UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL
EM HEMOTERAPIA E BIOTECNOLOGIA

CAROLINE KLEIN MARANHO

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IRREGULARES EM GESTANTES
ATENDIDAS EM SERVIÇOS PÚBLICOS DA HEMORREDE DE SANTA
CATARINA**

São Paulo
2016

CAROLINE KLEIN MARANHO

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IRREGULARES EM GESTANTES
ATENDIDAS EM SERVIÇOS PÚBLICOS DA HEMORREDE DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada à faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Professor orientador: Gil Cunha De Santis

São Paulo
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo

Maranho, Caroline Klein

Prevalência de anticorpos irregulares em gestantes atendidas em serviços
públicos da hemorrede de Santa Catarina / Caroline Klein Maranho;

Orientador: Gil Cunha De Santis. Ribeirão Preto, 2016.

110 p. : il. ; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área
de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

1.. 2. . 3.. 4.. 5..Doença Hemolítica Perinatal; Anticorpos Irregulares Maternos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: MARANHO, Caroline Klein

Título: PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IRREGULARES EM GESTANTES
ATENDIDAS EM SERVIÇOS PÚBLICOS DA HEMORREDE DE SANTA CATARINA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Hemoterapia e
Medicina Transfusional

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho aos
meus pais, Euclides e Márcia e
ao meu marido, Aguisson.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre me acompanhar nas minhas jornadas e me conceder as forças que preciso para continuar minhas batalhas diárias;

Ao Dr Gil e a Dra Flávia pela ajuda, orientação e por todo conhecimento transmitido;

Agradeço em especial aos meus pais, Euclides e Márcia. Ao meu pai por ser meu maior exemplo de força e determinação e a minha mãe pelas palavras doces de carinho e incentivo nos momentos que precisei;

Aos meus irmãos, Alexandre e Adriane, por me incentivarem e vibrarem com cada etapa concluída;

Aos meus sobrinhos Nicolas, Arthur e Maria Cecília, meus anjos de luz que são minha fonte de alegria diária e minha esperança de um país melhor;

Aos meus sogros, Deoclécio e Maria Zeneide, e aos meus cunhados Eveline, Guilherme, Jeferson e Jéssica pelo apoio, incentivo, ajuda e amizade;

Agradeço em especial ao meu marido, Aguisson, o principal incentivador para a realização desse mestrado. Sou grata pelo apoio, ajuda, palavras de carinho e amor proporcionado. Sua confiança em mim e seu incentivo foram fundamentais para que conseguisse concluir essa etapa;

Aos amigos do laboratório de Imunohematologia, em especial Everaldo, Mirela, Luiza, Orides, Andrea, Luis Felipe. Obrigada pela amizade, pela paciência e companheirismo nesses anos de estudo;

À amiga Ana Lúcia da equipe do CEMARK do HEMOSC pela ajuda e amizade;

À direção do HEMOSC pelo incentivo;

À Coordenadoria Geral de Sangue e Hemoderivados pela oportunidade ;

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto pela acolhida e por compartilharem o conhecimento na área.

"Só se pode alcançar um grande
êxito quando nos mantemos
fiéis a nós mesmos".

Friedrich Nietzsche

RESUMO

MARANHO, C.K. **Prevalência de anticorpos irregulares em gestantes atendidas em serviços públicos da hemorrede de Santa Catarina.** 2016, 150 f. Dissertação. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A doença hemolítica perinatal (DHPN) é caracterizada pela destruição das hemácias fetais por anticorpos da classe IgG presentes na circulação materna. Esses anticorpos, dirigidos contra antígenos eritrocitários presentes nas hemácias do feto, atravessam a barreira placentária e promovem a hemólise prematura dos eritrócitos, podendo levar à anemia fetal. O presente trabalho teve como objetivo principal determinar a prevalência dos anticorpos irregulares em gestantes atendidas em maternidades públicas da hemorrede de Santa Catarina por meio de um estudo observacional, com coorte retrospectiva, entre janeiro de 2012 a dezembro de 2015, englobando a análise de dados arquivados no laboratório de Imunohematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina, situado na cidade de Florianópolis. As variáveis investigadas nas amostras de cordão e de recém nascido (RN) foram: Anticorpo(s) materno(s) identificado(s) no teste de eluato de amostras com teste de antiglobulina direto positivo; fenotipagem ABO/RhD da mãe do RN. No caso das amostras de gestantes com suspeita de aloimunização e mães dos RNs, avaliaram-se as seguintes variáveis: anticorpo(s) antieritrocitário(s) identificado (s); fenotipagem ABO/RhD da gestante. O número total de casos analisados ao longo dos 4 anos foi equivalente a 585, sendo que o número de casos de anticorpos irregulares maternos na população estudada foi equivalente a 45. A distribuição do total de anticorpos irregulares maternos (TAIM) para cada ano demonstrou forte tendência de crescimento linear (coeficiente de correlação linear igual a 0,9311). Os dados coletados apontaram as seguintes especificidades de anticorpos, citados de acordo com a ordem decrescente de distribuição de frequência : anti-D (57,8%); anti-D,-C (11,1%); anti-c (6,7%); anti-c,-E (4,4%); anti-D,-E (4,4%); anti-M (4,4%); anti-C (2,2%); anti-E (2,2%); anti-K (2,2%); anti-Fy(b) (2,2%); anti-Jk(a) (2,2%) com prevalência de 41% do anti-D sob as outras classes de anticorpos. A associação entre o fenótipo RhD da gestante e a realização do teste de Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) demonstrou que o fato do fenótipo RhD ser positivo ou negativo não influencia na execução do teste ($p=0,1672$; Coeficiente de Cramer equivalente a 0,1783), entretanto, foi possível observar uma predominância do número de casos de testes de PAI não realizados sob os realizados, em especial em gestantes RhD positivo. Os resultados encontrados contribuíram para a elaboração do material clínico na forma de cartilha intitulado: DHPN - DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL E TESTES IMUNOHEMATOLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL. A cartilha foi elaborada na forma de perguntas e respostas englobando principalmente esclarecimentos sobre os testes imunohematológicos que auxiliem no diagnóstico da DHPN.

Palavras chave: Doença Hemolítica Perinatal; anticorpos irregulares maternos

ABSTRACT

MARANHO, C.K. **Prevalence of irregular antibodies in pregnant women attended by public services of hemorrede of Santa Catarina.** 2016 150 f. Master Dissertation. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016

Perinatal hemolytic disease is characterized by the destruction of fetal red blood cells by IgG antibodies present in the maternal circulation. These antibodies directed against erythrocyte antigens present in red blood cells of the fetus, cross the placental barrier and promote the premature haemolysis of red blood cells and can lead to fetal anemia. This study aimed to determine the prevalence of irregular antibodies in pregnant women in public hospitals in hemorrede of Santa Catarina through an observational study with retrospective cohort from January 2012 to December 2015, involving the analysis of archived data in Immunohematology laboratory of Center of Hematology and Hemoterapy of Santa Catarina, located in Florianópolis. The variables to be investigated in the cord samples and newborn (NB) were: maternal antibody identified in eluate test of samples with a positive direct antiglobulin test; phenotyping ABO / RhD of newborn's mother. For samples of pregnant women with suspected alloimmunization and mothers of newborns, the following variables will be evaluated: Antierythrocyte(ies) antibody(ies) identified; phenotyping ABO / RhD of the pregnant woman. The total number of cases analyzed over the four years was equivalent to 585, and the number of cases of maternal irregular antibodies in the population studied was equivalent to 45. The distribution of total maternal irregular antibodies (TMIA) for each year showed strong linear growth trend (linear correlation coefficient of 0.9311). The data collected showed the following specific antibodies, cited according to the descending order of frequency distribution: Anti-D (57.8%); anti-D, -C (11,1%); anti-c (6.7%); anti-c E (4.4%); anti-D, E (4.4%); Anti-M (4.4%); Anti-C (2.2%); Anti-E (2.2%); anti-K (2.2%); anti-Fy (b) (2.2%); anti-Jk(a) (2.2%) with a prevalence of 41% of anti-D in relation to other antibody specificities. The association between RhD phenotype of pregnant women and the realization of Irregular antibody screening test (PAI) showed that the fact of the RhD phenotype be positive or negative does not influence the test execution ($p = 0.1672$; Cramer coefficient equivalent to 0.1783), however, it was possible to observe a predominance of the number of cases of PAI tests not performed under performed, especially in RhD positive pregnant women. The results contributed to the development of the clinical material in the form of spelling book entitled: DHPN - PERINATAL HEMOLYTIC DISEASE AND IMMUNOHEMATOLOGICAL TESTS FOR LABORATORY DIAGNOSTICS. The spelling book was prepared in the form of questions and answers covering mainly clarifications on immunohematological tests to assist in the diagnosis of DHPN.

Keywords: Perinatal hemolytic disease; alomaternal antibodies.

LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Modelo esquemático da glicoproteína Kell ligada a proteína Xk.....	35
Figura 2: . Modelo esquemático da glicoproteína Duffy com domínios externos N-terminal e domínios citoplasmáticos C-terminal e a localização do polimorfismo o Fy ^a /Fy ^b	37
Figura 3: Modelo esquemático da glicoproteína Kidd com seus domínios citoplasmáticos amino terminal e carboxi terminal, domínio N-glican e a localização do polimorfismo Jk ^a /Jk ^b	39
Figura 4: Modelo esquemático da glicoproteína Diego, Banda 3 e os domínios amino terminal e carboxi terminal e a localização dos 21 antígenos pertencentes ao sistema.....	44
Figura 5: Modelo homólogo dos fenótipos RhD fraco e RhD parcial. A expressão da variante RhD fraco decorre de mutações genéticas na porção intracelular e/ou transmembrana da proteína. Já para a variante RhD parcial as mutações ocorrem na porção extracelular.....	51
Figura 6: Aglutinados (rosetas) formados em torno das células RhD positivas.....	64
Gráfico 1 Distribuição do TAIM para cada ano. 2012 (4 casos); 2013 (3 casos); 2014 (14 casos); 2015 (20 casos).....	78
Gráfico 2: Histograma de prevalência dos anticorpos irregulares maternos.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Especificidades de anticorpos irregulares no ano de 2012 identificados no teste de eluato e no soro da mãe e o número de casos com necessidade de transfusão.....	74
Tabela 2: Especificidades anticorpos irregulares de no ano de 2013 identificados no teste de eluato e no soro da mãe e o número de casos com necessidade de transfusão.	75
Tabela 3: Especificidades anticorpos irregulares de no ano de 2014 identificados no teste de eluato e no soro da mãe e o número de casos com necessidade de transfusão.....	75
Tabela 4: Especificidades anticorpos irregulares de no ano de 2015 identificados no teste de eluato e no soro da mãe e o número de casos com necessidade de transfusão.....	76
Tabela 5: Título dos aloanticorpos anti-D nos casos com necessidade de transfusão sanguínea.....	77
Tabela 6: Número de testes de PAI realizados e não realizados para os fenótipos RhD positivo e RhD negativo das mães. Valor de $p=0,1672$	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Correlação entre o anticorpo irregular e o desenvolvimento da DHPN.....	47
Quadro 2: Principais métodos de eluição.....	58
Quadro 3: Eventos hemorrágicos potencialmente sensibilizantes durante a gravidez.....	68
Quadro 4: Estratégias terapêuticas recomendadas após eventos hemorrágicos potencialmente sensibilizantes.....	69
Quadro 5: Especificações para seleção dos hemocomponentes na exsanguíneotransfusão.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH	Concentrado de Hemácia
DHPN	Doença Hemolítica Perinatal
Di	Diego
Fy	Duffy
GPA	Glicoforina A
GPB	Glicoforina B
HbF	Hemoglobina Fetal
K	Kell
Jk	Kidd
Lu	Lutheran
PAI	Pesquisa de Anticorpos Irregulares
RN	Recém Nascido
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
TAD	Teste da Antiglobulina Humana Direto
TAI	Teste da Antiglobulina Hunana Indireto
TAIM	Total de Anticorpos Irregulares Maternos
TIU	Transfusão Intrauterina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	20
4. HIPÓTESE.....	21
5. METODOLOGIA.....	21
5.1 Desenho do estudo.....	21
5.2 Local de estudo.....	21
5.3 População do estudo.....	22
5.4 Coleta de dados.....	23
5.5 Análise dos dados.....	24
5.6 Elaboração do material clínico.....	24
6. CUIDADOS ÉTICOS.....	25
7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
7.1 Fisiopatologia da DHPN.....	26
7.2 Mecanismos de transferência de anticorpos maternos para o feto.....	28
7.3 Anticorpos Irregulares envolvidos na DHPN.....	29
7.3.1 Anticorpos do Sistema RH.....	29
7.3.1.1 Anti-D.....	30
7.3.1.2 Anti-c.....	31
7.3.1.3 Anti-C, anti-E, anti-e.....	32
7.3.1.4 Anti-G.....	32
7.3.2 Anticorpos do Sistema Kell.....	34
7.3.3 Anticorpos do Sistema DUFFY.....	36
7.3.4 Anticorpos do Sistema KIDD.....	38
7.3.5 Anticorpos do Sistema MSN.....	40
7.3.6 Anticorpos do Sistema DIEGO.....	43
7.4 Importância clínica dos anticorpos na DHPN.....	46
7.5 Aspectos laboratoriais da DHPN.....	48
7.5.1 Diagnóstico laboratorial da DHPN.....	48
7.5.1.1 Exames laboratoriais realizados durante a gravidez na gestante.....	48
7.5.1.1.1 Tipagem sanguínea ABO.....	48
7.5.1.1.2 Tipagem sanguínea RhD.....	49
7.5.1.1.2.1 Profilaxia anti-D frente aos diferentes resultados de tipagem RhD em gestantes.....	52
7.5.1.1.3 Pesquisa de Anticorpos Irregulares.....	52
7.5.1.1.4 Titulação de anticorpos.....	55
7.5.1.2 Exames laboratoriais realizados no Recém nascido	56
7.5.1.2.1 Tipagem ABO/RhD.....	56
7.5.1.2.2 Teste da Antiglobulina Humana Direto.....	57
7.5.1.2.2.1 Teste de Eluição de Anticorpos (Eluato).....	57
7.5.1.3 Outros exames de relevância clínica.....	59

7.6 Imunoprofilaxia.....	61
7.6.1 Alternativas profiláticas frente a sensibilização por anti-D.....	61
7.6.1.1 Imunoglobulina Anti-D.....	61
7.6.2 Métodos de detecção da hemorragia feto materna.....	63
7.6.2.1 Teste de Roseta.....	63
7.6.2.2 Teste de Kleihauer-Betke.....	64
7.6.2.3 Citometria de Fluxo.....	66
7.6.3 Condutas para administração da imunoglobulina anti-D.....	66
7.6.3.1 Profilaxia de rotina.....	66
7.6.3.2 Profilaxia pós parto sem quadro hemorrágico.....	67
7.6.3.3 Profilaxia nos casos de eventos potencialmente sensibilizantes.....	67
7.7 Seleção dos hemocomponentes para transfusão sanguínea.....	70
7.7.1 Transfusão intrauterina.....	70
7.7.2 Exsanguíneotransfusão.....	71
8. RESULTADOS.....	74
8.1 Prevalência de anticorpos irregulares maternos.....	74
8.2 Elaboração do material clínico.....	81
9. DISCUSSÃO.....	82
10. CONCLUSÕES.....	87
11. REFERÊNCIAS.....	88
APÊNDICE 1-Termo de Anuência.....	109
APÊNDICE 2 -Termo de Consentimento para Uso de Arquivos, Registros e Similares.....	110
APÊNDICE 3-Pedido de Isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	111
APÊNDICE 4 - Tabela construída no Programa de Excel da Microsoft 2007 para análise das variáveis estudadas.....	113
ANEXO 1. Material Clínico Elaborado.....	115

1. INTRODUÇÃO

A doença hemolítica perinatal (DHPN) é caracterizada pela destruição das hemácias fetais por anticorpos da classe IgG presentes na circulação materna. Esses anticorpos, dirigidos contra antígenos eritrocitários presentes nas hemácias do feto, atravessam a barreira placentária e promovem a hemólise prematura dos eritrócitos, levando à anemia fetal (THAKRAL et al., 2010)

A primeira descrição da DHPN foi feita no ano de 1609. Nessa ocasião, uma gestante francesa deu à luz a um gemelar hidrópico natimorto e outro gemelar com icterícia grave (BOWMAN, 1994). Diamond e colaboradores (1932) evidenciaram que anemia congênita, hidropsia fetal e icterícia eram sintomatologia clínica de uma mesma doença, na qual a hemólise fetal estimulava a eritropoese, levando ao aumento da concentração de eritroblastos na circulação. Assim sendo, devido à presença de hematopoese extracelular e eritroblastenemia, a DHPN foi nomeada por muitas décadas como eritroblastose fetal (MACHADO; BARINI, 2006).

A partir da décima semana de gestação, os anticorpos IgG maternos dirigidos contra antígenos eritrocitários desencadeiam um processo de hemólise que resulta em anemia fetal. Essa anemia possui graus variáveis, de acordo com a intensidade da hemólise. Em fetos gravemente afetados, esse quadro, por sua vez, promove complicações, que compreendem desde o aumento da eritropoese medular até o recrutamento de sítios extra medulares tais como fígado, baço, placenta e rins, até que ocorra congestão hepática, obstrução do sistema porta, redução da pressão oncótica e, finalmente se instale o quadro de insuficiência cardíaca e hidropsia fetal (FLEGEL, 2007).

Fetos com quadro menos acentuado de hemólise, continuam liberando a bilirrubina indireta na corrente sanguínea, a qual é conjugada à albumina. Esse complexo é eliminado na circulação fetal e não ocasiona consequências graves para o feto. Entretanto, após o nascimento, o recém-nascido apresenta dificuldade em metabolizar o excesso de bilirrubina não conjugada, produzida como resultado da hemólise, que pode se depositar nos gânglios basais e nos núcleos do tronco cerebral, causando lesão neuronal em áreas específicas do cérebro, fenômeno conhecido por "*kernicterus*" (KLEIN; ANSTEE, 2014). Laboratorialmente, o quadro de hemólise do recém-nascido pode ser evidenciado pelo resultado positivo do teste da Antiglobulina Humana Direta (TAD) ou Coombs Direto. Esse, por sua vez, possibilita a detecção de hemácias sensibilizadas *in vivo* por anticorpos antieritrocitários. No caso dos recém-nascidos, os anticorpos

sensibilizantes são de origem materna e podem ser identificados por meio do teste de eluato (GIRELLO; KUHN, 2007).

Embora a DHPN causada pela incompatibilidade feto materna para antígenos do sistema ABO seja a mais comum, seu caráter é em geral benigno, pois raramente é grave a hemólise, visto que a expressão dos antígenos não é restrita às hemácias (GIRELLO; KUHN, 2007). No entanto, os antígenos do sistema Rh, em especial o antígeno D, são responsáveis por 95% dos casos de DHPN. Por outro lado, após a introdução e o amplo uso da imunoprofilaxia anti-D e a diminuição do número das famílias, observou-se um evidente decréscimo da incidência da doença ocasionada por esse anticorpo (BERNARDELLO et al., 2015). A utilização da imunoprofilaxia pré-natal na 28ª semana de gestação tem reduzido a aloimunização em até 96% das mulheres de risco nos países desenvolvidos. Após esse rápido e significativo decréscimo, a taxa de incidência de DHPN por anti-D tem se mantido constante nos últimos anos por vários fatores: falha da administração da imunoprofilaxia, falha no reconhecimento das situações clínicas de hemorragia materno-fetal, transfusão sanguínea incompatível e sensibilização espontânea. Somado a isso, outra consequência do amplo uso da imunoprofilaxia anti-D foi o aumento do número relativo de casos de DHPN por outras classes de anticorpos (MACHADO; BARINI, 2006). As especificidades mais envolvidas são: anti-c, anti-K, anti-E, anti-Fy(a), e anti-Jk(a), (GIRELLO; KUHN, 2007). Além do mais, na literatura já foram descritos outros casos de sensibilização materno-fetal por anticorpos da classe anti-Jk(b) (THAKRAL et al., 2010), anti-Di(a) (SILVA et al., 2010), anti-D,-C (NEGI; SINGH, 2012), anti-Js(b) (RIYAMI et al., 2013), anti-M (YASUDA et al., 2014) e anti-S (YOUSUF et al., 2012).

A etiologia da DHPN causada por outros anticorpos eritrocitários é igual à causada por incompatibilidade materno-fetal por anti-D e dependendo da especificidade podem apresentar graus diferentes de gravidade e manifestações clínicas. Os casos de sensibilização por outras classes de anticorpos são verificados principalmente em mães politransfundidas, ou que em algum momento da vida receberam transfusão sanguínea. Não existem procedimentos de administração de imunoglobulinas profiláticas para evitar a sensibilização da mãe contra outros antígenos eritrocitários (GIRELLO; KUHN, 2007).

Assim sendo, outros meios de profilaxia se tornam relevantes para evitar a sensibilização ou até mesmo para um melhor acompanhamento da gestante já sensibilizada. Por exemplo, a importância de selecionar concentrados de hemácias fenotipicamente semelhantes

para os antígenos mais imunogênicos, e a realização da Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) no soro da mãe. A PAI é uma técnica que utiliza o princípio do teste de Antiglobulina Humana Indireta (TAI) e tem como objetivo detectar anticorpos antieritrocitários de ocorrência não esperada (GIRELLO; KUHN, 2007). Esse teste, por sua vez, deveria ser realizado em todas as gestantes, na primeira visita pré-natal, e repetido na 28^o semana de gestação, (BAIOCHI; NARDOZZA, 2009). Porém, embora de suma importância no estado de Santa Catarina, o teste referido acima é executado, na maioria das vezes, apenas em gestantes RhD negativas, sem levar em conta outras especificidades de anticorpos. Nesse contexto, qual seria a prevalência de anticorpos irregulares em gestantes atendidas em serviços públicos de Santa Catarina?

2. JUSTIFICATIVA

Embora a etiologia e a fisiopatologia da DHPN estejam bem estabelecidas, a referida doença ainda contribui de maneira significativa para a morbimortalidade perinatal, mesmo em países desenvolvidos (MACHADO; BARINI, 2006). Nesses países, a incidência da doença é de aproximadamente 1 a 6/1000 vivos (MOISE, 2002). No entanto, no Brasil, especificamente no estado de Santa Catarina, esses dados não estão disponíveis na literatura.

Além do anticorpo anti-D, outras classes de anticorpos envolvidas na doença incluem anticorpos dirigidos contra antígenos do sistema KELL, DUFFY, MNS, KIDD (CIANCIARULLO; CECCON; VAZ, 2001; AKDAG et al., 2012) e DIEGO (SILVA; JORGE; HIRTSCH, 2004; WU et al., 2015). Os anticorpos dirigidos contra antígenos do sistema Kell, por exemplo, podem causar DHPN grave. A presença do anticorpo anti-Kell no feto e posteriormente no recém-nascido, pode levá-lo ao quadro de anemia grave até mesmo na presença de títulos baixos de concentração do anticorpo (MOISE, 2008). Além do mais, outros antígenos do sistema Rh e seus respectivos anticorpos são potenciais causadores da DHPN. Os anticorpos anti-E e anti-c, por exemplo, também estão implicados na etiologia da doença (HACKNEY et al., 2004). O anticorpo anti-c é importante causa de doença hemolítica perinatal grave, às vezes apresentando clínica semelhante à do anticorpo anti-D, com hemólise grave, podendo ter evolução letal (RATH et al, 2013).

Devido a isso, para evidenciar a possibilidade de passagem de anticorpos maternos dirigidos contra antígenos eritrocitários do feto, é necessária a realização de testes que detectem

anticorpos antieritrocitários, como, por exemplo, a Pesquisa de Anticorpos Irregulares no soro da mãe durante o primeiro trimestre de gravidez.

Apesar das recomendações científicas, em grande parte das maternidades públicas de Santa Catarina esse teste, quando realizado, é feito somente em gestantes RhD negativas, devido à relevância da sensibilização de gestantes pelo antígeno D. Devido a carência de informações acerca da existência de outras potenciais classes de anticorpos antieritrocitários causadores de DHPN, justifica-se a realização do presente trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência e a especificidade dos anticorpos irregulares em gestantes atendidas em maternidades públicas da hemorrede de Santa Catarina e elaborar um material clínico na forma de cartilha destacando a importância da realização do teste de pesquisa de anticorpos irregulares, independente da fenotipagem RhD da gestante, nos exames pré natais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar o fenótipo RhD das gestantes com os resultados obtidos na pesquisa de anticorpos irregulares;

Destacar os principais anticorpos envolvidos na DHPN descritos na literatura;

Descrever os testes imunohematológicos que devem ser realizados durante o pré natal em gestantes aloimunizadas e não aloimunizadas;

Discorrer sobre critérios imunohematológicos no que diz respeito a seleção de concentrados de hemácias para transfusão intrauterina e transfusão do recém-nascido;

Descrever a profilaxia para anticorpos anti-D e para outros anticorpos prevalentes.

4. HIPÓTESE

A detecção e posterior identificação de anticorpos irregulares possibilita a determinação do título do anticorpo, conferindo um melhor acompanhamento clínico da gestação e posteriormente do recém-nascido. Assim, além do anticorpo anti-D, serão listados na pesquisa outras especificidades de anticorpos tanto em gestantes RhD negativas quanto em gestantes RhD positivas (em especial anticorpos dirigidos contra outros antígenos do sistema RH e antígenos do sistema KELL) na amostra estudada. Além do mais, esses dados, bem como o esclarecimento da importância do teste de Pesquisa de Anticorpos Irregulares permitirão a construção do material clínico em forma de cartilha.

5. METODOLOGIA

5.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo observacional, transversal com coorte retrospectiva entre janeiro de 2012 a dezembro de 2015. Esse intervalo de tempo foi suficiente para encontrar uma prevalência de anticorpos maternos antieritrocitários significativa na população estudada.

5.2 Local onde se desenvolveu o estudo

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imunohematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), situado na cidade de Florianópolis-SC. O referido laboratório executa, entre outros exames, os testes de compatibilidade entre amostras de doadores e receptores. Esses testes incluem fenotipagem ABO/RhD, Pesquisa e Identificação de Anticorpos Irregulares e Prova de Compatibilidade. Além do mais, é responsável pela liberação de exames (ABO/RhD e Pesquisa de Anticorpos Irregulares) que qualificam as amostras de doadores no quesito imunohematologia. Somado a isso, outros testes realizados no laboratório, tais como TAD, auxiliam no diagnóstico de Anemias Hemolíticas Auto Imunes, Doença Hemolítica Perinatal e investigação de reações transfusionais. O HEMOSC de Florianópolis corresponde a uma unidade da Hemorrede de Santa Catarina, sendo denominado de

Hemocentro Coordenador. Além dele, a Hemorrede conta com seis hemocentros regionais situados nas cidades de Lages, Joaçaba, Criciúma, Chapecó, Joinville e Blumenau; três unidades de coleta situadas nas cidades de Canoinhas, Tubarão e Jaraguá do Sul. Além disso, a Hemorrede possui agências transfusionais ligadas aos hemocentros, são elas: Agência Transfusional do Hospital Governador Celso Ramos (Florianópolis), Agência Transfusional da Maternidade Carmela Dutra (Florianópolis), Agência Transfusional do Hospital Infantil (Florianópolis), Agência Transfusional Florianópolis (Florianópolis), Agência Transfusional do Hospital Regional de São José (São José), Agência Transfusional do Hospital e Maternidade Tereza Ramos (Lages), Agência Transfusional do Hospital do Oeste (Chapecó) e agência Transfusional do Hospital Municipal São José de Joinville. O APÊNDICE 1 trata-se do termo de anuência com pedido de autorização ao Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina para a realização do trabalho proposto.

5.3 População do estudo

No estudo foram incluídas: amostras de sangue de cordão ou periférico de recém nascidos (RN); amostras de sangue das respectivas mães dos RN; amostras de sangue de gestantes com suspeita de alo imunização. Essas amostras serão provenientes de maternidades públicas e hospitais públicos que prestem serviços as gestantes da hemorrede de Santa Catarina: Maternidade Carmela Dutra (Florianópolis), Hospital Regional de São José (São José), bem como amostras provenientes dos hemocentros regionais. No entanto, serão contabilizados somente resultados de amostras cujos testes foram realizados no hemocentro coordenador. Entretanto, serão excluídos dados obtidos de amostras de sangue de cordão e periférico de RN com resultado de TAD negativo (com exceção de casos nos quais o PAI do RN foi positivo).

5.4 Coleta de dados

As variáveis investigadas nas amostras de cordão e de RN foram: Anticorpos maternos identificados no teste de eluato de amostras com TAD positivo; fenotipagem ABO/RhD do recém-nascido. No caso das amostras de gestantes com suspeita de aloimunização e mães dos recém nascidos, procedeu-se à avaliação das seguintes variáveis: anticorpo (s) antieritrocitário (s) identificado (s); fenotipagem RhD da gestante e título dos aloanticorpos de especificidade anti-D. Além dessas variáveis, os casos com necessidade de transfusão sanguínea como forma de tratamento também foram contabilizados.

Os dados foram coletados a partir de registros manuais arquivados nos laboratórios de Imunohematologia do HEMOSC bem como registros informatizados disponíveis no sistema de informática da instituição. Os registros manuais são denominados planilha de registros de resultados. Essas planilhas estão contidas em Procedimento Operacional Padrão específico da Hemorrede e são utilizadas para registro de resultados. As informações contidas nesses registros são repassadas para o sistema informatizado denominado de HEMOSIS. O APÊNDICE2 contém o termo de consentimento para uso de arquivos, registros e similares.

Os dados foram coletados em finais de semana alternados, preferencialmente aos sábados, pela pesquisadora principal do estudo. Para a entrada da aluna no laboratório de Imunohematologia do HEMOSC nos finais de semana, foi solicitada a autorização à chefia imediata por comunicação interna. Assim sendo, a coleta de dados não comprometeu a rotina do laboratório.

Os dados coletados foram registrados diretamente em uma planilha construída no Programa de Excel da Microsoft 2007 (APÊNDICE 4). Nessa tabela, as variáveis inseridas na tabela para avaliação das amostras de sangue de cordão/periférico de RN serão: Sexo do RN, Tipagem ABO/RhD do RN, anticorpos irregulares maternos identificados no eluato e localidade na hemorrede. Para as mães dos RNs e para gestantes com suspeita de aloimunização as variáveis serão: Tipagem ABO e RhD da mãe/gestante, anticorpo irregular identificado e localidade na hemorrede.

5.5 Análise dos dados

Para a análise dos dados foram realizados os testes de distribuição de frequência com o auxílio do programa IBM SPSS Statistics 17.0. Os testes de Fisher, Coeficiente de Cramer e regressão foram feitos no programa BioEstat 5.0. Além disso, para a reprodução dos dados em gráficos foi utilizado o programa Graph Pad Prism 6.0.

5.6 Elaboração da Cartilha

O material clínico em forma de cartilha para aconselhamento de serviços públicos da Hemorrede de Santa Catarina foi elaborado na forma de cartilha a partir de julho de 2015 até abril de 2016, contendo as seguintes informações: descrição sintética da fisiopatologia da DHPN; sintomatologia clínica; principais sistemas de grupos sanguíneos envolvidos; prevalência dos anticorpos irregulares maternos encontrados no estado de Santa Catarina; testes para detecção e identificação dos anticorpos irregulares; profilaxia nos casos de anti-D e outros anticorpos.

O material clínico foi elaborado a partir de revisão bibliográfica. Para tal, se procedeu levantamento de artigos científicos nas bases de dados Scientific Electronic Library Online, (*Scielo*), *Pubmed* e *Scopus*, limitada aos últimos 10 anos, restringindo-se a busca a artigos em inglês, espanhol e português. No entanto, ressalta-se que foram relatados no manual informações contidas em artigos publicados na década de 60, 70, 80 e 90, principalmente no que diz respeito a elucidação de anticorpos antieritrocitários, primeiros casos de DHPN e elucidação da profilaxia anti-D, uma vez que a elaboração do material exige tais informações.

Ademais, analisaram-se outras fontes científicas, incluindo documentos eletrônicos e informações de sociedades médicas, livros e teses publicadas que possuem informações sobre a fisiopatologia, sintomatologia e dados epidemiológicos da DHPN.

A elaboração do material ocorreu na forma impressa e digital. Serão disponibilizados exemplares para a hemorrede de Santa Catarina.

6. CUIDADOS ÉTICOS

O estudo seguiu os preceitos éticos estabelecidos pela Resolução 466/2012 que define as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Sendo assim o presente trabalho foi submetido à avaliação por Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOSC e encontra-se registrado sob o número de CAAE 53624416.9.0000.0110.

Como a base de dados será proveniente de registros arquivados, torna-se impossível a localização dos pacientes e da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sendo assim foi solicitada a isenção do TCLE, prevista na resolução N° 466, de 12 de dezembro de 2012 (apêndice 3).

7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

7.1 Fisiopatologia da DHPN

A Doença Hemolítica do Recém Nascido (DHPN) é caracterizada pela destruição das hemácias fetais de neonatos por anticorpos regulares e irregulares maternos. Esses anticorpos se ligam a antígenos de herança genética paterna presentes no feto ou neonato (KENNEDY, 2008).

Os anticorpos irregulares maternos são produzidos frente à exposição a antígenos eritrocitários em duas situações: transfusão sanguínea e gravidez (BAIOCHI, NARDOZZA, 2009). Nesse último caso, a presença de glóbulos vermelhos fetais na circulação materna pode ocorrer espontaneamente durante a gestação ou quando ocorrem processos como trauma, amniocentese, cordocentese, aborto entre outros. Uma vez que essa produção de anticorpos maternos ocorre no final da gravidez, o feto e o neonato da primeira gestação é raramente acometido (KENNEDY, 2008).

Os anticorpos maternos da classe IgG são transportados via placenta para a circulação fetal e se ligam ao antígeno correspondente. Essa ligação promove a quimiotaxia de células como macrófagos. Esses, por sua vez, transportam as hemácias para o baço, onde são destruídas.

A hemólise leva a um mecanismo compensatório da medula fetal. Essa, por sua vez, promove um aumento da eritropoese e consequente liberação de células jovens da linhagem eritrocitária, denominadas eritroblastos. Com o agravamento do quadro de anemia, a eritropoese se expande ao fígado e ao baço, promovendo um aumento desses órgãos e hipertensão portal. Somado a isso, a diminuição da produção de albumina pelo fígado fetal leva a uma redução da pressão oncótica, edema generalizado e ascite, denominados de "hidropsia fetal". Se não tratada, na maioria dos casos a hidropsia fetal associada a danos cardiovasculares pode levar ao óbito do feto (KENNEDY, 2008).

Somado a isso, durante a gestação a destruição fetal dos eritrócitos libera hemoglobina. A molécula de hemoglobina liberada é metabolizada em bilirrubina. Essa atravessa a circulação materna direcionando-se ao fígado onde é conjugada. Após o nascimento a bilirrubina resultante da destruição dos eritrócitos fetais permanece na circulação do recém nascido, pois a ligação com a circulação materna é rompida. Entretanto, como o fígado do neonato é imaturo, não consegue conjugar a bilirrubina de forma eficiente. Assim sendo, o excesso de bilirrubina não conjugada atravessa a barreira hematoencefálica imatura e se acumula, podendo promover lesões cerebrais

graves, denominada "Kernikterus". Esse termo é uma condição resultante da toxicidade da bilirrubina às células dos gânglios de base e diversos núcleos do tronco cerebral e pode promover sequelas clínicas permanentes (SIMISTER, 2003). Os fetos acometidos podem apresentar, por exemplo, seqüelas no desenvolvimento neuropsicomotor secundárias ao dano cerebral. Além do mais, Cannon e colaboradores (2002) tem associado a incompatibilidade materno fetal por anticorpos do sistema Rh a um aumento do risco de esquizofrenia para o indivíduo em formação. Somado a isso, após o parto, a destruição contínua pode promover anemia. Entretanto, a concentração de anticorpos decresce ao longo de 12 semanas, com o tempo de meia-vida de 25 dias (KENNEDY, 2008).

O grau de hemólise e a severidade da doença está relacionada com a subclasse de IgG transportada via placenta bem como com o número de sítios antigênicos presentes nos eritrócitos (BOWMAN; POLLOCK, 1990). Quatro subclasses de IgG são reconhecidas: IgG 1, IgG 2, IgG3 e IgG4 e possuem variações estruturais e funcionais (MORELL et al, 1971). As subclasses IgG1 e IgG 3 promovem maior dano hemolítico, quando comparadas as outras duas subclasses. O transporte se dá pela placenta e é mediado pelo receptor Fc no começo do segundo trimestre do período gestacional e continua até o nascimento (FIRAM et al., 2001). Quando comparada a subclasse IgG3, anticorpos da subclasse IgG 1 estão associados com hemólise mais severa, uma vez que a concentração de anticorpos dessa subclasse transportada é maior e ocorre mais cedo (KENNEDY, 2008). Além desses fatores, a gravidade da hemólise está na dependência da reação antígeno-anticorpo. Esta reação é dependente por fatores relacionados à união do anticorpo com o antígeno e a aglutinação dos eritrócitos entre si. Dentre os fatores relacionados à essa união temos a constante de equilíbrio que representa a susceptibilidade do anticorpo ao antígeno. Dessa forma, quanto maior for a constante de equilíbrio, maior a afinidade entre eles, e menos imediata a ruptura dessa ligação (WEATHERALL; BUNCH, 1990).

7.2 Mecanismos de transferência de anticorpos maternos para o feto

A transferência de anticorpos maternos para o feto ocorre por meio da placenta. Ressalta-se, no entanto que anticorpos da classe IgG são os únicos a serem transferidos. Esse transporte só é possível devido a presença de receptores Fc (FcRn) nas células do sinciciotrofoblasto da placenta. Assim sendo, os anticorpos IgG se ligam a esses receptores e são transportados via FcRn por meio do mecanismo de transcitose com o intuito de aumentar a imunidade passiva do feto frente a antígenos encontrados na mãe (FIRAN et al., 2001; TESAR; BJORKMAN, 2010). Os receptores FcRn não estão confinados somente a placenta. Os mesmos também podem ser encontrados em células dendríticas, monócitos e macrófagos (ZHU et al, 2001).

A principal função dos receptores FcRn é o transporte ativo do anticorpo IgG. Por ser um transporte com caráter ativo, só ocorre no sentido da mãe para o feto não sendo possível sua ocorrência na direção reversa (KLEIN; ANSTEE, 2014). Os receptores Fc transportam os anticorpos IgG em vesículas ácidas. Além dessas vesículas protegerem os anticorpos de ataques lisossomais, favorecem a ligação de FcRn com resíduos de histidina presentes na porção Fc dos referidos anticorpos, uma vez que a interação desses dois componentes é maior em pH ácido, não sendo relevante em pH básico (MARTIN et al., 2001). Assim sendo, na circulação fetal que apresenta pH básico os anticorpos se desligam dos receptores Fc.

Além da função de transferência de IgG via placenta, os receptores FcRn possuem a propriedade de proteção desses anticorpos frente ao catabolismo. Dessa forma, o tempo de meia-vida dos anticorpos IgG é maior quando comparado a outras imunoglobulinas (22-23 dias em humanos). Assim sendo, os receptores Fc exercem papel fundamental na manutenção de elevados níveis de IgG na circulação (KLEIN; ANSTEE, 2014).

Nas primeiras doze semanas de gestação, apenas pequenas quantidades de IgG são transferidas ao feto. No entanto, em torno da vigésima quarta semana a transferência de anticorpos é significativamente elevada e tende a aumentar exponencialmente até o final da gravidez. Na maioria das vezes, a concentração dos anticorpos IgG tende a ser maior quando comparada a detectada no soro da mãe (KLEIN; ANSTEE, 2014).

7.3 Anticorpos Irregulares envolvidos na DHPN

7.3.1 Anticorpos do Sistema RH

O sistema RH é considerado o mais importante grupo sanguíneo depois do sistema ABO na medicina transfusional. A descoberta do sistema está relacionada com a elucidação das causas de icterícia e morte fetal de neonatos e fetos no século XIX (WESTHOFF, 2008). O referido sistema, considerado de alta complexidade, não é constituído apenas pelo antígeno D. Por volta de 1940, quatro antígenos adicionais foram caracterizados: os antígenos antitéticos C e c bem como os par de antígenos antitéticos E e e. Esses cinco antígenos são responsáveis pela maioria de anticorpos clinicamente significantes do sistema dentre os mais de 50 antígenos já catalogados (WESTHOFF, 2008).

Todos os antígenos do sistema RH são codificados pelos genes RHD e RHCE, cada um com 10 éxons em orientações opostas e são expressos somente na membrana dos eritrócitos. A afirmativa de que esses dois genes foram evolutivamente desenvolvidos a partir do evento de duplicação de um único gene baseia-se no fato de que compartilham 92% de homologia na sequência nucleotídica e 96% de similaridade na sequência de aminoácidos (DANIELS, 2002). Os alelos RHCE são designados RHCE*ce, RHCE*Ce, RHCE*cE e RHCE*CE de acordo com os antígenos que codificam. Já os alelos parciais e variantes RHD são denominados como RHD*DVI, RHD*DFR entre outros. Já as proteínas são identificadas como RhD, Rhce, RhCe, RhcE e RhCE de acordo com os antígenos presentes (WESTHOFF, 2008). Em contrapartida, o fenótipo RhD negativo pode ser resultado da deleção completa do gene RHD (mais frequente em caucasianos); presença do pseudogene RHD inativo (RHD ψ), sendo esse detectado em aproximadamente 65% de indivíduos de etnia negra. Além desses dois processos, a não produção de epítomos do antígeno D também é resultado da presença de um gene híbrido, denominado RHD-CE-D identificado em aproximadamente 15% de indivíduos negros (WESTHOFF, 2007). A exposição de um indivíduo RhD negativo ao antígeno D geralmente resulta na produção do anticorpo. A imunogenicidade do antígeno está relacionada principalmente ao elevado número de aminoácidos presente na proteína RhD comparado a um indivíduo que não possui a proteína. A complexa configuração da proteína resulta em uma resposta imune potente para o indivíduo que não a possui (WESTHOFF, 2008). Assim, cerca de 90% de indivíduos RhD negativos sensibilizam caso forem transfundidos com 1 unidade de Concentrado de Hemácia (CH) RhD positivo. Em relação as gestantes, a taxa de sensibilização cai para 17%. Tal diferença pode ser

explicada pelo fato da possibilidade do feto ser RhD negativo, no caso de heterozigosidade paterna, bem como pela quantidade inferior de células sanguíneas fetais que atravessa a placenta, quando comparada a transfusão de um CH não compatível (CONTRERAS, 1998). Além desses fatores, o acentuado grau de proteção conferido pela incompatibilidade ABO entre mãe suscetível e recém nascido deve ser citado reduz o risco de sensibilização de 16% para 2%. O provável mecanismo envolvido nesse caso seria a rápida destruição das hemácias fetais incompatíveis por anticorpos maternos anti-A e/ou anti-B fixadores de complemento, impossibilitando o reconhecimento do antígeno D pelo sistema imune (BAIOCHI; NARDOZZA, 2009).

Os anticorpos dirigidos a antígenos do sistema RH são na grande maioria da classe IgG e não ativam o sistema complemento, salvo raras exceções. São considerados clinicamente significantes em reações transfusionais hemolíticas tardias e no desencadeamento da DHPN. Nesse último caso, após o anti-D, o anticorpo anti-c é considerado o mais importante no desenvolvimento de anemia fetal grave. Por outro lado, os anticorpos anti-C, anti-E e anti-e estão implicados no aparecimento de anemia fetal branda (WESTHOFF, 2008).

7.3.1.1 Anti-D

O antígeno RhD é o mais importante do sistema Rh devido ao seu envolvimento na doença hemolítica perinatal e nas reações transfusionais hemolíticas. O antígeno RhD é considerado como um mosaico composto de 37 epítomos, onde pelo menos nove epítomos (epD1-epD9) já foram definidos por diferentes anticorpos monoclonais (LOMAS-FRANCIS et al., 1984).

O antígeno D contribui com cerca de 60% dos casos de DHPN com fetos assintomáticos e 90% dos casos com anemia fetal grave (LAMBIN et al., 2002; MOLLISON; ENGELFRIET; CONTRERAS, 2005). A incidência de DHPN por anti-D é influenciada pela frequência de mulheres RhD negativo que varia entre grupos étnico sendo mais elevada na etnia caucasiana (HADLEY, 2002). No Brasil, devido a diversidade étnica, a prevalência de mulheres RhD negativo varia de acordo com cada região. Entretanto, a população de gestantes RhD negativo está em torno de 10% (AMORIN et al., 2003; LOBATO, REICHENHEIM; COELI, 2008). Como o referido antígeno desenvolve-se nos eritrócitos fetais a partir da sexta semana e a circulação fetal já está bem estabelecida com 4 semanas de gestação, a sensibilização por anti-D

pode, teoricamente, se instalar desde o segundo mês de gestação (URBANIAK; GREISS, 2000). Segundo Tiblad e colaboradores (2013), dentre as gestantes que não recebem a profilaxia anti-D, aproximadamente 50% são sensibilizadas durante a primeira gestação ou no momento do parto do primeiro filho, sendo que a chance de desencadeamento de DHPN em gestações posteriores é elevado. Entretanto, dentre as gestantes que não recebem a profilaxia, um terço é sensibilizada a partir da segunda gestação (TIBLAD et al., 2013).

O advento da profilaxia anti-D teve como consequência a redução da incidência da aloimunização RhD durante a gestação (MOISE, 2008). Apesar dessa redução, o anti-D continua a ser o anticorpo mais comum que conduz a morbidade e a mortalidade fetal e neonatal (ROBERTS, 2008; CIANCIARULLO; CECCON; VAZ, 2003). A severidade da DHPN causada por anti-D pode ser explicada devido a alta imunogenicidade do antígeno e a possibilidade de produção de altos títulos do anticorpo, promovendo destruição acentuada de hemácias do feto. Dessa forma, em muitos casos a sintomatologia de hiperbilirrubinemia, anemia profunda, hidropsia fetal e até o óbito podem ser evidenciados (GIRELLO; KUHN, 2011).

7.3.1.2 Anti-c

O anticorpo anti-c é uma importante causa de DHPN severa que, às vezes apresenta evolução clínica semelhante a anemia fetal ocasionada por anti-D. Sendo assim, hemólise grave e, por vezes, a colestase podem ser verificadas (MONTEIRO; FERFEBAUM; DINIZ, 1996).

A alo imunização ocasionada pelo antígeno c é similar aquela observada para o antígeno D (HACKNEY et al., 2004). Caso a gestante e o pai da criança apresentem o fenótipo c negativo, o recém nascido apresentará o mesmo fenótipo para o antígeno e, caso a mãe possuir anti-c, o neonato não será afetado. Por outro lado, o feto poderá ser acometido pela doença caso o pai expresse na membrana da hemácia o antígeno em questão. Dependendo da zigosidade do gene, o feto apresentará a chance de 50% de possuir o fenótipo c positivo. Nesse caso, a gestante que apresentar fenótipo negativo para o antígeno c apresenta o risco de ser alo imunizada durante a gestação nas seguintes situações: hemorragia feto materna; deslocamento de placenta; aborto terapêutico ou espontâneo; sangramento durante o parto e gravidez ectópica (HACKNEY et al., 2004).

Wenk e colaboradores (1986) reportaram 70 casos de alo imunização materna pelo anticorpo anti-c. Dentre esses, em oito casos foi possível evidenciar hidropsia no neonato e morte prematura. Ainda no mesmo estudo, 25% dos casos apresentaram DHPN branda, não sendo necessário transfusões de sangue após o nascimento e 29% dos casos foram diagnosticados como DHPN moderada com necessidade de transfusão. Já o estudo proposto por Hackney e colaboradores (2004) demonstrou que dentre 55 gestantes com anti-c, 46 tiveram filhos com teste de antiglobulina humana direta positivo por anti-c. Dentre esses, 25% apresentaram DHPN de caráter grave, 7% foi evidenciado hidropsia e em 17% dos casos foi necessária a transfusão intra uterina.

A DHPN ocasionada pelo anti-c ocasiona elevações nos níveis de bilirrubina, encefalopatia, alterações auditivas no neonato e anemia tardia (MURKI; KANDRAJU; DEVI, 2012).

7.3.1.3 Anti-C, anti-E, anti-e

A detecção dos anticorpos anti-C, anti-E e anti-e em gestantes ocorre geralmente em conjunto com a identificação de anticorpos de especificidade anti-D, potencializando seu efeito hemolítico (SPONG; PORTER; QUEENAN, 2001). A presença isolada desses anticorpos raramente está associada com anemia fetal grave com necessidade de transfusão intra uterina para tratamento (VAN KAMP et al., 2001). Joy e colaboradores (2005) identificaram 32 gestantes alo imunizadas apenas com anti-E. Dentre essas, apenas 1 feto apresentou o quadro de hidropsia fetal, sendo que em 15% dos neonatos foi evidenciado anemia fetal leve.

7.3.1.4 Anti-G

O antígeno G é codificado pelos genes RHD e RHCE. Foi descrito pela primeira vez em 1958 por Allen e Tippett. Os autores postularam que eritrócitos contendo o antígeno C e/ou antígeno D expressavam também o antígeno G. Entretanto a densidade antigênica do antígeno G era máxima quando ambos os antígenos estavam presentes. Já eritrócitos que não expressavam antígeno D e C eram, na maioria das vezes, desprovidos da presença do antígeno G (ALLEN; TIPPETT, 1958; SKOV, 1976).

Os anticorpos anti-G parecem ser uma mistura de anti-D mais anti-C (anti-D, -C). Entretanto, os anticorpos anti-G, ao contrário da presença de anti-D,-C, não podem ser separados em métodos de adsorção e eluição de anticorpos. A suspeita do anticorpo ocorre quando um indivíduo RhD negativo transfundido com hemácias RhD negativo, porém C positivo, desenvolve um aloanticorpo semelhante ao anti-D (WESTHOFF, 2008). Assim, anti-G, que usualmente era chamado de anti-CD, pode ser definido como o anticorpo que é formado por indivíduos RhD negativo que reage com hemácias apresentando o fenótipo C+,D-; C-,D+; C+,D+, porém não reage com hemácias D-,C- (ISSIT; TESSEL, 1981).

De maneira similar a outros anticorpos do sistema RH, anti-G está implicado no desenvolvimento de DHPN de caráter severo em neonatos e fetos de mulheres RhD negativo (ccddee) (MULLER; SCHUCKER; BOCTOR, 2011). Nesses casos, a suspeita da presença de anticorpos anti-G decorre em situações nas quais gestantes RhD negativo dão a luz a neonatos RhD negativo, mas C positivo, e desenvolvem um anticorpo com perfil semelhante ao anti-D nos métodos de identificação (WESTHOFF, 2008). A maioria dos casos de DHPN por anti-G está associado com a presença de anti-D, anti-C ou ambos (HADLEY et al., 1996; SHIREY et al., 1997). Cash e colaboradores descreveram o primeiro caso no qual o anti-G isoladamente foi identificado em um recém nascido sem sinais clínicos de DHPN (CASH et al., 1999). Em contrapartida, Huber et al (2006) descreveram um caso de DHPN de caráter moderado com presença de hiperbilirrubinemia necessidade de fototerapia como forma de tratamento (HUBER et al., 2006).

A distinção da especificidade de anti-D, -C e anti-G pode ser feita com o auxílio de métodos de adsorção e eluição de anticorpos. Os métodos para a identificação do anticorpo anti-G foram inicialmente propostos por Allen e Tippett (1958) e reproduzidos por Issit e Tessel (1981). No método proposto, o soro é inicialmente adsorvido com hemácias R₀ (C-,D+) e após o processo de adsorção, procede-se o teste de eluato. O produto do referido teste é adsorvido com hemácias r' (C+,D-) para posterior realização de outro eluato. A ausência de reatividade desse novo eluato indica a ausência de anti-G. Por outro lado, a presença de reação positiva quando o eluato é testado com hemácias de fenótipo C-,D+; C+,D-; C+,D+ direciona para a presença de anti-G (ALLEN; TIPPETT, 1958; ISSIT; TESSEL, 1981). Os resultados encontrados por Issit e Tessel (1981) apontaram que o anticorpo anti-G estava presente em 30% das amostras apresentando anticorpos com perfil anti-D,-C.

Outros estudos com investigação semelhante, demonstraram que em 45% de amostras com perfil de anticorpos anti-D,-C, o anticorpo anti-D estava ausente (MALEY et al., 2001). No caso de gestantes aloimunizadas, Shirey e colaboradores (1997) postularam que dentre 7 gestantes com presença de anticorpos anti-D+C, 2 (30%) não apresentavam o anticorpo anti-D (SHIREY et al., 1997), indicando que o anticorpo presente era o anti-G.

A correta identificação do anticorpo é importante para a conduta frente a profilaxia anti-D, já que o anti-G como causa única de DHPN não interfere na decisão da forma de tratamento. Entretanto, nos casos de gestantes com anticorpos de especificidade anti-G, é possível proceder a administração da imunoglobulina com o intuito de prevenir a formação do anti-D (MULLER; SCHUCKER; BOCTOR, 2011).

7.3.2 Anticorpos do Sistema Kell

O sistema Kell é constituído por 31 antígenos, incluindo 3 antígenos obsoletos. Dentre esses, encontram-se 5 pares e 1 terceto de antígenos antitéticos. Os antígenos estão localizados em uma glicoproteína de membrana denominada CD238 com domínios Carboxi terminais (extracelular) terminais e amino terminais (intracelular). A glicoproteína Kell está ligada a proteína integral de membrana denominada Xk. Essa ligação ocorre por meio de uma ponte dissulfeto (figura 1). A ausência da proteína Xk resulta na diminuição da expressão da proteína Kell que conseqüentemente interfere na expressão dos antígenos desse sistema na membrana da hemácia. O antígeno K (Kel 1) é o mais conhecido no sistema. Sua incidência é de 9% na etnia caucasiana, 1,5% na etnia negra, sendo raro na população asiática. Seu antígeno antitético k (celano, Kel 2) possui alta prevalência em todas as populações. A expressão desses dois antígenos é resultado de um polimorfismo genético conferindo a substituição de um único nucleotídeo no éxon 6 (DANIELS, 2008).

Figura 1. Modelo esquemático da glicoproteína Kell ligada a proteína Xk.

Fonte. Adaptado de Daniels (2008)

Os anticorpos do sistema Kell são predominantemente da classe IgG, mais especificamente IgG1 (KLEIN; ANSTEE, 2005). Estão implicados em reações transfusionais hemolíticas e envolvidos na etiologia da DHPN (DANIELS, 2008). A aloimunização por antígenos do sistema Kell pode ocorrer principalmente por dois mecanismos: transfusões de sangue e gestação. Nesse último caso, ressalta-se que a incidência de anticorpos dirigidos a antígenos desse sistema, especificamente o anti-Kell, teve um aumento significativo nos últimos trinta anos. Esse resultado em partes é reflexo da falta de uma conduta transfusional simples na maioria dos países: transfusão de concentrados de hemácias Kell negativo em crianças do sexo feminino e mulheres em idade reprodutiva (LAKHWANI et al., 2011).

A DHPN ocasionada por anticorpos do sistema KELL, mais especificamente anti-Kell, apresenta diferenças laboratoriais e clínicas, quando comparada a outros anticorpos irregulares maternos causadores da doença. O grau da anemia fetal e neonatal observada pelos clínicos pode ser severa e representar o único sinal clínico da doença. Laboratorialmente, esse sinal clínico reflete na contagem de precursores eritroides nucleados neonatais, que pode ser baixa, direcionando para um indicativo de supressão da atividade eritropoietica fetal. Além do mais, a severidade da anemia fetal e neonatal parece não ser influenciada pelos títulos de anticorpos

maternos. O somatório desses achados pode ser explicado pelos mecanismos propostos para o desenvolvimento da DHPN por anticorpos do sistema KELL (ROBERTS, 2008).

Esses mecanismos incluem primeiramente a sensibilização de células (com antígenos do sistema KELL expressos) e posterior seqüestro pelo sistema reticuloendotelial fetal tendo como consequência a supressão da eritropoiese. Esse mecanismo foi descrito por Vaughan e colaboradores (1998). Em seu estudo, o pesquisador referenciado verificou que o crescimento *in vitro* de células progenitoras eritroides com expressão do antígeno Kell (provenientes de neonatos) era inibido após a adição de anticorpos anti-Kell (VAUGHAN et al., 1998), esclarecendo a evolução da anemia fetal e neonatal verificada por clínicos.

Os antígenos do sistema KELL expressam-se também em outros progenitores mieloides. Assim sendo, a inibição da fetoproliferação dessas células pode ser a explicação para o aparecimento de leucopenia e trombocitopenia em alguns neonatos (WAGNER; LANZER; GEISSLER, 2002)

De acordo com a literatura, o título crítico em gestantes alo-imunizadas é definido como aquele no qual há um significativo risco de aparecimento de anemia fetal severa. Para a maioria dos anticorpos, esse título crítico é equivalente a 1:32. Entretanto, para anticorpos do sistema Kell, particularmente anti-Kell, já foi reportado desencadeamento de anemia severa em títulos mais baixos. Sendo assim, para anticorpos dirigidos contra antígenos do sistema Kell, alguns pesquisadores recomendam estabelecer o título crítico menor ou igual a 1:8 (MOISE, 2008). Assim sendo, a falta de correlação entre o grau da anemia e a existência de métodos padrões para monitoramento das gestantes cujos fetos são acometidos por DHPN ocasionados por anticorpos do sistema KELL, direciona para problemas graves durante a gestação que podem levar o feto a óbito. Com isso, a estimativa da concentração da hemoglobina fetal por cordocentese é altamente recomendada ao longo da gestação (ROBERTS, 2008).

7.3.3 Anticorpos do Sistema DUFFY

O sistema Duffy de grupos sanguíneos é constituído por 6 antígenos inseridos em uma glicoproteína de membrana (DARC) (figura 2), sendo essa codificada pelo gene Duffy (DARC) localizado no cromossomo 1q23.2. Esse gene é composto por dois éxons, sendo que o éxon 1 codifica somente os 7 primeiros aminoácidos da glicoproteína Duffy (DANIELS, 2008). Além

dos eritrócitos, a glicoproteína Duffy é encontrada em células endoteliais de capilares e outras células ao longo do corpo: células endoteliais do fígado, ductos coletores, pulmão, glândula tireóide, entre outras (DEAN, 2005).

Os antígenos Fy(a) e Fy(b) são produtos dos alelos FYA e FYB e são oriundos de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) (figura 2). Esses polimorfismos ocorrem no éxon 2 do gene DARC e são responsáveis pelo aparecimento de três fenótipos principais: Fy(a+b+), Fy(a+b-) e Fy(a-b+). Em indivíduos de etnia negra, o fenótipo mais comum consiste no Fy(a-b-), sendo esse resultado de um gene silencioso em homozigose (DANIELS, 2008). A glicoproteína Duffy é uma receptora de citocinas nos eritrócitos, e liga uma variedade de quimiocinas pró-inflamatórias agudas e crônicas, incluindo interleucina-8 (ROT, 2005). Somado a isso, é reconhecido na literatura que os antígenos desse sistema têm função de receptores de merozoítas de *Plasmodium vivax* em humanos (SINGH et al., 2006).

Figura 2. Modelo esquemático da glicoproteína Duffy com domínios externos N-terminal e domínios citoplasmáticos C-terminal e a localização do polimorfismo Fy^a/Fy^b.

Fonte. Adaptado de Daniels (2008)

Os anticorpos do sistema Duffy, em especial anti-Fy(a), são reconhecidos por desencadear reações transfusionais hemolíticas tardias bem com DHPN, sendo que o prognóstico dessa varia de leve a grave (DANIELS, 2008). A prevalência de anticorpos anti-Fy(a) durante a gravidez está

em torno de 0,01-5,4% (JOVANOVIĆ-SRZENTIC et al., 2003). A baixa prevalência dessa especificidade de anticorpos durante a gravidez é acompanhada de poucos casos graves descritos na literatura (COOK; BAKER; WEAVER, 1989; DUFOUR et al., 1991). A doença é usualmente de caráter leve, sendo que tratamento na maioria das vezes requer somente a fototerapia (GOODRICK; HADLEY; POOLE, 1997). Os anticorpos anti-Fy(b) são cerca de 20 vezes menos comuns em relação ao anti-Fy(a) e raramente estão implicados na DHPN (MOISE, 2004). Como a DHPN ocasionada por anticorpos do Sistema Duffy é na maioria das vezes considerada branda, requer monitoramento menos rigoroso quando comparada a DHPN ocasionada por anticorpos de especificidade anti-D, -c ou -K. No entanto, Goodrick e colaboradores (1997) reportaram três casos nos quais anti-Fy(a), identificado na amostra de recém nascido e com título superior a 64 no soro materno, foi responsável pelo aparecimento de anemia severa. Devido a intensidade da hemólise ocasionada, foi necessário tratamento com transfusões intrauterinas. Hughes e seu grupo de pesquisa (2007) reportaram um caso severo de DHPN envolvendo anti-Fy(a) com título equivalente a 128 no soro materno. Esses dados sugerem que o título do anticorpo determinado na amostra de sangue da mãe é fundamental para o monitoramento da gestação e do recém nascido.

7.3.4 Anticorpos do Sistema KIDD

O Sistema Kidd é composto por três antígenos localizados em uma glicoproteína de membrana de múltipla passagem. O gene Kidd, denominado SLC14A1, é composto por 11 exons e está localizado no cromossomo 18q12.3 (DANIELS, 2008). Esse gene codifica a glicoproteína Kidd, que atravessa a membrana dez vezes, carrega domínios citoplasmáticos amino terminal e carboxi terminal e um domínio N-glican na terceira alça extracelular (figura 3) (LOMAS-FRANCIS, 2007). A glicoproteína Kidd é reconhecida por ser um transportador de uréia. Essa função foi reconhecida a partir de observações de que eritrócitos Jk(a-b-) são relativamente resistentes a lise por uréia. Dessa forma, a glicoproteína Kidd possibilita de maneira eficaz o transporte do referido metabólito intra e extra eritrocitária quando os glóbulos vermelhos atravessam elevadas concentrações de uréia na medula renal, prevenindo assim a desidratação (LUCIEN et al., 2002).

Os antígenos Jk(a) e Jk(b) são produtos de alelos oriundos de mutações gênicas envolvendo polimorfismos de um único nucleotídeo (figura 3). O fenótipo nulo Jk(a-b-) é resultado da presença de um gene silencioso em homozigose presente no locus JK. Embora muito raro na maioria das populações, esse fenótipo nulo é relativamente comum na população da Polinésia e está envolvido com a perda do antígeno de alta frequência Jk3 (DANIELS, 2008).

Figura 3. Modelo esquemático da glicoproteína Kidd com seus domínios citoplasmáticos amino terminal e carboxi terminal, domínio N-glican e a localização do polimorfismo Jk^a/Jk^b.

Fonte. Adaptado de Daniels (2008)

Anticorpos dirigidos a antígenos do Sistema Kidd são implicados no desencadeamento de reações transfusionais hemolíticas tardias. Em grande maioria são da classe IgG 1 e IgG3, no entanto, podem ser encontrados como IgG2, IgG4 e IgM (DANIELS, 2008). Apesar de anticorpos do sistema Kidd estarem implicados em reações transfusionais hemolíticas de caráter grave, raramente estão envolvidos no desencadeamento da DHPN. No entanto as razões pelas quais esses anticorpos não estejam implicados de maneira significativa na etiologia da doença hemolítica do recém-nascido mesmo em títulos elevados ainda não estão esclarecidas (DANIELS, 2008).

O primeiro caso reportado para anticorpos de especificidade anti-Jk(a) com sintomatologia foi em 1959. Na ocasião o neonato apresentava *kernicterus* (MATSON; SWANSON; TOBIN, 1959). Já para anticorpos anti-Jk(b), o primeiro relato descrito na literatura ocorreu em 1953 (PLAUT et al., 1953). Entretanto poucos casos de DHPN ocasionados por anticorpos do Sistema Kidd estão descritos. A severidade dos casos varia de leves, graves e fatais (FERRANDO et al.; 2008; KIM, 2006). A maioria dos relatos de casos descritos requerem apenas fototerapia como tratamento suporte (PARK et al., 2003), outros não requerem tratamentos, visto que o feto não apresenta sintomatologia clínica ao nascimento (RODRIGUEZ et al.; 2014). Somente um caso de DHPN por anticorpos anti-Jk(b) foi necessária transfusão sanguínea (MERLOB et al., 1987). Por outro lado, apesar da baixa incidência desses anticorpos no desencadeamento da doença, a sintomatologia de alguns neonatos acometidos por DHPN pode ser fatal. Fernando e colaboradores (2008) descreveram dois casos DHPN por anticorpos anti-Jk(b) nos quais um o neonato apresentou hidropsia fetal após o nascimento e no outro morte intrauterina. Assim, embora a doença hemolítica perinatal é reconhecida por apresentar sintomas brandos e um prognóstico favorável, anemia severa e hidropsia fetal podem ocorrer. Assim, a detecção dos anticorpos desse sistema bem como o monitoramento do título dos mesmos é recomendada (RODRIGUEZ et al., 2014).

7.3.5 Anticorpos do Sistema MNS

O Sistema MNS compreende 46 antígenos e é considerado altamente complexo. Essa alta complexidade é resultado de recombinações genéticas entre genes homólogos responsáveis pela codificação de glicoforinas que carregam os antígenos do sistema. Tais glicoforinas são denominadas: glicoforina A (GPA, CD235A) e glicoforina B (GPB, CD235B). Estão localizadas no cromossomo 4, banda q31 e são constituídas por 1 domínio N-terminal externo e 1 domínio C terminal, atravessando somente uma vez a membrana do eritrócito (DANIELS, 2008; ONDA; KUDO; FUKUDA, 1994). O gene responsável pela codificação da GPA é constituído por 7 éxons e apresenta na sua sequência gênica 97% de homologia com a GPB, sendo que o gene codificador dessa última glicoforina possui 5 éxons. Essas glicoforinas representam o maior grupo de sialoglicoproteínas da membrana do eritrócito (NOVARETTI et al., 2003). Dentre os antígenos do sistema MNS de maior importância clínica transfusional destacam-se os antígenos M e N

(localizados na glicoforina A) e os antígenos S, s e U (localizados na glicoforina B). Além desses antígenos, mais de 40 fenótipos variantes já foram identificados e são resultados de recombinações gênicas entre as glicoforinas A e B (BLUMENFELD; HUANG, 1995).

Em relação aos antígenos de maior importância clínica transfusional citados acima, ressalta-se que os respectivos anticorpos podem estar implicados em reações transfusionais hemolíticas e no desencadeamento da DHPN. Nesse último caso, os anticorpos mais descritos na literatura como causadores da doença hemolítica do recém nascido incluem o anti-M e em menor escala o anti-S (DANIELS, 2008).

Os antígenos M e N são expressos nas membranas dos eritrócitos fetais a partir da nona semana de gestação (BONY et al., 1999), dessa forma, ao nascimento, o número de cópias dos referidos antígenos que expressam-se na membrana das hemácias do neonato, é similar ao número de cópias de glicoforina A expressa na membrana do eritrócito fetal imaturo (HEATHCOTE; CARROLL; FLOWER, 2011).

Anticorpos de especificidade anti-M são geralmente da classe IgM e são detectados e identificados em aproximadamente 10% das gestantes com triagem positiva para anticorpos irregulares. No entanto, somente uma pequena porcentagem desses anticorpos detectados (0,01-0,7%) são da classe IgG, e podem atravessar a barreira placentária desencadeando variados graus de hemólise no feto ou no recém nascido (ARORA et al., 2015). Dessa forma, os fetos ou recém-nascidos podem ser assintomáticos ou com graus de anemia grave que podem levar a hidropsia fetal (WIKMAN et al., 2007; YOUNG-OWENS et al., 1997). O primeiro caso de DHPN ocasionada por anticorpos de especificidade anti-M, foi reportado em 1959. Na ocasião, uma gestante de gêmeos apresentava elevados títulos dos anticorpos em questão que atravessaram a barreira placentária em torno da trigésima quinta semana, resultando em morte de um dos fetos e anemia severa em outro (STONE; MARSH, 1959).

Como já mencionado, apesar da incidência de anticorpos anti-M ser baixa (YOUNG-OWENS et al, 1997), os casos de DHPN desencadeadas por essa especificidade de anticorpo concentram-se principalmente no continente asiático. De acordo com a literatura mais de 34 casos de DHPN fatal foram descritas no Japão desde 1975, sendo que na maioria dos casos houve necessidade de intervenções terapêuticas (MIMAYA; NAGAO; KOMIYA, 1975; NEGISHI et al, 2008). Além do mais, nos casos descritos, o aloanticorpo anti-M é formado por estímulos da

primeira gestação. Sendo assim, o segundo feto ou recém nascido é gravemente ou moderadamente afetado.

De maneira geral, o padrão ouro para diagnóstico imuno-hematológico laboratorial da DHPN, consiste no resultado positivo para o teste de antiglobulina humana direto na amostra no recém nascido. Entretanto, nos casos de doença hemolítica por anticorpos anti-M esse achado nem sempre ocorre, mesmo com o desenvolvimento completo do sistema MNS ao nascimento (BONY et al., 1999). Uma das explicações para esse fato está relacionada com o mecanismo desencadeado pelo anticorpo anti-M para o desenvolvimento da DHPN. A rápida hemólise intravascular verificada para casos de anti-M é similar ao encontrado para casos de DHPN por anti-K e assim como esse último anticorpo é independente do título do mesmo (VAUGHAN et al., 1998), (YASUDA et al., 2014). A similaridade dos mecanismos de DHPN desencadeada por anti-K e anti-M foi reportada por Nolan e colaboradores (2000) e reforçada por Wikman e sua equipe em 2007. Os pesquisadores demonstraram em seus experimentos que anticorpos anti-M maternos promovem uma redução dose dependente de progenitores eritroides imaturos (antígeno M positivos), acompanhada de reticulocitopenia. Esses achados indicam que anticorpos anti-M promovem supressão dos precursores eritroides, contribuindo para hemólise fetal e anemia neonatal hipogenerativa.

Anticorpos anti-S são da classe IgG e são formados a partir de imunização prévia. Como tratam-se de anticorpos da classe IgG, reagem melhor a 37°C e, *in vitro* são detectados por meio do teste de antiglobulina humana indireta (PARSH, 2000). Conforme já citado acima, o anticorpo anti-S pode desencadear reações transfusionais hemolíticas que vão de moderada a grave, bem como a doença hemolítica perinatal (DANIELS, 2011). Nesse sentido, o espectro da hemólise em recém nascidos ocasionadas por esse anticorpo pode ser severo. Nesses casos há necessidade de transfusões intrauterinas ainda no período fetal (PARSH, 2009). Por outro lado, em outros casos apenas o tratamento com fototerapia é suficiente para melhora do recém nascido (YOUSUF et al, 2012). O primeiro caso de DHPN por anti-S foi descrito em 1952. Na ocasião o recém nascido foi a óbito após 60 horas do parto em decorrência do quadro de "Kernicterus" (LEVINE; FERRARO; KOCH, 1952). Como a formação do anti-S decorre de sensibilização prévia, de maneira geral por transfusões sanguíneas, o teste de triagem para detecção dos anticorpos e o conhecimento do histórico transfusional da gestante tornam de suma importância. Dentre 175.000 gestações durante o período de 5 anos, anti-S foi detectado em 22 dessas no total de 19 mulheres. Entre essas, 13 formaram o anticorpo após transfusões sanguíneas subseqüentes (MAYNE et al., 1990). Outro

anticorpo do sistema MNS envolvido na DHPN é o anti-U. A literatura reporta em torno de 16 casos de gestações complicadas devido a presença do anticorpo anti-U. Similarmente ao anti-S, a gravidade dos casos varia de assintomática a severa (ZAGO et al., 2003). O primeiro caso de DHPN por anti-U foi no ano de 1961, no entanto, nesse caso não houve evidências clínicas de hemólise do recém nascido (ALFONSO; DE ALVAREZ, 1961). Em sete outros casos de DHPN por anti-U, também não houve hemólise fetal, nem necessidade de procedimentos hemoterápicos especiais (DOPP; ISHAM, 1983; SMITH et al., 1998; TUCK; STUDD, 1982). Por outro lado, outros casos da literatura reportam situações na qual procedimentos como transfusões intrauterinas bem como exsanguíneo transfusões foram necessárias para sobrevivência do feto e do recém nascido (BURKI; DEGNAN; ROSENFELD, 1964; CASTEL; DREJER; VERWEY, 1993).

7.3.6 Anticorpos do Sistema DIEGO

O Sistema de grupo sanguíneo Diego é composto por 21 antígenos localizados na glicoproteína de membrana denominada Banda 3. Essa glicoproteína é considerada a principal proteína integral na membrana dos eritrócitos e corresponde a aproximadamente 10^6 cópias por célula. A Banda 3 é composta por 911 aminoácidos e é codificada pelo gene SLC4A1 localizado no cromossomo 17q21-q22. Esse gene pertence a família dos genes transportadores de ânions (Solute Carrier Family 4/Anion Exchanger 1) (DANIELS, 2008; TANNER; MARTIN; HIGH, 1988). A glicoproteína banda 3 atravessa diversas vezes a membrana do eritrócito e seu domínio N-terminal apresenta um ponto de ancoragem para o citoesqueleto da membrana, por meio de interações com as proteínas periféricas anquirina 4.1R e 4.2, contribuindo para a manutenção da forma estrutural da hemácia (BRUCE et al., 2003). Já o domínio citoplasmático C-terminal, atravessa a membrana de 12 a 14 vezes possibilitando a formação de um canal iônico que troca íons HCO_3^- e Cl^- contribuindo para a retirada de CO_2 dos tecidos pelos eritrócitos (figura 4) (VINCE; CARLSSON; REITHMEIER, 2000).

Figura 4. Modelo esquemático da glicoproteína Diego, Banda 3 e os domínios amino terminal e carboxi terminal e a localização dos 21 antígenos pertencentes ao sistema.

Fonte. Adaptado de Daniels (2008).

Os principais antígenos do sistema são denominados Di(a) e Di(b). Esse par de antígenos antitéticos são oriundos de polimorfismos de um único nucleotídeo com substituição de um único aminoácido na Banda 3 na posição 854. No caso da presença do antígeno Di(a) o aminoácido presente é a Leucina. Para Di(b) o aminoácido encontrado é a Prolina (DANIELS, 2008). O antígeno Di(a) é raro nas populações da Europa e África (incidência de 0,01%), porém apresenta prevalência elevada nas populações asiático-mongolóides: chinês (5%), japonês (12%), coreano (14,5%), indígenas americanos (36%) (KOMATSU et al., 2004). Já o antígeno Di(b) é considerado de alta frequência na maioria das populações (DANIELS, 2008).

Os anticorpos anti-Di(a) e anti-Di(b) são usualmente da classe IgG 1 e IgG 3 e estão implicados em reações transfusionais hemolíticas e na etiologia da DHPN. A severidade da

doença hemolítica do recém nascido pode ser branda ou severa. Nesse último caso o anticorpo desse sistema comumente envolvido é o anti-Di(a) (DANIELS, 2008).

O antígeno Di(a) foi descrito pela primeira vez em 1955 por Larysse e colaboradores. O antígeno foi caracterizado após a identificação de um anticorpo no soro da mãe de um recém nascido com sintomatologia clínica da DHPN (LARYSSE; ARRENDIS; DOMINGUEZ, 1955). A sensibilização das gestantes por anticorpos anti-Di(a) ocorre principalmente por imunização da mulher no momento do parto quando as hemácias do feto carregadas dos antígenos Di(a) entram em contato com o sistema imunológico materno. Além do mais, procedimentos invasivos tais como amniocentese, cordocentese e coletas de amostras de vilos coriônicos também acarretam na sensibilização materna durante a gestação (MOLLINSON; ENGELFRIET; CONTRERAS, 1998; SILVA; JORGE; HIRTSCHE, 2004). Entretanto, a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) no soro de gestantes imunizadas com anti-Di(a) quando realizada, normalmente é negativa. Isso ocorre uma vez que antígenos Di(a) normalmente não fazem parte do padrão de reagentes de hemácias fenotipadas selecionadas para a produção dos reagentes da PAI, devido a baixa frequência em caucasóides e negros (PARK et al., 2003). Monestier e colaboradores (1984) descreveram na literatura um caso de DHPN por anti-Di(a) no qual o neonato apresentava grau moderado de hiperbilirubinemia, no entanto, a triagem sorológica para anticorpos irregulares no soro materna apresentava-se negativa. De maneira similar, Hundric-Haspl e seu grupo de pesquisa (2003), descreveram outro caso de doença hemolítica perinatal por anti-Di(a) com teste de PAI negativo no soro materno. Na ocasião, o neonato apresentou anemia intensa 3 semanas após o nascimento e foram necessárias 2 transfusões sanguíneas como tratamento suporte. De acordo com Park e colaboradores (2003), se antígenos diferentes são encontrados com maior frequência em determinada etnia, células contendo esses antígenos deveriam fazer parte dos reagentes de hemácias utilizados em triagens pré-transfusionais e gestacional, com intuito de investigar anticorpos eritrocitários em qualquer população.

De maneira similar a formação do anticorpo anti-Di(a), anti-Di(b) é geralmente formado durante a gestação ou após transfusões sanguíneas (IWAMOTO et al., 2000). O referido anticorpo foi caracterizado pela primeira vez em 1967 durante investigação de um quadro de reação transfusional hemolítica tardia (THOMPSON; CHILDERS; HATCHER, 1967).

Como os anticorpos anti-Di(b) em grande parte das subclasses IgG1 e IgG3, há grande chance da sintomatologia da DHPN ser severa caso o soro materno for incompatível com as

hemácias do feto. Assim, de acordo com a literatura, os casos de DHPN por anticorpos anti-Di(b) variam desde sintomas leves até sintomatologia de icterícia grave com necessidade de exsanguíneo transfusão (MOCHIZUKI et al., 2006; PARK et al., 1999). Além do mais o título do anticorpos parece estar implicado na gravidade da doença. Títulos superiores a 64 estão relacionados com sintomatologia mais acentuada quando comparados a títulos inferiores ao citado e muitas vezes o tratamento requer exsanguíneotransfusão (MOCHIZUKI et al., 2006).

7.4 Importância clínica dos anticorpos na DHPN

O quadro 1 apresenta um resumo da relevância clínica dos anticorpos citados no desencadeamento da DHPN. Além dos anticorpos citados, apresenta a importância clínica de outros antígenos não citados pertencentes a outros sistemas. A expressão desses antígenos, como por exemplo Lu(b) e Yt(a) é muito baixa nas hemácias do feto, e por isso não acarretam em hemólise acentuada. Além do mais, para alguns anticorpos sem importância clínica, a explicação para o não envolvimento na DHPN é baseado na presença do antígeno em células da placenta, neutralizando a transferência dos anticorpos para o feto (HASS et al., 2015).

Quadro1. Correlação entre o anticorpo irregular e o desenvolvimento da DHPN.

SISTEMAS DE GRUPOS SANGUÍNEOS E ANTÍGENOS	Risco de desenvolvimento da DHPN em fetos e neonatos antígeno positivo e severidade da doença.
ABO	Baixo ^b risco para a doença; em geral de caráter brando ^a ; raramente de caráter severo ^a .
RH: D	Alto ^b risco para a doença; geralmente de caráter muito severo ^a .
RH: c	Alto risco para a doença; geralmente de caráter muito severo ^a ou brando ^a
RH: E	Médio ^b risco para a doença; maioria de caráter brando ^a e às vezes severo ^a
RH: outros antígenos	Médio ^b risco para a doença; maioria de caráter brando ^a e poucas vezes de caráter severo ^a .
KELL: K	Alto ^b risco para a doença; geralmente de caráter muito severo ^a ou brando ^a .
KELL: outros antígenos	Médio ^b risco para a doença.
DUFFY: Fy(a)/ Fy(b)	Médio ^b risco para a doença; geralmente de caráter brando ^a .
KIDD: Jk(a)/Jk(b)	Baixo ^b risco para a doença; geralmente de caráter brando ^a .
MNS: M/N/S/s	Baixo ^b risco para a doença; maioria de caráter brando ^a , raramente de caráter severo ^a .
MNS: Outros antígenos	Baixo ^b risco para a doença; maioria de caráter brando ^a , raramente de caráter severo ^a .
I, LE, P1; LU, Yt	Sem risco; antígenos de baixa densidade antigênica nos eritrócitos fetais.
Antígenos pertencentes a outros sistemas de grupos sanguíneos	Risco muito baixo ^b ; raramente de caráter severo ^a .

a. Doença de caráter muito severo: necessidade de transfusão intrauterina e/ou exsanguíneo transfusão. Doença severa: Necessidade de transfusão intrauterina; indução de parto prematuro e/ou necessidade de transfusão após o nascimento. Doença branda: apenas tratamento com fototerapia é necessário.

b. Alto risco: > 50%; médio risco: >10-50%; baixo risco: 1-10%; risco muito baixo: <1%.

Fonte. Adaptado de Hass et al. (2015).

7.5 Aspectos laboratoriais da DHPN

7.5.1 Diagnóstico laboratorial da DHPN

O diagnóstico da DHPN engloba a participação conjunta entre paciente, obstetra e laboratório clínico. Nesse sentido, durante o primeiro trimestre de gestação, informações tais como histórico transfusional e gestações anteriores são fundamentais (MOISE, 2002).

7.5.1.1 Exames laboratoriais realizados durante a gravidez na gestante

Na primeira consulta clínica para a realização do pré natal, devem ser solicitados os seguintes exames laboratoriais: Tipagem sanguínea ABO e RhD (incluindo pesquisa de RhD fraco) e a PAI. Caso a gestante for RhD negativa e apresentar PAI negativa, deve-se proceder a administração da imunoglobulina (KENNEDY, 2008). Por outro lado, caso a gestante apresentar resultado de PAI positiva, é recomendado a identificação do (s) anticorpo (s) irregular (es).

7.5.1.1.1 Tipagem sanguínea ABO

O sistema de grupo sanguíneo ABO é constituído por quatro fenótipos majoritários: A, B, O e AB. Esses quatro fenótipos são determinados pela presença e ou ausência dos antígenos A e B na superfície das hemácias. Além do mais, o referido sistema também é caracterizado pela presença ou ausência de anticorpos naturais (ou anticorpos regulares) que se direccionam contra o antígeno ausente (COOLING, 2008).

Assim, sorologicamente, a determinação da tipagem ABO é realizada por meio da pesquisa dos antígenos na membrana da hemácia, sendo essa denominada prova direta. Para a execução dessa etapa, emprega-se os antissoros anti-A e anti-B, sendo que a utilização do soro anti-AB é facultativa. Além da prova direta, é realizada a pesquisa de anticorpos regulares no plasma/soro do indivíduo, sendo essa denominada prova reversa (GIRELLO; KUHN, 2007). Nesse caso, os reagentes são constituídos por hemácias denominadas A1 e B, que devem ser adquiridas comercialmente. O princípio do método da determinação da tipagem ABO baseia-se na técnica de hemaglutinação e pode ser realizada por meio das técnicas de tubo, gel e microplaca (COOLING, 2008).

7.5.1.1.2 Tipagem sanguínea RhD

A tipagem sanguínea RhD consiste na detecção do referido antígeno na membrana da hemácia. Assim, os termos Rh positivo e Rh negativo referem-se a presença ou ausência do referido antígeno no eritrócito (BARJAS-CASTRO, 2013).

Para a determinação da tipagem RhD, em geral são utilizados antissoros monoclonais. Esses podem conter somente anticorpos IgM, reativo exclusivamente em temperatura ambiente ou dispor de uma mistura de anticorpos IgM e IgG nomeado *blend*. Nesse último caso, a presença de anticorpos IgG possibilita (sorologicamente) a detecção do fenótipo RhD fraco por meio do emprego do princípio do teste de antiglobulina humana indireta (WHESTHOFF, 2008).

Paralelamente a execução da técnica acima descrita, no caso de emprego de antissoros diluídos em meio proteicos, deve ser empregado um controle de tipagem RhD, utilizando-se soro controle compatível com o antissoro utilizado e do mesmo fabricante do anti-D (GIRELLO; KUHN, 2007).

O princípio do método da determinação da tipagem RhD baseia-se na técnica de hemaglutinação e pode ser realizada por meio das técnicas de tubo, gel e microplaca, sendo que nessa última técnica não é possível a determinação do fenótipo RhD fraco (GIRELLO; KUHN, 2007).

A maioria dos fenótipos RhD positivo possui a proteína RhD (WHESTOFF, 2008). Entretanto, diferentes alelos RHD que codificam proteínas com mutações genéticas e culminam com a troca de aminoácidos na proteína principal já foram reportados (YE et al., 2014). Essas mutações tem como consequência principal variações quantitativas e qualitativas na expressão do antígeno em questão, denominadas variantes do antígeno D. Essas incluem o fenótipo RhD positivo normal, RhD fraco, RhD parcial e o fenótipo D_{el}. Estima-se que 1 a 2 % de indivíduos de etnia caucasiana carregam alelos RHD que codificam fenótipos variantes para a proteína, sendo que em indivíduos de etnia negra essa frequência é maior (WHESTOFF, 2008).

- RhD positivo normal: O indivíduo RhD positivo normal possui todos os epítomos da proteína RhD. Sorologicamente é detectado com antissoros anti-D IgM (GIRELLO; KUHN, 2007).

- RhD positivo fraco: Esse fenótipo é caracterizado pela redução quantitativa da densidade antigênica da proteína RhD na membrana da hemácia decorrente de mutações de único polimorfismo (SNPs) no gene. Essas mutações resultam na troca de aminoácidos na região intracelular e/ou transmembrana da proteína RhD que comprometem a inserção da mesma na membrana da hemácia (figura 5) (FLEGEL, 2007). Como as mutações resultam em alterações na quantidade da proteína e não nos epítomos da proteína RhD, indivíduos RhD fraco geralmente não desenvolvem anti-D (GIRELLO; KUHN, 2007). Sorologicamente, a detecção de fenótipos RhD fraco requer a inclusão de uma fase de antiglobulina humana indireta com emprego de antissoros anti-D IgG (BARROS et al., 2006) ou *blend*.
- RhD parcial: O fenótipo RhD parcial é caracterizado pela ausência e alterações de um ou mais epítomos da proteína RhD (figura 5), decorrente de mutações tais como SNPs e rearranjos gênicos, sendo que esses ocasionam o aparecimento de genes híbridos (regiões do gene RHD substituídas por RHCE) (FLEGEL, 2007). Além de resultar em perda e alteração de epítomos, a formação da proteína híbrida pode acarretar no desenvolvimento de novos antígenos (WHESTOFF, 2008). Diferentemente do que é observado para o fenótipo RhD fraco, na variante RhD parcial as mutações ocorrem na porção externa da membrana da hemácia. Sendo assim, a perda de epítomos somada a localização das mutações genéticas na membrana da hemácia possibilitam que indivíduos RhD parcial desenvolvam anticorpos anti-D caso entrem em contato com hemácias RhD positivo (WHESTOFF, 2008).
- Fenótipo D_{el}: O fenótipo Del é caracterizado por expressar quantidade ínfima do antígeno RhD na membrana da hemácia devido a mutações como os SNPs e mutações em sítios de splice, que impedem a integração da proteína a membrana da hemácia (FLEGEL, 2007). Sorologicamente não são detectados e conseqüentemente, indivíduos com esse fenótipo são fenotipados como RhD negativo (WHESTOFF, 2008).
- Fenótipo RhD negativo: As hemácias RhD negativas não expressam a proteína RhD inteiramente na superfície do eritrócito. A não expressão dessa proteína é resultado da deleção total do gene RhD, pseudogene RhD e formação de gene híbrido, sendo que a frequência dessas mutações varia de acordo com a etnia em questão (WAGNER; FLEGEL, 2004).

- Fenótipo RhD inconclusivo: O fenótipo RhD inconclusivo é visualizado sorologicamente por meio da aglutinação no controle de tipagem RhD. Essa aglutinação pode ser decorrente da presença de anticorpos IgG ligados a membrana dos eritrócitos ou proteínas séricas anormais que favorecem a aglutinação espontânea das hemácias (GIRELLO; KUHN, 2007). Nesses casos, para a conclusão da fenotipagem RhD, podem ser utilizadas técnicas adicionais tais como a técnica de bloqueio ou o emprego do reagente cloroquina, que favorecem a dissociação de anticorpos IgG (PERDOMO, 2003).

Figura 5. Modelo homólogo dos fenótipos RhD fraco e RhD parcial. A expressão da variante RhD fraco decorre de mutações genéticas na porção intracelular e/ou transmembrana da proteína. Já para a variante RhD parcial as mutações ocorrem na porção extracelular.

Fonte. Adaptado de Whestoff (2008).

A genotipagem RhD tem sido cada vez mais utilizada para diferenciar os antígenos RhD normal, RhD fraco e RhD parcial devido às limitações dos reagentes utilizados nos testes de hemaglutinação. As técnicas moleculares possibilitam distinguir as hemácias que perdem ou apresentam epítomos alterados (RhD parcial) daquelas que possuem níveis reduzidos do antígeno RhD (RhD fraco), diferenciação essa que não é possível sorologicamente. Essa distinção é importante para prevenir a aloimunização em gestantes, uma vez que indivíduos RhD parcial apresentam risco de aloimunização, enquanto que a maioria dos tipos de RhD fraco não produzem anti-D. Entretanto, são poucos os laboratórios que dispõem dessa metodologia,

justificando a importância da classificação sorológica e as condutas necessárias para prevenir a aloimunização (BARROS et al., 2006).

7.5.1.1.2.1 Profilaxia anti-D frente aos diferentes resultados de tipagem RhD em gestantes

O objetivo da realização da tipagem RhD em gestantes baseia-se na importância de detectar fenótipos que apresentam risco de desenvolver anti-D.

- Fenótipo RhD normal: Não é necessário administração da imunoglobulina;
- Fenótipo RhD negativo: É necessária a administração da imunoglobulina;
- Fenótipo RhD fraco e RhD parcial: Sorologicamente, a detecção do fenótipo RhD parcial, bem como a distinção do mesmo em relação ao fenótipo RhD fraco fica comprometida em virtude da escassa disponibilidade de antissoros comerciais. Dessa maneira, gestantes e que apresentem o fenótipo RhD fraco devem ser consideradas RhD negativo no que diz respeito a conduta para a administração da imunoglobulina (BARROS et al., 2006). Entretanto, caso seja possível diferenciar a nível molecular a variante RhD, a administração da imunoglobulina deve ser feita nas variantes RhD parcial e RhD fraco do tipo 4.
- Fenótipo RhD inconclusivo: Nesse caso, se mesmo com o auxílio de técnicas adicionais não for possível a determinação do fenótipo RhD, as gestantes devem ser consideradas RhD negativo no que diz respeito a conduta para administração da imunoglobulina.

7.5.1.1.3 Pesquisa de Anticorpos Irregulares

Os anticorpos irregulares são aqueles de ocorrência não esperada no sistema imune do indivíduo (GIRELLO; KUHN, 2007). A produção dos mesmos decorre do processo de aloimunização eritrocitária sendo essa uma consequência a uma resposta imunológica contra antígenos eritrocitários não expressos na membrana da hemácia, ocorrendo geralmente devido a sensibilização em transfusões de sangue e gestações (NOVARETTI, 2007).

A PAI utiliza como princípio o teste de antiglobulina humana indireto (Coombs Indireto) que detecta *in vitro* hemácias sensibilizadas por anticorpos (GIRELLO; KUHN, 2007) por meio da hemaglutinação e pode ser realizada em tubo, gel ou microplaca. A pesquisa de anticorpos

irregulares visa detectar anticorpos reativos somente em temperatura ambiente (anticorpos da classe IgM) bem como anticorpos reativos somente a 37°C (anticorpos da classe IgG) e anticorpos com amplitude térmica (reativos em temperatura ambiente e a 37°C). Além do mais, para a detecção dos anticorpos IgG após a incubação a 37°C é necessário o emprego do soro antiglobulina humana (soro de Coombs) (DOWNES; SHULMAN, 2008). O soro de Coombs favorece a aglutinação de hemácias sensibilizadas por anticorpos da classe IgG e/ou por frações do complemento (DOWNES; SHULMAN, 2008). O mesmo pode ser encontrado comercialmente de duas formas:

- Soro antiglobulina humana poliespecífico: Contém anticorpos dirigidos contra a IgG humana e frações do complemento C3 (C3b e/ou C3d) e podem exercer pouca atividade frente a anticorpos da classe IgM e IgA (GIRELLO; KUHN, 2007).
- Soro antiglobulina humana monoespecífico: São preparados especificamente contra determinada classe de Ig ou fração do complemento (GIRELLO; KUHN, 2007).

A importância do emprego do soro de Coombs na PAI baseia-se no fato de que anticorpos da classe IgG quando ligados a antígenos eritrocitários, não promovem a diminuição do potencial zeta, não permitindo que as hemácias se aglutinem. Já o soro antiglobulina humana promove a diminuição do potencial zeta até o ponto crítico, favorecendo a aglutinação (GIRELLO; KUHN, 2007).

Adicionalmente, a utilização de potencializadores, tais como albumina, polietilenoglicol e soluções de baixa força iônica contribuem para assegurar a detecção dos anticorpos. A albumina reduz a força de repulsão entre as células favorecendo a aglutinação. As soluções de baixa força iônica aceleram a ligação antígeno-anticorpo uma vez que promovem modificações iônicas no meio. Já o polímero polietilenoglicol também favorece a reação antígeno-anticorpo por meio da retirada de moléculas de água do meio (DOWNES; SHULMAN, 2008).

Para a execução da referida técnica o soro/plasma do indivíduo é testado frente a hemácias de triagem do grupo "O" e devem ser adquiridas comercialmente. É importante ressaltar que o kit de triagem deve conter no mínimo duas hemácias (GIRELLO; KUHN, 2007).

Os reagentes comerciais devem detectar anticorpos específicos que são considerados clinicamente significantes. Nesse sentido, os reagentes adquiridos comercialmente devem estar,

no mínimo, fenotipados para os seguintes antígenos: D, C, c, e, E, K, k, Fy(a), Fy(b), Le(a), Le(b), Jk(a), Jk(b), M, N, S, s, P1 (DOWNES; SHULMAN, 2008). Outra recomendação é que os antígenos dos sistemas RH, DUFFY, KIDD e MNS estejam expressos em dose dupla (maior densidade antigênica) e não em dose simples (menos densidade antigênica) a fim de evitar resultados falso negativos, uma vez que os anticorpos irregulares dirigidos contra esses antígenos podem apresentar efeito de dose (DA SILVA et al., 2016). Ademais, no Brasil devem ser incluídas células de triagem que expressem o antígeno Di(a). Essa necessidade é justificada pela alta frequência (3,6%) do fenótipo Di(a+) em indivíduos de etnia caucasiana (COZAC, 2004), quando comparado ao descrito na literatura (<0,1%) (POOLE, 1999) e pela presença de indivíduos sensibilizados com anticorpos de especificidade anti-Di(a) (DA SILVA, 2016).

Em relação às gestantes, torna-se fundamental a detecção de anticorpos da classe IgG, pois são esses que atravessam a placenta e estão implicados no desenvolvimento da DHPN (KENNEDY, 2008). É importante ressaltar que a padronização da técnica, o emprego da fase antiglobulina humana, utilização de reagentes de triagem adequados e capacitação por parte do laboratório clínico são fundamentais para assegurar a detecção dos anticorpos irregulares.

No caso de PAI positiva, é recomendada a identificação do (s) respectivo (s) anticorpo (s). O processo de identificação de anticorpos irregulares engloba a utilização de um painel de hemácias contendo um conjunto de células fenotipadas. Após a identificação do anticorpo irregular, é fundamental determinar seu significado clínico na DHPN, verificando principalmente a temperatura de reação, a classe da antiglobulina e, dependendo da especificidade do anticorpo, a determinação do título do mesmo (GIRELLO, KUHN, 2007; ROBERTS, 2008).

No caso de PAI negativa, é recomendado que o teste seja repetido entre a 20^a e 24^a semana de gestação e posteriormente antes do parto (SILVA, 2011). Para gestantes RhD negativas não sensibilizadas orienta-se repetir a referida técnica na 27^a semana de gestação, antes da administração da imunoglobulina profilática (BRIZOT et al., 2011).

7.5.1.1.4 Titulação de anticorpos

A titulação de anticorpos determina a concentração relativa de todos os anticorpos capazes de atravessar a placenta e causar a DHPN. Trata-se de uma técnica na qual o soro diluído seriado na razão 2 é testado frente a hemácias com o fenótipo conhecido e apropriado para cada situação e tem por finalidade detectar a mais alta diluição na qual um anticorpo específico demonstra reatividade (DA SILVA, 2011).

A determinação do título do anticorpo deve ser realizada no primeiro trimestre de gestação uma vez que norteia para decisões clínicas no caso de gestantes aloimunizadas (KENNEDY, 2008). Entretanto, é necessária a padronização da técnica por parte do laboratório clínico. De maneira geral utiliza-se a técnica em tubo empregando-se o princípio do TAI. Ressalta-se que a escolha das hemácias fenotipadas para execução da titulação influencia na determinação do título. Alguns protocolos empregam hemácias fenotipadas com o antígeno expresso em dose simples, com o intuito de mimetizar os eritrócitos do feto. Por outro lado, outros protocolos preconizam o emprego de hemácias com expressão do antígeno em dose dupla com a finalidade de aumento de sensibilidade (JUDD, 2001; KENNEDY, 2008). A técnica em tubo é semiquantitativa e determina o título dos anticorpos no soro que apresenta reação positiva. O título deve ser expresso pelo número da maior diluição onde a reatividade foi encontrada, sendo que a reação mínima é de 1+ (Ex. reação de 1 + detectada na diluição 1:32, título = 32) (DA SILVA et al., 2016). A titulação de anticorpos também pode ser realizada pela técnica em gelcentrifugação. Nesse caso determinação do título é representada por scores. Independente do método escolhido pelo laboratório clínico, o mesmo deve passar por um processo de validação e os profissionais devem estar capacitados.

A importância da realização da titulação decorre principalmente devido a possibilidade de comparação entre o títulos obtidos em períodos diferentes. Nessas situações, a diferença de dois títulos, quando comparado ao título da amostra inicial, é considerada importante pois indica estímulo para a produção de anticorpos (KENNEDY, 2008).

7.5.1.2 Exames laboratoriais realizados no Recém nascido

Após o nascimento do neonato, é recomendada a coleta de amostra de sangue de cordão para a realização dos testes laboratoriais listados abaixo:

- Tipagem ABO/RhD
- Teste da Antiglobulina Humana Direto (TAD), ou Coombs Direto
- Determinação de Bilirrubinas
- Hemograma

Adicionalmente, pode-se realizar o hematócrito, a dosagem de hemoglobina, a contagem de reticulócitos e o teste de eluição de anticorpos (no caso de TAD positivo).

Salienta-se que, ao utilizar amostras de sangue de cordão para a realização dos testes imunohematológicos (ABO/RhD; TAD e eluato) empregando a técnica em tubo, as hemácias utilizadas devem ser lavadas com solução fisiológica por no mínimo 6 vezes. Esse processo tem por finalidade eliminar a interferência da grande quantidade de proteínas, sobretudo pela presença da geléia de Wharton (GIRELLO; KUHN, 2007). No entanto, caso não seja possível a utilização de sangue de cordão, a coleta de sangue venoso do neonato pode ser solicitada. Nesse caso recomenda-se emprego de métodos que requeira pequena quantidade de amostra, como por exemplo a técnica em gel centrifugação (GIRELLO; KUHN, 2007).

7.5.1.2.1 Tipagem ABO/RhD

A determinação do ABO no sangue do neonato até os quatro meses de vida, deve ser realizada contemplando somente a pesquisa dos antígenos na membrana da hemácia. Sendo assim, executa-se somente a prova direta, uma vez que os anticorpos ABO detectados no teste são de origem materna (KENNEDY, 2008).

No que diz respeito a tipagem RhD recomenda-se a inclusão de métodos contendo a fase antiglobulina humana, a fim de detectar o fenótipo RhD fraco. Resultados de tipagem RhD positivo, RhD positivo fraco e RhD inconclusivo norteiam para a administração da imunoglobulina na mãe do neonato. Caso o resultado da tipagem RhD for inconclusivo, é recomendado o emprego de técnicas adicionais para elucidação do resultado (citadas no item 1.1.2).

7.5.1.2.2 Teste da Antiglobulina Humana Direto

O Teste da Antiglobulina Humana Direto (TAD) visa pesquisar a presença de hemácias sensibilizadas *in vivo* por anticorpos e/ou frações de complemento, de acordo com o soro antiglobulina humana utilizado (GIRELLO; KUHN, 2011).

O princípio da técnica é baseado na aglutinação de hemácias revestidas por anticorpos e/ou frações do complemento por meio da adição do soro de Coombs. Inicialmente, recomenda-se que as hemácias sejam testadas com soro antiglobulina humana poliespecífico. No caso de positividade, é aconselhável a repetição do teste com soro antiglobulina humana monoespecífico com o intuito de elucidar a especificidade da molécula sensibilizante (ZANTEC et al., 2012).

O TAD é considerado teste de triagem para a detecção de hemácias neonatais sensibilizadas por anticorpos maternos. Dessa maneira, a análise isolada de um resultado de TAD positivo não é indicativo de hemólise (ROBERTS, 2008). Em contrapartida, resultados negativos de TAD podem não indicar ausência de destruição da hemácia, uma vez que a referida técnica possui limitações, principalmente no que diz respeito a sensibilidade do teste. O teste de antiglobulina tem capacidade para detectar entre 150 a 500 moléculas de IgG por eritrócito. Hemácias sensibilizadas com quantidade de moléculas abaixo do limite de detecção direcionam para resultados falso negativos (DA SILVA et al., 2016). Nesse sentido, salienta-se a importância da análise conjunta dos testes laboratoriais e da sintomatologia clínica do neonato.

7.5.1.2.2.1 Teste de Eluição de Anticorpos (Eluato)

O teste de eluição de anticorpos tem por finalidade retirar o anticorpo sensibilizante da hemácia com o intuito de identificá-lo. No caso da DHPN, anticorpos maternos específicos que não são detectados no soro do recém nascido, podem ser identificados no teste de eluição, uma vez que esse possibilita a concentração de anticorpos (LEGER, 2008).

A eluição de anticorpos pode ser realizada por meio do emprego de métodos que alteram ou reverterem as forças de atração entre antígeno e anticorpos. Dessa forma, os métodos disponíveis podem dispor do emprego de solventes orgânicos (éter ou clorofórmio); soluções

que alteram o pH (kits comerciais de eluição ácida) e alteração da temperatura (aquecimento ou congelamento) que levam a destruição da hemácia (LEGER, 2008).

Muitos laboratórios utilizam kits comerciais de eluição ácida para a realização do eluato. As vantagens desses kits consistem na facilidade de uso e na diminuição da exposição a substâncias potencialmente prejudiciais, sendo essa a principal desvantagem da utilização de métodos que empregam solventes orgânicos. Ademais, os kits de eluição ácida possibilitam a recuperação da maioria dos anticorpos (JUDD; JOHNSON; STORRY, 2008). O quadro 2 lista os principais métodos de eluição empregados, inclusive para a DHPN.

Quadro 2. Principais métodos de eluição.

Método	Vantagens	Desvantagens
Aquecimento (56°C)	ABO-DHPN; método simples e rápido	Não é tão efetivo na dissociação de alo e auto-anticorpos dirigidos contra antígenos de outros grupos sanguíneos.
Congelamento	ABO-DHPN; método rápido, requer utilização de pequeno volume de amostra	Não é tão efetivo na dissociação de alo e auto-anticorpos dirigidos contra antígenos de outros grupos sanguíneos.
Eluição ácida	Método simples e rápido; adequado para a maioria dos alo e auto-anticorpos quentes.	Possibilidade de eluato falso positivo.
Solventes orgânicos	Alo e auto-anticorpos da classe IgG	Vapores nocivos

Fonte. Adaptado de AABB, 2008.

É importante ressaltar que para qualquer método de eluição, devem ser realizadas lavagens das hemácias (adulto no mínimo 3 vezes e sangue de cordão no mínimo 6 vezes) com o intuito de eliminar anticorpos interferentes e garantir que o anticorpo detectado no teste é a especificidade sensibilizante. Adicionalmente, é fundamental que seja testado paralelamente cm

o eluato um controle. Esse por sua vez consiste na solução fisiológica obtida depois da última lavagem das hemácias (LEGER, 2008).

7.5.1.3 Outros exames de relevância clínica

Historicamente, a severidade da anemia fetal bem como a avaliação da necessidade de transfusão eram monitoradas por meio da amniocentese. Esse método invasivo descrito em 1961 tinha por finalidade determinar os níveis de bilirrubina no líquido amniótico (LILEY, 1961) por meio da análise dos desvios da densidade óptica diretamente relacionada com a intensidade de hemólise. Entretanto, a partir da década de 80, com o desenvolvimento dos equipamentos de ultrassom, um novo procedimento invasivo denominado cordocentese, foi desenvolvido com a finalidade obtenção de sangue fetal puro, por meio da punção da veia umbilical pela via percutânea (HARMAN, 1985). Os procedimentos invasivos para determinação da anemia fetal acarretam em riscos de ruptura de membrana fetal, infecção, risco e agravamento da sensibilização e perda fetal (BLESSED; LACOSTE; WELCH, 2001).

Com intuito de minimizar os riscos fetais, métodos não invasivos de detecção de anemia fetal foram aprimorados. No ano 2000, Mari e colaboradores desenvolveram uma técnica não invasiva com o intuito de avaliar o pico da velocidade do fluxo sanguíneo sistólico da artéria cerebral média com o auxílio da ultrassonografia de Doppler (MARI et al., 2000). A artéria cerebral média origina-se na artéria carótida interna e é considerada um vaso de grande importância, uma vez que é responsável por irrigar grande parte do território cerebral, incluindo as regiões corticais e subcorticais (DA COSTA et al., 2003). A referida artéria apresenta como vantagem a fácil localização durante o exame ultrasonográfico conferindo resultados mais fidedignos no que diz respeito a análise dos parâmetros dopplervelocimétricos. A determinação da velocidade do fluxo sanguíneo fetal baseia-se no emprego de sons de alta frequência. Quando uma onda sonora de alta frequência é dirigida para um alvo em movimento, ela é refletida com uma frequência diferente quando comparada aquela que caracterizava o som emitido. Essa diferença de frequência é denominada efeito Doppler. Quando um feixe ultra sônico é dirigido para um vaso sanguíneo, a onda é refletida principalmente pelas células que fluem no interior desse vaso (CALLAGAN; ROWLAND; GOLDMAN, 1964).

Muitos estudos apontam a determinação do fluxo sanguíneo sistólico por meio da ultrassonografia de Doppler como técnica de referência para o diagnóstico de anemia fetal em gestantes aloimunizadas, além de fornecer uma estimativa da data do parto bem como do intervalo de transfusões intrauterinas (BAHADO-SINGH et al., 2000; SAU et al., 2009).

Outro método não invasivo para a análise do risco fetal consiste na determinação do grupo sanguíneo do feto a partir da detecção do DNA fetal com o auxílio de bases moleculares de diferentes polimorfismos (AVENT et al., 2000). Inicialmente, a determinação do grupo sanguíneo do feto era realizada a partir do DNA fetal de amostras coletadas do fluido amniótico e do vilo coriônico. No entanto, os riscos atribuídos a coleta dessas amostras (perda fetal, hemorragia fetal com consequente aumento da aloimunização materna) direcionou para busca métodos moleculares com utilização de amostras oriundas de outras localizações (MURRAY et al., 1983; NANAL; KYLE; SOOTHILL, 2003; TABOR; BANG; NORGAARD-PEDERSEN, 1987).

Nesse sentido, nos últimos 12 anos, a presença de DNA fetal livre circulante tem sido detectada no plasma materno (LO et al., 1997). Postula-se que a placenta possui uma grande quantidade de DNA livre fetal devido a liberação de material genético contido nas células trofobásticas na circulação materna após os eventos de apoptose e necrose (ALBERRY et al., 2009). Assim, em gestantes com o fenótipo RhD negativo, a detecção do gene RHD indica que o feto é RhD positivo (LO, 1999). Por outro lado, a não detecção do gene, direciona para a fenotipagem RhD negativa do feto. A determinação do DNA fetal livre no plasma materno contribuiu para possibilidades de diagnóstico molecular pré natal sem os riscos inerentes aos procedimentos invasivos (LO et al., 1997). Além disso, o DNA fetal livre desaparece rapidamente do plasma materno após o término da gestação (BENACHI et al., 2003).

A importância dos empregos de métodos moleculares na investigação da DHPN consiste na identificação do genótipo RHD do feto de mães RhD negativo com o intuito de minimizar a administração da profilaxia anti-D. Além do mais, os métodos moleculares auxiliam na elucidação do genótipo RHD do pai e do feto de gestantes aloimunizadas com o intuito de determinar o potencial risco de desenvolvimento da anemia fetal e estimar a necessidade de intervenções clínicas futuras (FASANO, 2016). De acordo com a literatura, a sensibilidade da genotipagem RhD a partir da detecção do DNA fetal livre no plasma materno é de 97,2%, já a especificidade fica em torno de 96,8% (BOMBARD et al., 2011; PIERLLI et al., 2010). Em

alguns países da Europa, além dos testes moleculares para a genotipagem RhD, são realizados métodos a nível molecular para a identificação de outros genótipos do sistema RH bem como de outros sistemas de grupo sanguíneo, como por exemplo o sistema KELL (FASANO, 2016).

7.6 Imunoprofilaxia

7.6.1 Alternativas profiláticas frente a sensibilização por anti-D

7.6.1.1 Imunoglobulina Anti-D

A maior prevalência de casos graves de Doença Hemolítica Perinatal ocorre devido a destruição das hemácias por anticorpos anti-D maternos. Essa afirmação baseia-se na frequência de fenótipos RhD negativos na população, a imunogenicidade do antígeno D e ao processo fisiopatológico de destruição das hemácias fetais por esses anticorpos (BRINC; LAZARUS, 2009). Entretanto, a aloimunização por anticorpos anti-D pode ser prevenida com o emprego de medidas imunoprofiláticas por meio do uso da imunoglobulina anti-D policlonal em mulheres RhD negativo (HAAS et al., 2014).

Na década de 40, pelo menos 50% de todos os fetos acometidos por DHPN morriam devido ao desenvolvimento do "kernicterus" ou hidropsia fetal. No início dos anos 60, Stem e colaboradores (1961) demonstraram experimentalmente que a administração de anti-D Ig poderia prevenir a sensibilização frente ao antígeno D. No mesmo período, os autores esclareceram o mecanismo de isoimunização RhD durante a gestação e introduziram na prática clínica a imunização passiva de gestantes RhD negativo por meio da utilização de imunoglobulina anti-D IgG (COHEN et al., 1964; CLARKE et al., 1963; FREDERICK; GORMAN; POLLACK, 1964; ZIPURSKY; ISRAELS, 1967). Os experimentos realizados em mulheres RhD negativas revelaram que a incidência da alo imunização por anticorpos anti-D, que antes ficava entre 12-13%, correspondia a um valor de 1-2% após a utilização da imunoprofilaxia pós parto (POLLACK; GORMAN; FREDERICK, 1967).

A profilaxia com a imunoglobulina anti-D possui efeito imunossupressor intensificado. Essa afirmação baseia-se no fato de que a subsequente exposição ao antígeno D não desencadeia uma resposta imune secundária e sim uma resposta imune primária. Entretanto, o exato mecanismo de ação da imunoglobulina ainda não está bem esclarecido. Alguns estudos postulam que a administração da imunoglobulina teria ação de diminuir a exposição da gestante a glóbulos vermelhos fetais bem como prevenir a apresentação dos eritrócitos fetais aos linfócitos B do

sistema imune materno por meio de modulação e retardo da ativação dessas células. A principal consequência seria a diminuição da imunidade humoral frente ao antígeno original (BRINC; LAZARUS, 2009; KUMPEL, 2006). Entretanto, a destruição acelerada das hemácias que expressam o antígeno D é considerado o principal mecanismo de ação da imunoglobulina, uma vez que diminui o número de hemácias que expressam o antígeno D para a apresentação antigênica (KUMPEL, 2006). Independente dos mecanismos de ação da imunoglobulina, é importante ressaltar que, nos dias atuais, o uso empírico da mesma como alternativa profilática de rotina e em casos de hemorragia intensa tem sido responsável pela redução da imunização de mulheres RhD negativas de 16% para aproximadamente 0,3% (QUERESHI et al., 2014). Apesar da profilaxia por meio do uso da imunoglobulina ser empregada há mais de 30 anos, é possível visualizar na prática clínica casos de aloimunização. Tal fato pode ser justificado por três causas: falha em reconhecer acontecimentos sensibilizantes ao longo da gravidez; omissão da administração da imunoglobulina anti-D e sensibilização por episódios de hemorragia feto materna espontâneos e clinicamente silenciosos (VICENTE et al., 2003).

De acordo com a literatura, durante o primeiro trimestre de gravidez aproximadamente 3% das gestantes apresentam quantidade suficiente de sangue fetal para detecção na circulação sanguínea. Já no segundo trimestre esse número aumenta para 12%. Por outro lado, no terceiro trimestre, o volume de sangue fetal detectado na circulação materna aumenta e contribui de maneira significativa para a aloimunização. Cerca de 48% de gestantes no terceiro trimestre de gestação apresentam quantidade suficiente de sangue do feto que possa ser detectado (STOCKMAN, 2001).

Na prática clínica, a imunoglobulina anti-D deve ser administrada em todas as gestantes RhD negativas que não estejam sensibilizadas, tanto como profilaxia de rotina bem como na sequência de eventos com risco de hemorragia transplacentar. Nessas situações a conduta terapêutica na administração da imunoglobulina é influenciada pela intensidade da hemorragia feto materna. Sendo assim, testes que possibilitem estimar o volume de sangue fetal auxiliam na determinação da quantidade de imunoglobulina anti-D que uma mulher RhD negativa deve receber a fim de prevenir o desenvolvimento de anticorpos (VICENTE et al., 2003).

A imunoglobulina anti-D possui um tempo de meia vida correspondente a 21 dias, em contrapartida pode ser detectada na circulação em baixos títulos após esse período. Pode ser

administrada por via intra muscular (IM) ou endovenosa (EV). Na prática a maioria dos serviços optam pelo emprego via IM devido a facilidade de administração (VICENTE et al., 2003).

7.6.2 Métodos de detecção da hemorragia feto materna

7.6.2.1 Teste de Roseta

O teste de roseta, descrito por Sebring e Polesky (1982), consiste em um método sensível que é capaz de detectar aproximadamente 10 mL de hemorragia fetal. No referido teste, a amostra de sangue materno é incubada com o reagente anti-D. Após o período de incubação é adicionado ao teste um indicador de células RhD positivas. Esse indicador proporciona a formação de aglutinados (rosetas) em torno das células RhD positivas que podem ser visualizadas em microscópio óptico (figura 6). O presente método pode evidenciar resultados falsos positivos nos casos nos quais as gestantes apresentem a variante RhD fraco. Por outro lado, resultados falso negativos podem ser verificados nas situações nas quais o neonato possua a variante mencionada acima para o antígeno D (KENNEDY, 2008).

Figura 6. Aglutinados (rosetas) formados em torno das células RhD positivas.

Fonte. Adaptado de Sandler e Sathiyamoorthy (2001).

A conduta profilática nos casos de teste de roseta negativo consiste na administração de uma dose de imunoglobulina equivalente a 300µg (KENNEDY, 2008). Em contrapartida, o teste de roseta positivo indica a ocorrência de hemorragia feto-materna em maior grau. Nesses casos, a administração de doses adicionais de imunoglobulina torna-se necessário a fim de garantir a eficácia da profilaxia. Sendo assim, o emprego de um método quantitativo para estimar o volume de sangue fetal presente na hemorragia é fundamental no que diz respeito a escolha da dosagem correta da profilaxia (SANDLER; SATHIYAMOORTHY, 2010).

7.6.2.2 Teste de Kleihauer-Betke

O teste de Kleihauer-Betke, ou de eluição ácida, é considerado o método quantitativo padrão para detecção da hemorragia feto materna e é baseado na determinação da proporção da hemoglobina fetal (HbF) (KLEIHAUER; BRAU; BETKE, 1957).

O princípio do teste é baseado na maior resistência da hemoglobina fetal frente a desnaturação ácida quando comparada a HbA (KLEIHAUER; BRAU; BETKE, 1957). Com base nesse argumento, no referido teste, a HbF pode ser distinguida da HbA em esfregaços de sangue

periférico materno mediante a realização de uma eluição com ácido. No método, a HbF não é eluída pelo reagente ácido empregado e se cora de vermelho escuro devido a presença da eosina e hematoxilina (reagentes utilizados no método de coloração). Em contrapartida, a HbA é rapidamente eluída pelo reagente ácido e como consequência é possível observar um pigmento róseo claro devido a presença do reagente hematoxilina (SANDLER; SATHIYAMOORTHY, 2010). Em ambos casos as células coradas são contadas em microscópio. Trata-se de um teste barato e de fácil realização. Entretanto, é considerado pouco específico uma vez que detecta a HbF do eritrócito sem distinção do RhD (VICENTE et al., 2003). Atualmente, kits comerciais baseados em métodos modificados da eluição ácida estão disponíveis. Esses métodos alternativos possuem como vantagem a possibilidade do emprego da automação para a detecção da HbF corada (SANDLER; SATHIYAMOORTHY, 2010).

O teste de Kleihauer-Betke é indicado após a 20^a semana de gestação, nos casos de hemorragia fetal de maior volume e após o parto de mulheres RhD negativas não sensibilizadas pelo antígeno D (AMB; CFM, 2011).

A fórmula abaixo possibilita calcular o volume de sangue fetal total após um quadro hemorrágico. Para a realização do cálculo, as células fetais e maternas devem ser contadas separadamente totalizando 2000 células (KENNEDY, 2008).

$$\text{Células fetais} \times \text{volume de sangue materno (mL)} / \text{total de células contadas} = \text{volume de sangue fetal total (mL)}$$

A partir do volume de sangue fetal total é possível calcular a dose adequada de imunoglobulina a ser administrada na mãe. Como 1 ampola de 300μg de imunoglobulina é capaz de neutralizar 30 mL de sangue total, caso o resultado encontrado a partir do emprego da fórmula for equivalente a 15 mL de sangue fetal total, seria necessário 0,5 ampolas para proceder a profilaxia. Devido a estimativa do cálculo, caso a segunda casa decimal do número de ampolas encontrado for $\geq$ a 0,5, deve-se arredondar o número para cima e acrescentar 1 ampola. Em contrapartida, se a segunda casa decimal do número de ampolas calculado for $\leq$ a 0,5, é necessário arredondar o valor encontrado para baixo e acrescentar 1 ampola (KENNEDY, 2008). Seguem dois exemplos para ilustrar o exposto acima:

- 1,6 ampolas calculadas: 2 ampolas (número arredondado para cima devido a segunda casa decimal) + 1 ampola (totalizando 3 ampolas para a profilaxia) (KENNEDY, 2008);
- 1,4 ampolas calculadas: 1 ampola (número arredondado para baixo devido a segunda casa decimal) + 1 ampola (totalizando 2 ampolas para a profilaxia) (KENNEDY, 2008).

7.6.2.3 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é um método que pode ser empregado para a quantificação do sangue fetal na hemorragia feto materna, uma vez que tal método possui boa reprodutibilidade, e maior sensibilidade em relação às outras técnicas (SANDLER; SATHIYAMOORTHY, 2010). Tal técnica consiste na mensuração óptica de células fluorescentes, as quais possuem determinada característica. Propriedades físicas, como o tamanho e a complexidade de células permitem a distinção de uma população celular (BROWN; WITTWER, 2000).

A aplicação de tal técnica nesse caso fundamenta-se em detectar o antígeno D+em hemácias fetais, distinguindo-se de hemácias D- maternas, empregando-se anticorpos Anti-D mono ou policlonais (MEDEARIS et al., 1984; NANCE et al., 1988; SANDLER; SATHIYAMOORTHY, 2010).

7.6.3 Condutas para administração da imunoglobulina anti-D

7.6.3.1 Profilaxia de rotina

Diante do risco aumentado de imunização no terceiro trimestre de gestação, é de suma importância que em todas as gestantes RhD negativas, que não estejam imunizadas pelo anticorpo anti-D, seja administrada a imunoglobulina anti-D Ig (QURESHI et al., 2014). De acordo com a literatura, existem duas estratégias terapêuticas para a profilaxia de rotina durante o pré natal:

- Dose única equivalente a 300 µg na 28ª semana de gestação (BOWMAN et al., 1978; BCSH, 2009; MACKENZIE et al., 2004; TROLLE, 1989).
- Duas doses reduzidas, sendo a primeira equivalente a 100 µg na 28ª semana, e a segunda dose correspondente a 125 µg na 34ª semana (BCSH, 2009; MACKENZIE et al., 1999).

7.6.3.2 Profilaxia pós parto sem quadro hemorrágico

A administração da imunoglobulina deve ser realizada no período de pós parto, incluindo as mulheres que receberam imunoprofilaxia no terceiro trimestre, pois reduz de maneira significativa o risco de aloimunização materna (CROWTHER; MIDDLETON, 2000). A abordagem terapêutica para administração da imunoglobulina consiste em:

- Dose recomendada equivalente a 300 µg (1.500 UI) (BCSH, 2009; QURESHI et al., 2014).

Adicionalmente, orienta-se que a profilaxia seja feita assim que a tipagem RhD do recém nascido esteja disponível e dentro de um período de 72 horas após o parto (FUNG et al., 2003). Nos casos em que não seja possível a obtenção do resultado da tipagem RhD do neonato dentro do período de 72 horas, a imunoglobulina anti-D deve ser administrada a fim de evitar uma possível sensibilização (BOWMAN, 2003). Caso não seja possível proceder a profilaxia dentro do período de até 72 horas, a mesma poderá ser realizada até duas semanas após o parto. Entretanto a profilaxia adiada poderá não ser eficaz (KUMPEL, 2002).

7.6.3.3 Profilaxia nos casos de eventos potencialmente sensibilizantes

Diante de eventos hemorrágicos potencialmente sensibilizantes (Quadro 3), a imunoglobulina anti-D Ig deve ser administrada até 72 horas após o quadro hemorrágico. Caso não seja possível respeitar esse período de tempo, a profilaxia deve ser realizada no prazo máximo de 10 dias (QURESHI et al., 2014).

Quadro 3. Eventos hemorrágicos potencialmente sensibilizantes durante a gravidez.

Amniocentese, Biópsia de vilo corial, Cordocentese
Hemorragia Uterina
Versão cefálica externa
Trauma abdominal
Gravidez ectópica
Evacuação de gravidez molar
Morte intrauterina
Intervenções terapêuticas <i>In Utero</i>
Aborto, Ameaça de aborto
Término da gravidez por intervenção terapêutica
Parto normal, cesárea ou instrumental

Fonte. Adaptado de Qureshi et al., 2014

No primeiro trimestre de gestação (até 12 semanas) a profilaxia anti-D é indicada nas seguintes situações: gravidez ectópica; evacuação de gravidez molar; término da gravidez por intervenção terapêutica e em casos de sangramento uterino. Por outro lado, após a 12^a semana de gestação, a imunoglobulina deve ser administrada após qualquer evento hemorrágico considerado potencialmente sensibilizante (Quadro 4).

Quadro 4. Estratégias terapêuticas recomendadas após eventos hemorrágicos potencialmente sensibilizantes.

Período de gestação	Dosagem mínima recomendada (µg)
Até 12 ^a semana	50
Entre 12 ^a e 20 ^a semana	50
Após 20 ^a semana	*100

*Dosagem mínima recomendada para eventos potencialmente sensibilizantes sem agravamento do quadro hemorrágico. A mínima dosagem é recomendada independente se a gestante recebeu a profilaxia de rotina.

Fonte. Adaptado de Qureshi et al., 2014

Após a 20^a semana de gestação após qualquer evento potencialmente sensibilizante, deve ser realizado um teste para quantificar a hemorragia feto materna. Caso o volume de sangue fetal for superior a 4 mL, doses adicionais de imunoglobulina devem ser administradas. O cálculo é calculado na seguinte proporção:

- 25 µg para cada mL de sangue fetal detectado no teste (no caso de administração IM) (BCSH, 2009; QURESHI et al., 2014).
- 20 µg para cada mL de sangue fetal detectado no teste (no caso de administração IV) (BCSH, 2009; QURESHI et al., 2014).

7.7 Seleção dos hemocomponentes para transfusão sanguínea

7.7.1 Transfusão intrauterina

A transfusão intrauterina (TIU) é considerada a principal opção terapêutica nos casos de anemia fetal grave associada a aloimunização, entre a 18^a e 35^a semana de gestação antes do desenvolvimento da hidropsia (OEPKES; VAN SCHELTEMA, 2007).

A técnica para o tratamento intrauterino, que tem por finalidade a correção da anemia fetal por meio da transfusão sanguínea, foi descrita pela primeira vez em 1963 por Liley e consistia na transfusão intraperitoneal de glóbulos vermelhos monitorado por radiografia. Para proceder a técnica, após instilação de um contraste opaco por amniocentese, o mesmo era concentrado no trato gastro intestinal fetal, proporcionando uma orientação radiográfica para a inserção de uma agulha intraperitoneal para transfusão (LILEY, 1963). Nos dias atuais a técnica de transfusão intraperitoneal, os eritrócitos são inseridos na cavidade peritoneal, com consequente absorção das células pelo sistema linfático fetal (OEPKES; VAN SCHELTEMA, 2007). Embora seja considerado um método que resulte numa restauração mais lenta da hemoglobina fetal comparado a técnica intravascular, é indicada nos casos de doença hemolítica grave de início precoce antes da 20^a semana de gestação. Nesse período o acesso venoso é limitado devido ao menor diâmetro da veia umbilical (HOWE; MICHAILIDIS, 2007).

Ao longo dos últimos trinta anos a correção da anemia fetal passou a ser mais efetiva e segura em decorrência do desenvolvimento da ultrassonografia e de procedimentos intravasculares. Assim, a transfusão intrauterina que era realizada exclusivamente pela via peritoneal, pode ser atualmente procedida por meio de técnica intravascular (OEPKES; VAN SCHELTEMA, 2007).

A técnica intravascular pode ser executada de três maneiras: cordocentese; intravascular com acesso através da porção intrahepática da veia umbilical ou por cardiocentese (OEPKES; VAN SCHELTEMA, 2007). A escolha do método depende da localização do feto, da posição da placenta e da preferência clínica. Trata-se de um procedimento ecoguiado que dura em média 40-60 minutos e pode ser realizado em um ambulatório, sob anestesia local (OEPKES; VAN SCHELTEMA, 2007).

Devem ser realizados na amostra de sangue da mãe testes pré transfusionais para seleção de concentrado de hemácias (ABO, RhD, PAI e prova cruzada). Caso a causa da anemia fetal

esteja associada a aloimunização por anticorpos irregulares maternos, deve ser realizado um painel de hemácias. A seleção dos concentrados de hemácias que serão utilizados na transfusão intrauterina, deve obedecer os seguintes critérios:

- Data de coleta da bolsa deve diferir da data do procedimento no prazo máximo de cinco dias (KENNEDY, 2008);
- Emprego de concentrado de hemácia do grupo "O" e compatível com os anticorpos irregulares maternos (BRASIL, 2013);
- Utilização de concentrado de hemácia irradiado com o intuito de prevenir a doença do enxerto *versus* hospedeiro (BRASIL 2013). Salienta-se, no entanto, que é recomendado que a irradiação seja procedida poucas horas antes do procedimento;
- Seleção de concentrado de hemácia desleucocitado ou anti-CMV (citomegalovírus) não reagente (BRASIL, 2013).

7.7.2 Exsanguíneotransfusão

A exsanguíneotransfusão é um procedimento caracterizado pela troca do sangue total do neonato, por meio da retirada de múltiplas alíquotas, pela mesma quantidade de sangue total de um doador homólogo. O procedimento é indicado principalmente no tratamento de hiperbilirrubinemia não conjugada de caráter severo quando essa representa risco de desenvolvimento de kernicterus no neonato. O quadro de hiperbilirrubinemia pode ser consequência das seguintes causas: prematuridade; infecções; desordens de conjugação (síndrome de Gilbert e síndrome de Crigler-Najjar tipo I e II); trauma; defeitos estruturais congênitos na membrana eritrocitária; eritroenzimopatias hereditárias e principalmente a DHPN (DENERY et al., 2001). Nesse último caso, a incompatibilidade feto materna por anticorpos do sistema ABO e anticorpos do sistema RH, em especial o anti-D, são as causas mais relatadas (BRECHER, 2002; HERMAN; MANNO, 2002).

O objetivo da exsanguíneotransfusão na DHPN consiste na correção da anemia, redução do título dos anticorpos maternos circulantes, remoção das hemácias sensibilizadas e remoção da bilirrubina não conjugada, antes da sua distribuição para os tecidos (DINIZ et al., 2001). Os testes pré transfusionais para a seleção dos hemocomponentes incluem:

- Tipagem ABO e RhD (ROBITAILLE et al., 2004);

- Pesquisa de Anticorpos Irregulares. Caso esse for positivo deve ser realizada a identificação do(s) anticorpo(s) detectado(s) por meio da realização do painel de hemácias (ROBITAILLE et al., 2004);
- Prova Cruzada

No caso de PAI positivo, é recomendado que a identificação de anticorpos seja procedida na amostra de soro oriunda da mãe do neonato Além do mais, é necessário a realização do TAD na amostra do neonato. Caso esse teste apresentar resultado positivo, é necessário a realização do teste de eluato (ROBITAILLE et al., 2004) a fim de identificar os anticorpos maternos sensibilizantes.

Para a realização da exsanguíneotransfusão o produto de escolha é o sangue total ou o sangue total reconstituído. Nesse caso, o concentrado de hemácia é reconstituído com plasma fresco congelado, cujo hematócrito após o processo deve ficar na faixa de 40-50% (ROBITAILLE et al., 2004). O sangue total ou o concentrado de hemácia que compõe o sangue total reconstituído deve ser desleucocitado, apresentar até 5 dias de coleta (embora alguns serviços utilizem entre 3 e 7 dias), e serem irradiados poucas horas antes do procedimento (BRASIL, 2013; DINIZ et al., 2001). O quadro 5 apresenta as especificações para configuração antigênica eritrocitária no que diz respeito a seleção dos hemocomponentes nas incompatibilidades feto materna pelo sistema ABO, RH e outros sistemas de grupos sanguíneo envolvidos no desencadeamento da DHPN.

Quadro 5. Especificações para seleção dos hemocomponentes na exsanguíneotransfusão

	Concentrado de Hemácias	Plasma fresco congelado
INCOMPATIBILIDADE ABO	Ausência do(s) antígeno(s) respectivo(s) ao anticorpo(s) presente(s) no plasma/soro materno* **.	Anticorpos do sistema ABO compatíveis com as hemácias do neonato*.
INCOMPATIBILIDADE RhD	Ausência do(s) antígeno(s) respectivo(s) ao anticorpo(s) presente(s) no plasma/soro materno * **.	Anticorpos do sistema ABO compatíveis com as hemácias do neonato*.
INCOMPATIBILIDADE POR OUTROS SISTEMAS	Ausência do(s) antígeno(s) respectivo(s) ao anticorpo(s) presente(s) no plasma/soro materno* **.	Anticorpos do sistema ABO compatíveis com as hemácias do neonato*.

*Concentrado de hemácia de tipagem "O" e plasma fresco congelado de tipagem "AB" são considerados opções de escolha para qualquer tipagem sanguínea do neonato. Ressalta-se somente que os concentrados de hemácia do grupo "O" devem apresentar títulos baixos de anticorpos ABO, ou serem lavados antes do processo de reconstituição.

**Os anticorpos maternos serão identificados após a realização do painel de hemácias na amostra da mãe e por meio do teste de eluato com as hemácias do neonato. Salienta-se, entretanto, que a escolha do fenótipo eritrocitário do concentrado de hemácia deve respeitar os anticorpos identificados no soro da mãe.

Fonte. Robitaille et al., (2004).

8. RESULTADOS

8.1 Prevalência de anticorpos irregulares maternos

As especificidades de anticorpos irregulares identificados ao longo dos 4 anos estão demonstradas nas tabelas 1,2, 3 e 4. Foram contabilizados os casos de anticorpos irregulares identificados nas amostras de RN (identificados no teste de eluato) e/ou no soro das respectivas mães dos RNs e de gestantes com suspeita de aloimunização (identificados no soro da mãe), além do número de casos de RN e feto com necessidade de transfusão sanguínea (incluindo TIU e exsanguíneotransfusão). Já a tabela 5, informa o título dos anticorpos anti-D nos casos de necessidade de transfusão sanguínea, quando esse teste foi realizado nos casos contabilizados.

Tabela 1. Especificidades de anticorpos irregulares no ano de 2012 identificados no teste de eluato e no soro da mãe e o número de casos com necessidade de transfusão.

Anticorpos identificados	Número de casos		Identificados no teste de eluato		Identificados no soro da mãe		Necessidade de transfusão	
	n [#]	%	n*	%	n*	%	n*	%
Anti-D	3	42,8	2	66,7	3	100,0	1	33,3
Anti-c,-E	1	14,3	*	-	1	100,0	0	-
Anti-E	1	14,3	1	100,0	0	-	0	-
Anti-D,-E	1	14,3	0	-	1	100,0	0	-
Anti-M	1	14,3	0	-	1	100,0	0	-

n[#] Número de casos totais de anticorpos irregulares identificados no teste de eluato e no soro da mãe. Valores correspondentes ao total de 7 casos de anticorpos maternos identificados no ano de 2012, excluindo-se o sistema ABO .

n*Valores correspondentes ao número total de casos de anticorpos irregulares para cada especificidade de anticorpo.

*Identificado no eluato somente os anticorpos irregulares de especificidade anti-c.

Tabela 2. Especificidades anticorpos irregulares de no ano de 2013 identificados no teste de eluato e no soro da mãe e o número de casos com necessidade de transfusão.

Anticorpos identificados	Número de casos		Identificados no teste de eluato		Identificados no soro da mãe		Necessidade de transfusão	
	n [#]	%	n*	%	n*	%	n*	%
Anti-D	4	100,0	4	100,0	2	50,0	1	25,0

n[#] Número de casos totais de anticorpos irregulares identificados no teste de eluato e no soro da mãe. Valores correspondentes ao total de 4 casos de anticorpos maternos identificados no ano de 2013, excluindo-se o sistema ABO .

n*Valores correspondentes ao número total de casos de anticorpos irregulares para cada especificidade de anticorpo.

Tabela 3. Especificidades anticorpos irregulares de no ano de 2014 identificados no teste de eluato e no soro da mãe e o número de casos com necessidade de transfusão.

Anticorpos identificados	Número de casos		Identificados no teste de eluato		Identificados no soro da mãe		Necessidade de transfusão	
	n [#]	%	n*	%	n*	%	n*	%
Anti-D	10	71,4	9	90,0	8	80,0	6	60,0
Anti-D,-C	2	14,3	*	-	2	100,0	1	50,0
Anti-c	1	7,1	1	100,0	1	100,0	0	-
Anti-K	1	7,1	1	100,0	1	100,0	1	100,0

n[#] Número de casos totais de anticorpos irregulares identificados no teste de eluato e no soro da mãe. Valores correspondentes ao total de 14 casos de anticorpos maternos identificados no ano de 2014, excluindo-se o sistema ABO .

n*Valores correspondentes ao número total de casos de anticorpos irregulares para cada especificidade de anticorpo.

*Identificados no eluato somente anticorpos de especificidade anti-D.

Tabela 4. Especificidades anticorpos irregulares de no ano de 2015 identificados no teste de eluato e no soro da mãe e o número de casos com necessidade de transfusão.

Anticorpos identificados	Número de casos		Identificados no teste de eluato		Identificados no soro da mãe		Necessidade de transfusão	
	n [#]	%	n*	%	n*	%	n*	%
Anti-D	9	45,0	9	100,0	5	55,5	3	33,3
Anti-D,-C	3	15,0	1	33,3	3	100,0	1	33,3
Anti-D,-E	1	5,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0
Anti-C	1	5,0	1	100,0	0	-	0	-
Anti-c	2	10,0	2	100,0	2	100,0	1	50,0
Anti-c,-E	1	5,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0
Anti-Fy(b)	1	5,0	0	-	1	100,0	1	100,0
Anti-Jk(a)	1	5,0	1	100,0	1	100,0	0	-
Anti-M	1	5,0	0	-	1	100,0	1	100,0

n[#] Número de casos totais de anticorpos irregulares identificados no teste de eluato e no soro da mãe. Valores correspondentes ao total de 20 casos de anticorpos maternos identificados no ano de 2015, excluindo-se o sistema ABO .

n*Valores correspondentes ao número total de casos de anticorpos irregulares para cada especificidade de anticorpo.

Tabela 5. Título dos aloanticorpos anti-D nos casos com necessidade de transfusão sanguínea.

TRANSFUSÃO SANGUÍNEA	
Título dos anticorpos anti-D	Número de casos
<256	2
<512	1
<1024	3
<2048	1
Não realizado	4
Total	11

O número total de casos analisados ao longo dos 4 anos foi equivalente a 585, sendo que desse número excluiu-se os casos de anticorpos maternos o sistema ABO, obtendo-se um número equivalente a 45 casos de anticorpos irregulares maternos na população estudada. Na análise de distribuição do total de anticorpos irregulares maternos (TAIM) para cada ano, observou-se uma tendência crescente a cada ano do número de anticorpos irregulares maternos. Para a análise empregou-se o coeficiente de correlação linear obtendo-se um valor igual a 0,9311, indicando que existe uma forte tendência de crescimento linear no número de casos de anticorpos irregulares maternos e portanto, uma forte correlação entre o aumento de casos com o decorrer dos anos. O comportamento dos dados está representado no gráfico 1.

Gráfico 1. Distribuição do TAIM para cada ano. 2012 (7 casos); 2013 (4 casos); 2014 (14 casos); 2015 (20 casos).

O gráfico 2 apresenta um histograma com o percentual de distribuição de frequência dos anticorpos ao longo dos quatro anos de análise. Empregou-se um teste de prevalência com o intuito de obter a frequência individual de cada anticorpo bem como a prevalência da especificidade de anticorpo mais frequente perante aos demais.

Gráfico 2. Histograma de prevalência dos anticorpos irregulares maternos.

De acordo com as tabelas 1, 2, 3 e 4 apresentadas, é possível visualizar que o anticorpo anti-D foi identificado na maioria dos casos de anticorpos irregulares maternos, de forma que sua prevalência foi ao menos três vezes maior quando comparado ao segundo grupo de anticorpos irregulares mais prevalente (anti-D, -C). Entretanto, ao agrupar todos os anos para uma única análise (Gráfico 2), percebe-se uma distância ainda maior, de quase cinco vezes, da quantidade de casos de anticorpos irregulares maternos de especificidade anti-D (frequência equivalente a 57,8%) para o número de casos de anticorpos de especificidade anti-D, -C (frequência equivalente a 11,1%). Além do mais, ainda na análise da prevalência dos anticorpos irregulares maternos ao longo dos 4 anos, ao comparar simultaneamente as demais especificidades de anticorpos com o anti-D verifica-se uma prevalência de 41% desse último sob todos os demais juntos.

A possível associação entre o fenótipo RhD da gestante e a realização do teste de PAI pode ser visualizada por meio da tabela 6 de contingência.

Tabela 6. Número de testes de PAI realizados e não realizados para os fenótipos RhD positivo e RhD negativo das mães. Valor de $p=0,1672$.

Pesquisa de anticorpos irregulares (PAI)			
Fenótipo RhD da mãe	Realizado	Não realizado	TOTAL
RhD positivo	0	12	12
RhD negativo	8	25	33
Total	8	37	45

Como a tabela de contingência apresenta poucos dados qualitativos, com valores pequenos, optou-se por utilizar o teste de Fisher para a comparação entre os grupos e um teste complementar para a verificação da associação entre as variáveis por meio do emprego do coeficiente de Cramer. De acordo com o teste de Fisher ($p=0,1672$), foi possível concluir com 95% de significância que os grupos se comportam de forma estatisticamente parecidas. Pelo coeficiente de Cramer, quanto maior seu valor, maior o nível de associação entre as variáveis qualitativas. Na presente análise o coeficiente de Cramer foi equivalente a 0,1783, comprovando a fraca associação entre o fenótipo RhD e o teste de PAI. Dessa forma, o fato do fenótipo RhD ser positivo ou negativo não influencia a realização do teste de PAI. Entretanto, cabe salientar que, embora não exista associação, é possível observar uma predominância elevada (de quase 5 vezes superior) no número de casos de testes de PAI não realizados sob os realizados. No caso de gestantes RhD positivo, esse aumento é de quase 12 vezes.

8.2 Elaboração do material clínico

O material clínico foi elaborado na forma de cartilha (ANEXO 1), sendo esta intitulada: DHPN - DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL E TESTES IMUNOHEMATOLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.

A cartilha foi dividida nos seguintes tópicos:

- Apresentação
- Propósito
- Doença Hemolítica Perinatal: Fisiopatologia
- Aloimunização
- Acompanhamento da gestante
- Acompanhamento da gestante aloimunizada
- Transfusão intrauterina
- Transfusão do RN
- Profilaxia Anti-D

O material clínico será disponibilizado na forma impressa para a hemorrede de Santa Catarina.

9. DISCUSSÃO

A aloimunização materna ocorre quando há exposição do indivíduo frente a antígenos eritrocitários não próprios, como ocorre por exemplo na transfusão de sangue e em processos patológicos durante a gravidez, tais como aborto espontâneo, gravidez ectópica, deslocamento placentário, trauma abdominal e placenta prévia e também em procedimentos obstétricos onde há ruptura da barreira feto materna: amostras das vilosidades coriônicas, amniocentese, cordocentese, versão cefálica externa, remoção manual da placenta, cesárea anterior, aborto terapêutico, entre outros (BAIOCHI; NARDOZZA, 2009; QUERESHI et al., 2014).

A ocorrência da hemorragia feto materna com consequente sensibilização da gestante bem como a transfusão de sangue não compatível constitui a base da etiopatogenia da DHPN. Dentre os anticorpos responsáveis pelo maior número de casos de DHPN de caráter grave associada a mortalidade fetal, destaca-se o anti-D (CIANCIARULLO; CECCON; VAZ, 2001), devido, principalmente a sua alta imunogenicidade e a incidência do fenótipo na população (URBANIÁK; GREISS, 2000). No decorrer da pesquisa foi possível observar uma predominância notável dos anticorpos irregulares maternos de especificidade anti-D, confirmada estatisticamente (predominância de 41% em relação a outras especificidades de anticorpos irregulares e frequência de 57,8% ao longo dos 4 anos). Dentre esse grupo, 11/26 fetos e neonatos acometidos necessitaram de transfusão sanguínea. Os títulos correspondentes aos casos com necessidade de transfusão, quando determinados, foram: 256, 512, 1024 e 2048. Para dois casos com título 1024 e o único caso de título correspondente a 2048 foi necessário o procedimento de TIU como forma de tratamento. De acordo com Howard e colaboradores (1998), em uma amostragem de 22.264 mulheres, 244 apresentaram anticorpos clinicamente significantes (correspondente a 1%), sendo que dentre essas, 100 apresentavam anticorpos de especificidade anti-D. Além da maior prevalência, fetos e neonatos de mães com anti-D apresentaram os piores desfechos clínicos: morte intra uterina, necessidade de transfusão intra uterina e pós nascimento, perda fetal antes da 24ª semana de gestação (HOWARD et al., 1998). Cianciarullo e colaboradores (2003) encontraram uma prevalência de 57,8% de anticorpos de especificidade anti-D, dentre gestantes com resultado de PAI positivo. Apesar da profilaxia anti-D proporcionar a diminuição da sensibilização de mulheres RhD negativo (BOWMAN, 2006), no Brasil a DHPN por anticorpos anti-D apresenta incidência de 5 casos para cada 1000 nascidos vivos. Esse

resultado indica que, mesmo com a profilaxia já instituída e preconizada, existem falhas da implementação de protocolos que exaltem a importância da profilaxia correta (PACHECO, 2013). No caso de Santa Catarina, muitas gestantes atendidas nas maternidades públicas de Florianópolis são oriundas de cidades do interior com sistemas de saúde precário e com pouco acesso a informação, ressaltando a importância de um material clínico explicativo abordando o assunto.

Com o advento da imunoglobulina como forma de profilaxia anti-D, outras especificidades de anticorpos começaram a emergir e se tornaram importante causa de DHPN (MOISE, 2000). A prevalência de outras especificidades de anticorpos envolvidas no desencadeamento da DHPN é de 1 em 500 gestantes, embora haja um risco menor de desenvolver doença grave (KOELEWIJN et al., 2008). No presente estudo, em relação ao sistema RH, foram identificados no período de análise dos dados (2012-2015) 14/45 casos de anticorpos. As especificidades encontradas foram: anti-D, -C (5/45-11,1%); anti-D, -E (2/45-4,4%); anti-C (1/45-2,2%); anti-c (3/45-6,7%); anti-c,-E (2/45-4,4%), anti-E (1/45-2,2%).

De acordo com os resultados, a associação de anticorpos anti-D,-C foi a mais frequente, após o anti-D. Em relação aos casos contabilizados, em dois deles foi necessária transfusão sanguínea, sendo que em um deles, o título do anti-D foi equivalente a 2048 e o procedimento de TIU foi empregado como forma de tratamento. No ano de 2014, os dois casos de anticorpos de especificidade anti-D,-C catalogados foram identificados no soro da mãe do RN, sendo que em um deles somente o anti-D foi identificado no teste de eluato. No ano de 2015, dos casos identificados para a associação dos anticorpos em questão, três foram identificados no soro da mãe e somente em um deles os dois anticorpos foram identificados no teste de eluato. Nas outras duas situações, os anticorpos recuperados a partir do referido método foram anti-D (em um caso) e anti-C (outro caso). A associação de anticorpos anti-D,-C possui importância clínica considerável. Cianciarullo e colaboradores (2003) verificaram que no grupo de RN com presença dos anticorpos em questão, todos evoluíram com icterícia, sendo que em três casos foi necessária transfusão sanguínea. Devido a importância da identificação dessa associação de anticorpos, recomenda-se que os protocolos possibilitem distinguir as seguintes combinações: anti-D+C+G; anti-D+C; anti-D+G, anti-C+G (PALFI; GUNNARSSON, 2001). No laboratório de imunohematologia do HEMOSC a pesquisa do antígeno G, bem como a distinção de todas as combinações citadas não é realizada. Dessa forma, no material clínico desenvolvido, optou-se por

ressaltar a importância de tal. O papel do antígeno G no desencadeamento de anemia fetal grave é controverso. Entretanto, a diferenciação das associações de anticorpos é fundamental pois gestantes RhD negativos com presença de anti-G ou anti-C+G podem receber imunoglobulina anti-D (PALFI; GUNNARSSON, 2001). Em relação ao único caso de anti-C identificado no período, o RN acometido (RhD positivo) não precisou de transfusão sanguínea. O anticorpo em questão é incomum nos casos de DHPN, especificamente nos casos graves, embora estejam descritos alguns casos na literatura (MITCHELL; JAMES, 1999; TREVETT et al., 2005).

Os anticorpos anti-E e anti-c, assim como os anticorpos anti-D, são importantes causas de DHPN (HASS et al., 2015). No presente estudo, o anticorpo anti-E foi identificado de forma isolada e associado a outros anticorpos: anti-D e anti-c. Apesar da baixa frequência (2,2%) do anticorpo isolado, Koelewijn e colaboradores (2008) apontaram o anti-E foi como o mais prevalente na população estudada, após o anti-D, embora em apenas 2% dos casos tenha desencadeado anemia fetal grave. No presente estudo, o único caso onde somente o anti-E foi identificado, o RN (RhD positivo) não precisou receber transfusão. Em contrapartida, Yoshida e colaboradores (2011) relataram um quadro grave de DHPN por anticorpos anti-E com necessidade de exsanguíneotransfusão. Já no presente trabalho, somente os casos onde o anti-E foi identificado associado a outros anticorpos foram necessárias transfusões como forma de tratamento. Em 1 dos casos de anti-D,-E, além do procedimento de TIU, o neonato necessitou de 2 transfusões sanguíneas. Já em relação aos dois casos de anti-c,-E, em um deles foram necessárias 4 transfusões. A associação de anticorpos anti-c,-E é frequente em gestantes aloimunizadas (KOELEWIJN et al., 2008). O antígeno c é altamente imunogênico e é reconhecido por ser causa de desenvolvimento de DHPN de caráter grave, com sintomatologia clínica semelhante ao anti-D (HACKNEY et al., 2004). No presente estudo, além da identificação do anti-c associado a outro anticorpo, foram contabilizados casos onde o mesmo foi identificado de maneira isolada. Nesse grupo, em apenas um caso houve necessidade de 3 transfusões de concentrado de hemácias. Cianciarullo e colaboradores (2003) presenciaram 8 casos de anticorpos anti-c em gestantes (8,9%) sendo que apenas o tratamento com fototerapia foi necessário. Já Koelewijn e colaboradores (2008) associaram o anti-c como causa de 10% de casos de DHPN de caráter severo (não contabilizando os casos por anti-D). No mesmo estudo, 5% dos casos de anemia grave foram associados a outros anticorpos além do sistema RH e 26% dos casos ao anticorpo anti-K.

O anti-K é considerado a segunda maior causa de DHPN, após o anti-D. Se não tratado, os fetos/neonatos acometidos podem apresentar anemia fetal severa, hidropsia e morte fetal (VAN WAMELEN et al., 2007). Na população estudada, apenas 1 caso (2,2%) de anti-K foi catalogado. Essa baixa incidência na amostragem pode estar relacionada a baixa frequência do antígeno Kell em indivíduos de descendência caucasiana (91%). Entretanto, no único caso envolvendo o referido anticorpo, foi necessário o procedimento de TIU como tratamento. De acordo com a literatura, a taxa de sobrevivência de fetos acometidos por DHPN ocasionadas por anti-K e tratados com TIU é equivalente a 58%. Esse número é inferior a taxa de sobrevivência de casos envolvendo o anti-D (89%). Essa diferença pode estar atribuída principalmente ao diagnóstico tardio da doença ocasionada por anti-K e monitoramento da gestante (VAN KAMP et al., 2004).

As outras especificidades de anticorpos irregulares encontradas foram: anti-M (2/45-4,4%), anti-Fy(b) (1/45-2,2%) e anti-Jk(a) (1/45-2,2%). A primeira especificidade citada é frequentemente encontrada em mulheres grávidas como anticorpo de ocorrência natural (IgM). Já os anticorpos anti-M da classe IgG podem promover o desenvolvimento de anemia fetal grave, assim como outros anticorpos dirigidos contra antígenos do sistema MNS (HEATHCOTE; CARROLL; FLOWER, 2011). Nos dois casos envolvendo anticorpo anti-M, foi detectado reação a 37°C (IgG), sendo que em um deles foi necessária transfusão sanguínea, apesar do resultado negativo de TAD no RN. Diferentemente do observado no trabalho proposto, Kowlewijn e colaboradores (2008) detectaram em 69 gestantes apenas anti-M da classe IgM.

Em relação as outras especificidades de anticorpos identificadas, apenas para o caso de anti-Fy(b) foi necessária transfusão sanguínea como forma de tratamento. No entanto, o referido anticorpo não foi detectado no teste de eluato mas apenas no soro da mãe. Apesar de pouco frequente, anticorpos contra antígenos do sistema DUFFY são reconhecidos como causadores de DHPN grave com necessidade de TIU como tratamento (DAJAK; STEFANOVIC; CAPKUN, 2011), sendo que anti-Fy(a) é encontrado com maior frequência quando comparado ao anti-Fy(b) (HUGHES et al., 2007). Por outro lado, para anticorpos do sistema KIDD a doença hemolítica neonatal ocasionalmente ocorre, mas em poucos casos é considerada grave (CIANCIARULLO et al., 2003). Apesar disso, já foram reportados na literatura relatos de casos com necessidade de exsanguíneotransfusão e casos com sinais de icterícia (RODRIGUEZ et al., 2014; THAKRAL et al., 2010). Baseado nesses fatos, o laboratório de imunohematologia do HEMOSC tem como protocolo realizar a fenotipagem eritrocitária da mãe para os antígenos Jk(a) e Jk(b) nos casos de

TIU, como forma de profilaxia. Além do risco de desencadeamento de DHPN, a preocupação com anticorpos do sistema KIDD baseia-se também no rápido decréscimo dos títulos para níveis indetectáveis em um curto período de tempo (THAKRAL et al., 2010).

No período escolhido para coleta de dados, foi possível visualizar uma tendência crescente a cada ano do número de anticorpos irregulares maternos. Essa tendência ao aumento de número de casos pode estar baseada em vários fatores: aumento do conhecimento a respeito do assunto, sintomatologia clínica mais evidente direcionando para a preocupação com o diagnóstico, melhora nos protocolos do laboratório de imunohematologia para esses casos. Por outro lado, apesar de estatisticamente não ter sido possível verificar uma relação entre a realização do teste de PAI e o fenótipo da gestante, salienta-se que em todos os casos de gestantes RhD positivo, o teste de PAI não foi realizado no pré natal, direcionando para a falta de conhecimento a respeito de outras potenciais especificidades de anticorpos, além do anti-D. Nesses casos, a identificação dos anticorpos no soro da mãe foi procedida depois do nascimento do RN, sendo que a iniciativa de solicitação das amostras partiu, na maioria das vezes do laboratório de imunohematologia. Em um dos eventos de mãe RhD positivo e feto acometido por anticorpo anti-c,-E, o concentrado de hemácia selecionado para a transfusão sanguínea foi O RhD negativo (ccdde), enfatizando o baixo conhecimento dos profissionais da área a respeito do assunto. Ademais, para gestantes com fenótipo RhD negativo, o número de testes de PAI realizados foram inferiores aos testes não realizados, corroborando ainda mais com a hipótese da falta de conhecimento a respeito de testes imunohematológicos que auxiliem no diagnóstico da DHPN.

Quando a presença dos anticorpos irregulares não é detectada na gravidez, as únicas alterações clínicas (que podem ser não específicas) observadas são: diminuição dos movimentos fetais; morte fetal; e icterícia neonatal. Em contrapartida, quando os anticorpos maternos são detectados por testes de triagem e identificados por testes complementares, a gravidez pode ser monitorada por testes laboratoriais e se necessário por investigações clínicas. Nos casos de anemia fetal com risco de desenvolvimento de hidropsia, transfusões de sangue intrauterina podem ser empregadas como alternativa de tratamento. Além disso, o desenvolvimento de "Kernicterus" após o nascimento pode ser prevenido com o auxílio de fototerapia ou exsanguíneotransfusão (HASS et al., 2015).

10. CONCLUSÕES

- O número total casos de aloimunização materna por anticorpos irregulares maternos na população estudada foi equivalente a 45;
- O anticorpo anti-D foi identificado na maioria dos casos de anticorpos irregulares maternos (frequência de 57,8% e prevalência de aproximadamente 41% em relação a outras especificidades de anticorpos;
- Na análise de distribuição do total de anticorpos irregulares maternos (TAIM) para cada ano, observou-se uma tendência crescente a cada ano do número de anticorpos irregulares maternos, indicando que existe uma forte tendência de crescimento linear no número de casos de anticorpos irregulares maternos e portanto, uma forte correlação entre o aumento de casos com o decorrer dos anos;
- Foi evidenciado uma fraca associação entre o fenótipo RhD e o teste de PAI. Dessa forma, o fato do fenótipo RhD ser positivo ou negativo não influencia a realização do teste de PAI;
- O material clínico, elaborado em forma de cartilha, será de utilidade para hemorrede, em especial para profissionais da área da saúde que não estão habituados com termos e testes imunohematológicos principalmente no que diz respeito a finalidade dos exames e princípios. Além do mais, a cartilha elaborada sintetiza a importância de outros anticorpos irregulares no desencadeamento da DHPN.

11. REFERÊNCIAS

AKGUL, S. K. A. Y. S. Y. M. Neonatal hyperbilirubinemia due to ABO incompatibility: does blood group matter? **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 55, p. 56-509, 2013.

AKTAG, A.; ERDEVE, O.; URAS, N.; SIMSEK, Y.; DILMEN, U. Hydrops fetalis due to Kell alloimmunization: A perinatal Approach to a Rare Case. **Turk Journal Hematology**, v. 29, p. 72-75, 2012.

ALBERRY, M. S.; MADDOCKS, D. G.; HADI, M. A.; et al. Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction. **Am. J. Med. Gynecol.**, v. 200, n. 1, p. 98.E1-E6, 2009.

ALFONSO, J. F.; DE ALVAREZ, R. R. Maternal isosensitization to the red cel antigen U. **Am.J. Obstet. Gynecol.**, v. 81, p. 45-48, 1961.

ALLEN, F. H. J.; TIPPETT, P. A. A new Rh blood type which reveals the Rh antigen G. **Vox. Sang.**, v. 3, p. 321-330, 1958.

ARORA, S.; DODA, V.; MARIA, A.; KOTWAL, U.; GOYAL, S. Maternal anti-M induced hemolytic disease of newborn followed by prolonged anemia in newborn twins. **Asian. J. Transfus. Sci.**, v. 9, n. 1., p. 98-101, 2015.

AVENT, N. D.; FINNING, K. M.; MARTIN, P. G.; SOOTHILL, P. W. Prenatal determination of fetal blood group status. **Vox Sang.**, v. 78, n. 2, p. 155-162, 2000.

BAHADO-SINGH, R. O. et al. Middle cerebral artery doppler velocimetric deceleration angle as a predictor of fetal anemia in Rh-alloimmunized fetuses without hydrops. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 183, n. 3, p. 746-751, 2000.

BAIOCHI, E.; NARDOZZA, L. M. M. Aloimunização. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 6, p. 311-316, 2009.

BARROS, C.; OTTA, M.; WAKIM, V. L.; ZAQUERONI, M.; JUNIOR BALEOTTI, W.; CASTILHO, L. Avaliação de reagentes anti-D na detecção dos antígenos D fraco e D parcial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 4, p. 269-274, 2006.

BENACHI, A.; STEFFAN, J.; GAUTIER, E.; ERNAULT, P.; OLIVI, M.; DUMEZ, Y et al. Fetal DNA in maternal serum: does it persist after pregnancy? **Hum. Genet.**, v. 113, p. 76-79, 2003.

BENARDELLO, F.; COLUZZI, S.; CURCIARELLO, G.; TODROS, T.; VILLA, S. Recomendations for the prevention and treatment of haemolytic disease of the foetus and newborn. **Blood Transfusion**, v. 13, p. 109-134.

BOMBARD, A. T. et al. Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negative women. **Prenatal diagnosis**, v. 31, n. 8, p. 802-808, 2011.

BONY, V. G. P. B. P. C. J. P. Time-course expression of polypeptides carrying blood group antigens during human erythroid differentiation. **Br. J. Haematol.**, v. 107, p. 263-274, 1990.

BOWMAN, J. M.; CHOWN, B.; LEWIS, M.; POLLOCK, J. M. Rh isoimmunization during pregnancy: antenatal prophylaxis. **Can Med. Assoc. J.**, v. 118, p. 623-627, 1978.

BOWMAN, J. M. Hemolytic disease (Erythroblastosis fetalis). In: CREASY, R. K.; RESNIK, R. **Maternal-Fetal Medicine**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, cap. 44. 1994.

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

BOWMAN, J. Rh-immunoglobulin: Rh prophylaxis. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 19, n. 1, p. 27-34, 2006.

BURKI, U.; DEGNAN, T. J.; ROSENFELD, R. E. Stillbirth due to anti-U. **Vox Sang.**, v. 9, p. 209-211, 1964.

BCSH. British Committee for Standards in Haematology, Transfusion Taskforce. **Guidelines for the estimation of fetomaternal hemorrhage**. 2009.

Disponível em <http://www.bcsguidelines.com/documents/BCSH_FMH_bcsht_sept2009.pdf>

Acesso em: 18 abr 2016.

BLESSED, W. B.; LACOSTE, H; WELCH, R. A. Obstetrician-gynecologists performing genetic amniocentesis may be misleading themselves and their patients. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 184, n. 7, p. 1340-1344, 2001.

BLUMENFELD, O. O. H. C. H. Molecular genetics of the glycophorin gene family, the antigens for MNS's blood groups: multiple gene rearrangements and modulation of splice site usage result in extensive diversification. **Hum. Mutat.**, v. 6, p. 199-209, 1995.

BRASIL. Portaria nº 2712 de 12 de novembro de 2013. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 221, 13 nov. 2013. Seção 1, p. 106.

BRECHER, M. E. et al. Perinatal issues in transfusion practice; Neonatal and pediatric transfusion practice. **Technical Manual:AABB**. 14. ed. Bethesda: Bethesda. 2002.

BRINC, D.; LAZARUS, A. H. Mechanisms of anti-D action in the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn.**Hematology American Society of Hematology Education Program**, p. 185-191, 2009.

BRIZOT M. L.; NISHIE E. N.; LIAO, A. W.; ZUGAIB, M.; SIMÕES, R. **Aloimunização Rh na Gestação. Projeto Diretrizes**. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 2011. Disponível em
<http://www.projetodiretrizes.org.br/diretrizes10/aloimunizacao_rh_na_gestacao.pdf>
Acesso em: 18 fev 2016.

BROWN, M.; WITTWER, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. **Clinical chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1221-1229, 2000.

BRUCE, L. J. et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane.**Blood**, v. 101, p. 4180-4188, 2003.

CALLAGAN, D. A.; GOLDMAN, D. E.; ROWLAND, T. C. Ultrasonic Doppler observation of fetal heart. **Obstetrics and Gynecology**. 655, NEW YORK, NY 10010: ELSEVIER SCIENCE INC, p. 637, 1964.

CANNON, M.; JONES, P. B.; MURRAY, R. M. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analysis review. **Am. J. Psychiatry**, v. 159, p. 1080-1092, 2002.

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

CASTEL, A.; DREJER, G. F.; VERWEY, R. A. Hemolytic disease in a newborn infant caused by rare maternal anti-erythrocyte antibodies and exchange transfusion with maternal blood frozen earlier. **Ned Tijdschr Geneeskde**, v. 135, n. 52, 2713-2715, 1993. 1993; 137(52):2713-15.

CIANCIARULLO, M. A.; CECCON, M. E. J.; VAZ, F. A. C. Doença Hemolítica Neonatal: antígenos e anticorpos envolvidos. **Pediatria**, v. 23, n. 3, p. 251-257, 2001.

CIANCIARULLO, M. A.; CECCON, M. E. J.; VAZ, F. A. C. Prevalência de marcadores imunohematológicos em recém nascidos ao nascimento e em suas respectivas mães e incidência de doença hemolítica numa maternidade de São Paulo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 49, n. 1, p. 45-53, 2003.

COHEN, F.; ZUELZER, W. W.; GUSTAFSON, D. C. E. A. Mechanisms of isoimmunization. I. The transplacental passage of fetal erythrocytes in homoespecific pregnancies. **Blood**, v. 23, p. 621-646, 1964.

COOK, S. G.; BAKER, J. W.; WEAVER, E. W. Intrauterine transfusion for anti-Duffy (Fy^a) haemolytic disease. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 29, p. 263-264, 1989.

COOLING, L. ABO, H, and Lewis Blood Groups and Structurally Related Antigens. In: ROBACK, J. D. G. B. J. H. T. H. C. D. **Technical Manual: AABB**. 16. ed. Bethesda: Bethesda, 2008. Cap. 12, p. 361-372.

COSTA, A. G. et al. Evolução dos índices doppler velocimétricos da artéria cerebral média em fetos de gestantes normais. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 25, n. 6, p. 437-442 2003.

CHOAVARATANA, R.; UER-AREEWONG, S.; MAKANANTAKOSOL, S. Fetomaternal transfusion in normal pregnancy and during delivery. **J. Med. Assoc. Thai.**, v. 80, p. 96-100, 1997.

CLARKE, C. A.; DONOHOE, W. T. A.; MCCONNELL, R. B. E. A. Further experimental studies of the prevention of Rh haemolytic disease. **Br. Med. J.**, v. 1, p. 979-984, 1963.

DANIELS, G. Other blood groups. In: ROBACK, J. D. G. B. J. H. T. H. C. D. **Technical Manual: AABB**. 16. ed. Bethesda: Bethesda, 2008. Cap. 14, p. 411-436.

DEAN, L. The Duffy blood group. In: DEAN, L. **Blood Groups and Red Cell antigens**. [S.l.]: [s.n.], 2005. p. 1-5.

DAJAK, S; STEFANOVIĆ, V; ČAPKUN, V. Severe hemolytic disease of fetus and newborn caused by red blood cell antibodies undetected at first-trimester screening (CME). **Transfusion**, v. 51, n. 7, p. 1380-1388, 2011.

DA SILVA, P. H.; ALVES, H. B.; COMAR, S. R.; HENNEBERG, R.; MERLIN, J. C.; STINGHEN, S. T. **Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos**. ARTMED Porto Alegre, 2016.

DIAMOND, L. K.; BLACKFAN, K. D.; BATY, J. M. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the newborn. **J. Pediatr.**, v. 1, p. 269-309, 1932.

DINIZ, E. M. A.; ALBIERO, A. L.; CECCON, M. E. J.; VAZ, F. A. C. V. Uso de sangue, hemocomponentes e hemoderivados no recém nascido. **J. Pediatr.**, v. 77, n. 1, p. 104-112, 2001.

DENNERY, P. A. ET AL. Neonatal hyperbilirubinemia. **N. Eng. J. Med.**, v. 344, p. 581-590, 2001.

DOPP, S. L.; ISHAM, B. E. Anti-U and haemolytic disease of the newborn. **Transfusion**, v. 23, p. 273-272, 1883.

DUFOUR, D. R.; MONOGHAN, W. P. ABO haemolytic disease of the newborn: a retrospective analysis of 254 cases. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 73, p. 369-373, 1980.

DUFOUR, P.; VINATIER, D.; BERNARDI, C.; EZZEDINE, M.; FONTEYNE, G.; MONNIER, J. C.; MANNESSIER, L. Allo-immunization foeto-maternelle grave anti-Duffy. **Journal de Gynecologie. Obstetrique et Biologie de la Reproduction**, v. 20, p. 809-814, 1991.

DUGUID, J. K. B. I. M. E. G. D. W. R. Haemolytic disease of the newborn due to anti-M. **Vox Sang.**, v. 68, p. 195-196, 1995.

FASANO, R. M. Hemolytic disease of the fetus and newborn in the molecular era. In: **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**. WB Saunders, 2015.

FERRANDO, M. et al. Severe hemolytic disease of the fetus due to anti-Jk(b). **Transfusion**, v. 48, p. 402-404, 2008.

FIRAN, M.; BAWDON, R.; RADU, C.; OBER, R.J.; EAKEN, D.; ANTOHE, F.; GHETIE, V.; WARD, E. S. The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer of gammaglobulin in humans. **Int. Immunol.**, v. 13, p. 993-1002, 2001.

FUNG, K.; EASON, E.; CRANE, J.; ARMSON, A.; DE LA RONDE, S.; FARINE, D. et al. Maternal-Fetal Medicine Committee, Genetics Committee. Prevention of Rh alloimmunization. **J. Obstet. Gynaecol. Can.**, v. 25, p. 765-773, 2003.

FURUKAWA, K.; NAKAJIMA, T.; KOGURE, T.; YASAKI, K.; YOSHIDA, M.; FUKAISHI, T.; et al. Example of a woman with multiple intrauterine deaths due to anti-M who delivered a live child after plasmapheresis. **Exp. Clin. Immunogenet.** v. 10, p. 161-167, 1993.

FLEGEL, W.A. The genetics of the Rhesus blood system. **Blood Transfusion**, v. 5, n. 2, p. 50-57, 2007.

FREDA, V. J.; GORMAN, J. C.; POLLACK, W. Successful prevention of experimental Rh sensitization in man with an anti-Rh gamma2-globulin antibody preparation: a preliminary report. **Transfusion**, v. 4, p. 26-32, 1964.

GIRELLO, A. N.; KUNH, T. I. B. B. **Fundamentos da Imuno-Hematologia Eritrocitária**. 2 ed. Editora Senac.São Paulo, 2007.

GIRELLO, A. L. ; KÜHN, T. I. B. B. **Fundamentos da Imuno-hematologia Eritrocitária**. 3 ed. Editora Senac São Paulo, 2011.

GOODRICK, M. J.; HADLEY, A. G.; POOLE, G. Haemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Fy(a) and the potential clinical value Duffy genotyping in pregnancies at risk. **Transfusion Medicine**, v. 7, p. 301-304, 1997.

HASS, M. et al. Anti-D prophylaxis: past, present and future. **Transfusion Medicine**, p. 1-7, 2014.

HAAS, M.; THURIK, F. F.; KOELEWIJN, J. M.; VAN DER SCHOOT, C. E. Haemolytic disease of the fetus and newborn. **Vox. Sanguinis**, v. 109, p. 99-113, 2015.

HACKNEY, D. N.; KNUDTSON, E. J.; ROSSI, K. Q.; KRUGH, D.; O`SHAUGHNESSY, R. W. Management of Pregnancies Complicated by anti-c Isoimmunization. **American College of Obstetricians and Gynecologists**, v. 103, n. 1, p. 24-30, 2004.

HADLEY, A. G.; POOLE, G. D.; POOLE, J.; ANDERSON, N. A.; ROBSON, M. Haemolytic disease of the newborn due to anti-G. **Vox Sang.**, v. 71, p. 108-112, 1996.

HARMAN, C. R. Specialized applications of obstetric ultrasound: management of the alloimmunized pregnancy. **Semin Perinatol**, v. 9, p. 184-97, 1985.

HEATHCOTE, D. J. C. T. E. F. R. L. Sixty years of antibodies to MNS system hybrid glycoporphins: What have we learned? **Transfus. Med. Rev.** , v. 25, p. 111-124, 2011.

HERMAN, J. H.; MANNO, C. S. Neonatal red cell transfusion. In Pediatric transfusion therapy. **Technical Manual: AABB press**. 14. ed. Bethesda: Bethesda, 2002.

HOWARD, H.; MARTLEY, V.; MCFADYEN, I.; CLARKE, C.; DUGUID, J.; BROMILOW, I.; et al. Consequences for fetus and neonate of maternal red cell alloimmunization. **Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.**, v. 78, n. 1, p. 62-66, 1998.

HOWE, D. T.; MICHAELIDIS, G. D. Intraperitoneal transfusion in severe, early-onset Rh isoimmunization. **Obstet. Gynecol.**, v. 110, p. 880-884, 2007.

HUGHES, L. H.; ROSSI, K. Q. K. D. W. O. R. W. Management of pregnancies complicated by anti-Fy(a) alloimmunization. **Transfusion**, v. 47, p. 1858-1861, 2007.

HUNDRIC-HASPL, Z. et al. Anti-Diego(a) red blood cell alloantibody as a possible cause of anemia in a 3-week-old infant. **Archives of Medical Research**, v. 34, p. 149-151, 2003.

ISSIT, P. D.; TESSEL, J. A. On the incidence of antibodies to the Rh antigens G, rhi (Ce), C and C^G in sera containing anti-CD or anti-C. **Transfusion**, v. 21, p. 412-418, 1981.

IWAMOTO, A.; NAKAMURA, M.; NAKAMURA, K. E. A. A case of Diego(b) incompatible newborn noticed by anemia (abstract). **J. Jpn. Soc. Premature Newborn Med.**, v. 12, p. 520, 2000.

JOVANOVIC-SRZENTIC, S. D. M. T. N. D. R. R. N. P. D. F. D. Antibodies detected in samples from 21,730 pregnant women. **Immunohematology**, v. 19, p. 89-92, 2003.

JOY, S. D.; ROSSI, K. Q.; KRUGH, D., et al. Management of pregnancies complicated by anti-E alloimmunization. **Obstet Gynecol.**, v. 105, p. 24-28, 2005.

JUDD, W. J. Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited. **Transfusion**, v. 41, p. 1445-1452, 2001.

JUDD, W. J. JOHNSON, S. T.; STORRY, J. **Juudd's methods in immunohematology**. 3 ed. Bethesda, MD: AABB Press, 2008.

KENNEDY, M. S. Perinatal Issues in Transfusion Practice. In: ROBACK, J. D. G. B. J. H. T. H. C. D. **Technical Manual:AABB**. 16. ed. Bethesda: Bethesda, 2008. Cap. 22, p. 625-636.

KIM, W. D. L. Y. H. A fatal case of severe hemolytic disease of newborn associated with anti-Jk(b). **J. Korean Med. Sci**, v. 21, p. 151-154, 2006.

KOELEWIJN, J. M. et al. One single dose of 200 µg of antenatal RhIG halves the risk of anti-D immunization and hemolytic disease of the fetus and newborn in the next pregnancy. **Transfusion**, v. 48, n. 8, p. 1721-1729, 2008.

KOELEWIJN, J. M. et al. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands. **Transfusion**, v. 48, n. 5, p. 941-952, 2008.

KOMATSU, F.; HASEGAWA, K.; YANAGISAWA, Y. E. A. Prevalence of Diego blood group Di(a) antigens in Mongolians: comparison with that in Japanese. **Transfusion Apheresis Science**, v. 30, p. 119-124, 2004.

KUMPEL, B. M.; VAN DE WINKEL, J. G. J. . W. N. A. C.; AL., E. Antigen topography is critical for interaction of IgG2 antired cell antibodies with Fcγ receptors..**Br. J. Haematol.**, v. 94, p. 175-183, 1996.

KUMPEL, B. M. On the mechanism of tolerance to the RhD antigen mediated by passive anti-D (RhD prophylaxis).**Immunology Letters**, v. 82, p. 67-73, 2002.

KUMPEL, B. M. On the immunologic basis of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis.**Transfusion**, p. 1652-1656, 2006.

KUMPEL, B. M. Lessons learnt from many years of experience using anti-D in humans for prevention of RhD immunization and haemolytic disease of the fetus and the newborn. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 154, n. 1, p. 1-5, 2008.

KLEIHAUER, E.; BRAUN, H.; BETKE, K. Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear (in German).**Klin Wochenschr**, v. 35, p. 367-368, 1957.

KLEIN, H. G.; ANSTEE, D. J. **Mollison`s Blood Transfusion in Clinical Medicine**.12 ed. Editora Wiley Blackwell.Oxford, 2014.

LAKHWANI, S.; MACHADO, P.; PECOS, P.; COLOMA, M.; REBOLLO, S.; RAYA, J. P. Kell hemolytic disease of the fetus. Combination treatment with plasmapheresis and intrauterine blood transfusion. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 45, p.9–11, 2011.

LAMBIN, P.; DEBBIA, M.; PUILLANDRE, P.; BROSSARD, Y. IgG1 and IgG3 anti-D in maternal serum and on the RBCs of infant suffering from HDN: relationship with the severity of the disease. **Transfusion**, v. 42, p. 1537-1546, 2002.

LARYSSE, M.; ARRENDTS, T.; DOMINGUEZ, S. R. Nuevo grupo sanguíneo encontrado en descendientes de Indios. **Acta Med. Venezolana**, v. 3, p. 132-138, 1955.

LEGER, R. M. The positive Direct Antiglobulin Human Test and Immune-Mediated Hemolysis. In: ROBACK, J. D. G. B. J. H. T. H. C. D. **Technical Manual:AABB**. 16. ed. Bethesda: Bethesda, 2008. Cap. 17, p. 499-519.

LEVINE, P. F. L. R. K. E. Haemolytic disease of the newborn due to anti-S. **Blood**, v. 7, p. 1030-1037, 1952.

LILEY, A. W. Liquor amnii analysis in the management of the pregnancy complicated by Rh sensitization. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 17, n. 2, p. 188-192, 1962.

LILEY, A. W. Intrauterine transfusion of foetus in haemolytic disease. **Br. Med. J.**, v. 2, p. 1107-1109, 1963.

LIUMBRUNO, G. M.; D´ALESSANDRO, A.; REA, F.; PICCININI, V.; CATALANO, L.; CALIZZANI, G.; PUPELLA, S.; GRAZZIANI, G. The role of antenatal immunoprophylaxis in the prevention of maternal-foetal anti-Rh(D) alloimmunization. **Blood transfusion**, v. 8, p. 8-16, 2010.

LO, Y.M.D. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. **The Lancet**, v. 350, n. 9076, p. 485-487, 1997.

LO, Y. M. D. Fetal RhD genotyping from maternal plasma. **Ann. Med.**, v. 31, p. 308-312, 1999.

LOMAS-FRANCIS, C.; TIPPETT, P.; THOMPSON, K. M., et al. Demonstration of seven epitopes on the D antigen using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. **Vox Sang.**, v. 57, p. 261-264, 1984.

LOMAS-FRANCIS, C. The value of DNA analysis for antigens of the Kidd blood group system. **Transfusion**, v. 47, p. 23S-27S, 2007.

LUCIEN, N.; SIDOUX-WALTER, F.; ROUDIER, N.; RIPACHE, P.; HUET, M.; TRINHTRANG-TAN, M. M. et al. Antigenic and functional properties of the human red blood cell urea transporter hUT-B1. **J. Biol. Chem.** v. 13, n. 37, p. 34101-34108, 2002

MACHADO, I. N.; BARINI, R. Doença Hemolítica Perinatal: Aspectos Atuais. **Revista de Ciências Médicas**, v. 15, n. 1, p. 69-74, 2006.

MACKENZIE, I. Z.; BOWELL, P.; GREGORY, H. et al. Routine antenatal Rhesus D immunoglobulin prophylaxis: the results of a prospective 10 year study. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 106, p. 492-497, 1999.

MACKENZIE, I. Z.; BICHLER, J.; MASON, G. C. et al. Efficacy and safety of a new, chromatographically purified Rhesus (D) immunoglobulin. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 117, p. 154-161, 2004.

MALEY, M.; BABB, R.; CHAPMAN, C. E.; FITZGERALD, J.; CAVANAGH, G. Identification and quantification of anti-D, -C and -G in alloimmunized pregnant women. **Transfus. Med.**, v. 11, p. 443-446, 2001.

MARI, G.; DETER, R.L.; CARPENTER, R.; RAHMAN, F.; ZIMMERMAN, R.; MOISE, JR, K.J. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 1, p. 9-14, 2000.

MARTIN, W. L.; WEST, A. P.; GAN, L.; et al. Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding. **Mol. Cell**, v. 7, p. 867-877, 2001.

MATSON, G. A. S. J. T. J. D. Severe hemolytic disease of the newborn caused by anti-Jk(a). **Vox Sanguinis**, p. 144-147, 1959.

MAYNE, K. M. B. P. J. G. S. J. E. A. The significance of anti-S sensitization in pregnancy. **Clin. Lab. Hematol**, v. 12, p. 105-107, 1990.

MEDEARIS, A. L. et al. Detection of fetal erythrocytes in maternal blood post partum with the fluorescence-activated cell sorter. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 148, n. 3, p. 290-295, 1984.

MERLOB, P. et al. Hemolytic disease of the newborn caused by anti-Jk(b). **Pediatric Hematol. Oncol.**, v. 4, p. 357-360, 1987.

MIMAYA, J. N. D. K. H. A case of hemolytic disease of the newborn due to M/N incompatibility. **Acta Pediatric Jpn**, v. 79, p. 340-344, 1975.

MITCHELL, S.; JAMES, A. Severe hemolytic disease from rhesus anti-C antibodies in a surrogate pregnancy after oocyte donation. A case report. **J. Reprod. Med.**, v. 44, n. 4, p. 388-390, 1999.

MOCHIZUKI, K. et al. Hemolytic disease of the newborn due to anti-Di(b): a case study and review of the literature. **Transfusion**, v. 46, p. 454-460, 2006.

MOISE, K. J. Managment of Rhesus Alloimmunization in Pregnancy. **Obstet. Gynecol.**, v. 100, p. 600-611, 2002.

MOISE, K. J. J. Hemolytic disease of the fetus and newborn. In: CREASY R. K, R. R. I. J. D. **Maternal-fetal medicine: principles and practice**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2004. p. 537-561.

MOISE, K. J. Fetal anemia due to non-Rheus-D red cell alloimmunization. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 13, p. 207-214, 2008.

MOLLISON, P. L.; ENGELFRIET, C. P.; CONTRERAS, M. **Blood transfusion in clinical medicine**. Oxford, UK: Blackwell Science, 1998.

MOLLISON, P. L.; ENGELFRIET, C. P.; CONTRERAS, M. Hemolytic disease of the fetus and the newborn. In: Mollison, P. L.; Engelfriet, C. P.; CONTRERAS, M. **Blood Transfusion in Clinical Medicine**. 11 ed. Oxford: Blacwell Science, p. 496-545, 2005

MONESTIER, M. et al. HDN caused by anti-Di(a) antibodies. **Arch. Fr. Pediatric**, v. 41, p. 641-643, 1984.

MORELL, A. S. F. V. L. E. E. A. Human IgG subclasses in maternal and fetal serum. **Vox Sang.**, v. 21, p. 481, 1971.

MONTEIRO, M. A. G.; FERFEBAUM, R.; DINIZ, E. M. A. Aspectos imunohematológicos, genéticos e clínicos da aloimunização por anticorpo anti-c: relato de dois caos. **Pediatrics**, v. 18, p. 95-98, 1996.

MULLER, C. L.; SCHUCKER, J. L.; BOCTOR, F. N. When anti-G and anti-C antibodies masquerade as anti-D antibody. **J. Matern. Fetal Neonatal Med.**, v. 24, p. 193-194, 2011.

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

MURKI, S.; KANDRAJ, H.; DEVI, S. A. Hemolytic disease of the newborn: Anti-c antibody induced hemolysis. **Indian J. Pediatr.**, v. 79, n. 2, p. 265-266, 2012.

MCDONNEL, I. M. H. S. D. S. P. Hydrops fetalis due to ABO incompatibility. **Arch. Dis. Child Fetal Neonatal**, v. 78, p. 220-221, 1998.

NANAL, R.; KYLE, P.; SOOTHILL, P. W. A classification of pregnancy losses after invasive prenatal diagnostic procedures an approach to allow comparison of units with a different case mix. **Prenat. Diagn.**, v. 23, n. 6, p. 488-492, 2003.

NANCE, S. J, NELSON J. M; ARNDT P. A.; LAM, H. C.; GARRATTY.G. Quantitation of fetal-maternal hemorrhage by flow cytometry. A simple and accurate method. **American journal of clinical pathology**, v. 91, n. 3, p. 288-292, 1989.

NEGISHI, Y. I. A. N. M. K. Y. A case of hemolytic anemia occurring with pure red cell aplasia-like disorder due to anti-M. **Jpn. J. Soc. Premature Newborn Med.**, v. 20, p. 352, 2008.

NEGI, G.; SINGH, G. D. Anti Rh Hemolytic Disease due to Anti C Antibody: Is Testing for Anti D Antibodies Enough? **Indian J. Hematol. Blood Transfusion**, v. 28, n. 2, p. 121-122, 2012.

NOVARETTI, M. C. Z., et al. Hemolytic disease of the newborn due to anti-U. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v. 58, p. 320-323, 2003.

NOVARETTI, M. C. Investigação laboratorial em pacientes com anticorpos eritrocitários. In: BORDIN, J. O.; LANGHI JUNIOR, D.M.; COVAS, D. T. **Hemoterapia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2007, p. 186-189.

OEPKES, D.; VAN SCHELTEMA P, A. Intrauterine fetal transfusions in the management of fetal anemia and fetal thrombocytopenia. **Semin. Fetal Neonatal Med.**, v. 12, p. 432-438, 2007.

ONDA, M. K. S. F. M. Genomic organization of glycoporphin A gene family revealed by yeast artificial chromosomes containing human genomic DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 13013-13020, 1994.

PACHECO, C. A. M. S. **Doença Hemolítica Perinatal RhD: Um problema de saúde pública no Brasil**. 2013. 95 f. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e da Mulher) - Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2013.

PALFI, M; GUNNARSSON, C. The frequency of anti-C+ anti-G in the absence of anti-D in alloimmunized pregnancies. **Transfusion Medicine**, v. 11, n. 3, p. 207-210, 2001

PARK, M. H. et al. A case of hemolytic disease of the newborn due to anti-Di(b) antibody. **J. Korean Soc. Neonatol.** , v. 6, p. 268-271, 1999.

PARK, T. P. S.; OH, S. H.; CHOI, J. C. E. A. The clinical significance of antibody screening including Di(a) panel cell in Asian Mongoloid populations. **J. Korean Med Sci**, v. 18, p. 669-672, 2003.

PARK, T. P. S.; OH, S. H.; CHOI, J. C. E. A. The clinical significance of antibody screening test including (Di(a) panel cell in Asian Mongoloid populations. **J. Korean Med. Sci.**, v. 18, p. 669-672, 2003.

PARK, D. K. et al. A case of haemolytic disease in a newborn due to anti-Jk(b). **Korean J. Pediatric**, v. 46, p. 718-721, 2003.

PARSH, B. S. Hemolytic disease of the newborn due to anti-S antibodies. **J. Nat. Med. Assoc.** , v. 92, p. 91-93, 2000.

PERDOMO, R. M. A. Eficiência da associação das técnicas de cloroquina e bloqueio na dissociação de auto-anticorpos IgG. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 2, p. 227, 2003.

PIRELLI, K. J. et al. Molecular determination of RHD zygosity: predicting risk of hemolytic disease of the fetus and newborn related to anti-D. **Prenatal diagnosis**, v. 30, n. 12-13, p. 1207-1212, 2010.

POOLE, J. The Diego Blood Group System-an Update. **Immunohematology**, n. 4, v. 15, p. 135-143, 1999.

POLLACK, W.; GORMAN, J. G.; FREDA, V. J. E. A. Results of clinical trials of RhoGAM in women. **Transfusion**, v. 8, p. 151-153, 1968.

POLLOCK, J. M.; BOWMAN, J. M. Anti-Rh(D) subclasses and severity of Rh hemolytic disease of the newborn. **Vox sang.**, v. 59, p. 176-179, 1990.

PLAUT, G. I. E. W.; MOURANT, A. E. S. R. R. R. A new blood group antibody, anti-Jk(b). **Nature**, v. 171, p. 431, 1953.

QUERESHI, H. et al. The use of anti-D immunoglobulin for the prevention of haemolytic disease of the fetus and the newborn. **Transfusion**, v. 24, p. 8-20, 2014.

RATH, M. E. A.; SMITS-WINTJENS, V. E. H. J.; LINDENBURG, I. T. M.; FOLMAN, C. C.; BRAND, A.; VAN KAMP, I. L.; OEPKES, D.; WALTHER, F. J.; LOPRIORE, E. Postnatal outcome in neonates with severe Rhesus c compared to Rhesus D hemolytic disease. **Transfusion**, v. 53, p. 1580-1585, 2013.

RIYAMI, A. Z.; SALMANI, M.; HASHAMI, S.; SABAH, M.; HINAI, S.; BALUSHI, H.; RIVAMI, N.; DUGHAIHI, T.; HOSNI, S. et al. Successful management of severe hemolytic disease of the fetus due to anti-Js(b) using intrauterine transfusions with serial maternal blood donations: a case report and a review of the literature. **Transfusion**, p 1-13, 2013.

ROBERTS, I. A. G. The changing face of haemolytic disease of the newborn. **Early Human Development**, v. 84, p. 515-523, 2008.

ROBITAILLE, N.; NUYT, A. M.; PANAGOPOULOS, A.; HUME, H. A. Exchange Transfusion in the Infant. In. HILLYER, C. D.; STRAUSS, R. G.; LUBAN, N. L. C. **Handbook of Pediatric Transfusion Medicine**. Academic press. 2004. Cap. 15, p. 157-163.

RODRIGUEZ, D. V. et al. Hemolytic Disease of the Newborn due to anti-Jk(b): Case Report and Review of the Literature. **Indian J. Hematol. Blood Transfusion**, v. 30, p. 135-138, 2014.

ROT, A. Contribution of Duffy antigen to chemokine function..**Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 16, p. 687-694, 2005.

SAU, A. et al. Management of red cell alloimmunized pregnancies using conventional methods compared with that of middle cerebral artery peak systolic velocity. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 88, n. 4, p. 475-478, 2009.

SANDLER, S. G.; SATHIYAMOORTHY, S. Laboratory methods for Rh immunoprophylaxis: a review. **Immunohematology**, v. 26, n. 3, p. 92-103, 2010.

SEBRING, E. S.; POLESKY, H. F. Detection of fetal hemorrhage in Rh immune globulin candidates. A rosetting technique using enzyme-treated Rh2Rh2 indicator erythrocytes. **Transfusion**, v. 22, p. 468-471, 1982.

SILVA, C. R.; JORGE, A. O. C.; HIRTSCHE, I. M. V. Alo-anticorpo anti-Di(a) em gestante. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 285-287, 2004.

SILVA, F. P. **A abordagem clínica e hemoterápica da Doença Hemolítica do Recém Nascido -Rh**. 2011

Disponível em:

<http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/revista_virtual/hematologia/artigo_ferdinando.pdf>. Acesso em: 18 abr 2016.

SIMISTER, N. E. Placental transport of immunoglobulin. **G. Vaccine**, v. 21, p. 3365-3369, 2003.

SINGH, S. K. H. R. B. H. C. C. E. S. A. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-bindinglike domain..**Nature**, v. 439, p. 741-744, 2006.

SHIREY, R. S.; MIRABELLA, D. C.; LUMADUE, J. A.; NESS, P. M. Differentiation of anti-D, -C and -G: clinical relevance in alloimmunized pregnancies. **Transfusion**, v. 37, p. 493-496, 1997.

SKOV, F. Observations of the number of available G (rhG, Rh12) antigen sites on red cells. **Vox Sang.**, v. 31, p. 124-130, 1976.

SMITH, G.; KNOTT, P.; RISSIK, J.; et al. Anti-U and haemolytic disease of the fetus and newborn. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 105, n. 12, p. 1318-1321, 1998.

SPONG, C. Y.; PORTER, A. E.; QUEENAN, J. T. Management of isoimmunization in the presence of multiple maternal antibodies. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 185, n. 2, p. 481-484, 2001.

STILLER, R. J. et al. Fetal ascites associated with ABO incompatibility: case report and review of the literature. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 175, p. 1371-1372, 1996.

STOCHMAN, J. A. Overview of the state of the art of Rh disease: history, current clinical management, and recent progress. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 23, p. 554-562, 2001.

STONE, B.; MARSH, W. L. Haemolytic disease of the newborn caused by anti-M. **Br. Journal of Haematology**, v. 5, p. 344-347, 1959.

TABOR, A.; BANG, J.; NORGAARD-PEDERSEN, B. Feto maternal haemorrhage associated with genetic amniocentesis: results of a randomized trial. **Br. J. Obstet. Gynecol.**, v. 94, p. 528-534, 1987.

TANNER, M. J.; MARTIN, P. G.; HIGH, S. The complete amino acid sequence of the human erythrocyte membrane anion-transport protein deduced from the cDNA sequence. **Biochem. Journal**, v. 256, p. 703-712, 1988.

TESAR, D.; BJORKMAN, P. An intracellular traffic jam: Fc receptor-mediated transport of Immunoglobulin G. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 20, n. 2, p. 226-233, 2010.

TOVEY, L. A.; TOWNLEY, A.; STEVENSON, B. J.; TAVERNER, J. The Yorkshire antenatal anti-D immunoglobulin trial in primigravidae. **Lancet**, v. 2, p. 244-246, 1983.

TROLLE, B. Prenatal Rh-immune prophylaxis with 300 micrograms immune globulin anti-D in the 28th week of pregnancy. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 68, p. 45-47, 1989.

TUCK, S. M.; STUDD, J. W. W. Sick cell disease in pregnancy complicated by anti-U antibody. Case report. **Br. J. Obstet Gynaecol.** v. 89, p. 91-92, 1982.

THAKRAL, B.; MALHOTRA, S.; SALUJA, K.; KUMAR, P.; MARWAHA, N. Hemolytic disease of newborn due to anti-Jk(b) in a woman with high risk pregnancy. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 43, p. 41-43, 2010.

THOMPSON, P. R.; CHILDERS, D. M.; HATCHER, D. E. Anti-Di(b) first and second examples. **Vox Sanguinis**, v. 13, p. 314-318, 1967.

TREVETT, JR, THOMAS, N; MOISE, JR; KENNETH, J. Twin pregnancy complicated by severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-g and anti-C. **Obstetrics & Gynecology**, v. 106, n. 5, Part 2, p. 1178-1180, 2005.

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

VAN KAMP, I. L.; KLUMPER, F. J.; BAKKUM, R. S., et al. The severity of immune fetal hydrops is predictive of fetal outcome after intrauterine treatment. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 185, p. 668-673, 2001.

VAN KAMP, I. L.; KLUMPER, F. J.; MEERMAN, R. H.; OEPKES, D.; SCHERJON, S. A; KANHAI, H. H. Treatment of fetal anemia due to red-cell alloimmunization with intrauterine transfusions in the Netherlands, 1988–1999. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 83, n. 8, p. 731-737, 2004.

VAN WAMELEN, D. J.; KLUM, ER, F. J.; HASS, M.; MEERMAN, R. H.; VAN KAM, I. L.; KES, O. Obstetric history and antibody titer in estimating severity of Kell alloimmunization in pregnancy. **Obstet. Gynecol.**, v. 109, n. 5, p. 1093-1098, 2007.

VAUGHAN, J. I.; WARWICK, R. M.; et al. Inhibition of erythroid cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, p. 798e-803, 1998.

VICENTE, L. F.; SERRANO, G. P. F.; SOARES, C.; ALEGRIA, A. M. Profilaxia da isoimunização RhD: uma proposta de protocolo. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, p. 255-260, 2003.

VINCE, J. W.; CARLSSON, U.; REITHMER, R. A. Localization of the Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger binding site to the amino-terminal region of carbonic anhydrase II. **Biochemistry**, v. 39, p. 13344-13349, 2000.

YOSHIDA, M. et al. Successful treatment of fetal intraperitoneal administration of immunoglobulin in a case of fetal hemolytic anemia with 131,072-fold anti-E alloimmunization. **Case reports in obstetrics and gynecology**, v. 2011, 2011.

ZANTEK.; N. D.; KOEPSSELL, S. A.; THARP JUNIOR, D. R.; COHN, C. S. The direct antiglobulin test: A critical step in the evaluation of hemolysis. **Am. J. Hematol.**, v. 87, p. 707-709, 2012.

ZHU, X.; MENG, G.; DICKINSON, B. L.; et al. MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages and dendritic cells. **J. Immunol.** v. 166, p. 3266-3276, 2001.

ZIPURSKY, A.; ISRAELS, L. G. The pathogenesis and prevention of Rh immunization. **Can. Med. Assoc.**, v. 97, p. 1245-1257, 1967.

WAGNER, T.; LANZER, G.; GEISSLER, K. Kell expression on myeloid progenitor cells. **Leukemia and Lymphoma**, v. 43, n. 3, p. 479-485, 2002.

WAGNER, F. F.; FLEGEL, W. A. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. **Immunohematology**, v. 20, p. 23-36, 2004.

WEATHERALL, D. J.; BUNCH, C. O sangue e os órgãos hematopoiéticos. In: SMITH, L. H.; THIER, S. O. **Fisiopatologia: os princípios biológicos da doença**. 2. ed. São Paulo: Editora Médica Panamericana. p. 158-294, 1990.

WENK. R. E.; GOLDSTEIN, P.; FELIX, J. K. Alloimmunization by hr'(c) hemolytic disease of newborns and perinatal management. **Obste. Gynecol.**, v. 67, p. 623-626, 1986.

WESTHOFF, C. M. The structure and function of the Rh antigen complex. In: **Seminars in hematology**. WB Saunders, 2007. p. 42-50.

WIKMAN, A.; EDNER, A.; GRYFELT, G.; JONSSON, B.; HENTER, J. I. Fetal hemolytic anemia and intrauterine death caused by anti-M immunization. **Transfusion**, v. 47, p. 911-917, 2007.

WU, Y.; FAN, L.; LIU, M.; SHEN, W.; XIANG, D.; CAI, X. Anti Di(b) causing disease of the fetus and newborn and the challenges of anti-Di(b) in perinatal management in China. **Transfusion Medicine**, v. 25, n. 6, p. 428-430, 2015.

WHESTOFF, C. M. The Rh System. In: ROBACK, J. D. G. B. J. H. T. H. C. D. **Technical Manual: AABB**. 16. ed. Bethesda: Bethesda, 2008. Cap. 13, p. 391-404.

YASSEN, H. et al. Does prophylactic phototherapy prevent hyperbilirubinemia in neonates with ABO incompatibility and positive Coomb's test? **J. Per. Inatol.**, v. 25, p. 590-594, 2005.

YASUDA, H.; OHTO, H.; NOLLET, K. E.; KAWABATA, K.; SAITO, S.; YAGI, Y.; NEGISHI, Y.; ISHIDA, A. Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn With Late Onset Anemia due to anti-M: A Case Report and Review of the Japanese Literature. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 28, p. 1-6, 2014.

YE, S.; WU, D.; WANG, M.; WU, X.; XU, H.; XU, H.; SHAO, C. A comprehensive investigation of RHD polymorphisms in the Chinese Han population in Xi'an. **Blood Transfusion**, v. 12, p. 396-304, 2014.

YOUNG-OWENS, A. D.; KENNEDY, M.; ROSE, R. L.; BOYLE, J.; O'SHAUGNESSY, R. Anti-M isoimmunization: management and outcome at the Ohio State University from 1969 to 1995. **Obstet. Gynecol.**, v. 90, p. 962-966, 1997.

YIGIT, S.; GURSOY, T.; KANRA, T. . E. A. Whole blood versus red cells and plasma for exchange transfusion in ABO haemolytic disease. **Trans. Med.**, v. 15, p. 313-318, 2005.

YOUSUF, R.; AZIZ, S. A.; YUSOF, N.; LEONG, C. Hemolytic disease of the fetus and newborn caused by anti-D and anti-S alloantibodies: a case report. **Journal of Medicine CaseReport**, v. 71, n. 6, p. 1-3, 2012.

APÊNDICE 1-Termo de Anuência

Prezada Diretora Denise Linhares Gerent

Solicitamos autorização institucional para realização da pesquisa intitulada **PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IRREGULARES EM GESTANTES ATENDIDAS EM SERVIÇOS PÚBLICOS DA HEMORREDE DE SANTA CATARINA**, pela acadêmica **Caroline Klein Maranhão** sob orientação do *Dr. Gil Cunha De Santis* com o seguinte objetivo geral: **Determinar a prevalência e a especificidade dos anticorpos irregulares em gestantes atendidas em maternidades públicas da hemorrede de Santa Catarina e elaborar um material clínico destacando a importância da realização do teste de pesquisa de anticorpos irregulares, independente da fenotipagem RhD da gestante, nos exames pré natais.** Assim, solicita-se acesso aos dados do laboratório de Imuno-Hematologia, dessa instituição. Oportunamente, pedimos autorização para que o nome desta instituição possa constar no relatório final bem como em futuras publicações na forma de artigo científico.

Ressaltamos que os dados coletados serão mantidos em absoluto sigilo de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS/MS) 466/12 que trata de Pesquisa envolvendo Seres Humanos. Salientamos ainda que os dados serão utilizados tão somente para realização deste estudo.

Na certeza de contarmos com a colaboração e empenho desta Diretoria, agradecemos antecipadamente a atenção, ficando à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

Nome do pesquisador

Assinatura do Pesquisador

Nome do orientador

Assinatura do Orientador

Florianópolis,/..... de 2016

Declaro para os devidos fins e efeitos legais que, objetivando atender as exigências para obtenção do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humano, e como representante legal do **Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina** tomei conhecimento legal do projeto de pesquisa **PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IRREGULARES EM GESTANTES ATENDIDAS EM SERVIÇOS PÚBLICOS DA HEMORREDE DE SANTA CATARINA**. Como esta instituição apresenta para o desenvolvimento deste projeto, autorizo a sua execução nos termos proposto.

Florianópolis,/..... de 2016

Direção ou Responsável da Instituição

APÊNDICE 2 -Termo de Consentimento para Uso de Arquivos, Registros e Similares

Eu, **Caroline Klein Maranhão**, responsável principal pelo projeto o qual pertence ao curso de **MESTRADO PROFISSIONAL EM HEMOTERAPIA** da **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**, venho pelo presente, solicitar autorização da **CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE SANTA CATARINA – HEMOSC** no laboratório de Imunohematologia para realização da coleta de dados através do banco de dados **HEMOSIS** e registro manuais no período da coleta de dados será de janeiro de 2012 a dezembro de 2015 para a dissertação sob o título **PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IRREGULARES EM GESTANTES ATENDIDAS EM SERVIÇOS PÚBLICOS DA HEMORREDE DE SANTA CATARINA**, com o objetivo de determinar a prevalência e a especificidade dos anticorpos irregulares em gestantes atendidas em maternidades públicas da hemorrede de Santa Catarina Esta pesquisa está sendo orientada pela Professor Dr. Gil Cunha De Santis. Declaro que:

- O acesso dos dados coletados a partir de planilhas de registros de resultados arquivados nos laboratórios de Imunohematologia do HEMOSC bem como registros informatizados disponíveis no sistema de informática da instituição será feito somente após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa.
 - O acesso aos dados será supervisionado pelo responsável do laboratório de Imunohematologia do HEMOSC que esteja plenamente informada sobre as exigências de confiabilidade;
 - O compromisso com a privacidade e a confidencialidade dos dados utilizados, preservando integralmente o anonimato e a imagem do sujeito bem como a sua não estigmatização será mantido;
 - A não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou econômico-financeiro, será assegurado;
- Contando com a autorização desta instituição, coloco-me à disposição para qualquer esclarecimento

Florianópolis, _____ de 2016

Assinatura do Pesquisador Principal

RG

Assinatura do Orientador da Pesquisa

RG

Direção ou Responsável da Instituição

APÊNDICE 3-Pedido de Isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Solicito ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC que autorize a realização da pesquisa sem a apresentação do **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**.

O projeto ***PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IRREGULARES EM GESTANTES ATENDIDAS EM SERVIÇOS PÚBLICOS DA HEMORREDE DE SANTA CATARINA***, que tem como responsável o autor ***Caroline Klein Maranhão*** e o orientador ***Dr. Gil Cunha De Santis***, utilizará apenas dados secundários coletados a partir de planilhas de registros de resultados arquivados nos laboratórios de Imunohematologia do HEMOSC bem como registros informatizados disponíveis no sistema de informática da instituição

Por se tratar de pesquisa que utilizara de registros manuais arquivados e o HemoSis nos laboratórios de Imuno-Hematologia a qual são dados secundários será realizado um estudo Observacional de Coorte Retrospectivo englobando um levantamento de dados contendo informações a respeito da especificidade de anticorpos irregulares detectados em amostras de sangue de cordão ou periférico de recém nascidos (RN); amostras de sangue das respectivas mães dos RN; amostras de sangue de gestantes com suspeita de alo imunização. O período da coleta de dados será de janeiro de 2012 a dezembro de 2015 e o tamanho da população será equivalente a 500.

É do conhecimento do pesquisador que conforme a Resolução 466/12 IV. 8-” Nos casos em que seja inviável a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou que esta obtenção signifique riscos substanciais à privacidade e confidencialidade dos dados do participante ou aos vínculos de confiança entre pesquisador e pesquisado, a dispensa do TCLE deve ser justificadamente solicitada pelo pesquisador responsável ao Sistema CEP/CONEP, para apreciação, sem prejuízo do posterior processo de esclarecimento.”

No presente caso entende-se ser dispensável apresentação do TCLE conforme razões citadas acima e pelas razões que serão listadas abaixo:

- Por ser um estudo observacional de coorte retrospectivo, que empregará apenas informações contidas em sistemas de informação institucional e dados disponíveis nas planilhas de registros de resultados sem previsão de utilização de material biológico;
- Porque todos os dados serão manejados e analisados de forma anônima, sem identificação nominal dos participantes de pesquisa;
- Porque os resultados decorrentes do estudo serão apresentados de forma agregada, não permitindo a identificação individual dos participantes
- Porque se trata de um estudo não intervencionista (sem intervenções clínicas) e sem alterações/influências na rotina/tratamento do participante de pesquisa, e consequentemente sem adição de riscos ou prejuízos ao bem-estar dos mesmos.

O investigador principal e demais colaboradores envolvidos no estudo acima se comprometem, individual e coletivamente, a utilizar os dados provenientes deste, apenas para os fins descritos e a cumprir todas as diretrizes e normas regulamentadoras descritas na Res. CNS Nº

466/12, e suas complementares, no que diz respeito ao sigilo e confidencialidade dos dados coletados.

Por fim, assumimos a responsabilidade pela fidedignidade das informações e aguardamos deferimento.

Florianópolis, _____ de 2016

Assinatura do Pesquisador Principal

RG

Assinatura do Orientador da Pesquisa

RG

APÊNDICE 4

- Tabela construída no Programa de Excel da Microsoft 2007 para análise das variáveis estudadas.

ANTICORPOS IRREGULARES ELUÍDOS EM AMOSTRAS DE CORDÃO/SANGUE PERIFÉRICO DE RECÉM NASCIDO

SEXO	ABO	RhD	ANTICORPO IDENTIFICADO	LOCALIDADE
-------------	------------	------------	-------------------------------	-------------------

ANTICORPOS IRREGULARES IDENTIFICADOS EM AMOSTRAS DE GESTANTES E MÃES DE RECÉM NASCIDOS

ABO	RhD	ANTICORPO IDENTIFICADO	LOCALIDADE
------------	------------	-------------------------------	-------------------

ANEXO 1. Material Clínico Elaborado**DHPN****DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL E TESTES IMUNOHEMATOLÓGICOS PARA
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

APRESENTAÇÃO

A Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) é ocasionada por anticorpos maternos da classe IgG que podem ser transportados ativamente da mãe para o feto através da placenta. Esses anticorpos podem levar a destruição das hemácias fetais e consequentemente anemia fetal, caso as hemácias expressem antígenos eritrocitários respectivos aos anticorpos maternos. Trata-se de uma doença que, se não tratada pode ocasionar mortalidade e morbidade perinatal com risco potencial de sequelas a longo prazo (FRANKLIN, 2009; MOLLISON; ENGELFRIET; CONTRERAS, 2005) até mesmo em países desenvolvidos, onde a incidência da doença é de aproximadamente 1 a 6/1000 nascidos vivos (MOISE, 2002).

Na maioria dos casos severos da doença, os anticorpos maternos envolvidos são de especificidade anti-D. Entretanto, a introdução da imunoglobulina anti-D (Ig) como alternativa profilática de rotina e em casos de hemorragia intensa tem sido responsável pela redução da imunização de mulheres RhD negativas pelo anticorpo citado de 16% para 0,3% (QUERESHI et al., 2014) além de contribuir para a diminuição dos casos de DHPN ocasionados pelo referido anticorpo (HASS et al., 2015). Por outro lado, apesar da profilaxia, 1 a 3 gestantes RhD negativas em 1000 desenvolvem anti-D podendo passar para o feto (KOELEWIJN et al., 2008). Já no Brasil, a taxa de DHPN por anticorpos anti-D é de aproximadamente 5 por 1000 nascidos vivos (PACHECO, 2013). A ocorrência de imunização por anti-D, mesmo com a profilaxia pode ser justificada por três causas: falha em reconhecer acontecimentos sensibilizantes ao longo da gravidez; omissão da administração da imunoglobulina anti-D e sensibilização por episódios de hemorragia feto materna espontâneos e clinicamente silenciosos (VICENTE et al., 2003).

Em relação a outras especificidades de anticorpos envolvidos no desencadeamento da DHPN sabe-se que a prevalência é de 1 em 500 gestantes, embora haja um menor risco de desenvolver doença grave (KOELEWIJN et al., 2008).

Como o grau de severidade da DHPN difere entre as outras especificidades de anticorpos, existe uma carência de informações no que diz respeito a detecção e identificação dos mesmos e até mesmo do anticorpos anti-D durante o pré natal. Quando a presença desses anticorpos não é detectada na gravidez, as únicas alterações clínicas (que podem ser não específicas) observadas são: diminuição dos movimentos fetais; morte fetal; e icterícia neonatal. Em contrapartida, quando os anticorpos maternos são detectados por testes de triagem e identificados por testes complementares, a gravidez pode ser monitorada por testes laboratoriais e se necessário por

investigações clínicas. Nos casos de anemia fetal com risco de desenvolvimento de hidropsia, transfusões de sangue intrauterina podem ser empregadas como alternativa de tratamento. Além disso, o desenvolvimento de "Kernicterus" após o nascimento pode ser prevenido com o auxílio de fototerapia ou exsanguíneotransfusão (HASS et al., 2015).

Esta cartilha tem como objetivo principal apresentar os testes imunohematológicos para detecção e identificação dos anticorpos antieritrocitários maternos bem como apresentar, além do anti-D, outras potentes especificidades de anticorpos que estão envolvidas no desencadeamento da DHPN. O material também discorre a respeito da profilaxia anti-D e alternativas profiláticas em relação a outras classes de anticorpos.

PROPÓSITO

A cartilha está organizada em uma breve introdução, seguida de perguntas e respostas, figuras, quadros e tabelas explicativas que visam orientar os profissionais da área da saúde a respeito dos testes imunohematológicos necessários para detecção e identificação de anticorpos irregulares maternos que auxiliam no diagnóstico laboratorial da doença bem como as condutas necessárias para a correta profilaxia anti-D e alternativas profiláticas em relação a outras classes de anticorpos.

1. Doença Hemolítica Perinatal: Fisiopatologia

A Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) é caracterizada pela destruição das hemácias fetais de neonatos por anticorpos regulares e irregulares maternos. Os anticorpos irregulares maternos são produzidos frente à exposição a antígenos eritrocitários em duas situações: transfusão sanguínea e gravidez (BAIOCHI, NARDOZZA, 2009). Nesse último caso, a hemorragia de glóbulos vermelhos fetais na circulação materna pode ocorrer espontaneamente durante a gestação ou na presença de processos como trauma, amniocentese, cordocentese, aborto entre outros. Uma vez que essa produção de anticorpos maternos ocorre no final da gravidez, o feto e o neonato da primeira gestação é raramente afetado (KENNEDY, 2008).

Apenas anticorpos da classe IgG são capazes de atravessar a placenta. Caso o feto expresse o antígeno eritrocitário respectivo ao anticorpo materno, este se liga e promove a destruição das hemácias com consequente anemia (Figura 1). A anemia fetal estimula a eritropoese compensatória, entretanto essa pode não ser suficiente para reversão do quadro. Outras classes de anticorpos, como por exemplo anticorpos de especificidade anti-K (Kell) podem acarretar na destruição de células progenitoras eritroides resultando em anemia fetal precoce. Com o agravamento do quadro de anemia, a eritropoese se expande ao fígado e ao baço, promovendo um aumento desses órgãos e hipertensão portal. Somado a isso, a diminuição da produção de albumina pelo fígado fetal leva a uma redução da pressão oncótica, edema generalizado e ascite, denominados de "hidropsia fetal". Se não tratada, na maioria dos casos a hidropsia fetal associada a danos cardiovasculares pode levar ao óbito do feto (KENNEDY, 2008). Somado a isso, a hemólise fetal tem como consequência o aumento dos níveis de bilirrubina. Essa atravessa a circulação materna direcionando-se ao fígado onde é conjugada. Após o nascimento a bilirrubina resultante da destruição dos eritrócitos fetais permanece na circulação do recém nascido, pois a ligação com a circulação materna é rompida. Entretanto, como o fígado do neonato é imaturo, não consegue conjugar a bilirrubina de forma eficiente. Assim sendo, o excesso de bilirrubina não conjugada atravessa a barreira hematoencefálica imatura e se acumula, podendo promover lesões cerebrais graves, denominada "Kernikterus". Esse termo é uma condição resultante da toxicidade da bilirrubina às células dos gânglios de base e diversos núcleos do tronco cerebral e pode promover seqüelas clínicas permanentes (SIMISTER, 2003). Os fetos acometidos podem apresentar, por exemplo, seqüelas no desenvolvimento neuropsicomotor secundárias ao dano cerebral (Figura 1).

Figura 1. Esquema ilustrativo da fisiopatologia da DHPN.

Fonte. Adaptado de Hass et al (2015).

2. Aloimunização

Os antígenos de grupos sanguíneos eritrocitários são estruturas macromoleculares localizados na superfície extracelular da membrana dos eritrócitos podendo ser de natureza carboidrato, proteína ou glicoproteína (Figura 2) (DANIELS, 2008), sendo que a expressão desses na hemácia caracteriza o fenótipo eritrocitário (GIRELLO, KUHN, 2007).

A aloimunização eritrocitária é uma resposta imunológica contra antígenos eritrocitários não próprios, ocorrendo devido à sensibilização em transfusões de sangue e gestações (NOVARETTI, 2007), desencadeando a formação de aloanticorpos irregulares. Dentre os aloanticorpos antieritrocitários, os dirigidos contra antígenos dos sistemas RH, KELL, DUFFY, KIDD, MNS e DIEGO possuem grande importância clínica, por reagirem a 37°C e provocarem hemólise no receptor de sangue e no feto ou recém nascido (DANIELS, 2008; IWAMOTO et al., 2000).

Os anticorpos irregulares, diferentemente do ABO, são aqueles de ocorrência não esperada e ocorrem em aproximadamente 0,3% a 2,0% da população em geral. O risco de aloimunização é de aproximadamente 1% após transfusão de uma unidade de concentrado de hemácias. No entanto, para determinadas populações (pacientes politransfundidos, talassêmicos e falciformes) esse risco é maior (GIRELLO; KUHN, 2007; MARTINS et al., 2008).

Em relação as gestantes, durante a primeira gravidez a sensibilização é muito rara e corresponde a 0,8 a 1,5% dos casos, respondendo o contingente de primigestas aloimunizadas por 5 a 6% dos casos, indicando que, precedendo a aloimunização, quase sempre há uma gestação de conceito positivo para o antígeno sensibilizante ou evento transfusional incompatível (HUCHET et al., 1987) .

2.1 Anticorpos Irregulares na DHPN

O desencadeamento da DHPN de caráter severo por anticorpos irregulares depende de vários fatores: classe do anticorpo Ig, especificidade dos aloanticorpos irregulares e o grau de expressão do antígeno na membrana eritrocitária fetal e em outros tecidos. O quadro 1 apresenta um resumo da relevância clínica dos anticorpos citados no desencadeamento da DHPN, incluindo, além dos sistemas de maior importância clínica, outros antígenos que não acarretam uma hemólise acentuada no feto.

Quadro 1. Importância clínica dos Anticorpos Irregulares envolvidos no desencadeamento da DHPN.

SISTEMAS DE GRUPOS SANGUÍNEOS E ANTÍGENOS	Risco de desenvolvimento da DHPN em fetos e neonatos antígeno positivo e severidade da doença.
ABO	Baixo ^b risco para a doença; em geral de caráter brando ^a ; raramente de caráter severo ^a .
RH: D	Alto ^b risco para a doença; geralmente de caráter muito severo ^a .
RH: c	Alto risco para a doença; geralmente de caráter muito severo ^a ou brando ^a
RH: E	Médio ^b risco para a doença; maioria de caráter brando ^a e às vezes severo ^a
RH: outros antígenos	Médio ^b risco para a doença; maioria de caráter brando ^a e poucas vezes de caráter severo ^a .
KELL: K	Alto ^b risco para a doença; geralmente de caráter muito severo ^a ou brando ^a .
KELL: outros antígenos	Médio ^b risco para a doença.
DUFFY: Fy(a)/ Fy(b)	Médio ^b risco para a doença; geralmente de caráter brando ^a .
KIDD: Jk(a)/Jk(b)	Baixo ^b risco para a doença; geralmente de caráter brando ^a .
MNS: M/N/S/s	Baixo ^b risco para a doença; maioria de caráter brando ^a , raramente de caráter severo ^a .
MNS: Outros antígenos	Baixo ^b risco para a doença; maioria de caráter brando ^a , raramente de caráter severo ^a .
I, LE, P1; LU, Yt	Sem risco; antígenos de baixa densidade antigênica nos eritrócitos fetais.
Antígenos pertencentes a outros sistemas de grupos sanguíneos	Risco muito baixo ^b ; raramente de caráter severo ^a .

a. Doença de caráter muito severo: necessidade de transfusão intrauterina e/ou exsanguíneo transfusão. Doença severa: Necessidade de transfusão intrauterina; indução de parto prematuro e/ou necessidade de transfusão após o nascimento. Doença branda: apenas tratamento com fototerapia é necessário.

b. Alto risco: > 50%; médio risco: >10-50%; baixo risco: 1-10%; risco muito baixo: <1%.

Fonte. Adaptado de Hass et al. (2015).

Em Santa Catarina, entre os anos de 2012 e 2015, a prevalência de anticorpos irregulares identificados no hemocentro de Florianópolis está demonstrada na figura 2.

Gráfico 1. Prevalência de Anticorpos Irregulares identificados no hemocentro de Florianópolis-SC entre 2012 e 2015.

Fonte. Autor (2016).

3. Testes imunohematológicos para acompanhamento da gestante: dúvidas e esclarecimentos.

3.1 Quando e quais exames imunohematológicos devem ser realizados para a gestante durante a gravidez?

Na primeira consulta clínica para a realização do pré natal, devem ser solicitados os seguintes exames laboratoriais: Tipagem sanguínea ABO e RhD (incluindo pesquisa de RhD fraco) e a Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI). Caso a gestante for RhD negativa e apresentar PAI negativa, deve-se proceder a administração da imunoglobulina (KENNEDY, 2008), respeitando o período correto. Por outro lado, caso a gestante apresentar resultado de PAI positiva, é recomendado a identificação do (s) anticorpo (s) irregular (es).

3.2 Como é feita a determinação da tipagem ABO?

A determinação da tipagem ABO é realizada por meio da pesquisa dos antígenos na membrana da hemácia, sendo essa denominada prova direta. Para a execução dessa etapa, emprega-se os antissoros anti-A e anti-B, sendo que a utilização do soro anti-AB é facultativa. Além da prova direta, é realizada a pesquisa de anticorpos regulares no plasma/soro do indivíduo, sendo essa denominada prova reversa (GIRELLO; KUHN, 2007). Nesse caso, os reagentes são constituídos por hemácias denominadas A1 e B, que devem ser adquiridas comercialmente. O princípio do método da determinação da tipagem ABO baseia-se na técnica de hemaglutinação e pode ser realizada por meio das técnicas de tubo, gelcentrifugação e microplaca (COOLING, 2008).

3.3 Como é feita a determinação da tipagem RhD?

O princípio do método sorológico da determinação da tipagem RhD baseia-se na técnica de hemaglutinação. Para a determinação da tipagem RhD em geral são utilizados antissoros monoclonais. Esses podem conter somente anticorpos IgM (reativo exclusivamente em temperatura ambiente), anticorpos IgG, ou dispor de uma mistura de anticorpos IgM e IgG nomeado *blend*. A presença de anticorpos IgG possibilita (sorologicamente) a detecção do fenótipo RhD fraco por meio do emprego do princípio do teste de antiglobulina humana indireta (Coombs Indireto) (WHESTHOFF, 2008). Paralelamente a execução da técnica acima descrita, no caso de emprego de antissoros diluídos em meio proteico, deve ser empregado um controle de tipagem RhD, utilizando-se soro controle compatível com o antissoro utilizado e do mesmo fabricante do anti-D (GIRELLO; KUHN, 2007).

VOCÊ SABIA??

Mutações genéticas tem como consequência principal variações quantitativas e qualitativas na expressão do antígeno D, denominadas variantes do antígeno D. Essas incluem o fenótipo RhD positivo normal, RhD positivo fraco, RhD positivo parcial

RhD positivo normal: O indivíduo RhD positivo normal possui todos os epítomos da proteína RhD. Indivíduos não desenvolvem anti-D

RhD positivo fraco: Caracterizado pela redução quantitativa da densidade antigênica da proteína RhD na membrana da hemácia. Indivíduos raramente desenvolvem anti-D

RhD positivo parcial: caracterizado pela ausência e alterações de um ou mais epítomos da proteína RhD. Indivíduos podem desenvolver anti-D

A genotipagem RhD tem sido cada vez mais utilizada para diferenciar os antígenos RhD normal, RhD fraco e RhD parcial devido às limitações dos reagentes utilizados nos testes sorológicos. Essa distinção é importante para prevenir a aloimunização em gestantes, uma vez que indivíduos RhD parcial apresentam risco de aloimunização, enquanto que a maioria dos tipos de RhD fraco não produzem anti-D. Entretanto, são poucos os laboratórios que dispõem dessa metodologia, justificando a importância da classificação sorológica (Quadro 2) e as condutas necessárias para prevenir a aloimunização (BARROS et al., 2006).

Quadro 2. Interpretação sorológica do fenótipo RhD empregando antissoro anti-D proteico.

FENÓTIPO RhD	RESULTADOS SOROLÓGICOS	
	SORO CONTROLE	SORO ANTI-D
Negativo	NEGATIVO	NEGATIVO
Positivo	NEGATIVO	REATIVO em TA (3+/4+)
*Positivo Fraco	NEGATIVO	REATIVO (1+/2+) ou NEGATIVO em TA. REATIVO em AGH
Inconclusivo	POSITIVO	POSITIVO

Legenda:TA (Temperatura Ambiente); AGH (Antiglobulina Humana)

*Para a determinação do fenótipo RhD positivo fraco deve ser incluída uma fase de AGH e não somente a leitura em TA.

Fonte. Girello; Kuhn (2007); Whestoff, (2008)

3.3 O que é teste de Coombs Indireto? E Pesquisa de Anticorpos Irregulares?

O teste de Coombs Indireto (ou teste da antiglobulina humana indireto, TAI) detecta *in vitro* hemácias sensibilizadas por anticorpos (GIRELLO; KUHN, 2007) por meio da aglutinação e pode ser realizada em tubo, gelcentrifugação ou microplaca empregando o soro antiglobulina humana (soro de Coombs) para detecção dos anticorpos IgG (fase AGH) (Figura 2) (DOWNES et al., 2008). O princípio do teste é empregado na determinação do fenótipo RhD fraco (figura32) e na Pesquisa de Anticorpos Irregulares. Assim, a PAI utiliza o princípio do Coombs Indireto para detecção de anticorpos irregulares no soro da gestante empregando as técnicas em tubo ou gel. Na técnica em tubo, a mesma é realizada conforme figura 4. Já na técnica em gel não é realizada a leitura em TA.

Figura 2. Esquema ilustrativo do princípio do TAI. As hemácias contendo antígenos eritrocitários (amostra de indivíduos ou reagentes de triagem da PAI) são colocadas frente ao soro contendo anticorpos IgG. Esses anticorpos se ligam aos respectivos antígenos eritrocitários, porém não promovem a aglutinação. A adição do soro de Coombs (anti-IgG) promove a aglutinação e visualização das hemácias sensibilizadas.

Figura 3. Esquema ilustrativo do princípio do TAI na fenotipagem RhD fraco. A adição do soro de Coombs após incubação é fundamental para detecção do fenótipo RhD fraco.

Fonte. Autor (2016)

Figura 4. Pesquisa de Anticorpos Irregulares na técnica em tubo. O soro da amostra teste é testado com os reagentes de hemácias de triagem. As leituras das reações de aglutinação são feitas em TA e AGH (após incubação a 37°C).

3.4 Existe alguma particularidade para a escolha dos reagentes utilizados na PAI?

Sim. No caso de gestantes, torna-se fundamental a detecção de anticorpos da classe IgG, pois são esses que atravessam a placenta e estão implicados no desenvolvimento da DHPN (KENNEDY, 2008). É importante ressaltar que a padronização da técnica, o emprego da fase antiglobulina humana, utilização de reagentes de triagem adequados e capacitação por parte do laboratório clínico são fundamentais para assegurar a detecção dos anticorpos irregulares. Os reagentes de hemácias devem ser adquiridos comercialmente e devem detectar anticorpos específicos que são considerados clinicamente significantes. Nesse sentido, os reagentes devem estar, no mínimo, fenotipados para os seguintes antígenos: D, C, c, e, E, K, k, Fy(a), Fy(b), Le(a), Le(b), Jk(a), Jk(b), M, N, S, s, e Di(a) (DOWNES et al., 2008). Outra recomendação é que os antígenos dos sistemas RH, DUFFY, KIDD e MNS estejam expressos em dose dupla (maior densidade antigênica) (Ex. Jk(a+b-)) e não em dose simples (menor densidade antigênica) (Ex. Jk(a+b+)) a fim de evitar resultados falso negativos, uma vez que os anticorpos irregulares dirigidos contra esses antígenos podem apresentar efeito de dose (DA SILVA et al., 2016).

3.5 É necessário a repetição da PAI ao longo da gestação?

Sim. No caso de PAI negativa, é recomendado que o teste seja repetido entre a 20^a e 24^a semana de gestação e posteriormente antes do parto (SILVA, 2011). Para gestantes RhD negativas não sensibilizadas orienta-se repetir a referida técnica na 27^a semana de gestação, antes da administração da imunoglobulina profilática (BRIZOT et al., 2011).

3.6 Para gestantes RhD negativo, é recomendada a realização da PAI após a administração da imunoglobulina anti-D?

Não, pois a imunoglobulina administrada poderá ser detectada no sangue materno após 12 semanas, dificultando diferenciar se o anticorpo detectado é proveniente de resposta imune materna ou se é exógeno. No caso de anti-D exógeno, os títulos do anticorpo tendem a diminuir como tempo. Já para anti-D imune, os títulos de anticorpo aumentam ou permanecem os mesmos (GOOCH et al., 2007).

4. Testes imunohematológicos para acompanhamento da gestante aloimunizada: dúvidas e esclarecimentos.

4.1 Quais exames imunohematológicos devem ser solicitados no caso de PAI positivo?

No caso de PAI positiva, é recomendada a identificação do (s) respectivo (s) anticorpo (s) por meio da realização de um painel de hemácias. O processo de identificação de anticorpos irregulares engloba a utilização um conjunto de células fenotipadas. Após a identificação do anticorpo irregular, é fundamental determinar seu significado clínico na DHPN, verificando principalmente a temperatura de reação, a classe do anticorpo (IgM ou IgG) (GIRELLO, KUHN, 2007; ROBERTS, 2008). Além do mais, a gestante deve ter um acompanhamento do corpo clínico e ser monitorada ao longo da gestação.

4.2 Qual a finalidade do exame "titulação de anticorpos"?

A titulação de anticorpos determina a concentração relativa dos os anticorpos capazes de atravessar a placenta e causar a DHPN. Trata-se de uma técnica na qual o soro diluído seriado na razão 2 é testado frente a hemácias com o fenótipo conhecido e apropriado para cada situação e tem por finalidade detectar a mais alta diluição na qual um anticorpo específico demonstra reatividade (DA SILVA et al., 2016). O título deve ser expresso pelo número da maior diluição onde a reatividade foi encontrada. A importância da realização da titulação decorre principalmente devido a possibilidade de comparação entre o títulos obtidos em períodos diferentes. Nessas situações, a diferença de dois títulos, quando comparado ao título da amostra inicial, é considerada importante pois indica estímulo para a produção de anticorpos (KENNEDY, 2008).

4.3 Devem ser solicitadas amostras do pai? Quais testes imunohematológicos devem ser realizados?

As amostras do pai devem ser solicitadas para que sejam realizados os seguintes testes: ABO, fenotipagem RhD e fenotipagem para os antígenos C, c, E, e e Kell. No caso de outros anticorpos irregulares, fenotipagem eritrocitária do antígeno (s) respectivo (s) ao (s) anticorpo (s) irregular (es) identificado (s) na amostra da mãe.

A figura 5 apresenta um algoritmo das condutas frente a resultados de testes imunohematológicos na amostra de gestantes.

Figura 5. Algoritmo contendo os testes imunohematológicos que devem ser realizados em amostras de sangue da gestante.

Fonte. Adaptado de Hass et al., 2015

5. Testes imunohematológicos solicitados para o Recém Nascido (RN): dúvidas e esclarecimentos.

5.1 Quais exames imunohematológicos devem ser solicitados para o RN? Existe alguma particularidade para a coleta de amostras?

Após o nascimento do neonato, é recomendada a coleta de amostra de sangue de cordão para a realização dos testes laboratoriais: Tipagem ABO/RhD; Teste da Antiglobulina Humana Direto (TAD), ou Coombs Direto. Ao utilizar amostras de sangue de cordão para a realização dos testes imunohematológicos empregando a técnica em tubo, as hemácias utilizadas devem ser lavadas com solução fisiológica por no mínimo 6 vezes. Já no emprego da técnica em gelcentrifugação, essa etapa não é necessária. No entanto, caso não seja possível a utilização de sangue de cordão, a coleta de sangue venoso do neonato pode ser solicitada. Nesse caso recomenda-se emprego de métodos que requeira pequena quantidade de amostra, como por exemplo a técnica em gelcentrifugação (GIRELLO; KUHN, 2007).

5.2 Existe alguma diferença entre a determinação do ABO e RhD das amostras de cordão em relação as amostras de adulto?

Na determinação do ABO sim. A determinação do ABO no sangue do neonato até os quatro meses de vida, deve ser realizada contemplando somente a pesquisa dos antígenos na membrana da hemácia. Sendo assim, executa-se somente a prova direta, uma vez que os anticorpos ABO detectados no teste são de origem materna (KENNEDY, 2008). No que diz respeito a tipagem RhD, recomenda-se a inclusão de métodos contendo a fase antiglobulina humana, a fim de detectar o fenótipo RhD fraco.

5.2 Qual a finalidade do TAD?

O Teste da Antiglobulina Humana Direto (TAD) visa pesquisar a presença de hemácias sensibilizadas *in vivo* por anticorpos e/ou frações de complemento, de acordo com o soro antiglobulina humana utilizado (GIRELLO; KUHN, 2011). O princípio da técnica é baseado na aglutinação de hemácias revestidas por anticorpos e/ou frações do complemento por meio da adição do soro de Coombs (figura 6). O TAD é considerado teste de triagem para a detecção de hemácias sensibilizadas por anticorpos maternos.

Figura 6. Esquema ilustrativo do princípio do TAD. As hemácias revestidas por anticorpos são colocadas frente ao soro de coombs que detecta os anticorpos sensibilizantes e/ou frações de complemento culminando na aglutinação das hemácias.

Fonte. Autor (2016).

5.3 No caso de TAD positivo, é possível identificar os anticorpos irregulares maternos? Qual exame deve ser realizado?

Sim é possível. Nesse caso deve ser solicitado o teste de eluato. Esse tem por finalidade retirar o anticorpo sensibilizante da hemácia com o intuito de identificá-lo por meio da utilização de reagentes de hemácias fenotipadas. No caso da DHPN, anticorpos maternos específicos que não

são detectados no soro do recém nascido, podem ser identificados no teste de eluição, uma vez que esse possibilita a concentração de anticorpos (LEGER, 2008).

5.4 A identificação dos anticorpos irregulares maternos deve ser realizada somente pelo teste de eluato? É possível identificá-los no plasma do RN?

A identificação de anticorpos irregulares maternos não deve ser realizada somente no teste de eluato. Na presença de TAD positivo por anticorpos irregulares, devem ser solicitadas amostras da mãe do neonato, já que o TAD possui limitações em relação a detecção de anticorpos sensibilizantes (DA SILVA et al., 2016). Na amostra da mãe do RN, será realizada a identificação de anticorpos irregulares por meio da realização de um painel de hemácias. Já no plasma do RN, é possível identificar os anticorpos irregulares maternos (no caso de disponibilidade de amostra suficiente para execução do teste). Entretanto, como os anticorpos irregulares maternos podem estar ligados nas hemácias do neonato, o teste de eluato é mais fidedigno quando comparado a identificação dos anticorpos irregulares no plasma.

A figura 7 apresenta um algoritmo contemplando os testes imunohematológicos que devem ser realizados nas amostras de RN de gestantes aloimunizadas.

Figura 7. Algoritmo contendo os testes imunohematológicos que devem ser realizados em amostras de sangue de cordão de neonatos de mães aloimunizadas.

Fonte. Autor (2016).

6. Seleção de hemocomponentes para transfusão sanguínea no feto/RN.

6.1 Transfusão intrauterina

6.1.1 Qual a finalidade da transfusão intrauterina?

A transfusão intrauterina (TIU) é considerada a principal opção terapêutica nos casos de anemia fetal grave associada a aloimunização e tem por finalidade a correção da anemia fetal por meio da transfusão sanguínea (OEPKES; VAN SCHELTEMA, 2007).

6.1.2 Quais testes imunohematológicos devem ser realizados?

Devem ser realizados na amostra de sangue da mãe testes pré transfusionais para seleção de concentrado de hemácias (ABO, RhD, PAI e prova cruzada). Caso a causa da anemia fetal esteja associada a aloimunização por anticorpos irregulares maternos, deve ser realizado um painel de hemácias.

6.1.3 Quais os critérios para a seleção do concentrado de hemácias?

A seleção dos concentrados de hemácias que serão utilizados na transfusão intrauterina, deve obedecer os seguintes critérios:

- Data de coleta da bolsa deve diferir da data do procedimento no prazo máximo de cinco dias (KENNEDY, 2008);
- Emprego de concentrado de hemácia do grupo "O" e compatível com os anticorpos irregulares maternos (BRASIL, 2013);
- Utilização de concentrado de hemácia irradiado com o intuito de prevenir a doença do enxerto *versus* hospedeiro (BRASIL 2013). Salienta-se, no entanto, que é recomendado que a irradiação seja procedida poucas horas antes do procedimento;
- Seleção de concentrado de hemácia desleucocitado ou anti-CMV (citomegalovírus) não reagente (BRASIL, 2013).

O quadro 3 apresenta as recomendações em relação a escolha do fenótipo eritrocitário do concentrado de hemácias em gestantes RhD negativo e RhD positivo, salientando que independente do fenótipo eritrocitário recomendado, deve ser obrigatoriamente respeitado o (s) anticorpo (s) irregular (es) identificado (s) na amostra da mãe.

Quadro 3. Critérios para a escolha dos fenótipos eritrocitários dos concentrados de hemácias para transfusão intrauterina em gestantes RhD positivo e RhD negativo.

FENOTIPAGEM RhD DA GESTANTE		
Sistemas de grupos sanguíneos	RhD positivo	RhD negativo
RH	*Respeitar a fenotipagem eritrocitária materna dos antígenos C, c, E, e	**CDE negativo
KELL	Antígeno K negativo	Antígeno K negativo
OUTROS***	Respeitar a fenotipagem eritrocitária materna dos antígenos Jk(a) e Jk(b)	Respeitar a fenotipagem eritrocitária materna dos antígenos Jk(a) e Jk(b)

* Caso exista a possibilidade do feto ser RhD negativo, opta-se por evitar a sensibilização da mãe do RN, visto que o feto não sensibilizará pelo antígeno D;

**Mesmo critério adotado para gestantes com fenótipo RhD inconclusivo e RhD fraco, respeitando também os anticorpos irregulares maternos identificados.

***No caso de gestantes em regime de transfusão regular (diagnóstico de anemia falciforme, *talassemia Intermedia ou Major*, Síndrome mielodisplásica) recomenda-se que a seleção do concentrado de hemácias (além dos anticorpos irregulares identificados), contemple a fenotipagem eritrocitária para antígenos Fy(a), Fy(b), Jk(a), Jk(b), S, s e Di(a).

6.2 Exsanguíneotransfusão e transfusão do RN de mãe aloimunizada

6.2.1 Qual a finalidade da exsanguíneotransfusão?

O objetivo da exsanguíneotransfusão na DHPN consiste na correção da anemia, redução do título dos anticorpos maternos circulantes, remoção das hemácias sensibilizadas e remoção da bilirrubina não conjugada, antes da sua distribuição para os tecidos (DINIZ et al., 2001).

6.2.2 Quais testes imunohematológicos devem ser realizados na exsanguíneotransfusão e na transfusão do RN de mãe aloimunizada?

Nas duas situações devem ser realizados testes pré transfusionais (ABO, RhD, PAI e prova cruzada). Na amostra pré transfusional inicial recomenda-se que a PAI seja realizada no soro da mãe ou na amostra de eluato do RN. A identificação de anticorpos irregulares deve ser procedida na amostra de soro oriunda da mãe. Além do mais, é necessário a realização do TAD na amostra do neonato. Caso esse teste apresente resultado positivo, é necessário a realização do teste de eluato (ROBITAILLE et al., 2004) a fim de identificar os anticorpos maternos sensibilizantes. A prova cruzada deve ser compatível com os anticorpos maternos. Somado a isso, no período neonatal (até 4 meses de vida), caso as hemácias selecionadas para transfusão não sejam do grupo "O",

deve ser investigado no plasma/soro do neonato a presença de anti-A ou anti-B com métodos que incluam uma fase de AGH (BRASIL, 2013).

6.2.3 Quais os critérios de seleção dos hemocomponentes na exsanguíneotransfusão?

A seleção dos concentrados de hemácias que serão utilizados na exsanguíneotransfusão, deve obedecer os seguintes critérios:

- Utilização de concentrado de hemácia irradiado com o intuito de prevenir a doença do enxerto *versus* hospedeiro. Salienta-se, no entanto, que é recomendado que a irradiação seja procedida poucas horas antes do procedimento;
- Seleção de concentrado de hemácia desleucocitado ou anti-CMV (citomegalovírus) não reagente (BRASIL, 2013).
- Sangue total colhido a menos de 5 dias. Caso não seja possível, será necessária uma autorização por escrito do médico assistente e do médico do serviço de hemoterapia (BRASIL, 2013).

O quadro 4 apresenta as especificações imunohematológicas para a seleção dos hemocomponentes para a transfusão.

Quadro 4. Critérios para seleção dos hemocomponentes na exsanguíneotransfusão

	CONCENTRADO DE HEMÁCIAS			PLASMA FRESCO CONGELADO			
INCOMPATIBILIDADE ABO	Ausência respectivo(s) presente(s) materno* **.	do(s) ao no	antígeno(s) anticorpo(s) plasma/soro	Anticorpos compatíveis com o neonato*.	do sistema com as	ABO hemácias do	
INCOMPATIBILIDADE RhD	Ausência respectivo(s) presente(s) materno * **.	do(s) ao no	antígeno(s) anticorpo(s) plasma/soro	Anticorpos compatíveis com o neonato*.	do sistema com as	ABO hemácias do	
INCOMPATIBILIDADE POR OUTROS SISTEMAS	Ausência respectivo(s) presente(s) materno* **.	do(s) ao no	antígeno(s) anticorpo(s) plasma/soro	Anticorpos compatíveis com o neonato*.	do sistema com as	ABO hemácias do	

*Concentrado de hemácia de tipagem "O" e plasma fresco congelado de tipagem "AB" são considerados opções de escolha para qualquer tipagem sanguínea do neonato. Ressalta-se somente que os concentrados de hemácia do grupo "O" devem apresentar títulos baixos de anticorpos ABO, ou serem lavados antes do processo de reconstituição.

**Os anticorpos maternos serão identificados após a realização do painel de hemácias na amostra da mãe e por meio do teste de eluato com as hemácias do neonato. Salienta-se, entretanto, que a escolha do fenótipo eritrocitário do concentrado de hemácia deve respeitar os anticorpos identificados no soro da mãe.

Fonte. Robitaille et al., (2004).

6.2.4 E na transfusão do RN de mãe aloimunizada, quais especificações para a seleção do concentrado de hemácias?

Além de respeitar os anticorpos irregulares maternos, o concentrado de hemácia deve ser desleucocitado e irradiado (recomenda-se que o processo de irradiação seja recente). Somado a isso, o concentrado de hemácia selecionado deve ser ABO compatível com o RN e com os anticorpos regulares maternos, caso estes estejam presentes na amostra de sangue do neonato. No caso de ausência de anticorpos irregulares de especificidade anti-D, não é obrigatório a seleção de hemácias RhD negativo.

6.3 Transfusão da gestante

6.3.1 Quais critérios imunohematológicos devem ser adotados para a escolha da fenotipagem eritrocitária do concentrado de hemácia?

Nas gestantes em regime de transfusão regular (diagnóstico de anemia falciforme, *talassemia Intermedia ou Major*, Síndrome mielodisplásica) recomenda-se que, além do ABO e RhD, a seleção do concentrado de hemácias, contemple a fenotipagem eritrocitária para antígenos Fy(a), Fy(b), Jk(a), Jk(b), S, s e Di(a). No caso de gestantes que não estejam incluídas no grupo acima, é recomendado que a seleção do concentrado de hemácia respeite, no mínimo, a fenotipagem dos antígenos C, c, E, e e Kell (além do ABO e RhD). Entretanto, caso seja possível, orienta-se que essa fenotipagem seja estendida para os outros sistemas de grupo sanguíneo envolvidos na DHPN: DUFFY, KIDD, MNS e DIEGO.

No caso de gestantes com anticorpos irregulares, além das recomendações acima, é obrigatório que a seleção do concentrado de hemácias apresente fenotipagem eritrocitária negativa para o(s) antígeno (s) respectivo (s) ao (s) anticorpo (s) irregular (es) identificados.

7. Profilaxia Anti-D

7.1 É necessária realização da profilaxia diante de qualquer resultado de fenotipagem RhD da gestante?

Não. A profilaxia anti-D deverá ser instituída mediante os seguintes resultados sorológicos de fenotipagem RhD: fenótipo RhD negativo, RhD fraco e RhD inconclusivo (mesmo após tentativa de elucidação do fenótipo). No caso de suspeita sorológica de RhD parcial, a profilaxia também deverá ser realizada.

7.2 Profilaxia sem quadro hemorrágico

7.2.1 Quais as estratégias terapêuticas para profilaxia anti-D?

Quando não há quadro hemorrágico, a imunoglobulina anti-D deve ser administrada como rotina durante a gravidez e após o parto. O período de administração da imunoglobulina de rotina bem como as dosagens recomendadas estão apresentados no quadro 5. Ressalta-se que, de acordo com a literatura, existem duas estratégias terapêuticas para a profilaxia de rotina durante o pré natal.

Quadro 5. Estratégias terapêuticas para profilaxia anti-D sem quadro hemorrágico.

	ETRATÉGIA TERAPÊUTICA 1	ETRATÉGIA TERAPÊUTICA 2
Profilaxia de rotina	Dose única equivalente a 300 µg na 28ª semana de gestação	Duas doses reduzidas, sendo a primeira equivalente a 100 µg na 28ª semana, e a segunda dose correspondente a 125 µg na 34ª semana
Profilaxia após o parto	Dose recomendada equivalente a 300 µg	-

Fonte. BCSH, (2009); Qureshi et al., 2014

7.2.2 Qual o período máximo de administração da imunoglobulina após o parto?

Orienta-se que a profilaxia seja feita assim que a tipagem RhD do recém nascido esteja disponível e dentro de um período de 72 horas após o parto (FUNG et al., 2003). Nos casos em que não seja possível a obtenção do resultado da tipagem RhD do neonato dentro do período de 72 horas, a imunoglobulina anti-D deve ser administrada a fim de evitar uma possível sensibilização (BOWMAN, 2003). Caso não seja possível proceder a profilaxia dentro do período de até 72 horas, a mesma poderá ser realizada até duas semanas após o parto. Entretanto a profilaxia adiada poderá não ser eficaz (KUMPEL, 2002).

7.2.3 Qual resultado de fenotipagem RhD do RN sinaliza para a realização da profilaxia?

Caso a fenotipagem do RN for RhD positivo, RhD positivo fraco ou inconclusiva deve ser instituída a profilaxia. Essa conduta também é válida diante da suspeita de fenótipo RhD parcial.

7.3 Profilaxia nos casos de eventos potencialmente sensibilizantes

7.3.1 Durante a gravidez, quais os eventos hemorrágicos são considerados potencialmente sensibilizantes e qual o período máximo de administração da imunoglobulina?

Os eventos hemorrágicos potencialmente sensibilizantes estão apresentados no quadro 6. A imunoglobulina anti-D Ig deve ser administrada até 72 horas após o quadro hemorrágico. Caso não seja possível respeitar esse período de tempo, a profilaxia deve ser realizada no prazo máximo de 10 dias (QURESHI et al., 2014).

Quadro 6. Eventos hemorrágicos potencialmente sensibilizantes durante a gravidez.

Amniocentese, Biopsia de vilo corial, Cordocentese
Hemorragia Uterina
Versão cefálica externa
Trauma abdominal
Gravidez ectópica
Evacuação de gravidez molar
Morte intra-uterina
Intervenções terapêuticas <i>In-Utero</i>
Aborto, Ameaça de aborto
Término da gravidez por intervenção terapêutica
Parto normal, cesárea ou instrumental

Fonte. Adaptado de Qureshi et al., 2014

7.3.2 Quais as estratégias terapêuticas recomendadas após eventos hemorrágicos potencialmente sensibilizantes?

As estratégias terapêuticas estão apresentadas no quadro 7.

Quadro 7. Estratégias terapêuticas recomendadas após eventos hemorrágicos potencialmente sensibilizantes.

PERÍODO DE GESTAÇÃO	DOSAGEM MÍNIMA RECOMENDADA (µg)
*Até 12ª semana	50
Entre 12ª e 20ª semana	50
Após 20ª semana	**100

* No primeiro trimestre de gestação (até 12 semanas) a profilaxia anti-D é indicada nas seguintes situações: gravidez ectópica; evacuação de gravidez molar; término da gravidez por intervenção terapêutica e em casos de sangramento uterino

**Dosagem mínima recomendada para eventos potencialmente sensibilizantes sem agravamento do quadro hemorrágico. A mínima dosagem é recomendada independente se a gestante recebeu a profilaxia de rotina.

Fonte. Adaptado de Qureshi et al., 2014

Após a 20ª semana de gestação após qualquer evento potencialmente sensibilizante, deve ser realizado um teste para quantificar a hemorragia feto materna (Teste de Kleihauer-Betke). Caso o volume de sangue fetal for superior a 4 mL, doses adicionais de imunoglobulina devem ser administradas. O cálculo é calculado na seguinte proporção:

- 25 µg para cada mL de sangue fetal detectado no teste (no caso de administração IM) (BCSH, 2009; QURESHI et al., 2014).
- 20 µg para cada mL de sangue fetal detectado no teste (no caso de administração IV) (BCSH, 2009; QURESHI et al., 2014).

7.3.3 Qual a finalidade do Teste de Kleihauer-Betke?

O teste de Kleihauer-Betke, ou de eluição ácida, é considerado o método quantitativo padrão para detecção da hemorragia feto materna e é baseado na determinação da proporção da hemoglobina fetal (HbF) (KLEIHAUER; BRAU; BETKE, 1957).

7.3.4 Quando o teste deve ser indicado? E como deve ser determinado o volume de sangue fetal?

O teste de Kleihauer-Betke é indicado após a 20ª semana de gestação, nos casos de hemorragia fetal de maior volume e após o parto de mulheres RhD negativas não sensibilizadas pelo antígeno D (BRIZOT et al., 2011). O cálculo do volume de sangue fetal total após um quadro hemorrágico deve ser feito segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Células fetais} \times \text{volume de sangue materno (mL)} / \text{total de células contadas} = \text{volume de sangue fetal total (mL)}$$

Para a realização do cálculo, as células fetais e maternas devem ser contadas separadamente totalizando 2000 células (KENNEDY, 2008).

Referências

BAIOCHI, E.; NARDOZZA, L. M. M. Aloimunização. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 6, p. 311-316, 2009.

BARROS, C.; OTTA, M.; WAKIM, V. L.; ZAQUERONI, M.; JUNIOR BALEOTTI, W.; CASTILHO, L. Avaliação de reagentes anti-D na detecção dos antígenos D fraco e D parcial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 4, p. 269-274, 2006.

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

BCSH. British Committee for Standards in Haematology, Transfusion Taskforce. **Guidelines for the estimation of fetomaternal hemorrhage**. 2009.

Disponível em <http://www.bcsguidelines.com/documents/BCSH_FMH_bcs_sept2009.pdf>

Acesso em: 18 abr 2016.

BRASIL. Portaria nº 2712 de 12 de novembro de 2013. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 221, 13 nov. 2013. Seção 1, p. 106.

BRIZOT M. L.; NISHIE E. N.; LIAO, A. W.; ZUGAIB, M.; SIMÕES, R. **Aloimunização Rh na Gestação. Projeto Diretrizes**. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 2011.

Disponível em

<http://www.projetodiretrizes.org.br/diretrizes10/aloimunizacao_rh_na_gestacao.pdf>

Acesso em: 18 fev 2016.

COOLING, L. ABO, H, and Lewis Blood Groups and Structurally Related Antigens. In: ROBACK, J. D. G. B. J. H. T. H. C. D. **Technical Manual: AABB**. 16. ed. Bethesda: Bethesda, 2008. Cap. 12, p. 361-372.

DANIELS, G. Other blood groups. In: ROBACK, J. D. G. B. J. H. T. H. C. D. **Technical Manual: AABB**. 16. ed. Bethesda: Bethesda, 2008. Cap. 14, p. 411-436.

DA SILVA, P. H.; ALVES, H. B.; COMAR, S. R.; HENNEBERG, R.; MERLIN, J. C.; STINGHEN, S. T. **Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos**. ARTMED Porto Alegre, 2016.

DINIZ, E. M. A.; ALBIERO, A. L.; CECCON, M. E. J.; VAZ, F. A. C. V. Uso de sangue, hemocomponentes e hemoderivados no recém nascido. **J. Pediatr.**, v. 77, n. 1, p. 104-112, 2001.

DOWNES, K. A.; SHUMAN, I. A.; ROBACK, J. D.; COMBS, M. R. Technical manual, 2008.

FRANKLIN, I. M. Prevention of rhesus haemolytic disease of the fetus and newborn. **The Lancet**, v. 373, n. 9669, p. 1082, 2009.

FUNG, K.; EASON, E.; CRANE, J.; ARMSON, A.; DE LA RONDE, S.; FARINE, D. et al. Maternal-Fetal Medicine Committee, Genetics Committee. Prevention of Rh alloimmunization. **J. Obstet. Gynaecol. Can.**, v. 25, p. 765-773, 2003.

GIRELLO, A. N.; KUNH, T. I. B. B. **Fundamentos da Imuno-Hematologia Eritrocitária**. 2 ed. Editora Senac. São Paulo, 2007.

GIRELLO, A. L. ; KÜHN, T. I. B. B. **Fundamentos da Imuno-hematologia Eritrocitária**. 3 ed. Editora Senac São Paulo, 2011.

GOOCH, A.; PARKER, J.; WRAY, J.; QURESHI, H. British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. **Transfusion Medicine**, v. 17, p. 252-262, 2007.

HAAS, M.; THURIK, F. F.; KOELEWIJN, J. M.; VAN DER SCHOOT, C. E. Haemolytic disease of the fetus and newborn. **Vox. Sanguinis**, v. 109, p. 99-113, 2015.

HUCHET, J; DALLEMAGNE, S; HUCHET, C; BROSSARD, Y; LARSEN, M; PARNET-MATHIEU, F. Ante-partum administration of preventive treatment of Rh-D immunization in rhesus-negative women. Parallel evaluation of transplacental passage of fetal blood cells. Results of a multicenter study carried out in the Paris region. **Journal de Gynecologié Obstetrique et Biologie de la Reproduction**, v. 16, n.1, p.101-111, 1987.

IWAMOTO, A.; NAKAMURA, M.; NAKAMURA, K. E. A. A case of Diego(b) incompatible newborn noticed by anemia (abstract). **J. Jpn. Soc. Premature Newborn Med.** , v. 12, p. 520, 2000.

KENNEDY, M. S. Perinatal Issues in Transfusion Practice. In: ROBACK, J. D. G. B. J. H. T. H. C. D. **Technical Manual:AABB**. 16. ed. Bethesda: Bethesda, 2008. Cap. 22, p. 625-636.

KOELEWIJN, J. M. et al. One single dose of 200 µg of antenatal RhIG halves the risk of anti-D immunization and hemolytic disease of the fetus and newborn in the next pregnancy. **Transfusion**, v. 48, n. 8, p. 1721-1729, 2008.

KUMPEL, B. M. On the mechanism of tolerance to the RhD antigen mediated by passive anti-D (RhD prophylaxis).**Immunology Letters**, v. 82, p. 67-73, 2002.

KLEIHAUER, E.; BRAUN, H.; BETKE, K. Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear (in German).**Klin Wochenschr**, v. 35, p. 367-368, 1957.

LEGER, R. M. The positive Direct Antiglobulin Human Test and Immune-Mediated Hemolysis. In: ROBACK, J. D. G. B. J. H. T. H. C. D. **Technical Manual:AABB**. 16. ed. Bethesda: Bethesda, 2008. Cap. 17, p. 499-519.

MARTINS, P. R. J. ALVES, V. M.; PEREIRA, G. A.; MORAES-SOUZA, H. Frequência de anticorpos irregulares em politransfundidos no Hemocentro Regional de Uberaba-MG, de 1997 a 2005. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 4, p. 272-276, 2008.

MOISE, K. J. Managment of Rhesus Alloimmunization in Pregnancy.**Obstet. Gynecol.**, v. 100, p. 600-611, 2002.

MOLLISON, P. L.; ENGELFRIET, C. P.; CONTRERAS, M. Hemolytic disease of the fetus and the newborn. In: Mollison, P. L.; Engelfriet, C. P.; CONTRERAS, M. **Blood Transfusion in Clinical Medicine**. 11 ed. Oxford: Blacwell Science, p. 496-545, 2005.

NOVARETTI, M. C. Investigação laboratorial em pacientes com anticorpos eritrocitários. In: BORDIN, J. O.; LANGHI JUNIOR, D.M.; COVAS, D. T. **Hemoterapia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2007, p. 186-189.

OEPKES, D.; VAN SCHELTEMA P, A. Intrauterine fetal transfusions in the management of fetal anemia and fetal thrombocytopenia. **Semin. Fetal Neonatal Med.**, v. 12, p. 432-438, 2007.

PACHECO, C. A. M. S. **Doença Hemolítica Perinatal RhD: Um problema de saúde pública no Brasil**. 2013. 95 f. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e da Mulher) - Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2013.

QUERESHI, H. et al. The use of anti-D immunoglobulin for the prevention of haemolytic disease of the fetus and the newborn. **Transfusion**, v. 24, p. 8-20, 2014.

ROBERTS, I. A. G. The changing face of haemolytic disease of the newborn. **Early Human Development**, v. 84, p. 515-523, 2008.

ROBITAILLE, N.; NUYT, A. M.; PANAGOPOULOS, A.; HUME, H. A. Exchange Transfusion in the Infant. In: HILLYER, C. D.; STRAUSS, R. G.; LUBAN, N. L. C. **Handbook of Pediatric Transfusion Medicine**. Academic press. 2004. Cap. 15, p. 157-163.

SILVA, F. P. **A abordagem clínica e hemoterápica da Doença Hemolítica do Recém Nascido -Rh**. 2011.

Disponível em:

<http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/revista_virtual/hematologia/artigoferdinando.pdf>. Acesso em: 18 abr 2016.

SIMISTER, N. E. Placental transport of immunoglobulin. **G. Vaccine**, v. 21, p. 3365-3369, 2003.

VICENTE, L. F.; SERRANO, G. P. F.; SOARES, C.; ALEGRIA, A. M. Profilaxia da isoimunização RhD: uma proposta de protocolo. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, p. 255-260, 2003.

WHESTOFF, C. M. The Rh System. In: ROBACK, J. D. G. B. J. H. T. H. C. D. **Technical Manual:AABB**. 16. ed. Bethesda: Bethesda, 2008. Cap. 13, p. 391-404.