Genotipagem RhD fetal não invasiva no acompanhamento de gestantes RhD negativo

Non invasive Fetal RHD Genotyping in management of pregnant RhD negative women

Luciana Cayres Schmidt[1]
Marina Martins Lobato[2]
Mário Dias Corrêa Júnior[3]
Antônio Carlos Vieira Cabral[4]
Marina Alves Faria[5]

Palavras-chave
Anemia
Gestantes
Isoimunização Rh
Sistema do Grupo Sanguíneo Rh-Hr

Keywords
Anemia
Pregnant women
Rh Isoimmunization
Rh-Hr Blood-Group System

Resumo O acompanhamento de gestantes de fenótipo RhD negativo é baseado na premissa de que seus fetos podem estar em risco de desenvolver a doença hemolítica perinatal (DHPN) ou eritroblastose fetal, trazendo sérios riscos ao feto em decorrência de hemólise, com consequente anemia, hidropsia e, por vezes, óbito intrauterino. Procedimentos invasivos como amniocentese ou cordocentese podem ser utilizados para se inferir o fenótipo RhD fetal, entretanto, oferecem riscos ao feto e à gestante. Nos últimos anos, o conhecimento sobre a genética dos grupos sanguíneos e o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular tem permitido a inferência de fenótipos de grupos sanguíneos a partir da detecção do material genômico. Inicialmente, a genotipagem do DNA fetal para o gene RhD era feita a partir de amostras de amniócitos ou de vilosidades coriônicas. No entanto, por tratar-se de testes invasivos, traziam risco ao feto e à gestante. A possibilidade de se obter DNA fetal a partir do plasma materno foi um grande avanço na prática clínica, por ser um procedimento não invasivo e, portanto, isento de risco. Esta revisão apresenta os princípios da técnica e os resultados de diferentes protocolos para genotipagem RhD fetal (publicados ao longo dos anos) e qual o seu propósito no acompanhamento das gestantes RhD negativo.

Abstract The RhD negative pregnant women management has been based on the fact that their fetuses may be at risk of developing hemolytic diseases (DHPN) or erythroblastosis fetalis. This condition may bring serious risks to the fetus due to hemolysis, with consequent anemia and hydrops and sometimes, intrauterine death. Invasive procedures such as amniocentesis or cordocentesis may be performed to assess the fetal RhD phenotype, however, it offers risks to both fetus and pregnant woman. In recent years, the knowledge about the genetics of blood groups and the development of molecular biology techniques has allowed the inference of blood group phenotypes by the detection of genomic material. Initially, the fetal DNA genotyping for the RHD gene was performed from amniocytes or chorionic villi samples. Unfortunately, these invasive tests could bring risk to the fetus and the pregnant woman. However, the possibility of obtaining fetal DNA from maternal plasma has been a major advance in clinical practice, as being a non-invasive procedure and therefore not providing any risks. This review presents the principles of techniques and results of different protocols for fetal RHD genotyping (published over the years) and its goal on the management of RhD negative pregnant women.

[1] Mestre e Doutoranda em Genética pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); Responsável pela Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas – Belo Horizonte (MG), Brasil.
[2] Doutor em Ciências Biológicas; Gerente de Desenvolvimento Técnico-Científico da Fundação Hemominas – Belo Horizonte (MG), Brasil.
[3] Mestre e Doutor em Obstetrícia pela UFMG; Professor-adjunto do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.
[4] Professor-titular de Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.
[5] Bióloga (PUC-MG); Bolsista de Apoio Técnico pela FAPEMIG – Fundação Hemominas – Belo Horizonte (MG), Brasil.
Endereço para correspondência: Luciana Cayres Schmidt – Alameda Ezequiel Dias, 321 – Santa Efigênia – CEP: 30130-110 – Belo Horizonte (MG), Brasil – E-mail: luciana.cayres@hemominas.mg.gov.br

Introdução

Gestantes de fenótipo RhD negativo podem desenvolver anticorpos voltados contra o antígeno D, um dos 50 antígenos do sistema de grupo sanguíneo Rh, presente nas hemácias de fetos RhD positivo, destruindo-as. Essa condição pode levar a uma importante anemia fetal denominada doença hemolítica perinatal (DHPN). Historicamente, a DHPN foi uma significante causa de morte fetal ou do recém-nascido, e antes de qualquer intervenção médica, as mortes neonatais por DHPN estavam entre 4 a 5 por 1.000[1] (D).

Normalmente, na primeira gestação de uma mulher RhD negativo gestando um feto RhD positivo a DHPN não ocorre, desde que a mãe não tenha sido aloimunizada por transfusões prévias de hemocomponentes RhD incompatíveis, por exemplo. Durante a gestação e, particularmente, ao nascimento, quando a placenta se separa do útero, um número variável de hemácias fetais entra na circulação materna. Por ser altamente imunogênico, apenas 1 mL de hemácias fetais contendo o antígeno D é capaz de imunizar a mãe[2] (D). Segundo Harmenig et al., o risco de uma mãe RhD negativo produzir anti-D após gerar um filho RhD positivo é de, aproximadamente, 9%, se imunoglobulina anti-D não foi administrada[2] (D).

A ligação de anticorpos anti-D a hemácias fetais pode levar à destruição acelerada dessas células. Como forma de tratamento pré-natal, pode ser realizada a transfusão intrauterina, a fim de minimizar os riscos ao feto. Entretanto, pelo fato de transfusões intrauterinas estarem associadas a um risco de 1–2% de perda perinatal, elas devem ser realizadas somente após criteriosa avaliação médica[2] (D). Após o nascimento, se o recém-nascido apresentar um grau de hemólise elevado, poderá ser realizada a ex-sanguíneo transfusão, com o principal objetivo de remover da circulação do recém-nascido hemácias sensibilizadas com anticorpos, anticorpos maternos e a bilirrubina presente em altas concentrações (igual ou maior a 340 µmol/L), além de promover o aporte de hemácias ao neonato, corrigindo a anemia[2] (D).

Apesar de todos os avanços no acompanhamento de gestantes RhD negativo, a DHPN ainda não foi erradicada. No Brasil, no ano de 2005, o número de mortes fetais (feto/recém-nascidos) por anemias, devido a fatores maternos, no período de 2005, foi de 12.351. Só na região sudeste o número foi de 4.717 e na região nordeste foi 3.993. Juntas, as regiões sudeste e nordeste são responsáveis por mais de 50% do número total de afetados no Brasil – Sistema de Informações sobre Mortalidade/Datasus (MS/SVS/DASIS)[3] (A). Em 2006, a incidência de DHPN por nascidos vivos foi de 10,5:21.000, enquanto na Europa a taxa era de 1:21.000 nascidos vivos[4] (C).

Em 1991, quando as bases moleculares do fenótipo RhD se tornaram conhecidas, a genotipagem RhD se tornou amplamente abordada e tem sido de grande utilidade no acompanhamento precoce de gestantes RhD negativo sensibilizadas ou em risco de imunização, a tempo de administrar a imunoprofilaxia anti-D antenatal ou de evitar sua infusão desnecessariamente, em caso de fetos RhD negativo[5] (A).

A genotipagem RhD fetal permite a predição do fenótipo RhD do feto a partir da análise de seu DNA. O teste envolve a amplificação de uma ou, preferencialmente, mais de uma região do gene RhD para determinar se o gene está presente, pois numerosas variantes de RhD já foram descritas, como RhDΨ e genes híbridos RhD-CE-D. Dessa forma, como o genótipo é utilizado para a predição do fenótipo expressado, um amplo conhecimento da genética dos grupos sanguíneos é absolutamente necessário.

Os primeiros métodos de genotipagem foram realizados mediante o isolamento direto de DNA fetal de amniócitos ou de vilosidades coriônicas[6] (A). Entretanto, tal procedimento é de alto custo e por requerer técnicas invasivas de coleta, é de difícil realização, sendo viabilizado somente em poucos centros. Além disso, está associado a um pequeno, mas significante risco de aborto espontâneo[7] (D). A amniocentese está associada à indução da hemorragia feto-materna em 17% dos casos onde esse procedimento é adotado e ao aumento da incidência de imunização gestacional[8] (A). A coleta de amostra vilo-coriônica apresenta um risco de 3% de hemorragia transplacentária e está associada ao aumento do título do anticorpo e da perda fetal de, aproximadamente, 0,3%[9] (A), além de oferecer risco de má-formação congênita[10] (C).

Nesse contexto, a genotipagem RhD fetal pode causar um grande impacto no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo, pois ao se inferir o fenótipo RhD do feto, torna-se possível definir corretamente qual a conduta mais adequada de acompanhamento da gravidez (se será considerada de alto risco ou não) e se há necessidade ou não do uso da imunoprofilaxia RhD.

Material e métodos

Para a elaboração desse artigo foi feita uma busca pelo Pubmed com o termo: "RhD *fetal genotype*", que retornou 113 trabalhos. A pesquisa na rede LILACS com o termo: "genotipagem fetal" retornou 4 artigos, dos quais apenas 1 se tratava de genotipagem fetal. Foram selecionados apenas artigos que apresentaram texto completo disponível para consulta. Não foi usado filtro de data. Todos esses foram avaliados, além das referências examinadas em busca de outros possíveis artigos de interesse.

Doença hemolítica perinatal e a Imunoprofilaxia RhD

A introdução da imunoprofilaxia RhD foi um marco importante na medicina preventiva. No Canadá, antes de sua introdução, a taxa de imunização RhD era de 13,2%. Subsequente à sua introdução, esta taxa foi reduzida para 0,14%[7] (B). Portanto, a taxa de sucesso da imunoprofilaxia RhD está em torno de 98–99%[7] (B).

Cerca de 0,71–1,9% dos casos de sensibilização RhD ocorrerão antes do parto, dos quais, a maioria, em decorrência de hemorragia transplacentária no terceiro trimestre da gestação. Essa causa residual, mas importante, de aloimunização RhD pode ser reduzida pelo uso de profilaxia antenatal na 28ª semana de gestação. Na experiência inicial, na Universidade de Manitoba, no Canadá, a imunoprofilaxia Rh antenatal com 28 e com 34 semanas de gestação reduziu a incidência de sensibilização de 1,8 para 0,1%, sem quaisquer efeitos adversos à mãe ou ao feto[3] (B).

Na Europa, a imunoprofilaxia RhD é rotineiramente administrada na 28ª ou 34ª semana de gestação (dependendo da dose) e até 72 horas após o nascimento de uma criança RhD positivo, ou ainda após aborto, gravidez ectópica, procedimentos invasivos e outras causas de hemorragia transplacentária. Entretanto, estima-se que cerca de 40% das gestantes europeias de fenótipo RhD negativo estejam recebendo a imunoprofilaxia RhD desnecessariamente, por estarem gestando fetos RhD negativo[8] (D).

No Brasil, não há dados sobre a incidência da DHPN após a introdução da profilaxia anti-D, principalmente porque não há uma conduta normatizada entre os diferentes serviços de saúde e profissionais quanto a seguir as recomendações do uso dessa profilaxia. O Manual de Orientação de Assistência pré-natal da Febrasgo cita que alguns autores recomendam a imunoglobulina a gestantes RhD negativo com 28 semanas. O projeto Diretrizes – Assistência Pré-natal, publicado pela Associação Médica Brasileira, em conjunto com o Conselho Federal de Medicina, cita que a administração de 100 mcg de imunoglobulina anti-D, entre a 28ª e 34ª semana de gravidez, para mulheres em sua primeira gravidez, não reduz o risco de imunização (RR=0,4; IC95% 0,15–1,2). No entanto, caso a imunoprofilaxia antenatal fosse padronizada no Brasil, cerca de 60% das gestantes RhD negativo deveriam recebê-la, por estarem gestando fetos RhD positivo e, portanto, em risco de desenvolver a DHPN.

Quanto à dose da imunoprofilaxia RhD, aceita-se que 20 µg de Ig (100 UI) sejam capazes de suprimir a sensibilização que seria causada por 1 mL de células RhD positivo, o que corresponde a 2 mL de sangue[11] (D). No Reino Unido, administra-se 100 mcg (500 UI), o suficiente para cobrir pelo menos 4 mL de células vermelhas, o que corresponde a 95% de todos os casos de hemorragia transplacentária. No Brasil, assim como nos Estados Unidos e em outros países, a dose administrada é de 300 µg, a qual é eficiente em 99,8% dos casos[11] (D).

Genotipagem RhD fetal

A genotipagem RhD permite a inferência do fenótipo RhD a partir da análise de DNA. O teste envolve a amplificação de uma ou mais regiões do gene RhD para determinar se o alelo está presente.

O gene RhD codifica a proteína RhD e está localizado no cromossomo 1 (1p36.13-p34.3) e intimamente ligado ao gene , que codifica a proteína RhCE. Os genes RhD e RHCE são altamente homólogos e expressam os antígenos do sistema Rh.

A grande proximidade e homologia entre os genes RhD e RHCE permitem a formação de alelos RhD híbridos, levando à produção de antígenos D diversificados, observados entre os diferentes grupos étnicos[12] (A). Há cerca de 120 alelos RhD já descritos[13] (D) e apesar de a maioria dos indivíduos que possuem o gene RhD expressarem a proteína D em uma sequência convencional de aminoácidos, 1–2% dos indivíduos caucasianos (e a maioria dos afro-americanos e hispânicos) têm alterações de sequência no RhD, resultando na produção de uma proteína alterada. Essas alterações podem levar a mudanças na expressão ou na estrutura da proteína D, e, consequentemente, dos epitopos do antígeno D, resultando nos fenótipos D fraco, D parcial ou D variantes, os quais podem conduzir a uma inferência errônea do fenótipo pela genotipagem do gene RhD[11] (D).

O fenótipo RhD negativo é encontrado em 15% da população caucasiana, 3–5% dos negros africanos e é raro em asiáticos. Cerca de 18% dos europeus não expressam o antígeno D devido, na grande maioria dos casos, a uma deleção completa do gene RhD. Entretanto, o fenótipo D negativo pode ser causado também por alelos híbridos RhD-CE-D, mutações sem sentido e outras alterações, como deleções ou inserções.

Genes híbridos RhD-CE-D ocorrem pela fusão de exons RHD com exons RHCE e podem resultar em fenótipos D negativo ou D parcial. Indivíduos portadores do fenótipo D parcial podem produzir anticorpos anti-D, e essa aloimunização pode ter relevância clínica[11] (D). Embora, muito raramente uma mulher D parcial produza anti-D após gestação de feto RhD positivo[14] (C), seria prudente administrar a imunoprofilaxia Rh em gestantes RhD parcial, a fim de reduzir a chance de aloimunização anti-D.

Genotipagem RhD fetal a partir de métodos invasivos

Os primeiros métodos de genotipagem RhD fetal foram realizados mediante o isolamento direto de DNA fetal de amniócitos ou de vilosidades coriônicas. Entretanto, tal procedimento é de alto custo e, por requerer técnicas invasivas de coleta, é de difícil realização, tendo sido utilizado somente em poucos centros. Além disso, está associado a um pequeno, mas significante risco de aborto espontâneo. A amniocentese está associada à indução da hemorragia feto-materna em 17% dos casos e ao aumento da incidência de imunização gestacional[5] (A). A coleta de amostra vilo-coriônica apresenta um risco de 3% de hemorragia transplacentária e está associada ao aumento do título do anticorpo e perda fetal em aproximadamente 0,3% dos casos, além de oferecer risco de má-formação congênita[6] (B).

Outra fonte de DNA fetal é o tecido da mucosa cervical, sendo esta coleta minimamente invasiva, mas a quantidade de DNA fetal recuperada é muito pequena e há possibilidade de contaminação com DNA materno, contribuindo para uma baixa sensibilidade do teste[6] (B).

Genotipagem RhD fetal não invasiva

A presença de ácido nucleico fetal na circulação materna foi estabelecida em 1948, antes da elucidação da estrutura do DNA, mas a primeira descrição da utilização do DNA fetal livre no plasma materno para genotipagem RhD fetal foi feita em 1997[15] (A). Atualmente, muitos grupos têm avaliado sua eficácia na predição da herança do gene RhD. Todavia, um protocolo único sem resultados falsos ou discordantes com a fenotipagem ainda não se encontra disponível.

O alto *turnover* de DNA fetal no plasma materno sugere que o DNA é liberado continuamente na circulação materna e em grandes quantidades. Por um lado, tem sido aceita a hipótese de que a fonte de DNA fetal livre é de sinciciotrofoblastos que sofreram apoptose, com fragmentação do DNA[16] (B). Por outro, células fetais no sangue materno são extremamente raras[6] (A).

Estudos evidenciaram que o tamanho dos fragmentos de DNA fetal no plasma materno é de 145 a 201 pb, em contraste com os fragmentos de DNA materno que são consideravelmente maiores[17] (B). Lo et al. demonstraram que a concentração de DNA fetal livre aumenta com o tempo de gestação e que o DNA fetal representa aproximadamente 3,4–6,2% de DNA livre no plasma materno durante o primeiro e terceiro trimestre de gestação, respectivamente[15] (A). Todavia, a quantidade de DNA fetal presente no soro materno varia de gestação para gestação e a cada dia ao longo do período gestacional[15] (B). Em contrapartida, a relativa proporção de DNA fetal no plasma materno é conhecida por aumentar em certas gestações com complicações, incluindo pré-eclâmpsia, casos onde há algum tipo de dano placentário e aneuploidia[16] (B).

Gravidezes prévias não afetam a eficácia dos testes de genotipagem, como no caso do isolamento de leucócitos fetais do sangue materno, que permanecem por muitos anos após a gestação[18] (C). O DNA fetal desaparece da circulação materna em poucas horas após o nascimento, sendo sua meia vida de 16 horas após cesariana e de 10 a 100 horas após parto normal, exceto em casos de doença hepática materna[19] (A).

Coleta e processamento da amostra materna e purificação do DNA fetal livre

Estudos têm demonstrado que a coleta de amostra materna visando a extração de DNA fetal pode ser realizada a partir da 5ª semana de gestação[18] (C), porém, a maioria dos autores têm trabalhado com amostras de gestantes com idade gestacional média entre 12,7 a 27,9 semanas[4,17] (A). As amostras de sangue periférico das gestantes RhD negativo são colhidas em ácido tetraetilenodiamino (EDTA) e devem ser processadas em até 48 horas, para evitar excesso de DNA materno decorrente de lise celular. Amostras processadas após esse prazo demonstraram um reduzido nível de DNA fetal, provavelmente devido à hemólise de células maternas com liberação de DNA materno no plasma.

O processamento da amostra materna envolve uma etapa de centrifugação inicial do sangue materno entre 800 a 3000 g por 10 minutos[7,8,14] (A). Após essa etapa, o plasma materno é separado das hemácias, tendo o cuidado de não remexer a camada de leucócitos (*buffy coat*) para não contaminar a amostra com DNA materno. Nessa etapa, o plasma materno pode ser centrifugado entre 2400 e 13.500 g por 10 minutos para remover todos os resíduos de células intactas. Caso o plasma materno não seja prontamente utilizado, poderá ser estocado entre -20ºC e -30ºC[7,8,18] (A). Entretanto, foi demonstrado que o número de cópias de DNA fetal foi maior quando a purificação de DNA fetal foi realizada no plasma fresco[19] (A).

A purificação do DNA fetal é um processo determinante para o sucesso da genotipagem fetal. A sensibilidade e a especificidade da técnica estão fortemente relacionadas à quantidade de DNA detectado. O DNA fetal pode ser extraído de forma manual ou automatizada, sendo que esta última permite a purificação de uma maior quantidade de DNA[19] (A). Após a purificação, o DNA pode ser imediatamente utilizado na PCR ou pode ser estocado a -20ºC.

Reação em Cadeia da Poimerase (PCR) em tempo real

A metodologia mais utilizada para a genotipagem RhD fetal no plasma materno é a PCR em tempo real. Nessa abordagem, no momento da amplificação do gene alvo, ocorre a emissão de fluorescência, que pode ser detectada e quantificada, permitindo a constante detecção e monitoramento dos produtos de amplificação durante toda a reação. Essa metodologia oferece algumas vantagens, como simplicidade técnica, rapidez de execução, alta sensibilidade e especificidade, com reduzido potencial de contaminação, quando comparado com as PCR convencionais.

A presença de detectores do sinal de fluorescência permite monitorar o aumento do sinal de fluorescência da reação e determinar o número de ciclos de amplificação necessários para se alcançar um limiar (*threshold*) de intensidade, chamado de Ct (*Threshold Cycle*). O Ct é definido como o número do ciclo em que houve a detecção do primeiro aumento significativo no sinal de fluorescência[20] (A). Em uma PCR ideal, na fase exponencial, a quantidade de DNA é duplicada a cada ciclo. Na maioria dos testes envolvendo DNA fetal, uma cópia de um fragmento do gene irá resultar em um valor de Ct de aproximadamente 38[21] (A).

A metodologia mais utilizada na PCR RhD fetal em tempo real é a que utiliza sondas *TaqMan* (Applied Biosystems). Essa metodologia é baseada na atividade 5' nuclease da Taq DNA polimerase para clivar uma sonda de hibridização fluorogênica duplamente marcada, durante a fase de extensão da PCR. Nessa metodologia, um dos fluoróforos funciona como um repórter e seu espectro de emissão é bloqueado por um segundo fluoróforo (*quencher*). Durante a fase de extensão da PCR, a atividade exonucleásica da DNA polimerase cliva a sonda e libera o fluoróforo repórter, aumentando, desta forma, o sinal de fluorescência[18] (A). Durante cada ciclo de PCR, essa fluorescência vai aumentando devido ao acúmulo exponencial de fluoróforos.

Considerando a alta homologia entre os genes RhD e RHCE e a ocorrência do pseudogene RhDΨ *e* outros alelos RhD variantes, os quais podem ser responsáveis por inferências errôneas, a abordagem mais amplamente utilizada no diagnóstico RhD fetal tem sido a análise de duas diferentes regiões do gene RhD, evitando preferencialmente o exon 10, que é frequentemente detectado em indivíduos portadores do haplótipo Cde, frequentemente associado ao fenótipo D parcial.

O uso de Controles e Marcadores de DNA fetal

Para a genotipagem RhD fetal, deve ser realizada uma PCR para amplificação de um gene controle, a fim de comprovar que houve recuperação de DNA a partir do plasma materno. Atualmente, têm sido utilizados como controle os genes CCR5, GAPDH, β-globina, β-actina, entre outros[4,14,17] (A, D, A). Quando não há amplificação do gene controle, os testes não são validados. Nesse caso, nova extração de DNA é necessária. Já como controle da reação de PCR para RhD, pode se incluir amostras de DNA genômico sabidamente RhD positivo, RhD negativo ou DNA extraído do plasma de gestantes com feto RhD positivo[4] (A).

Alguns protocolos de genotipagem RhD fetal também introduzem outra PCR para detectar especificamente a presença de DNA fetal. Para tal, o gene SRY vêm sendo bastante utilizado, e será amplificado no caso de fetos do sexo masculino[17] (A). Todavia, em casos de fetos do sexo feminino, não haverá amplificação do gene SRY e a PCR será negativa, não sendo possível comprovar a presença de DNA fetal. Para a detecção de DNA de feto feminino, alguns pesquisadores têm utilizado marcadores de polimorfismo de inserção/deleção bialélicos. São utilizados 8 a 11 marcadores, altamente polimórficos, que permitem a detecção de marcadores paternos no plasma materno, quando comparados ao DNA materno. Sendo assim, se há pelo menos um sinal positivo, conclui-se que o DNA analisado é realmente de origem fetal[15] (A). Alternativamente, um marcador epigenético foi descrito por Allen Chan et al., que demonstraram que o promotor do gene supressor de tumor, RASSF1A, é hipermetilado na placenta e hipometilado em células sanguíneas maternas. Dessa forma, utilizaram digestão com enzima de restrição sensível à metilação para detectar sequências hipermetiladas de RASSF1A no plasma de gestantes RhD negativo, confirmando a presença de DNA fetal[22] (A). No entanto, marcadores para detecção de DNA de fetal, principalmente do sexo feminino, vêm sendo pouco utilizados na prática clínica.

Acurácia, Sensibilidade e especificidade da genotipagem RhD fetal não invasiva

A acurácia da genotipagem RhD fetal no plasma materno é medida pela comparação entre o genótipo RhD predito e o resultado sorológico da análise de sangue do cordão umbilical ao nascimento da criança ou de PCR utilizando DNA extraído do líquido amniótico. Em uma metanálise recente, de 37 publicações, a acurácia diagnóstica total da genotipagem foi de 94,8%[23] (A). Todavia, alguns fatores podem alterar esse valor, como a idade gestacional, a presença de alelos RhD variantes que ocorre em frequências diferentes entre as populações étnicas, o tempo de armazenamento da amostra materna antes da separação do plasma materno, a metodologia de extração de DNA utilizada, os iniciadores e sondas utilizadas na PCR etc. A Tabela 1 mostra a

comparação da acurácia, número de amostras testadas e exons do gene RhD analisados entre alguns estudos de 2002 a 2009.

Lo et al. encontraram resultados completamente concordantes entre a genotipagem RhD fetal em tempo real e a análise sorológica do recém-nascido, quando foram analisadas amostras de gestantes no segundo ou terceiro trimestre de gestação, enquanto amostras coletadas no primeiro trimestre apresentaram genótipo RhD negativo para fetos sorologicamente fenotipados como RhD positivo[17] (A). Finning et al. sugerem, porém, que, apesar de ser possível alcançar a eficácia da genotipagem RhD no primeiro trimestre, seria prudente repetir o teste em estágios mais tardios da gestação, pois o exato estágio em que o DNA fetal atinge um nível de detecção ainda não é conhecido[19] (A).

O tempo de armazenamento da amostra materna antes do processamento do plasma é também um fator determinante para a sensibilidade e especificidade do teste. O atraso na separação do plasma do *buffy coat* materno pode levar à ruptura de células maternas e contaminação do plasma com DNA materno. Sendo assim, o DNA plasmático não deverá exceder 125 ng/mL. Se isso acontecer, indica que as células maternas foram lisadas e a eficácia do teste pode ser comprometida. A etapa de extração do DNA fetal é fundamental para a sensibilidade do teste de genotipagem no plasma materno, pois ausência de DNA fetal pode levar a resultados falso-negativos.

É importante ainda lembrar que os métodos sorológicos de fenotipagem RhD ao nascimento da criança também podem falhar. Após realizar estudo com 563 gestantes, amplificando segmentos dos exons 4, 5 e 10, Minon et al. obtiveram 100% (99,8% incluindo um incomum falso-positivo) de concordância entre a genotipagem e a fenotipagem do recém-nascido ao nascimento. Todavia, houve quatro resultados discrepantes com o fenótipo do sangue coletado do cordão umbilical, dos quais três se mostraram concordantes mais tarde, quando o sangue venoso ou células bucais da criança foram utilizados. O outro resultado discordante foi um caso incomum de falso-positivo na genotipagem, devido a um transplante de fígado de doador RhD positivo[24] (A).

Resultados falso-negativos na genotipagem podem ocorrer na ausência de DNA fetal e, por isso, é o maior desafio para a introdução desse teste na rotina clínica. É importante evitar resultados falso-negativo, pois a não recomendação da administração da profilaxia RhD em gestantes de feto RhD positivo poderia levar à aloimunização, morbidade e mortalidade da DHPN em subsequentes gravidezes[2] (D).

Benefícios e impacto da genotipagem RHD fetal no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo

Apesar de todos os avanços no acompanhamento de gestantes RhD negativo, a DHPN ainda é um problema para os serviços de saúde. Uma das causas da ocorrência de DHPN se deve principalmente à falta de atenção aos protocolos da imunoprofilaxia RhD e à espontânea e indetectada hemorragia feto-materna durante o terceiro trimestre de gravidez[3] (D).

A administração da imunoprofilaxia RhD antenatal não é realizada rotineiramente no Brasil, em parte, por acreditar-se que grande parte das gestantes RhD negativo estarão portando fetos RhD negativo e, portanto, estariam recebendo a vacina desnecessariamente. Além disso, a dose dessa vacina é de custo elevado, o que diminui as chances de acesso a esta profilaxia por gestantes de baixa condição socioeconômica. Por outro lado, em países onde a imunoprofilaxia RhD é aplicada de rotina, cerca de 40% das gestantes RhD negativo recebem a antiglobulina anti-D desnecessariamente, uma vez que seus fetos são RhD negativo[9] (C).

O Ministério da Saúde preconiza que gestantes RhD negativo com coombs indireto positivo sejam incluídas em programas de acompanhamento a gestantes de alto risco, aumentando o custo do acompanhamento pré-natal. Entretanto, sabe-se que cerca de 40% de gestantes RhD negativo estarão gestando um feto RhD negativo e, por isso, a inclusão dessas gestantes em programas de acompanhamento a gestantes de alto risco é desnecessária.

Tabela 1 - Comparação da acurácia (concordância entre a genotipagem RhD fetal no plasma materno com o fenótipo RhD do recém-nascido), número de amostras testadas e exons do gene RhD analisados entre alguns estudos de 2002 a 2009 em diferentes países

Autores	País	Nº de amostras testadas	Regiões do gene RHD analisadas	Concordância entre a genotipagem RHD fetal e fenótipo RhD do recém-nascido (%)
Costa et al.[5]	France	106	Não informado	100
Finning et al.[7]	UK	137	Exons 4,5,6	100
Brojer et al.[19]	Poland	255	Exons 7,10 e intron 4	100
Machado et al.[27]	Brasil	81	Exon 10, intron 4	97,3
Minon et al.[24]	Belgium	563	Exons 4,5,10	100
Müller et al.[28]	Germany	1113	Exons 5,7	99,5
Sesarini et al.[29]	Argentina	109	Exon 7	86,7

Nesse contexto, a genotipagem fetal para RhD pode causar um grande impacto no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo. Caso o feto não seja portador do gene RhD, nenhum procedimento adicional será necessário e a gestante, mesmo que sensibilizada com anticorpos anti-D, poderá ser acompanhada como uma gestante comum e não mais de alto risco, reduzindo bastante o nível de estresse da gestante e dos familiares, assim como o custo do acompanhamento. Em contrapartida, caso o feto seja portador do gene RhD, a genotipagem fetal constitui fonte de diagnóstico precoce de risco de DHPN, permitindo que todos os recursos necessários à segurança da gestante e do feto sejam adotados prontamente. Além disso, permitirá a correta administração da profilaxia antenatal, reduzindo ainda mais a chance de sensibilização materna.

Alguns países já implantaram a genotipagem RhD a partir de sangue materno na rotina de atendimento a gestantes RhD negativo. Alguns Centros europeus têm compartilhado sua experiência com a genotipagem RhD fetal a parir de plasma materno na rotina de atendimento a gestantes RhD negativo. No Reino Unido a genotipagem RhD fetal vem sendo oferecida desde 2001 e trouxe significativa redução do número de procedimentos invasivos[25] (B). Recentemente, foi realizado um estudo para avaliar o custo/benefício do uso da genotipagem RhD fetal não invasiva na Inglaterra e no Reino Unido, em relação ao risco de sensibilização, caso fosse abolida uma das doses da imunoprofilaxia RhD. Esse estudo revelou que é improvável que haja um efetivo custo/benefício para garantir o uso da genotipagem RhD não invasiva em larga escala nesses países em detrimento de uma das doses da imunoprofilaxia, pois a economia de recursos seria mínima, enquanto a taxa de sensibilização materna poderia ser inaceitavelmente alta[26] (A). No Brasil, ainda não há estudos avaliando o impacto da genotipagem RhD fetal não invasiva no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo ou na taxa de sensibilização materna.

Conclusão

A genotipagem RhD fetal a partir do plasma materno, por ser um método não invasivo, não traz nenhum risco clínico ao feto ou à gestante e tem sido eficiente na predição do fenótipo RhD fetal. Seu uso pode permitir o acompanhamento racional de gestantes RhD negativo, permitindo o acesso à profilaxia antenatal e possibilitando a redução de custo no atendimento a essas gestantes consideradas, *a priori*, de risco.

A sensibilidade e a especificidade da técnica de genotipagem estão fortemente relacionadas à idade gestacional, ao tempo de armazenamento da amostra pós-coleta, às quantidades de DNA fetal obtido e às regiões analisadas do gene RhD. A introdução de controles internos da amplificação são indispensáveis à segurança dos resultados obtidos. Marcadores da presença de DNA fetal também são importantes para garantir que o DNA amplificado foi o DNA materno e não o fetal, mas ainda não são de fácil uso.

A genotipagem RhD fetal não invasiva usando plasma materno é simples, rápida, sensível, específica e vem despontando como uma importante ferramenta na prática clínica em vários países, que já incluíram o teste na rotina de atendimento a gestantes RhD negativo. No Brasil, faltam estudos que demonstrem o impacto da sua implantação no acompanhamento a gestantes RhD negativo.

Leituras suplementares

1. Bowman J. The management of hemolytic disease in the fetus and newborn. Semin Perinatol. 1997;21:39-44.
2. Harmening, DM. Modern Blood Banking and Transfusion Practices. 15th edition. Philadelphia: F. A. Davis Company. 2005.
3. Ministério da Saúde (BR). Informações de saúde [Internet]. [cited 2011 Nov 20]. Available from: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/fet10uf.def
4. Daniels G, Finning KM, Martin PW, et al. Fetal blood group genotyping from DNA plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn (Review). Vox Sanguinis: Bristol. 2004;87(4):225-32.
5. Bennet PR, Le Van Kin C, Colin Y, Warwick RM, Chérif-Zahar B, Fisk NM, et al. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. N Engl J Med. 1993;329:607-10.
6. Costa JM, Giovangrandi Y, Ernault P, Lohman L, Nataf V, El Halali N, et al. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. Br J Haematol. 2002;119:255-60.
7. Wilson RD. Amniocentesis and chorionic villus sampling. Curr Opin Obstet Gynecology. 2000;12:81-6.
8. Finning KM, Martin PW, Soothill PW, et al. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noinvasive fetal RHD genotyping service; Transfusion. 2002;42:1079-85.
9. Martine GHM. Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. Transfusion. 2006;46(12):2142-8.
10. Denomme GA, Fernands BJ. Fetal blood group genotyping. Transfusion. 2007;47:6S64-8.
11. Manniing FA. Medicina Fetal: perfil biofísico, princípios e aplicabilidade clínica. Rio de Janeiro: Revinter; 2000.
12. Chen Q, Flegel WA. Random survey for RHD alleles among D+ European persons. Transfusion. 2005;45:1183-91.
13. Westhoff CM. Rh complexities: serology and DNA genotyping. Transfusion. 2007:47(1 Suppl);17-22S17-S22.
14. AABB Technical Manual.15th edition. Bethesda: Mark E. Brecher; 2005.
15. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. 1997;350:485-7.
16. Avent ND, Madgett TE, Maddocks DG, et al. Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and envolving applications. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. 2009;21:175-9.
17. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem. (Hong Kong). 2004;50(1):88-92.

18. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. Proc National Academy of Science USA. 1996;93:705-8.

19. Brojer E, Zupanska B, Guz K,et al. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. Transfusion: Warsaw. 2005;45(9):1473-80.

20. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. Blood. 2002;99(12):4618-25.

21. Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y, Ernault P, Olivi M, Gaillon T, et al. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: A two-year experience. Am J Obstet Gynecol. 2005;192:666-9.

22. Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, et al. Hypermethylated RASSF1A in Maternal Plasma: Universal fetal DNA Marker that Improves the Reliability of Noninvasive Prenatal Diagnosis. Clinical Chemistry 2006;52(22):11-18.

23. Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of no invasive fetal Rh genotyping from maternal blood-a meta-analysis. Am J Obstet Gynecol. 2006;195(11):63-73.

24. Minon JM, Gerard C, Senterre JM, et al. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. Transfusion. 2008; 48:373-81.

25. Finning KM, Martin PW, Daniels G. A Clinical Service in the UK to Predict Fetal Rh (Rhesus) D Blood Group Using Free Fetal DNA in Maternal Plasma. NY Acad. Sci. 2004;1022:119-23.

26. Szczepura A, Osipenko L, Freeman K. A new fetal RHD genotyping test: costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. BMC Pregnancy and Childbirth. 2011;11:5.

27. Machado IN, Castilho L, Pellegrino J Jr, et al. Fetal RHD genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse ethnic background. Rev Assoc Med Bras. 2006;52:232-5.

28. Müller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Köhler M, et al. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prphylaxis is feasible. Transfusion. 2008;48:2292-301.

29. Sesarini C, Giménez ML, Redal MA, Izbizky G, Aiello H, Argibay P, et al. Diagnóstico genético prenatal no invasivo de factor Rh y sexo fetal a través del análisis de ADN fetal libre en plasma materno. Arch Argent Pediatr. 2009;107:405-9.