



ATUALIZAÇÃO

## DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL: ASPECTOS ATUAIS<sup>1</sup>

### *PERINATAL HEMOLYTIC DISEASE: CURRENT ASPECTS*

Isabela Nelly MACHADO<sup>2</sup>  
Ricardo BARINI<sup>2</sup>

#### RESUMO

Após a introdução e o amplo uso da imunoprofilaxia anti-D, houve um evidente decréscimo na incidência da aloimunização das mulheres de risco nos países desenvolvidos. Entretanto, a taxa de incidência tem se mantido constante nos últimos anos, contribuindo de forma significativa para a morbimortalidade perinatal e configurando-se ainda como um desafio para a medicina materno-fetal. A doença hemolítica perinatal é caracterizada por anemia fetal de diferentes graus com seqüelas neuropsicomotoras, hidropisia e óbito fetal. Nenhum método propedêutico pré-natal isolado foi altamente indicativo de prognóstico perinatal das gestações complicadas por doença hemolítica perinatal. A transfusão intra-uterina é o único tratamento específico disponível atualmente para a doença hemolítica perinatal durante o período pré-natal. A mortalidade perinatal é de cerca de 16% para os fetos não hidróticos e 58% para os hidróticos. A tipagem RhD fetal permite a identificação de "fetos de risco" para a doença hemolítica perinatal, e pode ser realizada atualmente no nível molecular. Este artigo faz uma revisão de alguns aspectos da doença hemolítica perinatal, com um breve histórico, fisiopatologia, quadro clínico, aspectos diagnósticos e terapêuticos e atuais avanços, com ênfase na utilização de técnicas da biologia molecular.

**Termos de indexação:** anemia hemolítica congênita; diagnóstico pré-natal; eritroblastose fetal; isoimunização Rh.

<sup>1</sup> Artigo elaborado a partir da dissertação de I.N. MACHADO, intitulada "Genotipagem RHD fetal através da análise do plasma materno". Pós-Graduação em Tocoginecologia, Departamento de Tocoginecologia, Universidade Estadual de Campinas; 2004.

<sup>2</sup> Programa de Medicina Fetal, Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Rua Alexander Fleming, 101, Cidade Universitária, 13083-970, Campinas, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: I.N. MACHADO. E-mail: <imachado@fcm.unicamp.br>.

## ABSTRACT

*Following the introduction and broad availability of anti-D immunoprophylaxis, there was an evident decline in the alloimmunization incidence of the women at risk in developed countries. However, the incidence rates have remained relatively stable over the last years, contributing in a significant manner for perinatal morbidity and mortality and remaining a challenge for fetomaternal medicine. The hemolytic disease of the fetus and the newborn is characterized by different degrees of fetal anemia, with neurological and psychomotor sequelae, hydrops fetalis and fetal death. None of the available prenatal diagnostic methods are strong indicators of perinatal prognoses for pregnancies complicated by perinatal hemolytic disease. Intrauterine transfusion is the only specific treatment available in the prenatal period. Mortality rate is about 16% for non-hydropic fetuses and 58% for hydropic ones. The fetal RhD typing can identify fetuses at risk for hemolytic disease of the fetus and the newborn, and can actually be obtained at the molecular level. This article proposes a review of some aspects of the hemolytic disease of the fetus and the newborn, as a brief history, pathophysiology, diagnostic and therapeutic approaches and actual advances, focused on molecular biology tests.*

**Indexing terms:** anemia, congenital haemolytic; prenatal diagnosis; erythroblastosis, fetal; Rh alloimmunization.

## INTRODUÇÃO

A passagem transplacentária de anticorpos contra as células sangüíneas do feto pode causar destruição (hemólise) prematura dessas células, levando à anemia fetal. Essa condição é chamada de doença hemolítica perinatal (*Hemolytic Disease of the Fetus and the Newborn* - DHPN). Das formas clínicas de hemólise mediada por anticorpos IgG, a DHPN é a mais complexa porque envolve a produção de anticorpos em um indivíduo e destruição celular em outro.

A primeira descrição de que se tem registro da DHPN é de 1609, quando uma mulher francesa deu à luz um gemelar hidrópico natimorto e outro gemelar com icterícia grave. Diamond et al.<sup>1</sup>, em 1932, demonstraram que a anemia congênita, hidropisia fetal e icterícia faziam parte de uma mesma doença, na qual a hemólise fetal estimulava a eritropoiese, levando a um aumento na concentração de eritroblastos na corrente sangüínea (eritroblastose). Essa doença, devido à presença de hematopoiese extracelular e eritroblastenemia, ficou conhecida por muito tempo como eritroblastose fetal. A descoberta da causa da hemólise teve que esperar a descoberta do sistema de grupo sangüíneo Rh em 1939.

Após a introdução e o amplo uso da imunoprofilaxia anti-D, e da diminuição do tamanho das famílias<sup>2</sup>, houve um evidente decréscimo na incidência da DHPN<sup>3</sup>. A utilização da imunoprofilaxia pré-natal na 28ª semana de gestação e no período pós-natal tem reduzido a aloimunização em até 96% das mulheres de risco nos países desenvolvidos<sup>4</sup>. Após esse rápido e significativo decréscimo, a taxa de incidência tem se mantido constante nos últimos anos devido a vários fatores: falha da administração da imunoprofilaxia (ausente, insuficiente ou inoportuna), falha no reconhecimento das situações clínicas de hemorragia materno-fetal, transfusão sangüínea incompatível e sensibilização espontânea. Outra consequência do amplo uso da imunoprofilaxia anti-D foi um crescimento relativo da freqüência de aloimunização por outros antígenos<sup>5</sup>. Contudo, o antígeno RhD continua sendo o antígeno mais freqüente. A incidência atual da DHPN nos países desenvolvidos é de aproximadamente 1 a 6/1000 nascidos vivos<sup>6</sup>.

## Fisiopatologia e quadro clínico

O principal antígeno eritrocitário responsável pela DHPN é o antígeno D do sistema Rh, devido a

sua alta prevalência (85% da população branca) e alta imunogenicidade<sup>7-9</sup>. Por essa razão, embora existam 48 antígenos Rh, o antígeno D é o mais relevante clinicamente, sendo o indivíduo classificado como "Rh-positivo" ou "Rh-negativo" de acordo com a presença ou ausência do antígeno RhD, sem levar em consideração os demais antígenos. O antígeno RhD contribui com cerca de 60% dos casos de DHPN em fetos assintomáticos e 90% dos casos de anemia fetal grave<sup>10</sup>.

A sensibilização ao antígeno D ocorre quando uma gestante RhD-negativo é exposta a sangue RhD-positivo, deflagrando uma resposta imune materna contra o antígeno D. Basicamente, a sensibilização acontece no parto e puerpério, podendo também acontecer durante a gravidez, abortamento, gravidez ectópica e transfusões incompatíveis. Como a circulação fetal está bem estabelecida com quatro semanas de gestação e o antígeno RhD foi demonstrado em células fetais já na sexta semana (30-40 dias) após a concepção<sup>9</sup>, a sensibilização RhD pode se instalar, teoricamente, desde o segundo mês de gestação. Os anticorpos anti-D pertencem à classe IgG, portanto são capazes de atravessar a barreira placentária e destruir hemácias RhD-positivo fetais. Essa passagem de anticorpos é um processo ativo que envolve um fragmento da fração cristalizável (Fc) do anticorpo anti-D e o receptor de Fc na placenta. A imunoglobulina humana anti-D consiste principalmente das subclasses IgG1 e IgG3, que se diferenciam na estrutura bioquímica e nas propriedades biológicas. A subclasse IgG1 parece ser mais importante que a IgG3 na patogênese da anemia fetal<sup>10</sup>.

Cerca de 90% dos indivíduos RhD-negativo transfundidos com uma unidade de sangue RhD-positivo irão produzir anticorpos anti-D, enquanto a taxa de sensibilização de uma gestante RhD-negativo é de aproximadamente 17%<sup>11</sup>. Essa diferença se explica pelo fato de que o feto pode ser RhD-negativo no caso de heterozigotidade paterna e porque a quantidade de células sangüíneas fetais que atravessam a placenta é bem menor que aquela de uma transfusão incompatível.

A DHPN é caracterizada por anemia fetal de diferentes graus, hidropisia e óbito fetal. O quadro clínico varia desde uma discreta palidez até grave edema generalizado, com derrames cavitários (pleural, pericárdico e ascítico) que prejudicam a função respiratória do neonato. Pensava-se que a hidropisia fetal era secundária somente à insuficiência cardíaca como resultado de anemia fetal grave e hipervolemia. A hipótese mais recente é de que também a hipertensão venosa portal e umbilical estejam envolvidas na gênese da ascite fetal.

O crescimento extenso de áreas de eritropoiese ectópica no fígado resulta em compressão da circulação hepática e degeneração e distorção do parênquima hepático. Além disso, como resultado da disfunção hepática, desenvolve-se hipoproteïnemia fetal, que, juntamente com a placenta edematosa que tem dificuldade de transferir precursores das proteínas, também contribui para a ascite e o edema generalizado. Fetos do sexo masculino parecem ser mais gravemente afetados, quando comparados com os do sexo feminino<sup>12</sup>.

Os fetos acometidos podem apresentar seqüelas no desenvolvimento neuropsicomotor secundárias ao dano cerebral. Mais recentemente, a incompatibilidade materno-fetal no sistema Rh tem sido relacionada a um aumento no risco de esquizofrenia para o indivíduo em formação<sup>13</sup>. A hipóxia crônica e o acúmulo de bilirrubina indireta, que é uma neurotoxina, poderiam danificar as células da glia e causar esquizofrenia.

### Aspectos diagnósticos

A presença do anticorpo anti-D na circulação materna deve ser verificada na primeira consulta do acompanhamento pré-natal, e repetida pelo menos mais uma vez antes do parto, preferencialmente ao final do segundo trimestre. Se a gestante se mantiver sem o anticorpo anti-D, é desejável que ela receba uma dose da imunoglobulina humana anti-D na 28ª semana de gestação<sup>14</sup>. A imunoglobulina anti-D pode ter alguns raros efeitos adversos. Alguns fetos podem apresentar positividade fraca no teste da antiglobulina

humana (Coombs) direto, sem, entretanto, desenvolverem a DHPN<sup>15</sup>. Apesar de os únicos casos descritos de transmissão de doenças infecciosas relacionada à administração da IgG anti-D datarem da década de 70, esse risco não pode ser considerado zero, já que se trata de um derivado sangüíneo<sup>6</sup>. Uma vez sensibilizada (teste da antiglobulina humana indireto positivo), a gestante é encaminhada a um serviço de referência em medicina fetal, sendo acompanhada com titulações seriadas do anticorpo e amniocentese seriadas, na maioria dos casos.

Atualmente, busca-se o método ideal altamente indicativo de prognóstico perinatal das gestações complicadas por DHPN, ainda não encontrado. A ultra-sonografia tem como primeira evidência de feto acometido o aumento da circunferência abdominal devido à hepatoesplenomegalia. Outros achados são derrames cavitários e edema placentário. Infelizmente, embora facilmente diagnosticados, esses sinais ultra-sonográficos são tardios. Estudos recentes têm mostrado uma alta performance da medida do pico de velocidade sistólica na artéria cerebral média fetal por dopplervelocimetria, na predição da hemoglobinemia fetal<sup>16</sup>. Apesar dos resultados promissores do seguimento das gestantes aloimunizadas com essa avaliação dopplervelocimétrica, a maioria dos serviços especializados ainda utiliza a análise espectral do líquido amniótico como indicador indireto da hemólise fetal.

A determinação direta do hematócrito e da hemoglobina fetal por meio da cordocentese permite a determinação de prognóstico perinatal, além de permitir o tratamento imediato. A cordocentese permite também a determinação do fenótipo RhD fetal. Mas não é considerado o método ideal devido às complicações inerentes aos procedimentos invasivos. As taxas de perda fetal relacionadas à cordocentese têm sido estimadas em 1% a 2% para os fetos não hidróticos e aproximadamente 15% para os hidróticos antes da vigésima semana gestacional e 5% após esse período<sup>9</sup>. Além disso, a punção funicular pode causar hemorragia materno-fetal e agravar a sensibilização<sup>17</sup>.

## Aspectos terapêuticos

Sem tratamento, 25,0% a 30,0% dos fetos terão algum grau de anemia hemolítica e hiperbilirrubinemia, e outros 20,0% a 25,0% desenvolverão hidropisia grave<sup>18</sup>. A transfusão intra-uterina (TIU) é o único tratamento específico para a DHPN durante o período pré-natal disponível atualmente. Dos fetos acometidos, 50,0% vão necessitar de TIU<sup>19</sup>. A taxa de mortalidade após TIU em centros de referência é de 14,0% a 38,0% para fetos hidróticos e ao redor de 10,0% para os não hidróticos<sup>20,21</sup>. Uma mortalidade perinatal de 16,3% para os fetos não hidróticos e 58,3% para os hidróticos em 61 fetos submetidos a TIU foi descrita no nosso meio<sup>22</sup>.

## Desafios atuais

Embora tenha sua etiologia, fisiopatologia, história natural e profilaxia bem estabelecidas, a DHPN ainda contribui de maneira significativa para a morbimortalidade perinatal, mesmo em países desenvolvidos. Sua abordagem terapêutica ainda é predominantemente invasiva, com riscos inerentes de perda fetal e aumento do grau de sensibilização.

Atualmente, o maior problema do seguimento das gestantes RhD-negativo sensibilizadas não recai sobre a decisão de transfundir ou não o feto, mas, sim, sobre como se evitar a abordagem invasiva, já que todos os fetos são considerados "de risco" e recebem a mesma abordagem. Se considerarmos que aproximadamente 55% da população RhD-positivo é heterozigota para o gene RhD<sup>23</sup>, o feto de uma gestante RhD-negativo cujo pai é heterozigoto tem 50% de chance de ser RhD-negativo, e, portanto, não é "de risco" para desenvolver a DHPN e não necessitaria da mesma abordagem invasiva que um feto RhD-positivo.

A tipagem RhD fetal é, portanto, de primordial interesse para a medicina materno-fetal, pois permite a identificação de "fetos de risco" para a DHPN e também a identificação das "gestantes de risco" que podem se aloimunizar para o antígeno RhD, direcionando para esses grupos a intensificação

dos cuidados pré-natais, atualmente empregados a todas as gestantes RhD-negativo. A caracterização do sistema Rh no nível molecular tem permitido a identificação desse grupo de risco. A determinação RhD fetal no nível molecular pode ser feita em tecidos fetais como amniócitos, células trofoblásticas, células fetais e, mais recentemente, DNA fetal livre no plasma materno. Os métodos atuais de genotipagem *RhD* são baseados na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR- Polymerase Chain Reaction) por amplificação de seqüências específicas dos genes *RH* (*RhD* e *RhCE*)<sup>24</sup>.

As tentativas de utilização de amostras de vilo corial e amniócitos mostraram bons resultados, mas mantiveram o caráter invasivo<sup>25</sup>. O isolamento das células fetais mostrou-se tecnicamente sofisticado e demorado, além de ter sido demonstrado que essas células podem permanecer na circulação materna por muitos anos após o parto<sup>26</sup>. O DNA fetal livre no plasma materno parece ser a grande promessa dos métodos diagnósticos genotípicos. Essa notável descoberta abriu novas possibilidades de diagnóstico molecular pré-natal sem os riscos inerentes aos procedimentos invasivos<sup>27</sup>. Além da vantagem de ser um método não invasivo, o DNA fetal livre desaparece rapidamente do plasma materno após o término da gestação<sup>23,28-31</sup>.

A distribuição fenotípica do sistema Rh varia entre os grupos étnicos. Uma determinada técnica de genotipagem pode não ser totalmente aplicável para uma determinada população de origem étnica diferente ou diversificada. Portanto, é necessário que os protocolos de genotipagem sejam individualizados para diferentes populações. Começam a surgir estudos relacionados à padronização de técnicas moleculares de genotipagem *RhD* fetal na nossa população, podendo trazer benefícios imediatos e a longo prazo para nossas gestantes<sup>32</sup>.

## CONCLUSÃO

A DHPN é uma doença conhecida há séculos, que ainda contribui para as taxas de morbidade e

mortalidade perinatal de forma significativa. Ao longo dos anos, as descobertas realizadas em sua fisiopatologia têm permitido avanços na busca de métodos não invasivos para sua propedêutica e terapêutica. Paralelo a isso, sua profilaxia, embora bem conhecida e disponível, ainda apresenta falhas, na maioria das vezes atribuídas à negligência médica. Com a caracterização molecular dos grupos sanguíneos em franco desenvolvimento, novas perspectivas se abrem para a abordagem não invasiva dessa doença. A possibilidade de diagnóstico pré-natal do genótipo RhD fetal traz benefícios claros à população de gestantes RhD-negativo sobremaneira às aloimunizadas. É necessário que novos estudos validem esses métodos diagnósticos a fim de se tornarem disponíveis no nível populacional.

## REFERÊNCIAS

1. Diamond LK, Blackfan KD, Baty JM. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the newborn. *J Pediatr*. 1932; 1:269-309.
2. Adams MM, Marks JS, Gustafson J, Oakley Jr GP. Rh hemolytic disease of the newborn: using incidence observations to evaluate the use of Rh immune globulin. *Am J Public Health*. 1981; 71:1031-5.
3. Urbaniak SJ. Consensus conference on anti-D prophylaxis, April 7 and 8, 1997: final consensus statement. Royal College of Physicians of Edinburgh/Royal College of Obstetrician and Gynecologists. *Transfusion*. 1998; 38:97-9.
4. Trolle B. Prenatal Rh-immune prophylaxis with 300mg immune globulin anti-D in the 28th week of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1989; 68:45-7.
5. Wenk RE, Goldstein P, Felix JK. Kell alloimmunization, hemolytic disease of the newborn and perinatal management. *Obstet Gynecol*. 1985; 66:473-6.
6. Moise Jr KJ. Management of Rhesus Alloimmunization in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2002; 100:600-11.
7. Agre P, Cartron J-P. Molecular biology of the Rh Antigens. *Blood*. 1991; 78:551-63.
8. Howard H, Martlew V, McFadyen I, Martlew W, McFadgen I, Clarke C, et al. Consequences for fetus and neonate of maternal red cell alloimmunisation. *Arch Dis Child*. 1998; 78:62-6.

9. Urbaniak SJ, Greiss MA. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev.* 2000; 14:44-61.
10. Lambin P, Debbia M, Puillandre P, Brossard Y. IgG1 and IgG3 anti-D in maternal serum and on the RBCs of infants suffering from HDN: relationship with the severity of the disease. *Transfusion.* 2002; 42:1537-46.
11. Contreras M. The prevention of Rh haemolytic of the fetus and newborn: general background. *Br J Obstet Gynaecol.* 1998; 105(Suppl 18):7-10.
12. Ulm B, Svolba G, Ulm MR, Bernaschek G, Panzer S. Male fetuses are particularly affected by maternal alloimmunization to D antigen. *Transfusion.* 1999; 39:169-73.
13. Cannon M, Jones PB, Murray RM. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analysis review. *Am J Psychiatry.* 2002; 159:1080-92.
14. ACOG- American College of Obstetricians and Gynecologists. Prevention RhD alloimmunization. ACOG Practice bulletin no. 4. Washington (DC): American College of Obstetrician and Gynecologists; 1999.
15. Bowman JM, Chown B, Lewis M. Rh isoimmunization during pregnancy: antenatal prophylaxis. *Can Med Assoc J.* 1978; 118:623-7.
16. Mari G. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *N Engl J Med.* 2000; 342: 9-14.
17. Sikovanyecz J, Horváth E, Sallay É, Gellén J, Pál A, Szabó J. Fetomaternal transfusion and pregnancy outcome after cordocentesis. *Fetal Diagn Ther.* 2001; 16:83-9.
18. Tannirandorn Y, Rodeck CH. New approaches in the treatment of haemolytic disease of the fetus. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 1990; 3:289-320.
19. Bowman JM. Antenatal suppression of Rh alloimmunization. *Clin Obstet Gynecol.* 1991; 34:296-303.
20. Poissonnier MH, Brossard Y, Demedeiros N, Vassileva J, Parnet F, Larsen M, et al. Two hundred intrauterine exchange transfusions in severe blood incompatibilities. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161:709-13.
21. Schumacher B, Moise Jr KJ. Fetal transfusion for red blood cell alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1996; 88:137-50.
22. Cabral ACV, Taveira MR, Lopes APBM, Pereira AK, Leite HV. Transfusão intra-uterina na isoimunização materna pelo fator Rh. *RBGO.* 2001; 23:299-303.
23. Lo YMD. Fetal RhD genotyping from maternal plasma. *Ann Med.* 1999; 31:308-12.
24. Aubin JT, Le Van Kim C, Mouro I, Colin Y, Bignozzi C, Brossard, et al. Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. *Br J Haematol.* 1997; 98:356-64.
25. Crombach G, Niederacher D, Larbig D, Picard F, Tutschek B, Beckmann M, et al. Reliability and clinical application of fetal RhD genotyping with two different fluorescent duplex polymerase chain reaction assays: Three years' experience. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180:435-40.
26. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad USA.* 1996; 93:705-8.
27. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997; 350:485-7.
28. Faas BHW, Beuling EA, Christiaens GCML, von dem Borne AEGKr, van der Schoot CE. Detection of fetal RHD-specific sequence in maternal plasma. *Lancet.* 1998; 352:1196.
29. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998; 62:768-75.
30. Nelson M, Eagle C, Langshaw M, Popp H, Kronenberg H. Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma. *Vox Sang.* 2001; 80:112-6.
31. Benachi A, Steffann J, Gautier E, Ernault P, Olivi M, Dumez Y, et al. Fetal DNA in maternal serum: does it persist after pregnancy? *Hum Genet.* 2003; 113:76-9.
32. Machado IN, Rios M, Pellegrino Jr J, Barini R, Castilho L. Fetal RHD genotyping by analysis of maternal plasma at early gestational ages. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2003; 25(Suppl 2):223.

Recebido em: 10/12/2004  
Versão final reapresentada em: 26/4/2005  
Aprovado em: 27/3/2006