, pela técnica de PCR (Janet, 2007). A amostra de LA é também utilizada para fazer o estudo molecular, do genótipo do feto para, Kell, Duffy e Kidd. (Baia, 2006) Apenas algumas células são necessárias para a amplificação do DNA para análise do genótipo RHD fetal e, portanto, apenas 1 ou 2 ml de LA deve ser aspirado.

A tipagem do DNA pode ser efectuada em qualquer tecido fetal, como LA (amniócitos), células trofoblásticas (vilosidades coriônicas) ou sangue de cordão (células de sangue fetal) (Bennet *et al.*, 1993). Esta informação pode ser obtida nas primeiras semanas de gestação mas pode haver risco aumentado de perda fetal (Waldron, 2005).

Uma retrospectiva do conjunto de estudos realizados sobre amostras de LA, permite concluir que os excelentes resultados obtidos confirmam a eficácia do procedimento e justificam a sua utilização na prevenção da DHP em casos muito bem seleccionados. A sensibilidade e especificidade da técnica de PCR foram estimadas em 98,7% e 100%, respectivamente (Baia, 2006) e o valor preditivo positivo e negativo resultam em 100% e 96,9%, respectivamente (Van, 1996).

Biópsia das Vilosidades Coriônicas (BVC)

Pode ser efectuada entre a 10^a e a 12^a semana de gestação, podendo ser realizada por via transcervical ou transabdominal. A BVC também é orientada pela ultrassonografia, com introdução de um cateter ou agulha estéril dentro do local de implantação da placenta. As vilosidades coriônicas são aspiradas e

submetidas à determinação do genótipo fetal, não permitindo avaliar a anemia ou seja o estado fetal. A vantagem em relação à amniocentese é a sua disponibilidade mais precoce na gravidez, embora tenha a desvantagem de apresentar maior probabilidade de ocorrer HFM, o que pode fazer aumentar a aloimunização da grávida (Jonathan, 2005) (Fig. 15).

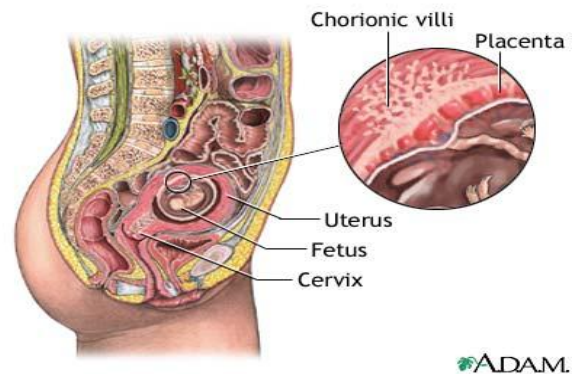


Figura 15 - . Amostra de Vilosidades Coriônicas

Cordocentese

A cordocentese ou recolha de uma amostra de sangue fetal na artéria umbilical por via percutânea, surgiu como uma alternativa à amniocentese.

A vantagem principal da cordocentese é a possibilidade de avaliar directamente o grau de anemia fetal, e simultâneamente fazer o tratamento. Este procedimento permite a determinação do genótipo fetal, avaliar a presença ou não de anemia e acidose no feto (Roman *et al.*, 2005). Além da concentração da hemoglobina fetal é possível determinar outros parâmetros hematológicos e bioquímicos que permitem prever o grau de anemia.

Por exemplo, em caso de anemia a contagem de reticulócitos, leucócitos, bilirrubina e níveis de eritropoietina fetal estão aumentados, os gases do sangue alterados e o teste de antiglobulina directo é positivo (Nicolaidis, 1998).

A obtenção de sangue fetal tem um risco de 2% de perda fetal e 40% de hemorragia feto materna, o que pode aumentar ainda mais a aloimunização materna (Bennett *et al.*, 1993). Esta técnica deve ser reservada para utilização

quando a ultrassonografia ou a amniocentese indicam a probabilidade de existência de DHP severa ou moderadamente severa com provável necessidade de tratamento intrauterino. Poderá ser efectuada a partir das 18 semanas de gestação (Liley, 2003).

Quando o hematócrito fetal é inferior a 30% está indicada a execução de transfusão intrauterina (Koenig, 2000) (Fig. 16).

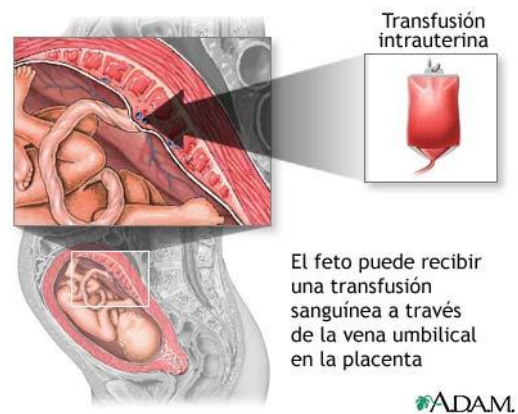


Figura 16 - Transfusão Intrauterina

2.7 - DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL (DHP)

A DHP, caracteriza-se pela presença de eritrócitos fetais revestidos por aloanticorpos IgG de origem materna, dirigidos contra o Ag de origem paterna presente nas células fetais e ausentes nas células da mãe. A imunização da mãe ocorre quando eritrócitos fetais entram na circulação materna, sendo descrito esse evento como hemorragia feto-materna. A HFM ocorre em cerca de 75% das gravidezes, principalmente durante o terceiro trimestre e na altura do parto, desencadeando uma resposta imune materna, com desenvolvimento de Ac anti-D.

Havendo transferência transplacentar de Ac anti-D do tipo IgG, estas vão revestir os eritrócitos provocando a destruição acelerada dos GV sensibilizados, antes ou após o nascimento. A severidade da doença pode variar entre a morte intrauterina a alterações serológicas em crianças assintomáticas (AABB, 1999d).

A designação doença hemolítica do recém-nascido, foi escolhida para substituir a designação eritroblastose fetal, quando o mecanismo da anemia fetal e da icterícia neonatal foi conhecido (Waldron *et al.*, 2005) – destruição eritrocitária acelerada com estimulação da produção dos eritrócitos.

Muitas das células fetais entram em circulação prematuramente como células nucleadas – eritroblastos - daí a designação eritroblastose fetal (AABB, 1999d) (Fig. 17)

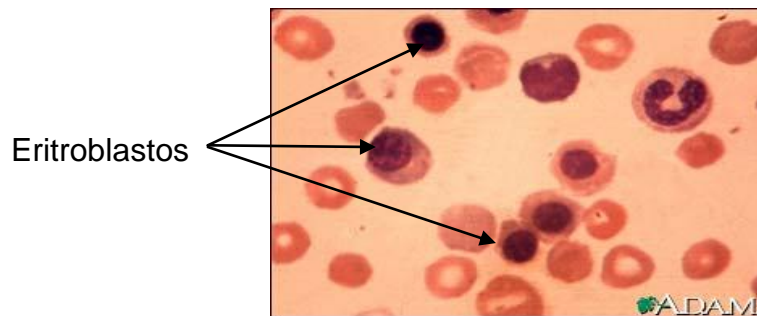


Figura 17 – Esfregaço sanguíneo na DHP, apresentando GV normais; GV com alterações morfológicas e eritroblastos

Originalmente esta patologia era incluída nas síndromes clínicas conhecidos como *kernicterus* do prematuro, anemia congénita do recém-nascido e hidrúpsia fetal (Calhoun, 2000).

A hemólise dos eritrócitos dos fetos e recém-nascidos determina uma estimulação eritropoiética, que pode associar uma eritropoiese extramedular, causando hepatoesplenomegalia e um aumento de eritroblastos na circulação.

A designação *Kernicterus* deve-se à hiperbilirrubinémia com deposição de bilirrubina não conjugada no cérebro que causa lesões irreversíveis ou mesmo a morte fetal. O Ag RhD continua a representar o Ag que está mais frequentemente envolvido na DHP (Waldron, 2005).

São considerados factores de risco materno associados com DHP: transfusões prévias, que em alguns casos podem ter decorrido em eventos médicos em que o doente desconheça a administração de transfusão prévia. Estas transfusões estão frequentemente associadas a: estadia hospitalar prolongada quando criança; procedimento cirúrgico major incluindo craneostomia, escoliose, doença congénita do coração, trauma abdominal, esplenectomia por razões médicas com

possível associação com doença hemolítica crónica; doença neoplásica em idade pediátrica; regresso ao bloco operatório até 7 dias depois de anterior gravidez.

As mães RhD negativas a quem não foi administrada Ig anti-D, que são negativas para outros antígenos diferentes do D e que apresentem complicações do foro obstétrico, tais como: gravidez ectópica; aborto espontâneo ou induzido; placenta prévia; cirurgia fetal; morte fetal ou que necessitem de fazer exames invasivos como amniocentese; cordocentese, apresentam um elevado risco de HFM e, portanto, de desenvolverem DHP. Também as mulheres que apresentam uma história de gravidez anterior com: transfusão *in útero*; morte fetal precoce por DHP; transfusão permuta de plasma; parto anterior em que o recém-nascido necessitou de transfusão permuta ou fototerapia (Waldron, 2005), têm elevado risco de desenvolver DHP.

Nem todos os Ac anti-eritrocitários do tipo IgG produzem DHP. A doença é induzida apenas por aqueles que causam destruição acelerada das células incompatíveis.

O estudo dos grupos sanguíneos permitiu concluir que a DHP não está apenas ligada aos Ac contra o Ag D, mas também a Ag de outros sistemas eritrocitários referidos no Quadro 3 (Baia, 2006; Koenig, 2000).

Frequência da DHP	Antígenos Maternos
Comum	c, Kell, E
Não Comum	e, C, Ce, Kp ^a , Kp ^b , cE, k, s, Wr ^a , Fy ^a
Raro	S, U, M, Fy ^b , N, Do ^a , Co ^a , Di ^a , Di ^b , Lu ^a , Yt ^a , Jk ^a , Jk ^b
Não Ocorrência	Le ^a , Le ^b , P

Quadro 3 – Associação da DHP com antígenos sanguíneos maternos

Em circunstâncias raras, a DHP pode também ocorrer em recém-nascidos de mães com RhD variantes (Koenig, 2000).

A aloimunização com Ag do sistema ABO é também causa comum de DHP. A incompatibilidade ABO não é diagnosticada durante a gravidez e os recém-nascidos raramente são sintomáticos ao nascimento (AABB, 1999d).

É de salientar que algumas mulheres podem ser imunizadas com mais de um tipo de Ag (Baia, 2006).

A DHP é habitualmente classificada em 3 categorias, com base na especificidade dos Ac IgG, que são por ordem decrescente de severidade:

A DHP causada apenas por Ac anti-D ou menos frequentemente, em combinação com Ac anti-C ou anti-E;

A DHP causada por Ac contra outros Ag no sistema Rh ou contra Ag de outros sistemas, como os Ac anti-c e anti-K que são habitualmente os mais frequentes;

A DHP ABO, causada por Ac anti-A e anti-B em mulheres do grupo O ou por Ac anti-A ou anti-B isolados.

Em todas as categorias, excepto na DHP ABO, os Ac maternos reflectem aloimunização por gravidez ou por transfusão (AABB;1999d).

A DHP é também classificada, em três graus, de acordo com a sua severidade:

Na DHP leve, os recém-nascidos apresentam o TAD positivo, mas não apresentam anemia, embora apresentem sinais de compensação eritropoiética *in útero* ou após o nascimento; não há necessidade de recorrer a transfusão permuta, para prevenir a toxicidade por hiperbilirrubinémia. Praticamente todos os recém-nascidos sobrevivem sem necessidade de tratamento invasivo.

Na DHP moderada, os recém-nascidos apresentam risco de toxicidade neuronal por hiperbilirrubinémia; podem apresentar sinais de anemia, mas não de acidose ou hidropsia; no sangue periférico pode observar-se policromasia, anisocitose e reticulocitose; no feto os produtos resultantes da hemólise podem ser degradados no sistema materno pelo que os recém-nascidos nascem habitualmente no fim ou perto do termo da gestação.

Os recém-nascidos requerem vigilância neonatal e podem necessitar de fototerapia ou de transfusão permuta, para tratamento da hiperbilirrubinémia.

Na DHP severa, os recém-nascidos apresentam hidropsia, hipertensão portal e ascite. Podem morrer antes, durante ou depois do nascimento, a não ser

que sejam sujeitos a tratamento intensivo. Sem tratamento, metade dos fetos desenvolvem hidropsia entre as 18 e as 34 semanas e a outra metade entre as 34 e as 40 semanas de gestação. Fetos com desenvolvimento precoce de hidropsia apresentam normalmente anemia sintomática severa e respondem bem a uma ou mais transfusões intrauterinas. Necessitam de transfusão permuta logo após o nascimento e fototerapia intensiva para prevenir os efeitos da hiperbilirrubinemia (Liley, 2003; Waldron, 2005; Hoffbrand, 2005).

2.7.1 - Incidência

A DHP pode estar associada a Ac de vários sistemas eritrocitários diferindo o tipo de Ac para as diferentes raças. Desta heterogeneidade resultam diferenças quanto à severidade e consequências da DHP (Ramasethu, 2001).

A incidência da DHP na população depende predominantemente da prevalência do Ag RhD Negativo. Nos indivíduos caucasianos a prevalência é de aproximadamente 15% (Liley, 2003).

Cerca de 15% das mães são RhD negativo e destas, 40% têm fetos RhD negativos (Daniels G. *et al.*, 2009). Na primeira gravidez, sem profilaxia, 15% destas mães podem ficar imunizadas contra o Ag D e 0,7% dos recém-nascidos podem desenvolver DHP. Na segunda e gravidezes posteriores a frequência de fetos afectados aumenta. Numa grávida com Ac anti-D, 50% dos fetos Rh positivos com DHP apresentam manifestações clínicas ligeiras, que não requerem intervenção; 25% dos fetos RhD positivo desenvolvem DHP mais grave, que requer intervenção depois do nascimento para prevenir *Kernicterus* e anemia; 25% desenvolvem uma forma grave, que requer intervenção *in útero*, no sentido de prevenir a severa morbidade e mortalidade que pode condicionar.

No período entre os anos 60 e os anos 90, o uso profilático pós-natal da Ig anti-D aumentou e a frequência de DHP por RhD decresceu drasticamente (óbitos atribuídos à aloimunização RhD passaram de 46/100,000 para 1,6/100,000 nascimentos). No mesmo período, verificou-se um aumento gradual na frequência da DHP devido a outros antígenos (Waldron, 2005; Gautier *et al.*, 2005; Daniels *et al.*, 2009).

2.7.2 - Características Clínicas

Depois da sensibilização, os Ac maternos anti-D do tipo IgG, atravessam a placenta e atingem a circulação fetal ligando-se ao Ag RhD que existe à superfície dos eritrócitos fetais. Os Ac ligam-se especificamente aos eritrócitos fetais (Koenig, 2000), e condicionam a sua destruição que pode ocorrer através de dois mecanismos:

- Os eritrócitos sensibilizados são lisados por acção de enzimas libertadas por macrófagos citotóxicos ou por linfócitos *natural killer*. A destruição destes eritrócitos, pode provocar a activação do sistema complemento (hemólise intravascular) (Urbaniak, 2000).
- Os eritrócitos sensibilizados aderem através dos Ac aos receptores Fc dos macrófagos, formando rosetas que serão destruídas pelo sistema mononuclear fagocítico (Ramasethu, 2001), a nível do baço (hemólise extravascular) (Urbaniak, 2000).

Existe um grupo de factores que influenciam a eficácia da destruição imune dos eritrócitos fetais, e, portanto a gravidade do processo hemolítico:

- A subclasse de IgG. A IgG3 (favorecida pela maior longitude na região da dobradiça), é a subclasse mais eficiente na destruição imune destas células.
- A concentração de IgG. A intensidade da destruição celular é proporcional a concentração de IgGs.
- A especificidade do Anticorpo. Os de maior importância clínica são os anticorpos dirigidos contra os antígenos dos sistemas Rh e Kell
- A expressão do antígeno. Quanto maior é o número de determinantes antigénicos e quanto mais expostos na superfície celular, mais induzem a ligação de Ac e, portanto, da reacção hemolítica
- O funcionamento do baço fetal, uma vez que o baço fetal é o local de eleição para a remoção e destruição dos GV.
- O polimorfismo dos receptores Fcy. Os genes que codificam os RFcy são polimórficos e podem afectar a capacidade dos mesmos para se unir com a IgG.

- A presença de anticorpos inibidores. Observaram-se gravidezes com altos títulos de anticorpos de importância clínica, por exemplo anti-Rh D, cujos filhos não são afectados com DHP. No soro da maioria destas mulheres detectaram-se anticorpos anti HLA que inibem a interacção entre os monócitos e os eritrócitos sensibilizados com anti-D por bloqueio dos RFcy dos macrófagos fetais (Valdês, 2006).

Anemia

Na DHP a anemia resulta de um aumento da destruição dos GV, ou de uma diminuição na sua produção. Ambos os mecanismos podem estar envolvidos em doentes com eritroblastose fetal (Koenig, 2000).

Numa gravidez normal a concentração média da hemoglobina fetal aumenta de forma linear com a gestação, de $10 \pm 1,2$ g/dl às 16 semanas até $15 \pm 1,2$ g/dl às 40 semanas, sendo 1 desvio padrão (DP) aproximadamente 1,2 g/dl. Há uma anemia moderada quando a concentração de hemoglobina apresenta um desvio de 2-4 g/dl relativamente ao valor normal e uma anemia severa quando há um desvio de 4 g/dl. A oxigenação do sangue fetal diminui em proporção com o grau de anemia, mas a pO_2 sanguíneo fetal, pCO_2 e pH mantêm normalmente valores normais (Nicolaidis *et al.*, 1998). Com a instalação e progressão da anemia fetal, pode observar-se falha cardíaca que condiciona uma diminuição da perfusão tecidual e acidose metabólica. Uma anemia fetal severa pode levar ao desenvolvimento de hidropsia ou, em casos extremos, à morte fetal (Koenig, 2000).

Fetos severamente afectados, além de anemia, podem apresentar hidropsia fetal com edema e ascite (Liley, 2003) (Fig 18).

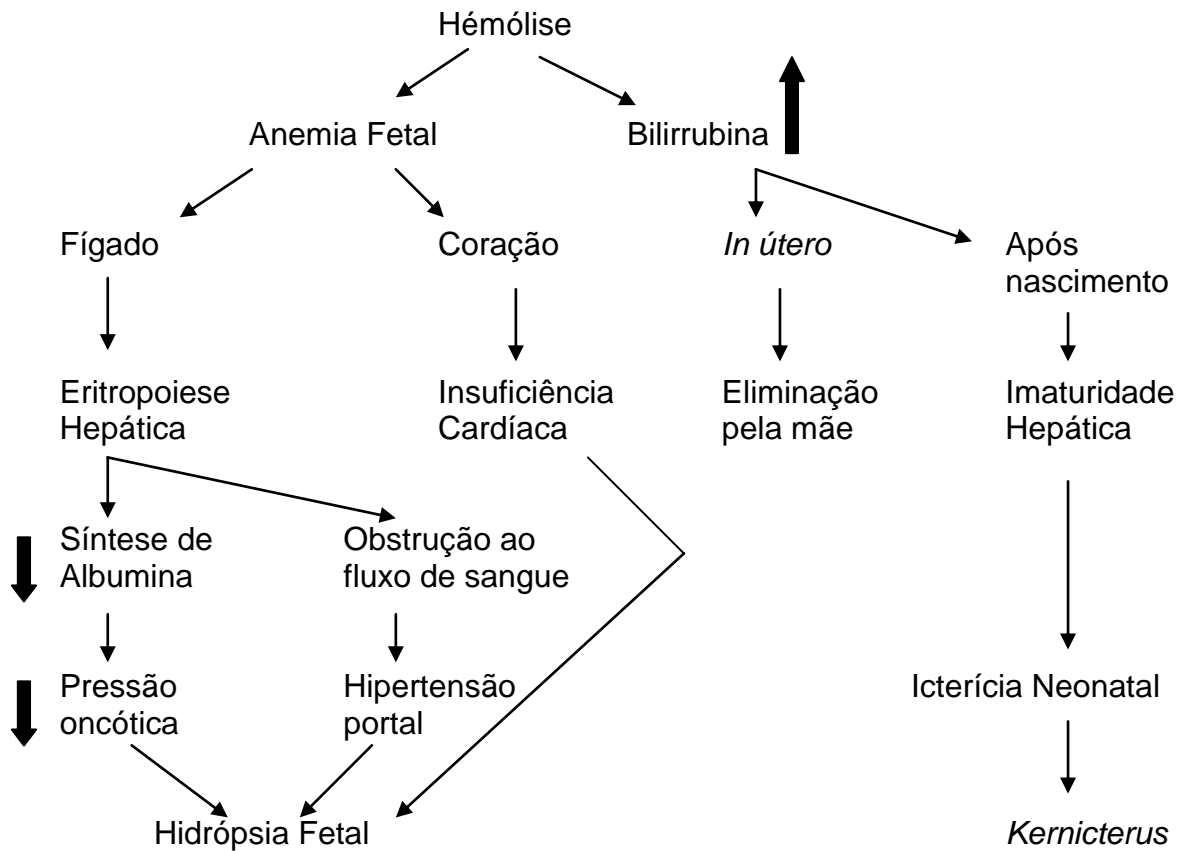


Figura 18 – Etiopatogenia da DHP

Inicialmente, atribuíam-se a hidropsia fetal à falência cardíaca. Actualmente, é aceite que se deve à hemólise severa, que determina uma eritropoiese extramedular extensa, localizada particularmente a nível do fígado e baço, mas também a nível dos rins e glândulas supra-renais (Baia, 2006). Os vasos hepáticos e a circulação hepática são afectados pela presença de aglomerados de células eritróides, que provocam uma obstrução portal e umbilical, diminuindo a perfusão placentar. (Liley, 2003; Koenig., 2000). Estas modificações interferem ainda com a função do hepatócito, a produção de albumina diminui, o que associada à disfunção hepática diminui a pressão intravascular oncótica, que descendo origina o aparecimento de edema generalizado, ascite, derrame pericárdico e pleural (anasarca) (Koenig., 2000; Baia, 2006).

O tratamento de hidropsia fetal com anemia requer o recurso à transfusão intrauterina de eritrócitos (Alarcón *et al.*, 2000). No entanto, fetos que sejam

hidrópticos antes deste procedimento, têm uma hipótese diminuída de sobrevivência, comparados com fetos não hidrópticos (Koenig., 2000).

Icterícia

Alguns recém-nascidos desenvolvem icterícia nos primeiros dias de vida, devido à incapacidade do fígado excretar a bilirrubina resultante da lise dos eritrócitos. Os recém-nascidos apresentam um elevado nível sérico de bilirrubina devido à baixa actividade da enzima hepática glucoroniltransferase, responsável pela sua excreção. Esta icterícia fisiológica apresenta normalmente o seu pico no segundo ou terceiro dia de vida e, normalmente, não requer intervenção.

A icterícia presente ao nascimento ou que ocorre nas primeiras 24 horas de vida, com um aumento dos níveis séricos da bilirrubina não conjugada, é patológica e está normalmente associada com DHP. Neste caso, o grau de icterícia está correlacionado com o grau de hemólise observado (Koenig, 2000; Ramasethu *et al.*, 2001; Waldron, 2005).

A presença de níveis elevados de bilirrubina indirecta nos recém-nascidos afectados pode levar ao desenvolvimento de uma encefalopatia, também denominada *Kernicterus*, causada pela deposição de pigmentos de bilirrubina, que provocam necrose neuronal nos gânglios basais e cerebelo (Ramasethu *et al.*, 2001).

A bilirrubina indirecta é insolúvel na água e circula no plasma ligada à albumina. Quando a capacidade de ligação à albumina é excedida, observa-se bilirrubina livre no plasma, que se difunde através dos tecidos. As membranas celulares são compostas por uma bicamada lipídica que favorece a sua difusão. O conteúdo lipídico das membranas do tecido nervoso é superior à dos outros tecidos, o que explica a alta afinidade da bilirrubina indirecta para este tecido, onde determina alterações na função das mitocôndrias e, a morte neuronal (Lissauer *et al.*, 1999). A encefalopatia é inicialmente marcada por prostração e hipotonia. Com o aumento da severidade da doença, os doentes podem apresentar sinais de disfunção cerebral, como hipertonicidade muscular, posição curvada ao deitar (opistótonos), convulsões, arritmia respiratória.

Cerca de 10% dos recém-nascidos com sinais e sintomas de *Kernicterus*, não sobrevivem. Os que sobrevivem apresentam lesões irreversíveis tais como atraso intelectual severo, paralisia cerebral, surdez, estrabismo, etc. (Lissauer *et al.*, 1999; Ramasethu *et al.*, 2001; Baia, 2006).

Com os avanços no controle dos efeitos da aloimunização nos fetos e recém-nascidos, esta situação – *Kernicterus* – no recém-nascido, resultante da DHP é cada vez mais rara (Koenig, 2000; Lissauer *et al.*, 1999).

2.8 - PROFILAXIA DA ALOIMUNIZAÇÃO

2.8.1 - Imunoglobulina Anti-D

Nos anos 60, estudos realizados em mulheres voluntárias RhD negativo permitiram verificar que quando injectadas com GV RhD positivo e IgG anti-D, não produziam Ac anti-D. Decidiu-se que a IgG anti-D passaria a ser administrada a mães RhD negativo, depois do parto de recém-nascidos RhD positivo, ou quando ocorria HFM na altura ou logo a seguir ao parto, como forma de prevenir a aloimunização materna (Scott, 2001). Por volta dos anos 70 passou a vigorar no programa de saúde pública, na profilaxia da DHP.

A imunização passiva com Ig anti-D previne a aloimunização de mulheres RhD negativo, quando administrada logo após exposição a GV fetais RhD positivo, e nas primeiras 72 h após o parto. A Ig anti-D “neutraliza” o Ag D presente na superfície dos eritrócitos fetais RhD positivo, que passaram para a circulação sanguínea materna, impedindo a resposta imune com produção de Ac anti-D (Urbaniak, 1998; Scott, 2001). Actualmente, sabe-se que esta administração apenas suprime a resposta imune primária, não tendo qualquer efeito nos indivíduos em que a imunização está já estabelecida, razão pela qual não está indicada a sua administração nas mulheres já sensibilizadas (Vicente *et al.*, 2003). A Ig anti-D não protege de outros Ac que não o anti-D e que podem causar DHP (Guideline, 2002).

Não existe uniformização na dose de Ig anti-D a administrar no pós-parto: no Reino Unido utilizam a dose de 100µg; na maior parte dos países Europeus

utilizam 200-250 µg; nos EUA e em Portugal 300 µg (Scott, 2001; Vicente, 2003). No Reino Unido, a introdução da profilaxia no pós-parto de 500UI (100µg) de Ig anti-D, intramuscular (num rácio de 25µg por 1 ml de GV fetais), reduziu o risco de aloimunização em 90%, ficando marcada por excepcionais resultados em termos de segurança e eficácia (Kumpel, 2001).

Depois da administração de uma dose de Ig, os eritrócitos fetais são eliminados da circulação materna num período que varia de algumas horas a alguns dias, dependendo da quantidade da HFM. O período da *clearance* esplénica varia com o volume de eritrócitos fetais a eliminar (Cortey *et al.*, 2006) (Fig 19).

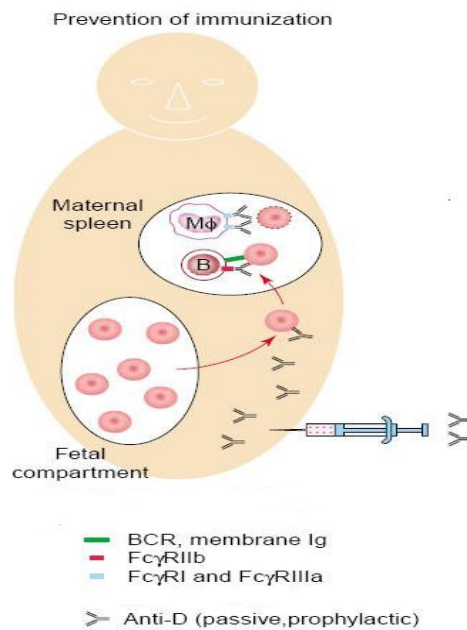


Figura 19 – Imunização Passiva

O mecanismo responsável pela imunossupressão não está ainda completamente esclarecido sendo aceites como prováveis as seguintes explicações:

- A supressão das células B especificamente produtoras de anti-D é mediada pela coligação do receptor Fc da IgG passiva e dos eritrócitos RhD positivos fetais. Este parece constituir o fenómeno essencial subjacente à profilaxia.

- A rápida destruição e *clearance* (a nível esplénico) dos eritrócitos RhD positivos fetais aos quais se ligou a IgG anti-D na circulação materna, é mediada por interacções com os macrófagos e células B que contribuem também para o efeito obtido com a profilaxia, diminuindo o número de células RhD positivas disponíveis para a apresentação antigénica (Wells *et al.*, 1991; Kumpel *et al.*, 2001; Scott, 2001).

O sucesso da profilaxia está directamente relacionado com a capacidade de reconhecer e quantificar os episódios de hemorragia transplacentar. É recomendado quantificar o volume de hemorragia feto-materna antes da administração da dose de Ig anti-D (Cortey *et al.*, 2006).

A HFM excessiva designa normalmente os incidentes em que o volume transferido de GV fetais para a circulação materna supera a capacidade de neutralização conferida pela dose de Ig anti-D utilizada, necessitando de uma dose adicional, capaz de assegurar a destruição e a *clearance* dos GV fetais (Robson *et al.*, 2005).

Mais de 50% das HFM excessivas ocorrem depois de partos normais, no entanto, existem outras circunstâncias clínicas com mais probabilidade de lhe estarem associadas, tais como: partos traumáticos, incluindo cesarianas; remoção manual da placenta; mortes intrauterinas; trauma abdominal durante o 3º trimestre de gestação; gravidez de gémeos (ao nascimento) e hidropsia fetal inexplicada (Guideline, 2002).

A dose de Ig anti-D a administrar é determinada de acordo com o nível de exposição aos eritrócitos RhD positivo e tem sido estabelecida com base no conhecimento de que 0,5 ml de concentrado de eritrócitos RhD positivo ou 1 ml de sangue RhD é neutralizado por, aproximadamente, 50 UI (10 µg) de IG anti-D. Nos casos de suspeita de uma hemorragia feto-materna de grande volume (> 4ml) que ocorre em 0,7-0,8% das mulheres, doses adicionais de anti-D devem ser administradas, 100 UI (20 µg) por 1 ml de sangue fetal (Infarmed, 2008).

A HFM é quantificada pelo teste Kleihauer-Betke (teste de eluição ácida) ou por citometria de fluxo. Embora esta última técnica seja mais específica (permite detectar eritrócitos fetais RhD positivo), reproduzível e precisa para grandes hemorragias, é mais dispendiosa e não está disponível na maioria dos hospitais.

O volume fetoplacentar aumenta de 25 ml às 19 semanas para 150 ml às 31 semanas, estimando-se que as HFM espontâneas aumentem de frequência e volume durante o decurso da gravidez, especialmente durante o 2º e 3º trimestres (Urbaniak, 1998).

A importância dada à Ig anti-D e à quantificação da HFM com potencial efeito sensibilizante, tem mais ênfase depois das 20 semanas de gestação (o volume sangue fetal não atinge 30 ml antes desta idade gestacional).

Na profilaxia pós-natal, o teste Kleihauer não permite calcular com rigor a dose necessária, mas sim identificar as grávidas que precisam de uma dose Ig anti-D adicional devido a HFM excessiva. Trata-se de um teste barato e de fácil realização. Porém, é apenas semiquantitativo e com fraca reprodutibilidade. Por outro lado, este teste é dirigido aos eritrócitos fetais, sem distinção do RhD.

Ou seja, são quantificados os eritrócitos fetais mesmo que RhD negativos. Quando não é possível utilizar técnicas mais sofisticadas, os resultados (devidamente integrados na clínica) constituem a única forma de confirmar e quantificar a HFM (Vicente *et al.*, 2003).

Deve ser colhida uma amostra de sangue materno em anticoagulante EDTA, logo a seguir ao parto (± 2 h) e proceder ao teste de Kleihauer, no sentido de identificar as grávidas com HFM excessivas. Para ajustar a dose de Ig anti-D a administrar, calcula-se

$$\text{Volume de sangue estimado (ml)} = \% \text{ eritrócitos fetais} \times 50$$

O nº de doses de Ig anti-D necessário determina-se dividindo o volume de sangue estimado por 30 (1 dose neutraliza 30 ml de sangue fetal). Deve ser arredondado às décimas e adicionada uma dose suplementar. Não se deve administrar mais que 4 doses de Ig anti-D IM em 24h. Se forem necessárias mais doses, deverão ser administradas no período das 72h após o parto. O teste de Kleihauer deve ser repetido 48-72h após a administração de Ig anti-D até obter o valor de 0% (AABB, 1999d).

Estão descritos casos em que os GV maternos apresentam níveis aumentados de hemoglobina fetal (HbF > 10,0-15,0%) (Robson, *et al.*, 2005), como sejam a persistência da HbF, a drepanocitose e a β -talassémia, e que se não forem previamente diagnosticadas e tomadas em consideração, implicam uma

sobrevalorização dos resultados. Nestas situações, uma dose de 500UI (100µg) deverá ser administrada mesmo que o teste Kleihauer ou a Citometria de fluxo não tenham permitido a diferenciação entre células fetais e maternas

Apesar da profilaxia no pós-parto, e de ao mesmo tempo que se administra Ig anti-D se utilizar o teste Kleihauer-Betke para estimar a quantidade de HFM e de se administrar doses suplementares após incidentes inesperados, verificou-se que continuavam a aparecer mães aloimunizadas, e a DHP continuava a ocorrer com a frequência de aproximadamente 1:1000 nascimentos.

Concluiu-se que as razões para tal facto poderiam ser:

- erros na tipagem do grupo RhD;
- esquecimento de administração da Ig;
- importante hemorragia transplacentar na gravidez ou no parto, para a qual a dose de Ig administrada não fora suficiente para neutralizar os Ac;
- existência de uma HFM espontânea e clinicamente silenciosa na gravidez (Urbaniak, 1998; Scott, 2001; Cotorruelo *et al.*, 2002).

A mais importante causa da aloimunização presentemente, é a imunização ocorrida durante a gravidez e que surge, aparentemente, sem ocorrência de nenhum evento sensibilizante (Guideline, 2002).

As HFMs indetectáveis são mais frequentes durante as últimas 12 semanas de gravidez, pelo que vários estudos indicam que a administração de Ig anti-D durante a gravidez, numa dose maior às 28 semanas (300µg) ou em duas doses menores às 28 e às 34 semanas (100µg) de gestação, pode prevenir a sensibilização das grávidas. (Pereira, *et al.*, 2007). A administração de Ig anti-D às 28 semanas de gestação em mulheres RhD negativo, é uma intervenção eficaz na prevenção da DHP, reduzindo o risco de aloimunização de 2 para 0,1%. A relação custo benefício é positiva se considerarmos as mortes fetais e neonatais evitadas, as deficiências prevenidas, o tratamento fetal, neonatal e também os custos indirectos relacionados com os problemas emocionais e familiares decorrentes desta doença (Circular normativa, 2007).

Existem duas preocupações em relação à garantia da segurança na profilaxia com Ig anti-D: o risco do aumento ou incremento da imunização materna por Ac anti-D e o efeito dos Ac anti-D passivos no feto. Em teoria, a existência de baixos

níveis de Ac anti-D passivos na circulação materna pode resultar num aumento da resposta imune primária, como foi observado em modelos experimentais, revelando uma acção oposta em relação ao que havia sido planeado. Na prática, utilizando mulheres voluntárias imunizadas, tal efeito não se observa.

A passagem transplacentar de Ig pode afectar o feto. Em teoria 10% da dose de 300µg (30µg) administrada à grávida passam para a circulação fetal.

Era esperado que os Ac anti-D provocassem anemia no feto, mas observações durante os ensaios efectuados não confirmam tal suspeita e, embora 28% dos fetos ABO compatíveis com a mãe, apresentem à nascença uma prova de antiglobulina directa positiva fraca, após a administração de uma dose de 300µg às 28 semanas de gestação, nenhum recém-nascido apresentou sinais de anemia ou hiperbilirrubinémia. A conclusão é que os Ac anti-D passivos, atravessam a placenta podendo interagir com as células fetais, provocando PADs positivas fracas, mas não o suficiente para provocar hemólise ou anemia no feto (Urbaniak, 1998).

A profilaxia pré-natal foi introduzida em muitos países, mas com alguma controvérsia devido ao aumento de produção de Ig que tal medida acarreta, uma vez que é administrada a todas as grávidas RhD negativas independentemente do feto ser RhD positivo ou não. O grupo RhD do feto não é normalmente conhecido na rotina a não ser após o parto.

A Ig anti-D pode ser administrada por via intramuscular (IM) ou endovenosa (EV), diferindo entre si na facilidade de administração e na velocidade com que se atingem os picos séricos. A biodisponibilidade dos anticorpos é imediata se a administração da Ig for por via EV e demora de um a dois dias se for por via IM, daí a importância da administração nas primeiras 72 horas (Cortey *et al.*, 2006). Na prática, a maioria dos países utiliza a via IM, pela facilidade de administração e porque os vários estudos feitos não mostraram quaisquer diferenças na eficácia da protecção auferida. Em Portugal a única formulação comercial disponível é na dose 1500 UI (300µg), que fornece protecção durante 12 semanas, neutralizando a transfusão feto-materna de 30 ml de sangue total (15 ml de eritrócitos fetais).

Caso não seja administrada na altura devida por circunstâncias excepcionais, alguma protecção é conferida se administrada até 10 dias após o evento sensibilizante (Bowman, 1985).

A Ig anti-D correntemente utilizada, é derivada do fraccionamento de plasma de indivíduos, cuidadosamente seleccionados, que foram sensibilizados por gravidez, transfusão ou por vontade própria para produzir Ac anti-D.

Para se obter um alto título de Ac anti-D policlonais, é necessário um grande número de dadores, pelo que são levantados alguns problemas éticos.

Têm que ser feitos todos os esforços no sentido de garantir que todos os GV utilizados na imunização são seguros e livres de qualquer organismo patogéneo. Os GV têm que ser mantidos em quarentena para garantir que não vão provocar nenhuma doença no dador. Ainda assim, é sempre possível o aparecimento de agentes infecciosos para os quais não existem testes disponíveis para o seu diagnóstico ou os que existem não são suficientemente sensíveis.

A doença da Variant Creutzfeldt-Jakob (vCJD) é um bom exemplo, para além de outras complicações, devidas à deliberada imunização, como: Ac anti plaquetários e Ac anti-leucócitos ou Ac contra outros Ag eritrocitários que não o D, que podem estimular e transformar uma futura terapêutica transfusional mais perigosa e grave para estes indivíduos. O plasma obtido de *pools* de dadores para produzir Ac anti-D pode também estar afectado em termos de transmissão de infecções. Entre 1991 e 1994, Ac anti-D produzidos na Irlanda foram responsáveis pela transmissão da hepatite C a 44 mulheres (Scott, 2001).

Embora os *pools* de plasma sejam purificados e inactivados por recurso à utilização de novas tecnologias e o risco de contaminação seja mínimo, a possibilidade de infecção devida a príões ou vírus desconhecidos ou emergentes e a outros agentes patogénicos, permanece.

A Ig anti-D é um bem limitado, caro e a logística de administração de uma ou mais doses como profilaxia pré - natal levou a uma maior e mais dispendiosa produção. A sua administração pode ainda provocar efeitos adversos e muitas mulheres têm alguma resistência em aceitar este tipo de tratamento (Kumar, 2008).

É recomendado que, sempre que seja administrada Ig anti-D, o nome e o nº do lote do produto sejam registados, de modo a manter um registo dos lotes usados (Infarmed, 2008).

Uma das alternativas à imunização de dadores voluntários, seria recorrer a uma fonte segura e efectiva de Ac anti-D monoclonais (mAb).

Quando for possível a produção de um produto monoclonal *in vitro*, a partir de linhas celulares “seguras”, poderá evitar-se a exposição a infecções provenientes de produtos de natureza humana (Scott, 2001).

Recentemente foi desenvolvido um Ac anti-D monoclonal recombinante (MonoRho), de natureza inteiramente humana, que é reactivo com todos os fenótipos RhD e variantes, incluindo RhD^{VI}. Embora os estudos efectuados já tenham concluído da sua excelente tolerabilidade, segurança e bom tempo de semi-vida, novos estudos clínicos continuam a ser implementados no sentido de abordar a sua eficácia na eliminação dos GV RhD positivos fetais e de prevenir a aloimunização (Bichler *et al.*, 2004). Os Ac anti-D monoclonais são ainda escassos em termos de fornecimento, o seu custo é elevado e as preparações existentes ainda não estão em uso clínico (Bowman, 2007).

2.8.2 - Esquema de conduta de profilaxia ao longo da gravidez

No início da gravidez, ou idealmente numa consulta pré-concepcional, todas as mulheres devem realizar uma tipagem do grupo sanguíneo e uma PAI, para eliminar a hipótese da grávida já ter desenvolvido previamente uma aloimunização ao Ag D ou a qualquer outro Ag com significado clínico (Cortey *et al.*, 2006). As grávidas quando RhD negativas com PAI positiva devem ser encaminhadas para o hospital para uma consulta de alto risco, com vista a um tratamento diferenciado e a uma vigilância e seguimento da gravidez adequado à prevenção da DHP (Costa, 2003; Araújo *et al.*, 2003). Se a PAI for negativa, as grávidas devem ser informadas das implicações em termos de sensibilização e da importância de efectuarem profilaxia com Ig anti-D. A administração da Ig anti-D é condicionada pelo prévio consentimento livre e esclarecido por parte da grávida. Este esclarecimento deve abranger informação relativa ao eventual risco associado à utilização de hemoderivados, de natureza humana, e à possibilidade da não administração se o pai biológico for RhD negativo. Deve repetir-se a PAI às 24-26 semanas de gestação. Se a PAI for negativa administrar, às 28 semanas, Ig anti-D (300 µg). Depois da administração de Ig,

não se deve repetir mais a PAI. A Ig anti-D tem uma semi-vida de 21 dias, mas pode manter-se em circulação em titulações mínimas durante períodos superiores (Costa, 2003). A presença de Ac passivos, dependendo da sensibilidade da técnica utilizada, pode dar uma PAI positiva num intervalo entre 2 a 4 meses (Cortey *et al.*, 2006).

Como pode ser difícil ou impossível distinguir entre Ac anti-D passivos e Ac anti-D resultantes de uma imunização no final da gravidez, ou na altura do parto, deve ser ainda administrada à grávida após o parto e no caso de recém-nascido ser RhD positivo, Ig anti-D (300 µg), nas 72h a seguir ao parto (Guideline, 2002).

A administração de Ig anti-D deve ser efectuada na sequência de qualquer evento com risco de HFM. Sempre que há dúvida na sua administração, pode e deve ser efectuado um teste Kleihauer para orientar a conduta (Costa, 2003).

Outras situações já estabelecidas para administração de Ig anti-D em grávidas RhD negativas incluem:

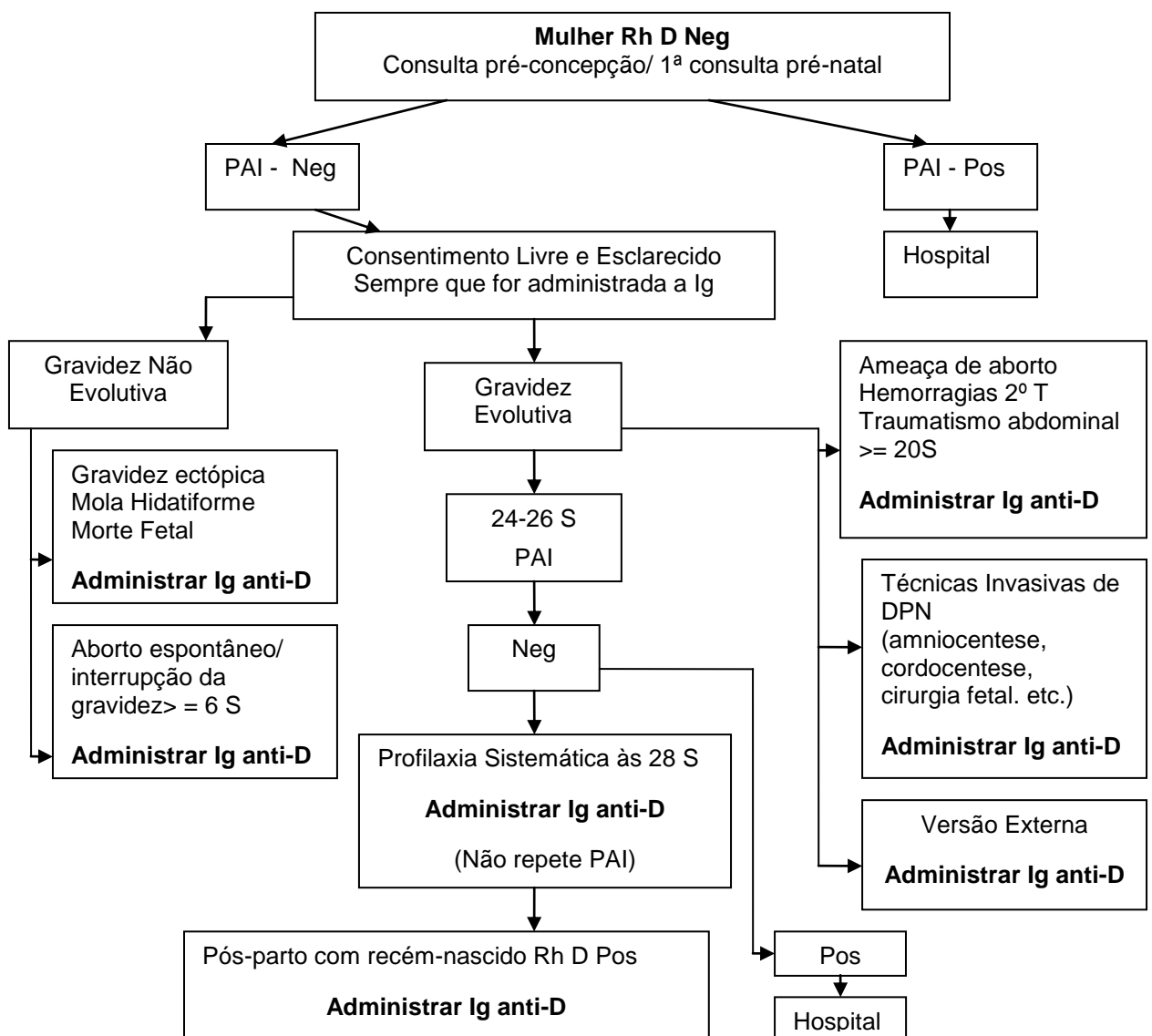
- Abortos: interrupção médica da gravidez; aborto espontâneo, após 6 semanas de gestação; gravidez ectópica ou gravidez molar; ameaça de aborto com metrorragias após as 12 semanas, no caso de metrorragias intermitentes, repetir administração de Ig anti-D de 6 em 6 semanas
- Hemorragias da 2ª metade da gravidez (descolamento da placenta, placenta prévia)
- Técnicas invasivas de diagnóstico/terapêutica fetal: amniocentese, cordocentese, biópsia das vilosidades, inserção de drenos, redução embrionária
- Cirurgia/trauma abdominal (inclui a versão externa)
- Morte fetal

A dose a aplicar será determinada pela idade gestacional. Se a gravidez terminar entre as 6 e as 12 semanas de gestação, uma dose de 50 µg será suficiente para proteger a grávida contra o pequeno volume fetal (<2,5 ml) do 1º trimestre.

Em Portugal, a dose 50 µg, não está actualmente comercializada, no entanto as Instituições, por autorização da Direcção Geral de Saúde podem, anualmente, tal como para outros medicamentos, fazer o pedido de autorização especial, para a sua aquisição. Este procedimento não só reduzirá em 6 vezes a quantidade de

hemoderivado administrado, como também os seus custos (Circular Informativa, 2007).

Se a grávida já estiver sensibilizada para o Ag D não se deve administrar Ig anti-D, porque aumenta a gravidade da aloimunização. Quando a Ig foi administrada previamente (após amniocentese ou por metrorragias, p.ex.) a profilaxia deve ser repetida 12 semanas após a primeira administração, não sendo, no entanto, necessário fazê-lo antes das 28 semanas de gestação (Cortey, 2006; Circular Normativa, 2007).



3 - DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO FETAL POR MÉTODOS NÃO INVASIVOS VERSUS PROFILAXIA DA ALOIMUNIZAÇÃO

A aplicação mais importante da determinação pré-natal do genótipo sanguíneo fetal, utilizando métodos não invasivos, é a previsão do fenótipo fetal em grávidas já imunizadas contra o Ag D.

Este teste de diagnóstico efectuado no DNA fetal livre, presente no plasma materno, utilizando técnicas de biologia molecular (PCR) constituiu um grande avanço a nível clínico.

A genotipagem fetal também é útil para testar todos os fetos de grávidas RhD negativo, evitando o tratamento pré-natal com Ig anti-D em 40% de grávidas RhD negativo portadoras de fetos RhD negativo (Daniels *et al.*, 2007; Bowman *et al.*, 2007; Gautier *et al.*, 2005).

Por outro lado, fetos RhD negativos, de grávidas a quem foi administrada a profilaxia anti-D, são expostos à Ig anti-D sem qualquer benefício. Embora a quantidade de Ac a que são expostos seja muito menor do que a que ocorre na aloimunização natural, é extremamente improvável que produza algum efeito adverso não conhecido. Todavia, não existem estudos que demonstrem as consequências de tal procedimento (Urbaniak, 1998).

A disponibilidade de resultados precoces e fiáveis que permitam a identificação das mulheres RhD negativo com risco de sensibilização, tem a finalidade de planear testes posteriores e um esquema profilático pré-natal, mais eficiente na prevenção da aloimunização ao Ag D (Gautier *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2003).

É previsível que a implementação pré-natal “em massa” dos testes para a determinação do genótipo fetal, utilizando o plasma materno, leve a uma substancial redução no uso da Ig anti-D que é um produto caro e um bem limitado (Finning *et al.*, 2008).

Enquanto isso não se verifica, tem-se tentado implementar novas estratégias no sentido de manter ou aumentar a provisão da Ig anti-D, como seja: o uso de doses menores de Ig em certas circunstâncias, como por exemplo, no primeiro trimestre de gestação; uso de testes capazes de quantificar correctamente a HFM; implementação de *guidelines* para o uso correcto de Ig anti-D (Gautier *et al.*, 2005).

A nível económico, a análise da aplicabilidade da genotipagem fetal tem sido orientada pelos seguintes vectores/questões:

- Será o risco e o custo da Ig anti-D tão significativo que seja conveniente utilizar a determinação da genotipagem fetal?
- A administração da Ig anti-D está associada a um baixo risco clínico depois da implementação dos métodos actualmente utilizados na sua preparação e controlo, que garantem que os riscos de transmissão de infecções, embora existentes, são pouco expressivos. Se a prevenção de riscos não é um argumento convincente em favor da genotipagem fetal, podemos, pelo menos, dizer que este tipo de teste será rentável?
- Seria a realização de testes de genotipagem fetal em todas as grávidas RhD negativo, seguido de administração de Ig anti-D apenas nos casos necessários, mais eficiente do que administrar a Ig a todas as mulheres RhD negativo?

Actualmente existe uma noção generalizada de que, considerando apenas as variáveis económicas, a determinação do genótipo fetal por métodos não invasivos apresenta-se menos atractiva do que a administração da Ig anti-D a todas as grávidas RhD negativo.

Neste contexto, pretende-se, considerando apenas os custos imputados à:

- Ig anti-D que constam da tabela de preços implementada pelo IGIF para as Instituições e Serviços integrados no Serviço Nacional de Saúde;
- determinação do genótipo fetal que constam da tabela de preços das Instituições e Serviços integrados no Serviço Nacional de Saúde – Diário da República, 1ª Série - nº 21 – 30 de Janeiro 2009; e
- pesquisa de anticorpos irregulares que constam da tabela de preços das Instituições e Serviços integrados no Serviço Nacional de Saúde – Diário da República, 1ª Série - nº 21 – 30 de Janeiro 2009;

avaliar qual das alternativas é economicamente mais eficiente, tendo em consideração, nomeadamente, o seu custo unitário estimado.

4 - Análise económica da determinação do genótipo fetal RHD por métodos não invasivos, utilizando amostras de plasma materno *versus* profilaxia da aloimunização.

População alvo: Grávidas RhD negativo com gestações normais que não necessitam de recorrer a métodos de diagnóstico invasivo

Objectivo: Clarificar a nível puramente económico e considerando apenas os custos imputados à Ig anti-D administrada, à determinação pré-natal do genótipo fetal e à pesquisa de anticorpos irregulares, qual das seguintes metodologias apresenta um custo estimado inferior:

- Aplicação do procedimento actual com administração Ig anti-D ou
- Aplicação do método que consiste na realização do teste de genotipagem fetal numa amostra de sangue materno

Em termos genéricos, os dois métodos caracterizam-se da seguinte forma:

a) Ig anti-D:

São efectuados 2 testes de pesquisa de anticorpos irregulares, um no início da gravidez e outro antes da administração de Ig às 28 semanas de gestação.

É administrada a Ig anti-D a todas as grávidas RhD negativo às 28 semanas. Aquando do nascimento, no caso do recém-nascido ser RhD positivo, é-lhe administrada nova dose de Ig.

b) Teste de genotipagem fetal:

No início da gravidez é efectuado um teste de pesquisa de anticorpos a todas as grávidas RhD negativo sendo também sujeitas ao teste de genotipagem fetal, identificando-se os casos em que o feto é igualmente RhD negativo. Nos casos em que tal não se verifique, i.e., o feto seja RhD positivo, é efectuado um 2º teste

de pesquisa de anticorpos e administrada a Ig anti-D às 28 semanas e no nascimento.

Para efeitos da comparação supra referida, será definido o seguinte quadro de pressupostos:

1. Número de grávidas RhD Negativo: 10.000 (“nRh (D)N”)
2. Custo unitário da Ig: EUR 80,6715 (“CIg” – sendo CIg_{28} o custo unitário da Ig às 28 semanas e CIg_N o custo unitário da Ig administrada após o nascimento)
3. Custo unitário das pesquisas de anticorpos irregulares: EUR 4,65 (“EX”)
4. Custo unitário do teste de genotipagem fetal: EUR 53,80 (“CDNA”)
5. Proporção de recém-nascidos RhD positivos: 60% dos casos em que a mãe é RhD negativo

Neste contexto, o custo total estimado do procedimento actualmente adoptado pode ser dado pela seguinte expressão:

$$\text{Custo Total Estimado} = \left\{ \begin{array}{l} nRh (D)N \times CIg_{28} \\ + \\ nRh (D)N \times 2 \times EX \\ + \\ nRh (D)N \times 60\% \times CIg_N \end{array} \right\}$$

Explicitando de forma parcelada, a componente $nRh (D)N \times CIg_{28} + nRh (D)N \times 2 \times EX$ representa o custo total suportado com a Ig administrada e os exames efectuados por todas as mulheres grávidas RhD negativo.

Por outro lado, a expressão $nRh (D)N \times 60\% \times CIg_N$ ilustra o custo estimado da Ig administrada ao nascimento apenas aos 60% de casos em que, sendo a mãe RhD negativo, o recém-nascido é RhD positivo.

No quadro dos pressupostos supra definidos, para 10.000 grávidas RhD negativo, o custo total estimado ascende a EUR 1.383.744, i.e., o custo médio estimado é de EUR 138,37 por cada grávida RhD Negativo.

Por outro lado, o custo total estimado recorrendo ao teste de genotipagem fetal poderá ser dado pela seguinte expressão:

$$\text{Custo Total Estimado} = \left\{ \begin{array}{l} n\text{Rh (D)N} \times [\text{CDNA} + \text{EX}] \\ + \\ n\text{Rh (D)N} \times 60\% \times [\text{CIg}_{28} + \text{EX} + \text{CIg}_N] \end{array} \right\}$$

Explicitando de forma parcelada, a componente $n\text{Rh (D)N} \times [\text{CDNA} + \text{EX}]$ representa o custo total suportado com o teste de genotipagem fetal e a pesquisa de anticorpos irregulares realizados a todas as mulheres grávidas RhD negativo.

Por outro lado, a expressão $n\text{Rh (D)N} \times 60\% \times [\text{CIg}_{28} + \text{EX} + \text{CIg}_N]$ ilustra o custo estimado das Igs administradas e do 2º teste de pesquisa de anticorpos irregulares efectuado apenas aos cerca de 60% de casos em que, sendo a mãe RhD negativo, o recém-nascido é RhD positivo

No quadro dos pressupostos supra definidos, para 10.000 grávidas RhD negativo, o custo total estimado ascende a EUR 1.580.458, i.e., o custo médio estimado é de EUR 158,05 por cada grávida RhD negativo.

5 - CONCLUSÃO

Em face do exposto, demonstra-se que, considerando o quadro de pressupostos definido, a realização do teste de genotipagem fetal revela-se cerca de EUR 19,67 mais dispendioso do que o procedimento actualmente adoptado - administração de Ig anti-D por cada grávida RhD negativo.

De salientar que, caso o custo unitário do teste de genotipagem fetal se reduza para um valor inferior a EUR 34,2 (face aos considerados EUR 53,80 – decréscimo de aproximadamente 36,4%), a realização do referido teste mostrar-se-ia economicamente preferível ao método actualmente adoptado.

A alta taxa de exactidão encontrada nos testes na previsão do gene RHD fetal resultaram na implementação em maior escala da determinação do genótipo fetal por recurso aos métodos não invasivos. Embora estes testes e as suas metodologias ainda estejam configuradas a um número restrito de laboratórios especializados (Gautier *et al.*, 2005), antecipa-se que num futuro próximo, com a automatização e standardização de protocolos e com o desenvolvimento de uma tecnologia mais robusta e segura, seja possível a sua implementação de uma forma mais universal, o que levará a uma diminuição do preço por teste (Gautier *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2003).

Não obstante, são necessários estudos económicos em larga escala para a avaliação da implementação da genotipagem fetal RHD, por métodos não invasivos, na rotina da maioria dos laboratórios.

A avaliação económica depende ainda de cada país, dado ser necessário avaliar quais as *guidelines* que regem os procedimentos em causa e se estas estão devidamente implementadas.

Abordando o problema através de uma visão meramente economicista, a administração de Ig anti-D a todas as mulheres RhD negativo continua a ser actualmente a estratégia mais rentável.

Porém, abordando o problema através de uma visão humanista, convém lembrar que não existe necessidade de administrar Ig profilática pré-natal a

grávidas com fetos RhD negativo depois de sujeitas a potenciais eventos sensibilizantes como por exemplo a amniocentese. Por outro lado, sendo o teste suficientemente preciso, não há necessidade de recorrer a tipagem serológica do RhD nas células do cordão após o nascimento.

Em segundo lugar, a Ig anti-D existe em quantidade limitada, proveniente do plasma de voluntários que foram imunizados com GV RhD positivo, sendo uma questão ética sobre a imunização de pessoas com produtos sanguíneos para a produção de uma droga cuja utilização nem sempre é essencial.

Em terceiro lugar, e o mais importante, trata-se de eliminar o tratamento não necessário de grávidas com produtos de natureza humana com os inconvenientes associados.

Adicionalmente, não são despiciendo os encargos incorridos pelos serviços de sangue com a finalidade de garantir a segurança do abastecimento dos produtos sanguíneos derivados do plasma humano (Avent, 2008; Daniels *et al.*, 2009). Neste sentido, o incremento progressivo da utilização de técnicas baseadas na genotipagem fetal permitira uma mitigação dos referidos encargos, potenciando as vantagens económicas associadas à nova metodologia.

Em face do supra exposto, e embora não exista nenhum estudo publicado que englobe as perspectivas económica e humanista, é possível depreender que uma das principais vantagens da aplicação da genotipagem fetal consiste na sua capacidade de aliar um custo efectivo expectavelmente decrescente com uma significativa redução de riscos desnecessários para a saúde pública.

Neste contexto, dado que os direitos de propriedade intelectual associados à genotipagem fetal foram concedidos a nível mundial, espera-se que os progressos neste campo – e bem assim a massificação da utilização da técnica – não sejam dificultados por questões meramente jurídicas (Daniels *et al.*, 2009).

Por fim, importa ainda salientar o papel do Estado na implementação de técnicas não invasivas que permitam reduzir a exposição da população a riscos desnecessários.

Deste modo, compete ao Estado o incentivo ao desenvolvimento tecnológico nesta matéria e no contexto do sector da Saúde, a revisão da gestão da despesa pública em saúde e a sensibilização dos clínicos e de todos os profissionais do sector, no sentido de garantirem uma melhor prestação de serviços numa área

tão sensível como a do diagnóstico pré-natal e que levanta tantos problemas de natureza ética.

BIBLIOGRAFIA

- a) AABB-American Association of Blood Banks, Technical Manual em "Immunology" 13ª ed., cap. 11:22-250, 1999a
- b) AABB-American Association of Blood Banks, Technical Manual, em "The Rh System" 13ª ed., cap. 14:295-313, 1999b
- c) AABB-American Association of Blood Banks, Technical Manual, em "Initial Detection and Identification of alloantibodies to Red Cell Antigens" 13ª ed., cap. 19:389-418, 1999c
- d) AABB-American Association of Blood Banks, Technical Manual em "Perinatal Concerns in Transfusion Practice" 13ª ed., cap. 23:495-512, 1999d
- Alarcón PA *et al.*, "Erythropoiesis, red cells, and the approach to anemia" em "Hematologic Problems of the Neonate", R. D.Christensen., 2000, 1ª ed., cap. 3:40-53, 2000
- Araújo F *et al.* "Determinação pré-natal do genótipo RHD por métodos não invasivos" *Progr Diag Trat Prenat* 15(3): 126-132, 2003
- Araújo F, "As Funções do Grupos Sanguíneos" em "ABO Revista de Medicina Transfusional", nº 24:7-17,2005
- Roman AS *et al.* "Complicações do final da gravidez" em "Obstetrícia e Ginecologia – Diagnóstico e tratamento" Alan H. DeCherney *et al.*, 9ª ed., cap. 15: 233-245, 2005
- Avent ND "RHD Genotyping from Maternal Plasma: Guidelines and Technical Challenges" em *Methods in Molecular Biology*,: Prenatal Diagnosis 444, cap. 14: 185, 2008
- Baia Fátima "Doença Hemolítica Perinatal", *Revista Portuguesa de Ciências Biomédicas*, 1:6-21, 2006
- Bennett PR *et al.* "Prenatal Determination of Fetal RhD Type by DNA Amplification", *New England Journal of Medicine*, 329:607-610, 1993
- Bichler J *et al.* "Pharmacokinetics and safety of recombinant anti-RhD in healthy RhD-negative male volunteers" *Transfusion Med.*, 14(2):165-171, 2004
- Bischoff FZ, *et al.* "Noninvasive determination of fetal RhD status using fetal DNA in maternal serum and PCR" [J Soc Gynecol Investig.](#); 6(2):64-9., 1999
- Bowman JM *et al.* "Fetomaternal transplacental haemorrhage, during pregnancy and after delivery" *Vox Sang* 51(2):117-121, 1986

Bowman JM “Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD1” *Transfusion Clinique et Biologique* 14:572–577, 2007

Calhoun DA, D.O, “Hematologic Aspects of the Maternal-fetal Relationship” em “Hematologic Problems of the Neonate”, R. D.Christensen., 2000, 1ª ed., cap.. 6:91, 2000

Catálogo de Aprovisionamento Público da Saúde - IGIF

Chiu RWK *et al.* “Effects of blood processing protocols on fetal and total DNA quantification I maternal plasma” *Clin Chem* 9: 1607-1613, 2001

Circular Informativa nº 22/SR “Aquisição de Imunoglobulina anti-D na dosagem de 50 µg” Direcção Geral de Saúde, 2007

Circular Normativa nº 2 “Profilaxia da Isoimunização Rh” Direcção Geral de Saúde, 2007

Clóvis P. “Enfermedad Hemolítica Perinatal”. López Borrasca A. Ed. Enciclopedia Iberoamericana de Hematología . Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca 424-438, 1992

Connie *et al.*, “The Structure and Function of the Rh antigen Complex” em *Semin Hematol.*; 44(1): 42–50, 2007

Cortey A *et al.* “Prevention de l’allo-immunisation rhésus-D foeto-maternelle. Aspects pratics” *J de Gineco Obstet et biologie de la reproduction* 35, S1:123-130, 2006

Costa, Maternidade Alfredo da “Profilaxia da Isoimunização RhD” em “Protocolos de Actuação - Actualizações”, 2003

Cotorruelo C, *et al.* “Early detection of RhD status in pregnancies at risk of hemolytic disease of the newborn”. *Clin Exp Med*; 2(2):77-81, 2002.

Daniels G *et al.* “Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn”, *Vox Sanguinis* 87:225-232, 2004

Daniels G. *et al.*, “Fetal blood group genotyping. Present and future”. *Ann N Y Acad Sci* 1075: 88-95, 2006

Daniels G. *et al.* “Fetal RhD genotyping: a more efficient use of anti-D immunoglobulin” *Transfusion Clinique et Biologique* 14 (6): 568-571, 2007

Daniels G. *et al.* “The Rh blood group system” em “Essential Guide to Blood Groups” 1ª ed.. cap. 4: 33-44, 2007

Daniels G *et al.* “Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects”, *Prenat Diagn*, 29:101-107, 2009

Diário da República, 1ª Série-nº21 “Tabela de preços das Instituições e Serviços Integrados no Serviço Nacional de Saúde” 30 de Janeiro 2009

Duran José *et al.* “Distribuição dos Grupos Sanguíneos na População Portuguesa” em “ABO Revista de Medicina Transfusional”, nº 29:5-17,2007

Finning K *et al.* “Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study” *BMJ*; 336: 816-818, 2008

[Finning K](#), *et al.* “The use of maternal plasma for prenatal RhD blood group genotyping”, [Methods Mol Biol.](#), 496:143-57, 2009

Flegel WA *et al.*,”Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to Practice” *Transfusion Medicine*, 8: 281–302, 1998

Gautier *et al.*,”Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: A two-year experience” *American Journal of Obstet and Gynecolo* 192: 666–669, 2005

Guideline “Use of Anti-D immunoglobulin for Rh Prophylaxis (Green-top 22) Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 2002

Hilden JO *et al.*,”HLA phenotypes and severe Rh (D) immunization”. *Tissue Antigens* 46:3131-315, 1995

Hoffbrand AV *et al.*, “Haemolytic disease of the newborn” em “Postgraduate Haematology” 5ª ed., cap. 16: 270-275, 2005

Infarmed, Folheto informativo”WinRho SDF, 600 UI, pó e solvente para solução injetável ou para perfusão Imunoglobulina humana anti-D”, 2008

Jonathan Gillen-Goldstein *et al.* “Métodos de Avaliação da Gestão de Risco” em “Obstetrícia e Ginecologia – Diagnóstico e tratamento” Alan H. DeCherney *et al.*, 9th ed. cap. 13: 211-219, 2005

Kenneth J.Moise, JR “The fetus with Immune Hydrops” em Harrison “The Unborn Patient, the art and science of fetal therapy”, cap. 34: 513-522, 2001

Koenig, JM, M.D.,”Evaluation and treatment of Erythroblastosis Fetalis in the Neonate” em “Hematologic Problems of the Neonate”, R. D.Christensen., 2000, 1ª ed., cap. 10:185-203, 2000

Kumar S “Universal RHD genotyping in fetuses” *BMJ* 336: 783-784, 2008

Kumpel BM *et al.*, “Mechanism of anti-D-mediated immune suppression-a paradox awaiting resolution?” *Trends in Immunology* 22 (1):26-31, 2001

Liley HG, “Immune Hemolytic Disease”, em “Hematology of Infancy and Childhood”, Nathan and Oski’s volume1, 6ª ed., cap. 3:56-80, 2003

Lissauer T. *et al.* "Perinatal medicine" em "Illustrated Textbook of Pediatrics", 2ª ed.: 67-82, 1999

Lissauer T. *et al.* "Neonatal medicine" em "Illustrated Textbook of Pediatrics", 2ª ed.: 83-100, 1999

Lo YMD *et al.* "Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum", *Lancet*; 350:485-487, 1997

Lo YMD "Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma" *Am Journal Hum Genet* 64:218-224, 1999

Lo YMD "Fetal RhD genotyping from maternal plasma" *Ann Med* 31:308-312, 1999

[Mannessier L](#) "Immunohematologic surveillance of the pregnant woman and the new prevention policy of anti-RH1 allo-immunization", *Transfusion Clinique et Biologique* 14, 1:112-119, 2007

[Minon JM](#), *et al.*, "New approaches to prenatal diagnosis of rhesus incompatibility" *Revue Médicale de Liège*, 61(11):756-62, 2006

Moser, MI *et al.* "Avaliação Genética de discrepâncias Serológicas Rh D" em "ABO Revista de Medicina Transfusional", nº 35:79,2008

Muller S *et al.*, "The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible" *Transfusion Practice* 48:2292-2299, 2008

[Neil D. et al.](#), "The Rh blood group system: a review ", em *Blood* 95, 2:375-387, 2000

Nelson M. *et al.* "Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma" *Vox Sanguinis* 80; 112-116, 2001

Nicolaides KH *et al.*, " Management of Red Cell Isoimmunized Pregnancies " em " Textbook of Perinatal Medicine " *Asim Kurjak et al.*, Volume 2, 1ª ed, cap. 99: 1073-1078,1998

Norte, Cláudia *et al.* " Incidência de Aloimunização nos doentes do Serviço de Imunohemoterapia do Centro Hospitalar do Baixo Alentejo" em "ABO Revista de Medicina Transfusional", nº 32:39,2007

Pereira JC *et al.* "Prenatal determination of the fetal RhD blood group by multiplex PCR: a 7-year Portuguese experience", *Prenatal Diagnosis*, 27:633-637, 2007

Ramasethu J *et al.*, "Alloimmune Hemolytic Disease of the Newborn", em "Williams Hematology", Ernest Beutler *et al.*, 6ª ed., cap. 58:665- 672, 2001

Ramos Paulo, "Antigénio RH D: Nomenclatura, Reagentes e Técnicas de Grupagem (Ortho Clinical Diagnostics)" em "ABO Revista de Medicina Transfusional", nº 32: 13-17,2007

Remington et. al., "Developmental Immunology and Role of Host Defences in Susceptibility to Infection", em "Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant", 6ª ed., cap. 4:140-141, 2006).

Robson SC *et al.*, "Anti-D immunoglobulin in RhD prophylaxis" *An International Journal of Obstetrics and Gynecology*, 105(2): 129-134, 2005

Roitt IM et al "Prophylaxis" em "Essential immunology", 10ª ed., cap.14: 281, 2001

Rouillac C *et al.*, "Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD1" *Transfusion Clinique et Biologique* 14:572–577, 2007

Schoot, CE *et al.*, "Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status" *Seminars in Fetal e Neonatal Medicine* 13:63-68, 2008

Scott ML, "Monoclonal anti-D for immunoprophylaxis" *Vox Sanguinis*; 81(4):213-218, 2001

Singleton BK *et al.*, "The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype" *Blood* 95:12-18,2000

Tonn T," Sensitive Determination of the Rh D Genotype in Mixed Samples Using Fluorescence-Based Polymerase Chain Reactio", *Vox Sanguinis* 72:177-181, 1997

Urbaniak SJ "The scientific basis of antenatal prophylaxis" *BJ of Obstet and Gynecol*, 105 (18): 11-18, 1998

Urbaniak *et al.*, "RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn" *Blood Reviews*, 14:4-61, 2000

Valdês MEA, "Citopenias secundarias a aloimunización materna" *Rev Cubana Hematol Inmunol Med Transf* ;22(3), 2006

Van den Veyver *et al.* "Fetal RhD typing by polymerase chain reaction in pregnancies complicated by rhesus alloimmunization", *Obstet Gynecol*; 88:1061-1067, 1996

Van der Schoot CE *et al.*, "Non-invasive antenatal RHD typing" [Transfusion Clinique et Biologique](#), [13 ; 1-2](#) :53-57, 2006

Vicente LF *et al.*, "Profilaxia da isoimunização RhD: uma proposta de protocolo" *Acta médica Portuguesa*; 16: 225-260, 2003

Wagner FF *et al.*,"RHD Positive Haplotypes in D Negative Europeans".*BMC genetics* 2:10, 2001

Wagner FF *et al.*,"Review: the molecular basis of the RH blood group phenotypes" *Immunohematology*; 20: 23-36, 2004

Waldron PE *et al.*, “Hemolytic disease of fetus and newborn” em “Neonatal Hematology”, Pedro de Alarcón and Eric Werner, cap. 6:91-131, 2005

KDW, Editorial Comment “Effect of High Throughput RHD Typing of Fetal DNA in Maternal Plasma on Use of Anti-RhD Immunoglobulin in RhD Negative Pregnant Women: Prospective Feasibility Study.” *Obstetrical & Gynecological Survey*. 63(8):499-500, 2008.

Wells JV *et al.*, “Hematologic Diseases – Hemolytic Disease of the Newborn” em “Basic and Clinical Immunology” 7^a ed. cap. 38: 481-483, 1991