

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós Graduação em Genética

Universidade Federal de Minas Gerais

Genotipagem *RHD* fetal no plasma materno como ferramenta não invasiva na predição do risco da doença hemolítica perinatal em gestantes RhD negativo

Luciana Cayres Schmidt

Orientador: Eduardo Martin Tarazona-Santos

Novembro de 2010

Luciana Cayres Schmidt

GENOTIPAGEM *RHD* FETAL NO PLASMA MATERNO COMO
FERRAMENTA NÃO INVASIVA NA PREDIÇÃO DO RISCO DA DOENÇA
HEMOLÍTICA PERINATAL EM GESTANTES *RHD* NEGATIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito básico para obtenção do grau de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Martín Tarazona Santos

Co-orientadora: Dr^a Marina Martins Lobato
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

Departamento de Biologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

2010

Agradecimentos

À Deus, o autor da vida, que me deu os pés como os da corça e me fez andar em lugares altos...

À Marina Lobato Martins meus sinceros agradecimentos pelo tempo disponibilizado para minha orientação, pela paciência, pelo exemplo, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelo total apoio e pelas inúmeras contribuições para o meu crescimento e aprendizado.

Ao orientador Eduardo Martín Tarazona, pelo apoio.

À Marina Alves, pelo empenho e pela dedicação irrestrita ao trabalho.

À Maria Clara Fernandes da Silva Malta, pelo incentivo, exemplo, apoio e pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Frederico Monken e à equipe do Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas, por me auxiliarem na captação de gestantes para o projeto.

Ao professor Antônio Carlos Vieira Cabral, pelas orientações, ensinamentos e apoio.

À equipe do Laboratório de Imuno-hematologia e do Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas, pelo apoio e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação Hemominas, pelo incentivo e apoio.

Ao programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas / UFMG, pela oportunidade.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Aos meus filhos e ao meu esposo, pelo apoio e incentivo.

Sumário

Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas	ix
Abstract	3
Introdução	4
1. Revisão bibliográfica	4
1.1 A doença hemolítica perinatal.....	4
1.2 Fisiopatologia da DHPN e intervenções clínicas	5
1.3 Doença Hemolítica Perinatal causada por Anti-D	6
1.4 Administração de anti-D profilático	7
1.5 O gene RHD	8
1.6 A proteína RhD	9
1.7 Bases moleculares do fenótipo RhD negativo	13
1.8 Genotipagem RHD fetal	14
1.9 Genotipagem RHD fetal não invasiva	15
1.9.1 Obtenção e processamento do plasma materno	16
1.9.2 Purificação de DNA fetal	17
1.9.3 PCR em tempo real na genotipagem RHD fetal	18
1.10 Controles e marcadores da genotipagem RHD fetal.....	23
1.11 Acurácia, sensibilidade e especificidade da genotipagem RHD fetal.....	24
1.12 Teste da zigozidade RHD paterna	26
2. Relevância e Justificativa	28
3. Objetivos	30
3.1 Objetivos gerais	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4. Material e Métodos	31
4.1 População de estudo	32
4.2 Cálculo amostral do número de gestantes RhD negativo	33
4.3 Fenotipagem RhD materna e paterna	34
4.4 Preparação das amostras	35
4.5 Purificação do DNA fetal a partir do plasma materno	35
4.5.1 Purificação do DNA fetal usando o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) ...	35

4.5.2 Purificação do DNA fetal usando o kit Nucleo Spin Plasma XS (Marchery Nagel)	36
4.6 Purificação do DNA materno e paterno	36
4.7 PCR em tempo real para o gene da albumina humana	37
4.8 PCR em tempo real para o gene RHD	37
4.9 Critérios de interpretação da genotipagem RHD fetal	38
4.10 Avaliação do limite mínimo de detecção da PCR para o gene RHD	42
4.11 PCR em tempo real para detecção do gene SRY	45
4.12 Avaliação do limite mínimo de detecção do gene SRY na PCR em tempo real	46
4.13 PCR para determinação da zigosidade RHD em amostras paternas	48
4.14 PCR multiplex para genotipagem RHD de amostras maternas e paternas	48
4.15 – Análise da performance da PCR em tempo real para a genotipagem RHD fetal e para a detecção do gene SRY	50
5 Resultados	51
5.1 Características gerais da população de estudo	51
5.2 Resultados da PCR em tempo real para o gene RHD e comparação com o fenótipo RhD dos recém-nascidos	52
5.3 Resultados das PCR convencional multiplex para o gene RHD em amostras materna e paterna (se disponível) realizadas para os casos inconclusivos na genotipagem RHD fetal	60
5.4 Resultados da PCR em tempo real para o gene SRY e comparação com o sexo dos recém-nascidos	63
5.5 Resultados dos testes para avaliar a zigosidade RHD paterna e comparação com o fenótipo do recém-nascido	67
5.6 Custo da genotipagem RHD fetal não invasiva	68
6 Discussão	70
7 Conclusão	79
8 Referências bibliográficas	80

Lista de figuras

Figura 1 - Aloimunização materna por anti-D.	6
Figura 2 - Genes <i>RHD</i> e <i>RHCE</i>	8
Figura 3 - As proteínas RhD, RhCE e RhAg.	9
Figura 4 - Polimorfismos na proteína RhD, resultando no fenótipo D fraco ou D parcial.	11
Figura 5 - Representação da organização genômica característica de um fenótipo D positivo e de três fenótipos D negativo.	13
Figura 6 - Fases da PCR.	19
Figura 7- Resultado gráfico de uma PCR em tempo real.	20
Figura 8 – PCR em tempo real usando sonda TaqMan®.	21
Figura 9 - Formação da <i>Rhesus</i> Box híbrida.	27
Figura 10 - Fluxograma geral da metodologia do estudo	31
Figura 11 - Fluxograma dos testes realizados nas amostras materna e paterna.	32
Figura 12 – Figura representativa de uma fenotipagem RhD em cartela gel teste.	34
Figura 13- Critérios de interpretação dos resultados da genotipagem <i>RHD</i> fetal.	42
Figura 14 - Avaliação do limite mínimo de detecção do gene <i>RHD</i> na PCR em tempo real.	43
Figura 15 – Curva padrão obtida na avaliação do limite mínimo de detecção do gene <i>RHD</i> (exon 5) na PCR em tempo real.	44
Figura 16 – Curva padrão obtida na avaliação do limite mínimo de detecção do gene <i>RHD</i> (exon 7) na PCR em tempo real.	45
Figura 17- Avaliação do limite mínimo de detecção do gene <i>SRY</i> na PCR em tempo real.	46
Figura 18 – Curva padrão obtida na avaliação do limite mínimo de detecção do gene <i>SRY</i> na PCR em tempo real.	47

Figura 19 – Frequência de aloanticorpos produzidos por gestantes RhD negativo aloimunizadas.	51
Figura 20 – Frequência de aloanticorpos produzidos por gestantes RhD negativo com histórico de aborto.	52
Figura 21- PCR em tempo real para o gene <i>RHD</i>.	53
Figura 22- PCR em tempo real para o gene da albumina humana.	54
Figura 23 – Genotipagem <i>RHD</i> materna e paterna por PCR convencional.	60
Figura 24– Proposta de protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo utilizando a genotipagem <i>RHD</i> fetal como ferramenta diagnóstica.	78

Lista de tabelas

Tabela 1 – Tipos de reagentes anti-D monoclonais disponíveis no mercado e sua reatividade com algumas categorias de D parcial.....	12
Tabela 2 – Reagentes anti-D licenciados pelo FDA e sua reatividade com algumas hemácias D parcial e Rhce que resultam em discrepâncias na fenotipagem RhD	12
Tabela 3 - Exons do gene <i>RHD</i> analisados nas reações de PCR em tempo real para genotipagem <i>RHD</i> fetal.	22
Tabela 4 - Comparação da acurácia (concordância entre a genotipagem <i>RHD</i> fetal no plasma materno com o fenótipo RhD do recém-nascido), número de amostras testadas e exons do gene <i>RHD</i> analisados entre alguns estudos de 2002 a 2009.	25
Tabela 5 - Iniciadores e sondas para PCR em tempo real para detectar o gene <i>RHD</i> . .	38
Tabela 6 – Alelos <i>RHD</i> variantes com mutações localizadas em regiões de anelamento dos iniciadores (EX5F: 636-654; EX5R: 697-717) e sonda (EX5P: 656-681) usados na amplificação do exon 5 do gene <i>RHD</i>	39
Tabela 7 - Alelos <i>RHD</i> variantes com mutações localizadas em regiões de anelamento dos iniciadores (EX7F: 972-992, EX7R: 1025-1046) e sonda (EX7P: 997-1023) usados na amplificação do exon 7 do gene <i>RHD</i>	41
Tabela 8 - Avaliação do limite mínimo de detecção do gene <i>RHD</i> na PCR em tempo real.....	44
Tabela 9 - Avaliação do limite mínimo de detecção do gene <i>SRY</i> na PCR em tempo real.....	47
Tabela 10 - Iniciadores usados na PCR multiplex para detectar os exons 3, 4, 5, 7 e 9 do gene <i>RHD</i>	49
Tabela 11 – Resultados da PCR <i>RHD</i> fetal e comparação com o fenótipo RhD dos recém-nascidos.	55
Tabela 12 – Resultados da genotipagem <i>RHD</i> fetal utilizando PCR em tempo real e comparação com o fenótipo do recém-nascido.	58

Tabela 13 - Cálculo da sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da genotipagem <i>RHD</i> fetal em relação ao fenótipo do recém-nascido.....	59
Tabela 14- Resultado das genotipagens <i>RHD</i> materna e paterna (quando disponível) realizadas nos casos inconclusivos de genotipagem <i>RHD</i> fetal.....	61
Tabela 15 – Localização dos iniciadores dos exons 5 e 7 na PCR convencional e em tempo real para o gene <i>RHD</i> , incluindo a sonda.	62
Tabela 16 - Resultados da PCR <i>SRY</i> fetal e comparação com o sexo dos recém-nascidos.....	63
Tabela 17 - Sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da genotipagem <i>SRY</i> fetal.	66
Tabela 18 – Resultado da zigozidade <i>RHD</i> paterna e comparação com o fenótipo RhD do recém-nascido.....	67
Tabela 19 – Custo da genotipagem <i>RHD</i> fetal não invasiva (dados de março de 2009).	68

Lista de abreviaturas

AGH: Antiglobulina humana

Ct: Threshold Cycle (Ciclo limiar)

DHPN: Doença Hemolítica Perinatal

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

Fig.:Figura

Ig: imunoglobulina

kDa:Kilo Daltons

Min.:Minuto

mRNA: RNA mensageiro

pb : Pares de base

PCR: Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

Seg.:Segundos

SNP: *single-nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídio único)

Resumo

O acompanhamento a gestantes RhD negativo é baseado na premissa de que seus fetos podem estar em risco de desenvolver a doença hemolítica perinatal (DHPN), o que pode trazer sérios riscos ao feto. Procedimentos invasivos como amniocentese ou cordocentese podem ser utilizados para se conhecer o fenótipo RhD fetal, entretanto, oferecem riscos ao feto e à gestante. A possibilidade de se detectar o gene *RHD* no DNA fetal extraído do plasma materno possibilitou um grande avanço no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo por ser um procedimento não invasivo e que, portanto, não acarreta qualquer risco à mãe ou ao feto.

Material e métodos: 55 amostras de sangue de gestantes RhD negativo foram processadas para purificação do DNA fetal. PCR em tempo real foi realizada para amplificar segmentos dos exons 5 e 7 do gene *RHD*. Os resultados da genotipagem fetal no plasma materno foram comparados com a fenotipagem RhD dos recém-nascidos, realizada em amostras de sangue umbilical colhida ao nascimento. Também foram realizadas PCR para detecção do gene *SRY* e para estudo da zigozidade *RHD* paterna, quando a amostra paterna estava disponível.

Resultados: Os resultados da genotipagem *RHD* fetal puderam ser comparados com 43 fenótipos RhD dos recém-nascidos. Houve cinco resultados inconclusivos, nenhum falso negativo e um falso positivo, devido a uma provável fenotipagem RhD incorreta. A sensibilidade do teste foi de 100%, a especificidade foi de 94,1% e a concordância dos resultados moleculares com os sorológicos foi de 97,7%, se considerarmos que o único resultado sorológico discordante estava correto. Entretanto, este não parece ser o caso, uma vez que a genotipagem usando DNA fetal extraído de plasma materno foi concordante com a genotipagem *RHD* a partir de células da mucosa bucal do recém-nascido.

Conclusão: O teste para a genotipagem *RHD* fetal não invasiva mostrou-se sensível e viável como ferramenta auxiliar na rotina de atendimento a gestantes RhD negativo.

Abstract

The management of RhD negative pregnant women is based on the premise that their fetuses may be at risk of developing hemolytic disease (DHPN), which could bring serious risks to the fetus. Invasive procedures such as amniocentesis or cordocentesis can be used to define the fetal RhD phenotype, however, it offers risks to both fetus and pregnant woman. The ability to detect fetal *RHD* gene in DNA from maternal plasma allowed a major advance in the care protocol to RhD negative pregnant women for being a non-invasive procedure and therefore carries no risk to the mother or fetus.

Methods: 55 blood samples from RhD negative pregnant women were processed for extraction of fetal DNA. Real time PCR was performed to amplify segments of exons 5 and 7 of *RHD* gene. The results of fetal genotyping using maternal plasma were compared with the RhD phenotype of newborns, performed in cord blood sample obtained at birth. PCR for detection of *SRY* gene and for the study of *RHD* zygosity was also performed, when the paternal sample was available.

Results: The results of fetal *RHD* genotyping could be compared with 43 RhD phenotypes of newborn. There were five inconclusive results, no false negative and one false positive due to a probable incorrect RhD phenotyping. The test sensitivity was 100%, specificity was 94,1% and concordance between molecular and serological tests was 97,7% if we consider that the only discordant serological result was correct. However, in this case, genotyping from maternal plasma was concordant to that determined from the newborn buccal cells.

Conclusion: The test for noninvasive fetal *RHD* genotyping was a sensitive and viable tool in management of RhD negative pregnant women.

Introdução

1. Revisão bibliográfica

1.1 A doença hemolítica perinatal

A doença hemolítica perinatal (DHPN) é caracterizada pela destruição de hemácias fetais por anticorpos IgG de origem materna (HARMENING, 2005) e é uma das causas da inclusão de gestantes RhD negativo em programas de acompanhamento a gestantes de alto risco em ambulatórios obstétricos. A destruição de hemácias fetais pode provocar desde um quadro de discreta anemia à eritoblastose, hidropsia, falência cardíaca e morte fetal. A gravidade da doença vai depender do número de glóbulos destruídos, da capacidade do feto em compensar a destruição acelerada das hemácias e ainda do seu diagnóstico precoce, permitindo um tratamento eficaz e evitando sequelas trágicas e desnecessárias (MOLLISON et al., 1997).

Mais de 50% das DHPN são causadas pelo antígeno D, um dos 50 antígenos do sistema de grupo sanguíneo Rh (CORREA et al., 2004). Em caucasianos, cerca de 10% de todas as gestações envolve uma mulher RhD negativo e um feto RhD positivo, colocando a mãe em risco de sensibilização e os futuros conceptos em risco de desenvolver DHPN. Cerca de 5% das DHPN resultam em morte fetal ou neonatal e outros 5% resultam em moderados a graves problemas de desenvolvimento fetal (FINNING et al., 2008).

Historicamente, a DHPN foi uma significativa causa de morte fetal ou do recém-nascido, e antes de qualquer intervenção médica as mortes neonatais por DHPN estavam entre 4 a 5 por 1.000 recém-nascidos. Em 1968, com a introdução da imunoprofilaxia RhD houve uma significativa queda na incidência de DHPN (BOWMAN, 1997). Entretanto, apesar de todos os avanços no acompanhamento de gestantes RhD negativo, a DHPN ainda não foi erradicada. No Brasil, no período de 2005, o número de mortes fetais ou de recém-nascidos por anemias, causadas por fatores maternos, foi de 12.351. Só na região sudeste o número foi de 4.717 e na região nordeste foi de 3.993. Juntas, as regiões sudeste e nordeste são responsáveis por mais de 50% do número total de afetados no Brasil (DATASUS). Em 2006, a incidência de DHPN por nascidos vivos foi de 10,5:21.000, enquanto na Europa a taxa era de 1:21.000 nascidos vivos (DANIELS et al., 2004).

1.2 Fisiopatologia da DHPN e intervenções clínicas

A ligação de anticorpos da classe IgG a hemácias fetais pode levar à destruição acelerada dessas células. Em casos de DHPN provocada pelo antígeno de grupo sanguíneo RhD, há uma estimulação da eritropoese para compensar a rápida destruição eritrocitária, levando à produção de eritrócitos nucleados imaturos, os eritroblastos, constituindo o quadro conhecido por “eritroblastose fetal”. Entretanto, em casos de DHPN provocados pelo antígeno “K”, do grupo sanguíneo Kell, há supressão da eritropoese, que somada à destruição de eritrócitos da circulação fetal, pode levar à anemia intensa (VAUGHN et al., 1998).

Em fetos severamente afetados, em que a produção de células hematopoiéticas pela medula óssea fetal é insuficiente para compensar a anemia, órgãos como o baço e o fígado são estimulados à produção de células hematopoiéticas, sobrecarregando-os e levando a um quadro de hepatoesplenomegalia, hipertensão portal e destruição de hepatócitos. Isso pode resultar em hipoproteinemia, insuficiência cardíaca e hepática, além de edema generalizado, quadro conhecido por “hidropsia fetal” (GOODSTEIN, 2008). Fetos menos afetados continuam sofrendo hemólise com a conseqüente liberação de bilirrubina indireta na corrente sanguínea, que antes do nascimento é conjugada à albumina no fígado materno sendo eliminada da circulação fetal sem maiores danos. Entretanto, ao nascimento, pela dificuldade de metabolizar a alta concentração de bilirrubina liberada pelo rompimento eritrocitário, o recém-nascido pode apresentar altas concentrações de bilirrubina sérica, 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*” (MOLLISON et al., 1997).

Como forma de tratamento pré-natal poderá ser realizada a troca de plasma materno, com o objetivo de diminuir a concentração do anticorpo em mulheres sensibilizadas ou a transfusão intra-uterina, a fim de minimizar os riscos ao feto. Entretanto, pelo fato de transfusões intra-uterinas estarem associadas a um risco de 1 a 2% de perda perinatal, elas devem ser realizadas somente após criteriosa avaliação médica (WEINER & OKAMURA, 2006).

Após o nascimento, se o recém-nascido apresentar um grau de hemólise elevado, poderá ser realizada a ex-sanguíneo transfusão, com o principal objetivo de remover da circulação do recém-nascido hemácias sensibilizadas com anticorpos, anticorpos maternos e a bilirrubina presente em altas concentrações (igual ou maior a 340 $\mu\text{mol/L}$), além de promover o aporte de hemácias ao recém-nascido, corrigindo a anemia (MOLLISON et al., 1997).

1.3 Doença Hemolítica Perinatal causada por Anti-D

O antígeno D, do sistema de grupo sanguíneo Rh, é responsável por cerca de 50% dos casos de aloimunização materna. Segundo Daniels (2004), a despeito do uso da imunoprofilaxia anti-D, a aloimunização RhD ainda é a maior causa de doença hemolítica severa em fetos e neonatos (DANIELS et al., 2004).

Normalmente, a DHPN não ocorre na primeira gestação de uma mulher RhD negativo portando um feto RhD positivo, caso a mãe ainda não tenha sido aloimunizada. Entretanto, durante a gestação e particularmente ao nascimento, quando a placenta se separa do útero, um número variável de hemácias fetais entra na circulação materna. Por ser altamente imunogênico, apenas 1 mL de hemácias fetais contendo o antígeno D é capaz de imunizar a mãe. Segundo Harmenig e colaboradores (2005), o risco de uma mãe RhD negativo produzir anti-D após gerar um filho RhD positivo é de aproximadamente 9%, se a imunoprofilaxia anti-D não for administrada. No caso de mulheres com uma história de fetos portadores de hidropsia fetal devido ao anti-D, há 90% ou mais de chances de um subsequente feto ser também afetado (BOWMAN, 1990). Em contraste, durante a primeira gestação sensibilizada, o risco de hidropsia fetal é de 8 a 10%.

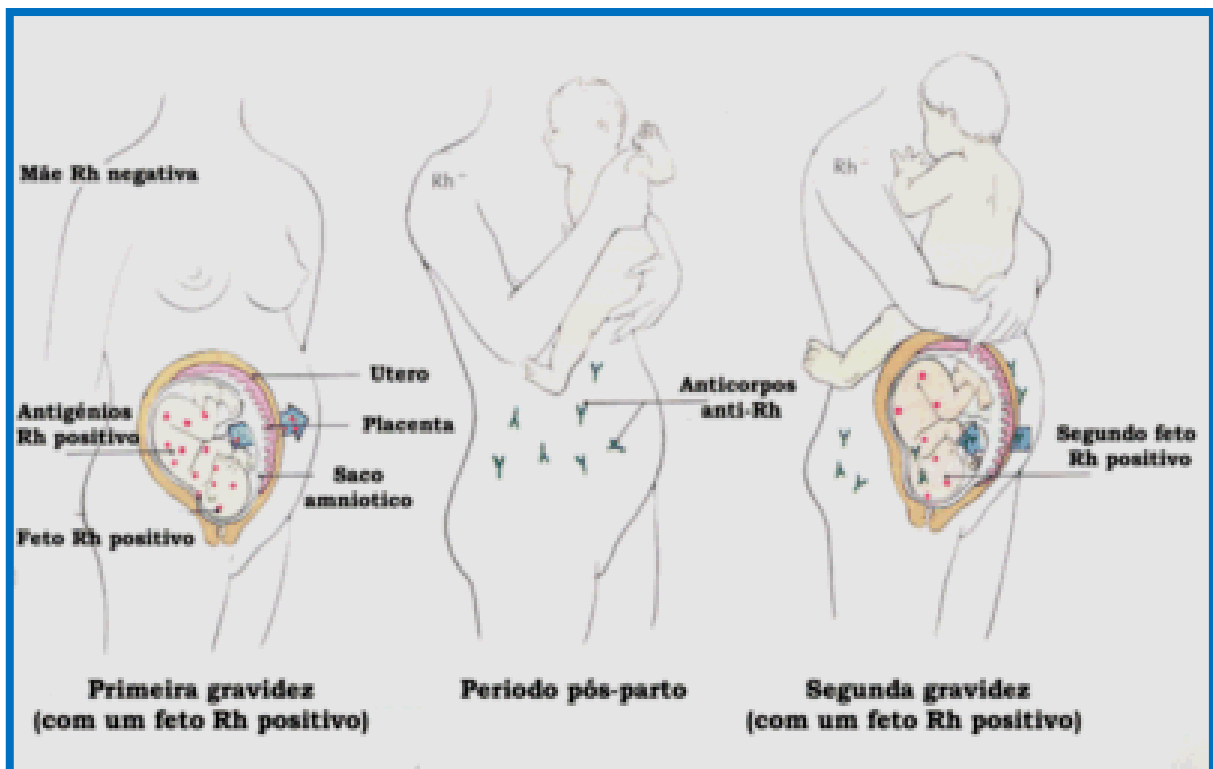


Figura 1 - Aloimunização materna por anti-D

Numa primeira gestação de uma mulher RhD negativo portando um feto RhD positivo, pode haver transferência feto-materna, sobretudo durante o parto. A presença de hemácias RhD positivo na circulação materna pode estimular a produção de anticorpos anti-D maternos. Numa próxima gestação de um feto RhD positivo, o anti-D atravessa a barreira transplacentária e se liga às hemácias fetais, destruindo-as.

1.4 Administração de anti-D profilático

A introdução da imunoprofilaxia RhD em 1968 foi um marco importante na medicina preventiva. No Canadá, antes de sua introdução, a taxa de imunização RhD era de 13,2%. Subsequente à sua introdução, a taxa de imunização RhD foi reduzida para 0,14%. A taxa de sucesso da imunoprofilaxia RhD é, portanto, de 98,4 a 99% (MOLLISON et al., 1997; SCOTT, 2001).

Cerca de 0,71 a 1,9% dos casos de sensibilização RhD ocorrem antes do parto, a maioria dos quais em decorrência de hemorragia transplacentária no terceiro trimestre. Esta causa residual, mas importante, de doença aloimune RhD pode ser reduzida pelo uso de profilaxia antenatal, em mulheres RhD negativo não sensibilizadas, com risco de estar gestando um feto RhD positivo.

Na experiência inicial na Universidade de Manitoba, no Canadá, a imunoprofilaxia com 28 e novamente com 34 semanas de gestação reduziu a incidência de sensibilização de 1,8 para 0,1%, sem quaisquer efeitos adversos à mãe ou ao feto (CORREA et al., 2004; MANNING, 2000). Sendo assim, a recomendação é que todas as mulheres RhD negativo não imunizadas recebam uma dose profilática de imunoglobulina anti-D antenatal, isto é, entre a 28ª e a 34ª semana de gestação e até 72 horas após o nascimento de um recém-nascido RhD positivo, ou ainda após aborto, gravidez ectópica, procedimentos invasivos e outras causas de hemorragia transplacentária.

A administração da imunoprofilaxia anti-D não é isenta de riscos. Por ser produzida a partir de *pool* de plasma humano, pode veicular agentes infecciosos. Entre 1977 e 1978, centenas de mulheres foram contaminadas com o vírus da hepatite C após receberem a imunoprofilaxia anti-D (FINNING et al., 2008). Entre 1991 e 1994, o anti-D produzido na Irlanda foi responsável pela transmissão da hepatite C a 44 mulheres (BELIARD, 2006; KUMPEL, 2002). Além disso, seu fornecimento está cada vez mais escasso, o que eleva o custo e diminui o acesso a essa profilaxia.

1.5 O gene *RHD*

O gene *RHD* codifica a proteína e os antígenos RhD e está localizado no cromossomo 1 (1p36.13-p34.3). Esse gene é flanqueado por duas regiões altamente homólogas, as “*Rhesus boxes*”, de orientação idêntica (figura 2). Intimamente ligado ao gene *RHD*, encontra-se o gene *RHCE*, que codifica a proteína RhCE e seus principais antígenos C, c, E, e. Esses genes estão separados por um terceiro gene, um segmento de 30.000 pb, o SMP1 (AVENT & REID, 2000).

RHD e *RHCE* são altamente homólogos, possuem 10 exons cada e cerca de 60 Kb. A grande proximidade e homologia entre os genes *RHD* e *RHCE* permitem a formação de alelos *RHD* híbridos, levando à produção de antígenos D diversificados, observados entre os diferentes grupos étnicos (CHEN & FLEGEL, 2005). Há cerca de 120 alelos *RHD* já descritos (WESTHOFF, 2005), e apesar da maioria dos indivíduos que possuem o gene *RHD* expressar a proteína D em uma sequência convencional de aminoácidos, 1 a 2% dos indivíduos de origem europeia e a maioria dos afroamericanos e latinoamericanos têm alterações de sequência do *RHD*, resultando na produção de uma proteína alterada (WESTHOFF, 2005).

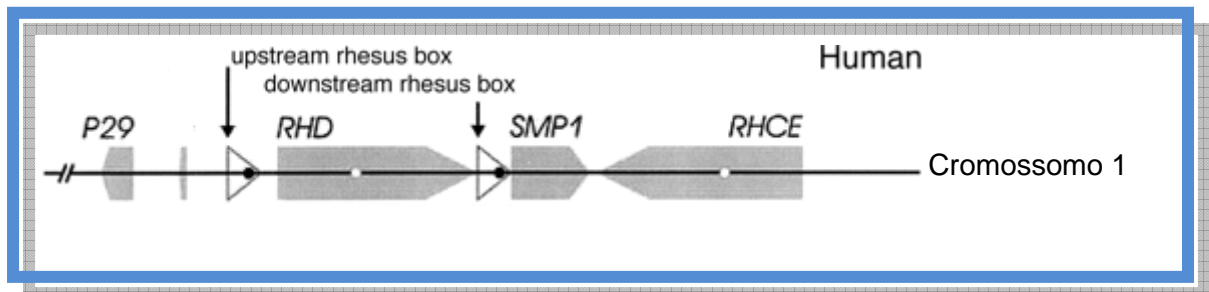


Figura 2 - Genes *RHD* e *RHCE*.

Os genes *RHD* e *RHCE* estão localizados no cromossomo 1, possuem orientação oposta e estão separados apenas por um terceiro gene, o SMP1. O gene *RHD* é flanqueado por duas regiões, as “*Rhesus Box (upstream e downstream Rhesus Box)*”. Fonte: Wagner e Flegel, 2002.

1.6 A proteína RhD

A proteína RhD consiste de 417 aminoácidos e é formada por doze hélices transmembranas, que entram e saem da membrana eritrocitária seis vezes, formando seis alças extracelulares, levando-a a ser denominada “proteína de múltiplos passos” (figura 3). A proteína RhD não é glicosilada e é expressa apenas na membrana dos eritrócitos, se a proteína RhAG, codificada pelo gene *RHAG* (cromossomo 6 p11-p21.1), estiver presente (AVENT & REID, 2000).

O antígeno D é uma coleção de epítomos de conformações dependentes ao longo da proteína RhD. Alterações na sequência de aminoácidos podem levar a mudanças na expressão, na estrutura ou nos epítomos do antígeno D, resultando nos fenótipos D fraco, D_{el}, D parcial ou epítomos RhCE “D-like”, os quais podem conduzir a uma inferência errônea do fenótipo RhD (WESTHOFF, 2005).

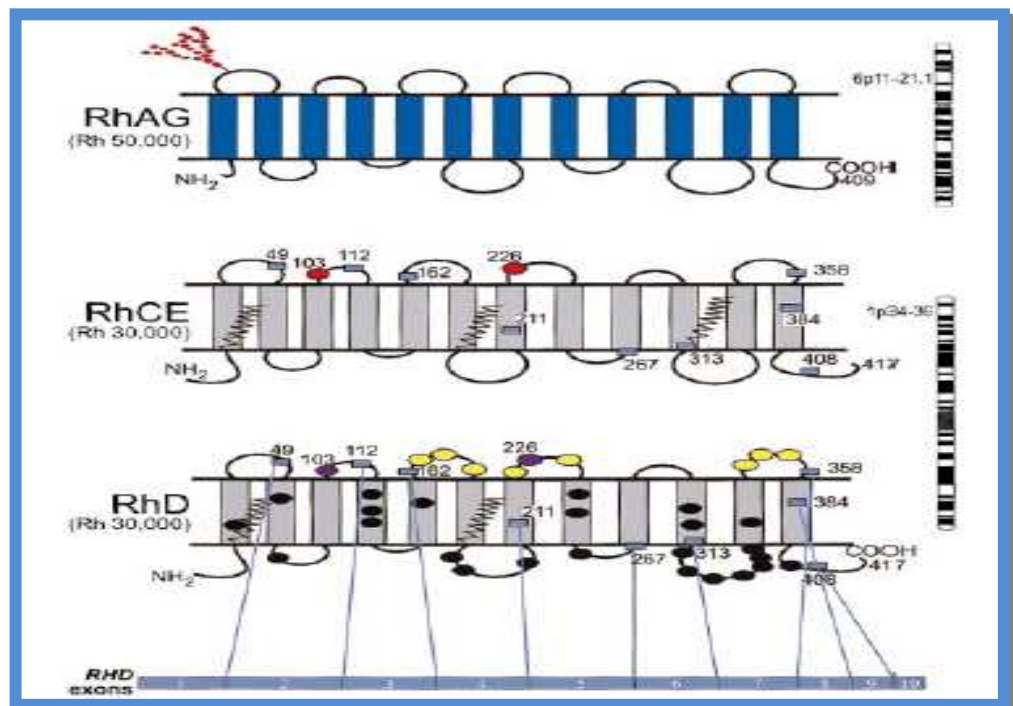


Figura 3 - As proteínas RhD, RhCE e RhAg.

As proteínas RhD, RhCE e RhAg atravessam a membrana eritrocitária seis vezes. Dos aminoácidos específicos do antígeno D, 8 estão na superfície exofacial (●) e 24 em domínios transmembrana ou citoplasmáticos (○). Círculos vermelhos (●) representam aminoácidos críticos para os antígenos C/c (Ser103Pro) e E/e (Pro226Ala), da proteína RhCE. Fonte: Avent & Reid, 2000.

O fenótipo D fraco é caracterizado por mutações que são na grande maioria das vezes substituições únicas de nucleotídeos (SNP) localizadas na região transmembranar ou intracelular (figura 4). Essas alterações afetam a quantidade de proteína RhD na membrana, levando a um número reduzido de sítios antigênicos nas hemácias. Isso faz com que o antígeno D seja detectado somente na fase da antiglobulina humana (AGH) (WESTHOFF, 2005). Todavia, existem fenótipos D fraco de tão baixa densidade antigênica que não são detectados nem mesmo na fase de AGH. Sabe-se ainda que, quando o haplótipo Cde se encontra em trans com o haplótipo cDe, pode haver um efeito supressor na expressão do antígeno D, levando a resultados discordantes na fenotipagem RhD (WAGNER et al., 1999). Mais de 50 diferentes tipos de mutações associadas ao fenótipo D fraco já foram reportados (tipos 1-54), mas os tipos mais frequentemente encontrados (D fraco tipos 1, 2 e 3) aparentemente não têm epítomos D alterados, o que faz com que os principais tipos de D fraco não levem à produção de anticorpos caso o portador de tal fenótipo venha a receber uma transfusão de hemocomponente RhD positivo, ou no caso de mulheres, venha a gestar um feto RhD positivo (WESTHOFF, 2005).

O fenótipo D_{el} , um tipo de D fraco frequentemente encontrado em asiáticos, é caracterizado por uma densidade antigênica abaixo do nível de detecção pelos reagentes anti-D disponíveis atualmente no mercado para a fenotipagem RhD e só é detectado por testes de adsorção e eluição com anti-D, o que faz com que indivíduos D_{el} sejam erroneamente classificados como RhD negativo, embora o gene *RHD* esteja presente (WESTHOFF, 2005).

O fenótipo D parcial é caracterizado por mutações localizadas na região extracelular da membrana eritrocitária (figura 4). Esse fenótipo pode ser causado por substituições únicas de nucleotídeos (SNP) ou de conversão gênica, resultando na troca de exons do gene *RHD* por exons do gene *RHCE* e vice-versa, formando um gene híbrido *RHD-CE-D*. Essas mutações podem levar à formação de novos epítomos ou de epítomos alterados que podem ou não ser detectados pelos reagentes anti-D utilizados na fenotipagem (tabela 1). Portadores desse fenótipo, se estimulados por uma proteína RhD normal, podem produzir anticorpos anti-D.

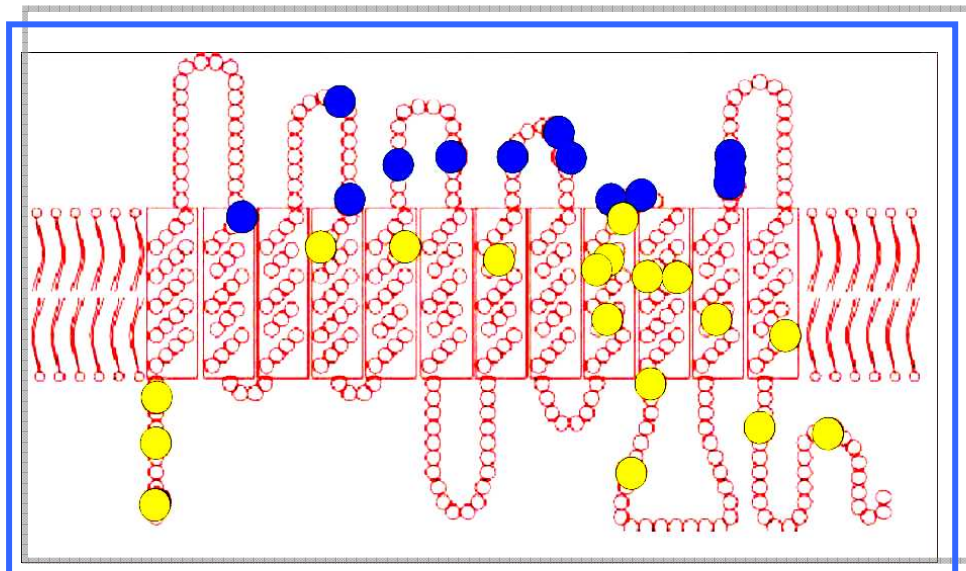


Figura 4 - Polimorfismos na proteína RhD, resultando no fenótipo D fraco ou D parcial.

Desenho esquemático da proteína RhD inserida entre a dupla camada fosfolipídica da membrana eritrocitária. Em amarelo estão representados polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) localizados na região transmembranar e intracelular gerando o fenótipo RhD fraco. Já os pontos azuis representam os polimorfismos de SNP na região extracelular, caracterizando o fenótipo D parcial. Fonte: Flegel & Wagner, 2002.

O fenótipo RhCE “D-like” é caracterizado pela ausência do gene *RHD*. Entretanto, a proteína RhCE tem aminoácidos D-específicos que reagem com alguns anti-D, sendo erroneamente classificados como RhD positivo. Dois exemplos, D^{HAR} (também conhecido como R_0^{Har}), encontrado em indivíduos de ancestralidade germânica e Crawford (ceCF), presente em indivíduos de ancestralidade africana, são notáveis devido à sua forte reatividade com alguns reagentes monoclonais licenciados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e completa ausência de reatividade com outros (tabela 2), mesmo quando o teste indireto da antiglobulina humana ou pesquisa de D fraco é realizado (WESTHOFF, 2005).

Face ao exposto, os diversos tipos de metodologias e reagentes empregados na fenotipagem RhD também podem ser responsáveis por fenotipagens RhD discrepantes (WESTHOFF, 2005). Alguns fenótipos D fraco e particularmente, D fraco tipo 2, nem sempre são detectados. Além disso, nenhum reagente anti-D atualmente disponível no mercado detecta hemácias D_{el} (WESTHOFF, 2005).

Tabela 1 – Tipos de reagentes anti-D monoclonais disponíveis no mercado e sua reatividade com algumas categorias de D parcial.

Clone	II	IIIa	IIIb	IIIc	IVa	IVb	Va	VI	VII	DFR	DBT	R ₀ ^{HAR}	HMI	Howe	Carr	Casar i	Lore	Sor	1711 844
RUM-1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MS-201	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TH-28	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
MS-26	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+/-	+	+	+
MAD-2	+	NT	NT	NT	+	NT	(+)	-	+	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT

(+) Reação positiva

(-) Reação negativa

(NT) Não testado

Tabela 2 – Reagentes anti-D licenciados pelo FDA e sua reatividade com algumas hemácias D parcial e Rhce que resultam em discrepâncias na fenotipagem RhD

Reagente	IgM Mono clonal	IgG	D parcial		D – ou D-like epitopo(s) em Rhce			
			D ^{VI} TA/AGH	DBT TA/AGH [*]	D ^{HAR}	CE ^{CF}	ce ^{RT}	CE ^{SL}
Gammaclone	GAMA401	F8D8	N / P	P	P	P	P	NTE
Immucor series	MS201	MS26	N / P	P	P	N	N	(+)
Immucor series	Th28	MS26	N / P	P	Var / P	N	N	(+)
Ortho BioClone	MAD2	Policl.	N / P	N / P	N	N	N	NTE
Ortho Gel	MS201	NSA	N/N	P	P	N	N	(+)
Policlonal	NSA	NSA	N / P	N / P	N	N	N	(+)*

* Células tratadas com enzimas

(+): Fracamente positivo

Cauc.: Caucasianos

AGH: Fase antiglobulínica

TA: Teste realizado à temperatura ambiente

N: Negativo

Var: Variável

P: Positivo

NSA: Não se aplica

NTE: Não testado

Fonte: WESTHOFF, 2005

1.7 Bases moleculares do fenótipo RhD negativo

O fenótipo RhD negativo é encontrado em 15% da população europeia, 8% dos africanos e é raro em asiáticos (REID & CHRISTINE, 2004).

Cerca de 18% dos europeus não expressam o antígeno D devido, na grande maioria dos casos, a uma deleção completa do gene *RHD*. Entretanto, o fenótipo D negativo pode ser causado também por alelos híbridos *RHD/CE* envolvendo as alças exofaciais 3 a 6, mutações em sítios de *splicing*, mutações sem sentido e outras alterações como deleções ou inserções, conforme mostrado na figura 5 (COLIN, 1991).

Em africanos, esse fenótipo é decorrente em 18% dos casos de uma deleção completa do gene *RHD*, em 67% dos casos pela presença do pseudogene *RHD Ψ* e em 15% dos casos pelo híbrido *RHD-CE-D* (*Cde^s*) (AVENT & REID, 2000).

O *RHD Ψ* é caracterizado pela inserção de 37 pares de base no exon 4, que introduz um códon de terminação (*stop codon*) na posição 210 (exon 6) (figura 5). O gene *RHD Ψ* difere do *RHD* funcional por um ponto único de mutação nos exons 4 e 6 e muitos pontos de mutação no exon 5. Esse fenótipo está presente em cerca de 24% dos afro-americanos D negativo e em 17% dos sul-africanos D-negativo miscigenados (SINGLETON et al., 2000).

O gene híbrido *RHD-CE-D* consiste na fusão de exons *RHD* com exons *RHCE*. O híbrido *RHD-CE-D* mais comum em caucasianos, o D parcial categoria VI (*D^{VI}*), consiste dos exons 1-3 e 7-10 do gene *RHD* e dos exons 4-6 do gene *RHCE* (DANIELS et al., 2004).

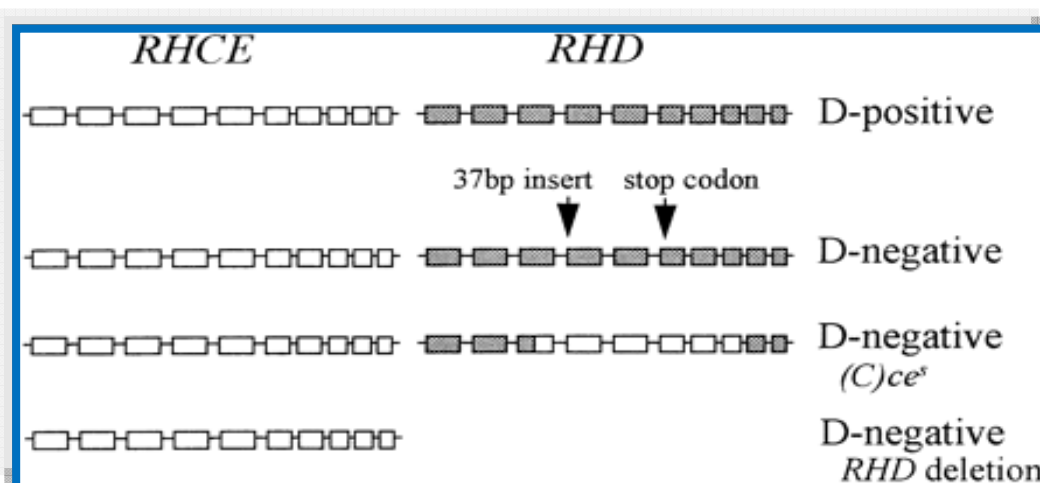


Figura 5 - Representação da organização genômica característica de um fenótipo D positivo e de três fenótipos D negativo.

Primeira linha: representação do genótipo *RHD* positivo devido à presença do gene *RHD*. Segunda linha: representação do gene *RHD Ψ* , responsável pelo

fenótipo RhD negativo, por se tratar de um gene *RHD* não funcional, onde há uma inserção de 37 pares de base no exon 4 e a formação de um “*stop codon*” no exon 6. Terceira linha: representação do gene híbrido *RHD-CE-D*, onde parte dos exons de *RHD* se funde aos exons de *RHCE*, levando à ausência de epítomos da proteína RhD, resultando em um fenótipo RhD negativo. Quarta linha: Representação do fenótipo RhD negativo devido à deleção total do gene *RHD*.

1.8 Genotipagem *RHD* fetal

Em 1991, quando as bases moleculares do fenótipo RhD se tornaram conhecidas, a genotipagem *RHD* se tornou amplamente abordada e tem sido de grande utilidade no acompanhamento precoce de gestantes RhD negativo sensibilizadas ou em risco de imunização, a tempo de administrar a imunoprofilaxia anti-D antenatal ou de evitar sua infusão desnecessariamente, em caso de fetos RhD negativo (BENNET et al., 1993).

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

Os primeiros métodos de genotipagem foram realizados mediante o isolamento direto de DNA fetal de amniócitos ou de vilosidades coriônicas (COSTA et al., 2002). Entretanto, tal procedimento é de alto custo e por requerer técnicas invasivas de coleta, é de difícil realização, sendo viabilizado somente em poucos centros. Além disso, está associado a um pequeno, mas significativo risco de aborto espontâneo (WILSON, 2000). A amniocentese está associada à indução da hemorragia feto-materna em 17% dos casos onde esse procedimento é adotado (TABOR et al., 1987) e ao aumento da incidência de imunização gestacional (FINNING et al., 2002). A coleta de amostra vilo-coriônica apresenta um risco de 3% de hemorragia transplacentária e está associada ao aumento do título do anticorpo e perda fetal de aproximadamente 0,3% (MARTINE et al., 2006), além de oferecer risco de má formação congênita (DENOMME & FERNANDES, 2007).

Análise de DNA extraído de tecido da mucosa cervical é minimamente invasiva, mas a quantidade de DNA fetal recuperada é muito pequena e há possibilidade de contaminação por DNA materno, contribuindo para uma baixa sensibilidade do teste (LO et al., 1997).

1.9 Genotipagem *RHD* fetal não invasiva

A presença de ácido nucléico fetal na circulação materna foi estabelecida em 1948, antes da elucidação da estrutura do DNA, mas a primeira descrição da utilização de uma PCR em tempo real utilizando DNA fetal livre no plasma materno só se deu em 1997 (LO et al., 1997) e muitos grupos têm avaliado sua eficácia na predição da herança do gene *RHD*. Todavia, um protocolo único sem resultados falsos ou discordantes com a fenotipagem ainda não se encontra disponível (MACHADO et al., 2006).

O alto “*turnover*” de DNA fetal no plasma materno sugere que o DNA é liberado continuamente na circulação materna e em grandes quantidades. Tem sido aceita a hipótese de que a fonte de DNA fetal livre é o sinciotrofoblasto. Um trabalho envolvendo gravidezes anembrionicas (desprovidas de feto, porém com material placentário) demonstrou que DNA derivado de fetos (isto é, placenta) foi encontrado em tais gestações em níveis similares às gestações controles com feto de idade similar. Por esta razão, acredita-se que a fração fetal de DNA livre no plasma materno é derivada de sinciotrofoblastos que sofreram apoptose, e então o DNA é fragmentado (AVENT et al., 2009).

Estudos evidenciaram que o tamanho dos fragmentos de DNA fetal no plasma materno é de 145 a 201 pb, em contraste com os fragmentos de DNA materno que são consideravelmente maiores (CHAN et al., 2004). Lo e colaboradores (1997) demonstraram que a concentração de DNA fetal livre no plasma aumenta com o tempo de gestação, sendo que o DNA fetal representa aproximadamente 3,4% a 6,2% de DNA livre no plasma materno durante o primeiro e terceiro trimestre de gestação, respectivamente (FINNING et al., 2002). Todavia, a quantidade de DNA fetal presente no soro materno varia de gestação a gestação e a cada dia ao longo do período gestacional (AVENT et al., 2009). Por outro lado, a relativa proporção de DNA fetal no plasma materno é conhecida por aumentar em certas gestações com complicações, incluindo pré-eclampsia, casos onde há algum tipo de dano placentário e aneuploidia (ZHOU et al., 2005).

Esforços para aumentar a proporção de DNA fetal comparados com a grande quantidade de DNA materno têm sido envidados. Para tal, tem sido utilizado o formaldeído (AVENT et al., 2009) como um fixante para impedir a lise de células maternas durante a

purificação do DNA fetal a partir do plasma materno. Entretanto, seu uso não tem tido reprodutibilidade por diferentes laboratórios.

Gravidezes prévias não afetam a eficácia dos testes, como no caso do isolamento de leucócitos fetais do sangue materno, que permanecem por muitos anos após a gestação (BIANCHI et al., 1996). O DNA fetal desaparece da circulação materna em poucas horas após o nascimento, sendo sua meia vida de 16 horas após cesariana e de 10 a 100 horas após parto normal, exceto em casos de doença hepática materna (AVENT et al., 2009). Por outro lado, microquimerismo ou transplante de células fetais nos órgãos linfóides ou na medula óssea podem levar à persistência de uma pequena quantidade de células nucleadas na circulação materna após a gestação (AVENT et al., 2009).

RNA fetal livre também pode ser encontrado em amostras de plasma materno, apesar de sua susceptibilidade ao ataque por nucleases. Recentemente, foi descrito que mRNA expressos em placenta estão encapsulados dentro de uma vesícula derivada de sinciotrofoblasto e podem ser fonte de RNA em amostras de plasma materno com aparente resistência à RNase. A detecção de mRNA no plasma materno, pode, portanto, permitir a inclusão dessa fonte de ácido nucléico fetal para fins diagnósticos (GUPTA et al., 2004).

1.9.1 Obtenção e processamento do plasma materno

Estudos têm demonstrado que a coleta de amostra materna visando a purificação de DNA fetal pode ser realizada a partir da 5ª semana de gestação (GROOTKERK-TAX et al., 2006). Entretanto, nesse caso, seria prudente repetir o teste em estágios mais tardios da gestação, pois o exato estágio em que o DNA fetal atinge um nível de detecção não é ainda conhecido. A maioria dos autores, todavia, trabalhou com amostras de gestantes com idade gestacional média entre 12,7 a 27,9 semanas para a genotipagem *RHD* (FINNING et al., 2008; COSTA et al., 2002; MINON et al., 2008; JOHNSON et al., 2004).

As amostras de sangue periférico das gestantes RhD negativo são colhidas em EDTA e devem ser processadas em até 48 horas, para evitar excesso de DNA materno decorrente de lise celular. Amostras processadas após esse prazo demonstraram um reduzido nível de DNA fetal, provavelmente devido à hemólise de células maternas com liberação de DNA materno no plasma. O volume de amostra materna coletada varia entre 3 mL e 20 mL, dependendo do protocolo adotado (FINNING et al., 2008; FINNING et al., 2002, SINGLETON et al. 2000; FINNING et al., 2004; GAUTIER et al., 2005). Todavia, a maioria

dos autores concorda que é prudente colher mais de 10 mL de sangue materno, devido à possível necessidade de repetição dos testes (BROJER et al., 2005).

Para o armazenamento do sangue materno colhido poderão ser utilizados tubos contendo apenas anticoagulante (EDTA) ou gel separador, que após centrifugação separa a camada de plasma da camada de leucócitos. Apesar de controverso, estudo realizado por Brojer e colaboradores (2005) demonstrou que o número de cópias fetais detectadas nos tubos contendo a barreira de gel foi inferior ao contido nos tubos sem a barreira de gel (BROJER et al., 2005).

O processamento da amostra materna envolve uma etapa de centrifugação inicial do sangue materno entre 800 a 3000 g por 10 minutos (MARTINE et al., 2006; LO et al., 1997; FINNING et al., 2004; GAUTIER et al., 2005; BROJER et al., 2005; ZHOU et al., 2005). Após essa etapa, o plasma materno é separado das hemácias, tendo o cuidado de não remexer a camada de leucócitos (*"buffy coat"*) para não contaminar a amostra com DNA materno. Nessa etapa, o plasma materno pode ser centrifugado entre 2400 g a 13.500 g por 10 minutos, para remover todos os resíduos de células intactas. Caso o plasma materno não seja prontamente utilizado, poderá ser estocado entre -20°C e -30°C (MARTINE et al., 2006; FINNING et al., 2004; GAUTIER et al., 2005; BROJER et al., 2005; ZHOU et al., 2005). Entretanto, foi demonstrado que o número de cópias de DNA fetal foi maior quando a purificação de DNA fetal foi realizada no plasma fresco (BROJER et al., 2005).

1.9.2 Purificação de DNA fetal

A purificação do DNA fetal é um processo determinante para o sucesso da genotipagem fetal. A sensibilidade e a especificidade da técnica estão fortemente relacionadas à quantidade de DNA detectado. O DNA fetal pode ser extraído de forma manual ou automatizada, sendo que essa última permite a purificação de uma maior quantidade de DNA (BROJER et al., 2005).

A grande maioria dos laboratórios utiliza a metodologia de coluna, cuja purificação do DNA é realizada através de membranas de sílica (FINNING et al., 2002; COSTA et al., 2002; MARTINE et al., 2006; MINON et al., 2008; GAUTIER et al., 2005; ZHOU et al., 2005; ATAMANIUK et al., 2009). Outros, entretanto, utilizam tecnologia baseada em partículas magnéticas, às quais o ácido nucléico se liga, sendo capturado, no final do processo, por hastes magnetizáveis (MÜLLER et al., 2008). Müller e colaboradores (2008) compararam a quantidade de DNA fetal extraído por esses dois métodos e demonstraram que maiores

quantidades de DNA fetal livre foram recuperadas quando o DNA foi extraído com partículas magnéticas ($p \leq 0,05$, $n = 660$) (MÜLLER et al., 2008).

Os kits utilizados para a purificação do DNA fetal livre no plasma materno são geralmente destinados à purificação de DNA genômico de sangue total, soro ou plasma. Kits para detecção de DNA/RNA viral em fluidos humanos também têm sido utilizados como uma forma sensível e específica de purificação de DNA. Recentemente, foi desenvolvido um método de hibridização e captura magnética utilizando iniciadores (“*primers*”) de hibridização específicos para a purificação de DNA fetal, o qual apresentou resultados significativamente melhores que o método de purificação de DNA/RNA viral ($p < 0,05$, $n=8$) (LEGLER et al., 2009).

Após a purificação, o DNA pode ser imediatamente utilizado na PCR ou pode ser estocado a -20°C .

1.9.3 PCR em tempo real na genotipagem *RHD* fetal

A técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real permite a amplificação de segmentos de DNA alvo, com grande sensibilidade e especificidade. No momento da amplificação / extensão do gene alvo ocorre a emissão de fluorescência, que pode ser detectada e quantificada, permitindo a constante detecção e monitoramento dos produtos de amplificação durante toda a reação. Essa metodologia oferece algumas vantagens como simplicidade técnica, rapidez de execução, especificidade de amplificação e custo relativamente baixo, com reduzido potencial de contaminação, quando comparado com as PCR convencionais. Todavia, o sucesso da amplificação depende da quantidade e da qualidade do DNA extraído.

Uma PCR básica pode ser subdividida em três fases: exponencial, linear e final (platô) (figura 6). Na fase exponencial a sequência alvo é duplicada e acumulada a cada ciclo (assumindo uma eficiência da reação de 100%). A amplificação exponencial ocorre porque nessa fase há grande quantidade de reagentes frescos e disponíveis. Desta forma, a cinética da reação contribui para a duplicação do “*amplicon*” (produto de PCR). Na fase linear, há uma alta variabilidade, pois com o progresso da reação, alguns reagentes são consumidos como um resultado da amplificação. Nessa fase, as reações de amplificação começam a diminuir e o produto da PCR não é mais duplicado a cada ciclo. Na fase final (platô), a reação é finalizada e não há mais formação do produto. Todavia, cada tubo ou

reação irá atingir um limite máximo em diferentes pontos, devido a diferentes reações cinéticas para cada amostra (www.appliedbiosystems.com).

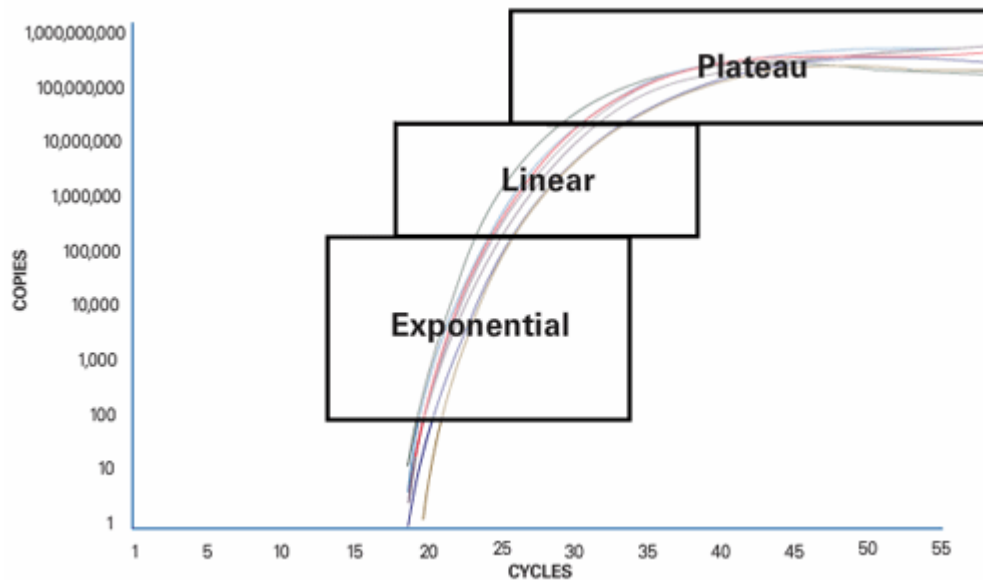


Figura 6 - Fases da PCR.

Na primeira fase, o produto da amplificação é duplicado e acumulado a cada ciclo. Na fase linear, as reações começam a diminuir e o produto da PCR não é mais duplicado a cada ciclo. Na fase final, um platô é alcançado com a finalização da reação e não há mais formação do produto. Fonte: www.appliedbiosystems.com

Na PCR em tempo real, o equipamento calcula dois valores: O “threshold” e o Ct (“*Cycle threshold*”). O “threshold” é o nível de detecção onde a reação atinge uma intensidade de fluorescência acima da fluorescência de fundo. O ciclo da PCR onde a amostra atinge esse nível é chamado de Ct (“*Cycle Threshold*”), conforme apresentado na figura 7. Através da comparação de valores de Ct de amostras de concentrações diferentes com uma série de padrões, a quantidade de DNA alvo pode ser determinada com acurácia. Em uma PCR ideal, na fase exponencial, a quantidade de DNA é duplicada a cada ciclo. Sendo assim, uma diferença de 1 Ct representa uma diferença de duas vezes na

concentração de DNA. Na maioria dos testes envolvendo DNA fetal, uma cópia de um gene irá resultar em um valor de Ct de aproximadamente 38 (GROOTKERK-TAX et al., 2006).

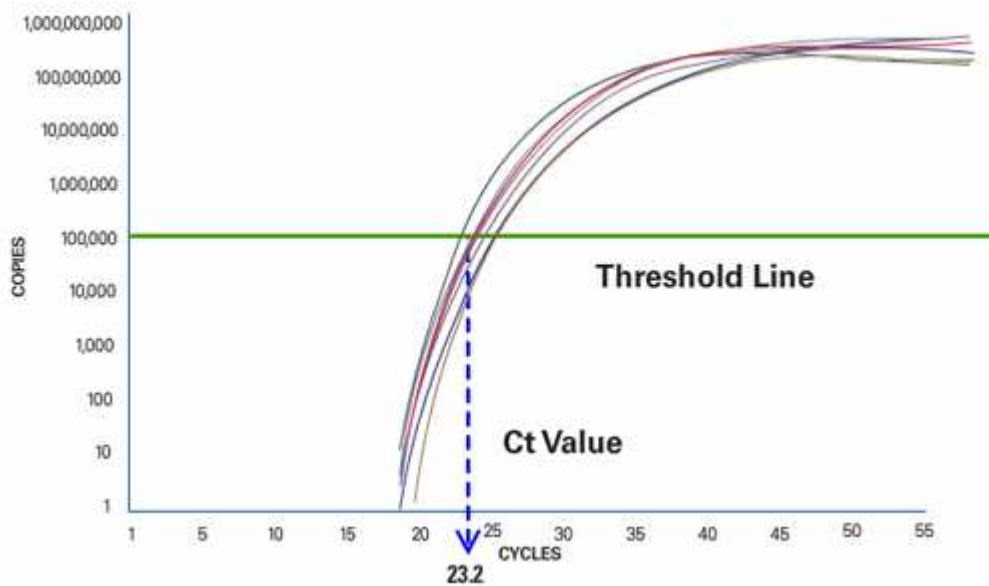


Figura 7- Resultado gráfico de uma PCR em tempo real.

O ciclo onde a amostra atinge uma intensidade de fluorescência acima do sinal de fundo é chamado de Ct (*"Cycle Threshold"*).

A PCR em tempo real pode ser realizada por basicamente três métodos principais: Sondas hidrolizáveis, sondas hibridizáveis e agentes ligantes ao DNA. A metodologia mais amplamente abordada na PCR *RHD* fetal é a que utiliza sondas *TaqMan* (Applied Biosystems). Essa metodologia é baseada na atividade 5' nuclease da Taq DNA polimerase para clivar uma sonda de hibridização fluorogênica duplamente marcada, durante a fase de extensão da PCR. Nessa metodologia, um dos fluoróforos funciona como um repórter e seu espectro de emissão é bloqueado por um segundo fluoróforo (*"quencher"*). Durante a fase de extensão da PCR, a atividade exonucleásica da DNA polimerase cliva a sonda e libera o fluoróforo repórter, aumentando desta forma o sinal de fluorescência (ALIZADEH et al.,

2002) (figura 8). Durante cada ciclo de PCR, essa fluorescência vai aumentando devido ao acúmulo exponencial de fluoróforos.

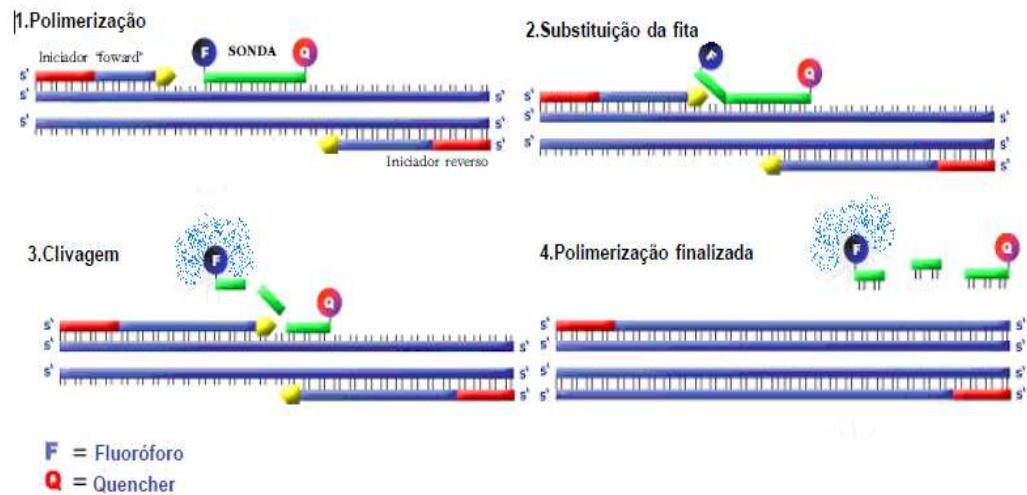


Figura 8 – PCR em tempo real usando sonda TaqMan®.

O sistema TaqMan consiste de uma sonda marcada com um fluoróforo de alta energia, chamado de “repórter”, na extremidade 5’ e com um fluoróforo de baixa energia chamado de “quencher”, na extremidade 3’. Quando essa sonda intacta é excitada por uma fonte de luz, a emissão da fluorescência do “repórter” é suprimida pelo “quencher” como resultado da proximidade entre eles. Quando a sonda é clivada pela atividade 5’ nucleásica da Taq DNA polimerase, essa distância aumenta promovendo a transferência de energia. Conseqüentemente, a emissão de fluorescência do “repórter” aumenta e a do “quencher” diminui.

Considerando a alta homologia entre os genes *RHD* e *RHCE* e a possível presença do *RHD* pseudogene (*RHDψ*), que podem ser responsáveis por inferências errôneas, a abordagem mais amplamente utilizada no diagnóstico RhD fetal utilizando PCR em tempo real tem sido a análise de duas diferentes regiões do gene *RHD*, evitando-se preferencialmente o exon 10, que é frequentemente detectado em indivíduos portadores do haplótipo Cde, geralmente associado ao fenótipo D parcial (LEGLER et al., 2009).

Finning e colaboradores (2008) recomendam a inclusão do exon 4 ou 5, combinado com um exon alternativo (7 ou 10) para evitar a incorreta predição de fetos *RHD Ψ* ou *RHD-CE-D^s* como RhD positivo (FINNING et al., 2008). Todavia, não há padronização nos protocolos para amplificação do gene *RHD*, conforme mostrado na tabela abaixo. No entanto, com o objetivo de aumentar a sensibilidade da técnica, recomenda-se testar a amostra em duplicata a quadruplicata para o diagnóstico *RHD* fetal (MINON et al., 2008; GAUTIER et al., 2005; BROJER et al., 2005; MÜLLER et al., 2008).

Tabela 3 - Exons do gene *RHD* analisados nas reações de PCR em tempo real para genotipagem *RHD* fetal.

Exon analisado	Referência
Exons 4, 5, 10	Finning et al., 2004 Zhou et al., 2005 Minon et al., 2008
Exons 7 e 10	Brojer et al., 2005 Carbonne et al., 2007 Allen Chan et al., 2006
Exons 5 e 7	Finning et al., 2008 Müller et al., 2008
Exon 5	Grootkerk-Tax, 2006
Exon 7	Atamaniuk et al., 2009
Exon 10	Lo YM et al., 1998

1.10 Controles e marcadores da genotipagem *RHD* fetal

Considerando-se que a concentração de DNA fetal livre no plasma materno é muito pequena, faz-se necessária a inclusão de controles e marcadores para verificar se há presença de DNA (controle da amplificação) e, especificamente, de DNA fetal na PCR.

Vários estudos utilizam como controle interno da amplificação de DNA o gene *CCR5* (Universal Chemokine Receptor Gene) (FINNING et al., 2008; WHESTOFF, 2005; MINON et al., 2008; GAUTIER et al., 2005). Outros genes que podem ser utilizados são o *GAPDH* (gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase) (FINNING et al., 2004; ZHOU et al., 2005), β -globina (MACHADO et al., 2006; MÜLLER et al., 2008; CARBONNE et al., 2007), β -actina (BROJER et al., 2005) ou *SOD* (Superóxido dismutase) (COSTA et al., 2002). Quando não há amplificação do gene controle, os testes não serão validados. Nesse caso, são necessárias nova purificação de DNA e nova PCR.

Como controle da reação de PCR pode se usar amostras de DNA genômico RhD positivo e RhD negativo (FINNING et al., 2008) ou DNA extraído do plasma de gestantes de feto RhD positivo (GROOTKERK-TAX et al., 2006; FINNING et al., 2004).

Para verificar se o DNA fetal foi amplificado, utilizam-se marcadores. No caso de fetos do sexo masculino poderá ser amplificado o gene *SRY* (DANIELS et al., 2004; FINNING et al., 2002; MINON et al., 2008; FINNING et al., 2004; ZHOU et al., 2005). Finning e colaboradores (2008), entretanto, determinaram o sexo fetal usando sequências específicas de iniciadores relativos a alelos X (cromossomo X) e Y (cromossomo Y) do gene da amelogenina. Todavia, em casos de fetos do sexo feminino com ausência de amplificação do gene *RHD*, pode-se utilizar marcadores de polimorfismo de inserção/deleção bialélica (MILLER et al., 2008). Usualmente são utilizados 8 a 11 marcadores, altamente polimórficos, que permitem a detecção de marcadores paternos no plasma materno, quando comparados ao DNA de leucócitos materno. Alternativamente, um marcador epigenético foi descrito por Allen Chan e colaboradores (2006), que demonstraram que o promotor do gene supressor de tumor, *RASSF1A*, é hipermetilado na placenta e hipometilado em células sanguíneas maternas. Desta forma, utilizaram digestão com enzima de restrição sensível à metilação para detectar sequências hipermetiladas de *RASSF1A* no plasma de gestantes RhD negativo, confirmando a presença de DNA fetal.

Na prática clínica, no entanto, marcadores para identificação de DNA de origem fetal não têm sido utilizados.

1.11 Acurácia, sensibilidade e especificidade da genotipagem *RHD* fetal

A acurácia da genotipagem *RHD* fetal no plasma materno é medida pela comparação entre o genótipo *RHD* fetal predito e o resultado sorológico da análise de sangue do cordão umbilical do recém-nascido ou por PCR utilizando DNA extraído do líquido amniótico. A tabela 4 mostra a concordância de resultados da genotipagem fetal e fenotipagem do recém-nascido em vários estudos, empregando diferentes metodologias de PCR em tempo real. Em uma meta análise recente, de 37 publicações, a acurácia diagnóstica total do teste de genotipagem *RHD* fetal não invasiva foi de 94,8% (GEIFMAN-HOLTZMAN et al., 2006). Todavia, alguns fatores podem alterar esse valor, como a idade gestacional, a presença de alelos *RHD* variantes, o tempo de armazenamento da amostra materna antes da separação do plasma materno, a metodologia de purificação de DNA utilizada, etc.

Lo e colaboradores (1998) encontraram resultados completamente concordantes entre a genotipagem *RHD* fetal e a análise sorológica, quando foram analisadas amostras de gestantes no segundo ou terceiro trimestre de gravidez. Todavia, amostras coletadas no primeiro trimestre apresentaram genótipo *RHD* negativo para fetos sorologicamente fenotipados como RhD positivo. Finning e colaboradores (2002) sugerem que, apesar de ser possível alcançar a eficácia da genotipagem *RHD* no primeiro trimestre, seria prudente repetir o teste em estágios mais tardios da gestação.

O tempo de armazenamento da amostra antes do processamento do plasma é também um fator determinante para a sensibilidade e especificidade do teste. A demora em separar o plasma da camada leucocitária materna pode levar à ruptura de células maternas e contaminação do plasma com DNA materno. Sendo assim, o DNA plasmático não deverá exceder 125 ng/mL. Se isso acontecer, indica que as células maternas foram lisadas e a eficácia do teste pode ser comprometida. Nesse caso, uma nova amostra deve ser obtida (FINNING et al., 2002).

A etapa de purificação do DNA fetal é fundamental para a sensibilidade da genotipagem fetal no plasma materno, pois ausência de DNA fetal pode levar a resultados falso-negativos.

É importante ainda lembrar que os métodos sorológicos de fenotipagem RhD ao nascimento também podem falhar. Após realizar estudo com 563 gestantes, amplificando segmentos dos exons 4, 5 e 10 do gene *RHD*, Minon e colaboradores (2008) obtiveram 100% de concordância (99,8% incluindo um incomum falso-positivo) entre a genotipagem e a fenotipagem RhD do recém-nascido. Nesse estudo, houve quatro resultados inicialmente entendidos como discrepantes com o fenótipo do sangue coletado do cordão umbilical. Entretanto, três se mostraram concordantes mais tarde, quando o sangue venoso ou células

buciais do recém-nascido foram utilizados. O único caso falso positivo na genotipagem foi devido a uma causa incomum, um transplante de fígado de doador RhD positivo.

Resultados falso-negativos podem ocorrer na ausência de DNA fetal e por isso são o maior desafio para a introdução desse teste na rotina clínica (ZHOU et al., 2005). Um resultado falso-negativo pode impedir a administração da imunoprofilaxia anti-D em gestantes com feto RhD positivo, podendo levar a uma potencial aloimunização, morbidade e mortalidade da DHPN em subseqüentes gestações (FINNING et al., 2008).

Tabela 4 - Comparação da acurácia (concordância entre a genotipagem *RHD* fetal no plasma materno com o fenótipo RhD do recém-nascido), número de amostras testadas e exons do gene *RHD* analisados entre alguns estudos de 2002 a 2009.

Referência bibliográfica	Nº de amostras testadas	Regiões do gene <i>RHD</i> analisadas	Concordância entre a genotipagem <i>RHD</i> fetal e fenótipo RhD do recém-nascido
Costa et al., 2002	106	Não informado	100%
Finning et al., 2002	137	Exons 4, 5, 6	100%
Brojer et al., 2005	255	Exons 7, 10 e intron 4	100%
Lan Zhou et al., 2005	98	Exons 4, 5, 10	94%
Machado et al., 2006	81	Exon 10, intron 4	97,3%
Minon et al., 2008	563	Exons 4, 5, 10	100%
Müller et al., 2008	1113	Exons 5, 7	99,5%
Sesarini et al., 2009	109	Exon 7	86,7%

1.12 Teste da zigosidade *RHD* paterna

O teste da zigosidade *RHD* paterna pode ser realizado para avaliar se o pai RhD positivo é homocigoto ou heterocigoto para o gene *RHD*. Esse teste permite a predição do risco de DHPN por anti-D, caso a mãe seja RhD negativo e o pai RhD positivo. Se o pai é homocigoto para o gene *RHD*, então pode-se inferir que o feto será RhD positivo, e o risco de DHPN por anti-D deve ser considerado, não sendo necessária a tipagem fetal. No entanto, se o pai é heterocigoto para o gene *RHD*, a probabilidade do feto ser RhD positivo é de 50%, e a tipagem fetal deve ser realizada para avaliação do risco de DHPN.

O princípio do teste é baseado na existência de um segmento denominado “*Rhesus box*” híbrida, gerado pela deleção completa do gene *RHD*. O gene *RHD* é flanqueado “*upstream*” e “*downstream*” por dois segmentos homólogos de DNA de cerca de 9000 pb, denominados de “*Rhesus boxes*”. Esses segmentos compartilham 98,6% de identidade (WAGNER et al., 2000) entre si. Na população europeia, o fenótipo D negativo geralmente se deve a uma deleção completa do gene *RHD* em decorrência de um desigual “*crossing-over*” entre essas duas “*Rhesus boxes*”, resultando em uma única “*Rhesus box*” híbrida (WAGNER et al., 2000; AVENT & REID, 2000). Assim, a detecção da “*Rhesus box*” híbrida tem sido aplicada para demonstrar a presença da deleção *RHD*, e permite definir se um indivíduo RhD positivo é homocigoto (ausência da *Rhesus box* híbrida) ou heterocigoto (presença da *Rhesus box* híbrida) para o gene *RHD*.

O teste de zigosidade *RHD* baseado na detecção da “*Rhesus box*” híbrida vem sendo realizada por PCR, usando iniciadores específicos para detectar a sequência híbrida, ou por PCR – RFLP (PERCO et al., 2003). Todavia, essas técnicas podem falhar em indivíduos com variações alélicas do gene *RHD*.

O teste de zigosidade *RHD* também pode ser baseado na dosagem paterna do gene *RHD*, através de PCR quantitativa em tempo real (CHIU et al., 2003). O princípio do teste é que indivíduos heterocigotos para o gene *RHD* têm uma menor quantidade desse gene e possuem uma menor relação entre os genes *RHD* e *RHCE* do que indivíduos homocigotos. Entretanto, em uma recente publicação, foi demonstrado que a dosagem *RHD* pode levar a uma interpretação errônea, principalmente em indivíduos portadores de alelos híbridos *RHCE-D-CE*. Nesses casos, pode-se encontrar uma proporção muito alta de *RHD* para *RHCE*, típica para homocigotos *RHD* (YU et al., 2006). Em indivíduos afro-americanos é comum a presença do *RHD Ψ* , que pode levar a uma falsa inferência de homocigosidade (SINGLETON et al., 2000). Outro alelo *RHD* não-funcional presente nessa população é aquele ligado ao (C)ce^s, o qual pode ser identificado por seu exon 3, que é um exon híbrido

composto de uma região 5' do gene *RHD* e uma região 3' do gene *RHCE* (FAAS et al., 1997).

Quando a inferência da zigosidade *RHD* é incorreta, como no caso de “*Rhesus boxes*” híbridas variantes, o teste da dosagem *RHD* pode ser aplicado. Entretanto, segundo Flegel (2007), não há nenhum laboratório que utilize as duas técnicas. Por isso, os pais devem ser orientados sobre a limitação da técnica adotada.

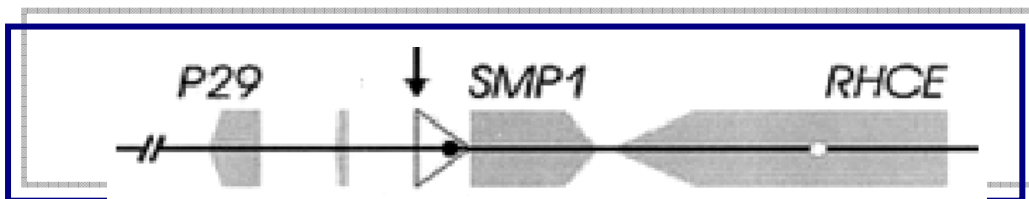


Figura 9 - Formação da *Rhesus Box* híbrida.

Devido a uma deleção do gene *RHD* ocorre a formação de uma única “*Rhesus box*” híbrida (indicada pela seta).

2. Relevância e Justificativa

Apesar de todos os avanços no acompanhamento de gestantes RhD negativo, a DHPN ainda não foi erradicada. Uma das causas da prevalência de DHPN se deve principalmente à falta de atenção aos protocolos de imunoprofilaxia anti-D e à espontânea e indetectada hemorragia feto-materna durante o terceiro trimestre de gravidez. Há ainda um alto custo envolvendo o acompanhamento de gestantes RhD negativo, devido à necessidade de realização de muitos testes laboratoriais e de intervenções médicas constantes.

A Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) preconiza que toda gestante RhD negativo não aloimunizada receba a imunoprofilaxia anti-D entre a 28^a e 34^a semana de gestação e no máximo 72 horas pós-parto. Entretanto, a profilaxia antenatal não tem sido realizada devido à premissa de que grande parte de gestantes RhD negativo estarão gestando fetos RhD negativo, e que, portanto, estariam recebendo a imunoprofilaxia desnecessariamente. Além disso, possui um custo elevado, o que diminui as chances de acesso a essa profilaxia por gestantes de baixa condição sócio-econômica. Por outro lado, em países onde a imunoprofilaxia anti-D é aplicada de rotina, mais de 40% das gestantes RhD negativo recebem a antiglobulina anti-D desnecessariamente, uma vez que seus fetos são RhD negativo.

Nesse contexto, a genotipagem *RHD* fetal pode causar um grande impacto no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo, sobretudo àquelas acompanhadas na rede pública de saúde. Caso o feto não seja portador do gene *RHD*, nenhum procedimento adicional será necessário e a gestante poderá ser acompanhada como uma gestante comum e não mais de alto risco, como é feito atualmente, reduzindo bastante o nível de “stress” da gestante e dos familiares, assim como o custo do acompanhamento pré-natal. Em contrapartida, caso o feto seja portador do gene *RHD*, a genotipagem fetal constitui fonte de diagnóstico precoce de risco de DHPN, permitindo que todos os recursos necessários à segurança da gestante e do feto sejam adotados prontamente. Além disso, permitirá a administração da profilaxia antenatal, reduzindo ainda mais a chance de sensibilização materna.

A genotipagem *RHD* no plasma materno usando PCR em tempo real é de simples execução, rápida, sensível, específica, e de custo relativamente baixo e vem despontando como uma importante ferramenta na prática clínica em vários países, que já incluíram o teste na rotina de atendimento a gestantes RhD negativo. No Brasil, até o momento, apenas um artigo foi publicado (CHINEN et al., 2010) descrevendo o uso da metodologia de PCR em tempo real na genotipagem *RHD* fetal. Ainda faltam estudos que demonstrem a

viabilidade da implantação desta ferramenta na rede pública de saúde no acompanhamento de gestantes RhD negativo consideradas de alto risco.

3.Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Desenvolver um teste para genotipagem *RHD* fetal a partir do plasma materno e avaliar a acurácia da técnica como uma ferramenta não invasiva na predição do fenótipo RhD fetal.

3.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer uma técnica para genotipagem *RHD* fetal no plasma materno por PCR em tempo real, usando o sistema “*TaqMan*”.
2. Avaliar a recuperação de DNA fetal por detecção do gene *SRY* por PCR em tempo real, utilizando o sistema “*TaqMan*”.
3. Determinar a zigosidade do gene *RHD* em amostras paternas, por PCR convencional.
4. Avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia do teste de genotipagem *RHD* fetal e a viabilidade do seu uso na rotina de acompanhamento de gestantes RhD negativo.

4. Material e Métodos

A metodologia deste estudo seguiu o fluxograma geral delineado abaixo (figura 10). A análise do DNA materno e/ou paterno foi realizada de acordo com a necessidade ou disponibilidade de amostras (figura 11).

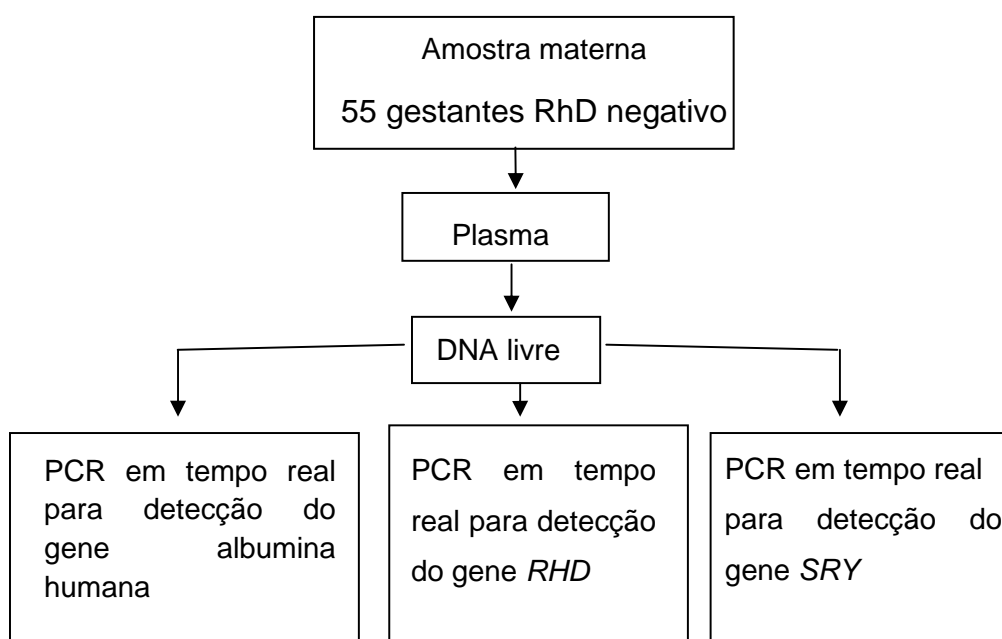


Figura 10 - Fluxograma geral da metodologia do estudo

O plasma materno foi obtido mediante centrifugação da amostra materna. O DNA fetal livre foi extraído a partir do plasma materno e submetido a reações de PCR em tempo real para detecção dos genes da albumina humana, *RHD* e *SRY*.

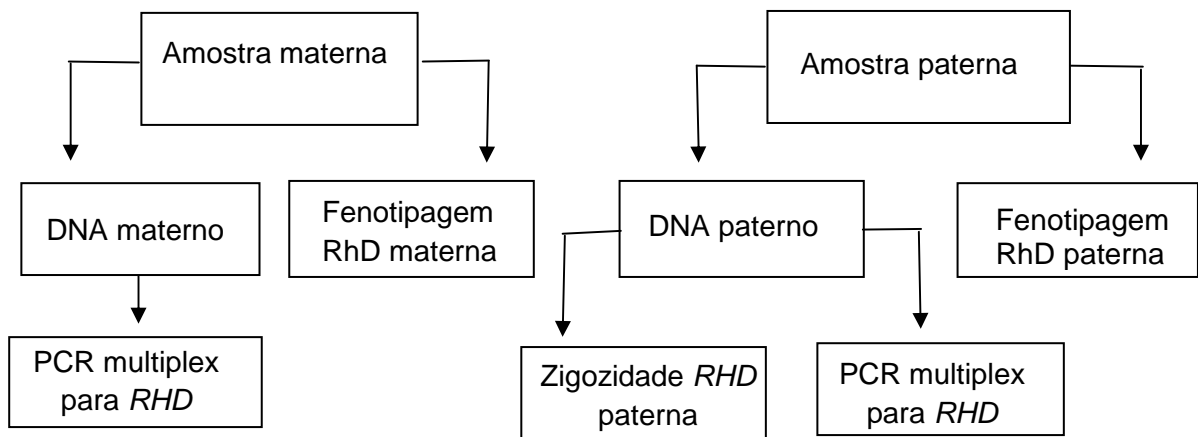


Figura 11 - Fluxograma dos testes realizados nas amostras materna e paterna

A amostra materna foi submetida à fenotipagem RhD para confirmação do fenótipo RhD materno. Quando necessário, foi extraído o DNA materno e realizada a genotipagem *RHD* por PCR multiplex. Quando disponível, foi realizada a PCR para determinação da zigozidade *RHD* paterna e quando necessário, foi extraído o DNA paterno e realizada a PCR multiplex para o gene *RHD*.

4.1 População de estudo

Foram colhidos 10 mL de sangue em tubo contendo anticoagulante EDTA de 55 gestantes com fenótipo RhD negativo, com idade gestacional superior a 10 semanas, atendidas no Ambulatório de Acompanhamento a Gestantes de Alto Risco do Hospital das Clínicas / UFMG. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, sob o parecer N^o ETIC 115/07 e todas as gestantes participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram também colhidos 5 mL de sangue total em tubo contendo EDTA de 14 pais com fenótipo RhD positivo para o teste de zigozidade *RHD* paterna.

4.2 Cálculo amostral do número de gestantes RhD negativo

Foi realizado o cálculo amostral para determinação do número de gestantes RhD negativo necessário para avaliação da sensibilidade e especificidade do teste de genotipagem *RHD* fetal, de modo que pudessem ser testados tanto fetos RhD positivo quanto RhD negativo. O cálculo amostral foi baseado no número médio de gestantes RhD negativo atendidas no ambulatório do Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas / UFMG num período de 2 anos, na frequência do fenótipo RhD negativo e RhD positivo na população caucasiana e num erro amostral máximo de 5%.

N= Número médio de gestantes RhD negativo atendidas no ambulatório do Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas / UFMG num período de 2 anos

P= Frequência do fenótipo RhD negativo na população caucasiana

Q= Frequência do fenótipo RhD positivo na população caucasiana

d= Erro amostral máximo permitido (5%)

$\alpha=0,05$

$\alpha / 2 =0,025$

$Z_{\alpha/2} = 1,96$

$$n \geq N / 1 + (N - 1) / PQ \times (d / Z_{\alpha/2})^2$$

$$n \geq 50 / 1 + (49) / 0,15 \times 0,85 \times (0,05 / 1,96)^2$$

$$n \geq 50 / 1 + 49 / 0,1275 \times (0,025)^2$$

$$n \geq 50 / 1 + 1,96 \times 0,000625$$

$$n \geq 50 / 1 + 0,001225$$

$$n \geq 50 / 1,001225$$

$$n \geq 49,93$$

4.3 Fenotipagem RhD materna e paterna

Para a confirmação do grupo sanguíneo materno e paterno (se disponível), foi realizada a fenotipagem ABO/RhD pela metodologia gel teste. Para tal, foi utilizada a cartela ABO/RhD (Diamed Latino América) contendo anti-D policlonal (figura 12). Foi realizada uma suspensão de hemácias a 5% em enzima bromelina, adicionando-se 10 µL do concentrado de hemácias teste em 200 µL de solução de bromelina. Adicionou-se 10 µL dessa suspensão em cada um dos microtubos da cartela ABO/RhD, contendo anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D, anti-CDE e controle Rh. A cartela foi centrifugada a 1.000 x g por 10 minutos e então foi realizada a leitura da aglutinação obtida. Para confirmação do fenótipo RhD negativo todas as amostras maternas foram submetidas à pesquisa de D fraco pela metodologia tubo, utilizando-se soro anti-D blend (IgG + IgM – clones MS26 + TH-28) e soro da antiglobulina humana poliespecífico (Diamed Latino América). A pesquisa de D fraco em tubo consistiu na realização de uma suspensão de hemácias a 5%, adicionando-se 25 µL de concentrado de hemácias em 500 µL de solução salina (NaCl 0,9%). Em um tubo de Khan adicionou-se 50 µL de soro anti-D e em seguida 50 µL da suspensão de hemácias teste a 5% em salina. Após homogeneização, incubou-se o tubo a 37°C por 15 minutos. A seguir o tubo foi lavado três vezes com solução salina para remover o anti-D não ligado às hemácias e foi feita a adição do soro da antiglobulina humana (soro de coombs) para promover a aglutinação, caso tenha havido a ligação antígeno-anticorpo. Em paralelo, realizou-se a mesma reação utilizando-se soro controle Rh do mesmo fabricante do soro anti-D, para validar a pesquisa de D fraco. A reação foi considerada positiva se houve aglutinação no tubo contendo anti-D e ausência de aglutinação no tubo contendo soro controle Rh e negativa, se houve ausência de aglutinação em ambos os tubos.



Figura 12 – Figura representativa de uma fenotipagem RhD em cartela gel teste.

Fenotipagem RhD pela metodologia gel teste de uma amostra do grupo O RhD negativo.

4.4 Preparação das amostras

Imediatamente após a coleta de 10 mL de sangue materno em EDTA, o tubo foi centrifugado a 2.500 x g por 10 minutos. O plasma materno foi separado do concentrado de hemácias e novamente centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi distribuído em tubos eppendorf em alíquotas de 400 µL e estocado a -20°C até o momento da purificação do DNA fetal. Foi separada uma alíquota de 1 mL da camada de leucócitos para purificação de DNA materno. Em caso de coleta de amostra paterna, foi separada uma alíquota de 1 mL da camada de leucócitos para purificação do DNA paterno.

4.5 Purificação do DNA livre no plasma materno

Foram utilizados dois kits comerciais para a purificação do DNA fetal livre no plasma materno. O kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Alemanha) foi utilizado em 25 amostras e o kit Nucleo Spin Plasma XS (Marchery Nagel, Alemanha) foi utilizado em 30 amostras.

4.5.1 Purificação do DNA plasmático usando o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)

A purificação do DNA foi feita conforme as recomendações do fabricante, conforme descrito a seguir. A uma amostra de 400 µL de plasma materno acrescentou-se 40 µL de Protease Qiagen e 400 µL do Tampão AL. O tubo foi misturado em agitador e incubado à 56°C por 10 minutos. Centrifugou-se brevemente para remover as gotas na tampa do tubo e adicionou-se 400 µL de etanol (96-100%). Agitou-se por 15 segundos e centrifugou-se novamente para remover as gotas na tampa do tubo. O conteúdo do tubo foi adicionado à coluna de centrifugação contendo um tubo coletor de 2 mL. Centrifugou-se à 11.000 x g por 5 minutos e descartou-se o tubo coletor. A coluna de centrifugação foi colocada em novo tubo coletor e foram adicionados 500 µL do Tampão AW1 à coluna. Centrifugou-se como antes e descartou-se o tubo coletor. A coluna de centrifugação foi colocada em novo tubo coletor e adicionaram-se 500 µL do Tampão AW2. Centrifugou-se a 15.000 x g por 3 minutos e descartou-se o tubo coletor. A coluna de centrifugação foi colocada em um tubo de 1,5 mL limpo e adicionou-se 50 µL do Tampão AE. Incubou-se à temperatura ambiente

por 5 min. e centrifugou-se à 15.000 x g por 5 minutos. A amostra foi estocada à -20°C até o momento do uso.

4.5.2 Purificação do DNA plasmático usando o kit Nucleo Spin Plasma XS (Marchery Nagel)

A purificação do DNA foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante, conforme descrito a seguir. Uma amostra de 240 µL de plasma materno foi transferida para um tubo de 1,5 mL limpo e adicionou-se 20 µL de proteinase K. Agitou-se e incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se 360 µL do tampão BB. O tubo foi invertido três vezes, vortexado por três segundos e centrifugado brevemente para remover as gotas na tampa do tubo. O conteúdo do tubo foi adicionado à coluna de centrifugação contendo um tubo coletor de 2 mL. Centrifugou-se a 2.000 x g por 1 minuto. Centrifugou-se novamente a 11.000 x g por 1 minuto e descartou-se o tubo coletor. A coluna de centrifugação foi colocada em novo tubo coletor e foram adicionados 500 µL do Tampão de lavagem WB. Centrifugou-se a 11.000 x g por 1 minuto. A coluna de centrifugação foi colocada em novo tubo coletor e adicionaram-se 250 µL do Tampão de lavagem WB. Centrifugou-se a 11.000 x g por 3 minutos e descartou-se o tubo coletor. A coluna de centrifugação foi colocada em um tubo de 1,5 mL limpo e adicionou-se 20 µL do tampão de eluição e centrifugou-se à 11.000 x g por 1 minuto. A amostra foi estocada à -20°C até o momento do uso.

4.6 Purificação do DNA materno e paterno

Quando necessário, foi purificado o DNA materno, utilizando o kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Alemanha). A amostra de sangue total foi centrifugada à 2.500 x g por 10 minutos à temperatura ambiente para a coleta da camada intermediária (leucócitos). Foram coletados 200 µL desta camada, na qual acrescentou-se 20 µL de Protease Qiagen e 200 µL do Tampão AL. O tubo foi misturado em agitador e incubado à 56°C por 10 min. Centrifugou-se brevemente para remover as gotas na tampa do tubo e adicionou-se 200 µL de etanol (100%). Agitou-se por 15 segundos e centrifugou-se novamente para remover as gotas na tampa do tubo. O conteúdo do tubo foi adicionado à Coluna de Centrifugação com um tubo coletor de 2 mL. Centrifugou-se à 10.000 x g por 5 minutos e descartou-se o tubo coletor. A Coluna de Centrifugação foi colocada em novo tubo coletor e foram adicionados 500 µL do Tampão AW1 à coluna. Centrifugou-se como antes e descartou-se o tubo coletor. A coluna de centrifugação foi colocada em novo tubo

coletor e adicionaram-se 500 µL do Tampão AW2. Centrifugou-se a 15.000 x g por 3 minutos e descartou-se o tubo coletor. A coluna de centrifugação QIAamp foi colocada em um tubo de 1,5 mL limpo e adicionou-se 200 µL do Tampão AE para eluição do DNA. Incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugou-se à 7.000 x g por 3 minutos. Uma alíquota foi retirada para leitura da concentração do DNA em espectrofotômetro na absorvância de A260 e na absorvância de A280, para determinar o grau de pureza. A amostra foi estocada à -20°C até o momento do uso. A partir de sangue total coletado do pai, o DNA paterno foi obtido como descrito para o DNA materno.

4.7 PCR em tempo real para o gene da albumina humana

Para a confirmação da presença de DNA na amostra de DNA fetal obtida, todas as amostras foram submetidas a uma PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan para detecção do gene da albumina humana. A reação foi feita em um sistema de PCR em tempo real (modelo 7300, Applied Biosystems, EUA), utilizando-se o kit TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA). Foram utilizados 200 nM dos iniciadores ALB-F (5' – GCTCAACTCCCTATTGCTATCACA – 3') e ALB-R (5' – GGGCATGACAGGTTTTGCAATTGCAATATTA – 3'), 100 nM da sonda ALB-P marcada com FAM (5' - FAM-TTGTGGGCTGTAATCAT-MGB – 3') e 5 µL da amostra de DNA fetal, com um volume final de reação de 25 µL. Os ciclos de temperatura consistiram de uma fase inicial à 50°C por 2 minutos, e 95°C por 10 minutos, seguida por 45 ciclos à 95°C por 15 segundos e à 60°C por 1 minuto.

4.8 PCR em tempo real para o gene *RHD*

Para a determinação da presença do gene *RHD*, foi desenvolvida uma PCR em tempo real usando o sistema TaqMan para amplificação simultânea de regiões dos exons 5 e 7 do gene *RHD*, consistindo em um produto de 82pb e 75 pb, respectivamente.. As sequências dos iniciadores e sondas, suas concentrações e localizações estão descritas na tabela 5. A reação foi realizada em um sistema de PCR em tempo real (modelo 7300, Applied Biosystems, EUA) usando-se o kit TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 200 nM dos iniciadores EX5F e EX5R, 100 nM da sonda EX5P marcada com FAM para detecção do exon *RHD* 5, mais 200 nM dos iniciadores EX7F e EX7R e 100 nM da sonda EX7P marcada com VIC (tabela 5) para detecção do exon *RHD* 7, e 5 µL do DNA fetal, com um volume final da reação de 25 µL. Os ciclos de temperatura consistiram de

uma fase inicial à 50°C por 2 minutos, e à 95°C por 10 minutos, seguida por 45 ciclos à 95°C por 15 segundos e à 60°C por 1 minuto. Cada amostra foi testada em duplicata. Como controle positivo e negativo foram utilizadas amostras de DNA genômico de doadores de sangue com fenótipo RhD positivo e negativo, respectivamente, previamente genotipadas por PCR convencional, em uma concentração de 1 ng/ µL. Os resultados da PCR para *RHD* só foram considerados em amostras que apresentaram amplificação prévia do gene da albumina humana. Amostras com amplificação dos exons *RHD* com Ct superior a 42 foram consideradas negativas.

Tabela 5 - Iniciadores e sondas para PCR em tempo real para detectar o gene *RHD*.

Exon	Iniciadores e sondas	Sequência (5' – 3')
<i>RHD</i> Exon 5	EX5F	636-CGCCCTCTTCTTGTGGAT <u>G</u> -654
	EX5R	717-GAACACGGCATTCTTCCTTTC-697
	EX5P	656-FAM-TCTGGCCAAGT <u>TT</u> CAACTCTGCTCGCT-MGB-681
<i>RHD</i> Exon 7	EX7F	972-CAGCTCCATCATGGGCTACAA-992
	EX7R	1046-AGCACCAGCAGCACAATGTAGA-1025
	EX7P	997-VIC-AGCTTGCTGGGTCTGCTTGGAGAGATC-MGB-1023

Bases em negrito: distinguem *RHD* de *RHCE*.

Bases duplamente sublinhadas: distinguem *RHD* de *RHDΨ*

4.9 Critérios de interpretação da genotipagem *RHD* fetal

Foi feita uma busca na literatura da descrição de alelos *RHD* variantes, para verificar se os polimorfismos encontrados nestes alelos coincidiam com as regiões de anelamento dos iniciadores e sondas dos exons 5 e 7 utilizados na amplificação do gene *RHD*, de modo que poderiam resultar na não amplificação da região gênica testada.

As tabelas 6 e 7 mostram os alelos *RHD* variantes que possuem mutações nas regiões de anelamento dos iniciadores e sondas utilizados nesse estudo, cujo fenótipo pode ser RhD positivo ou negativo.

Tabela 6 – Alelos *RHD* variantes com mutações localizadas em regiões de anelamento dos iniciadores (EX5F: 636-654; EX5R: 697-717) e sonda (EX5P: 656-681) usados na amplificação do exon 5 do gene *RHD*.

Nome	Alelo	Mutações
D fraco tipo 4*	<i>RHD</i> (T201R,F223V)	602C>G, 667T>G, 819G>A
D fraco tipo 4.1*	<i>RHD</i> (W16C,T201R,F223V)	648G>C, 602C>G, 667T>G, 819G>A
D fraco tipo 16	<i>RHD</i> (W220R)	658T>C
D fraco tipo 27*	<i>RHD</i> (P221S)	661C>T
D categoria Va-like (YH)*	<i>RHD-CE</i> (5:F223V-V245L)	667T>G, 744C>T
D categoria V tipo VII*	<i>RHD-CE</i> (5:F223V-G263R)-D	667T>G, 787G>A
DCS*	<i>RHD-CE</i> (5:F223V-A226P)-D	667T>G, 676G>C
DVa-associado (HK)	<i>RHD</i> (E233K)	697G>A
D categoria IIIa*	<i>RHD</i> (N152T,T201R,F223V)	455A>C, 602C>G, 667T>G
D categoria Va (Kou.)*	<i>RHD-CE</i> (5:F223V-E233Q)-D	667T>G, 697G>C
D categoria Va (Hus.)*	<i>RHD-CE</i> (5)-D	667T>G, 800A>T
D categoria Va TO	<i>RHD-CE</i> (5:E233Q-V238M)-D	697 G>C, 712G>A
D categoria VI tipo IV	<i>RHD-CE</i> (2-5)-D	CDe

Nome	Alelo	Mutações
DHMii	<i>RHD-CE (3-5)-D</i>	cDE
D categoria VI tipo III	<i>RHD-CE (3-6)-D</i>	CDe
D categoria VI tipo I	<i>RHD-CE (4-5)-D</i>	cDE
D categoria VI tipo II	<i>RHD-CE (4-6)-D</i>	CDe
DCS	<i>RHD-CE (5:F223V-A226P)-D</i>	
D categoria Va (Kou.)	<i>RHD-CE (5:F223V-E233Q)-D</i>	
D categoria Va TO	<i>RHD-CE (5:E233Q-V238M)-D</i>	
D categoria Va-like (YH)	<i>RHD-CE (5:F223V-V245L)-D</i>	
D categoria Va (Hus.)	<i>RHD-CE(5)-D</i>	
R ₀ ^{Har}	<i>RHCE-D(5)-CE</i>	cDe
<i>RHD</i> pseudogene		Duplicação de 37 pb na junção intron3 / exon 4 múltiplas mutações com sentido, códon de terminação no exon 6
<i>RHD</i> (exon 5 variant)		Códon de terminação prematuro

Fonte: <http://rhesusbase.atspace.com>

Tabela 7 - Alelos *RHD* variantes com mutações localizadas em regiões de anelamento dos iniciadores (EX7F: 972-992, EX7R: 1025-1046) e sonda (EX7P: 997-1023) usados na amplificação do exon 7 do gene *RHD*.

Fenótipo RhD fraco ou parcial			
Nome	Alelo	Mutações	Tipo
D fraco tipo 7	<i>RHD</i> (G339E)	1016G>A	D fraco
D fraco tipo 24	<i>RHD</i> (L338P)	1013T>C	
D fraco tipo 30	<i>RHD</i> (E340M)	1018G>A, 1019A>T	
D categoria IV tipo III	<i>RHD-CE</i> (6-9)- <i>D</i>		Alelos híbridos
D categoria IVb (J)	<i>RHD-CE</i> (7-9)- <i>D</i>		
Fenótipo RhD negativo			
Grande híbrido	<i>RHD</i> (1-6)- <i>CE</i> (7-10)?		Alelo híbrido

Fonte: <http://rhesusbase.atspace.com>

Diante disso, se uma amostra de DNA fetal (em duplicata) apresentou amplificação de apenas um exon do gene *RHD*, o resultado foi considerado inconclusivo, pois a ausência de amplificação de um dos exons pode ser devido a diferentes polimorfismos encontrados em alelos *RHD* variantes, cujo fenótipo pode ser tanto RhD positivo (fraco ou parcial) ou RhD negativo, não sendo possível inferir qual dos dois tipos. Se, no entanto, uma amostra apresentar amplificação de um exon na duplicata e do outro exon, em apenas uma replicata, o resultado foi considerado positivo.

Em resumo, o critério de interpretação da genotipagem *RHD* fetal é mostrado na figura abaixo:

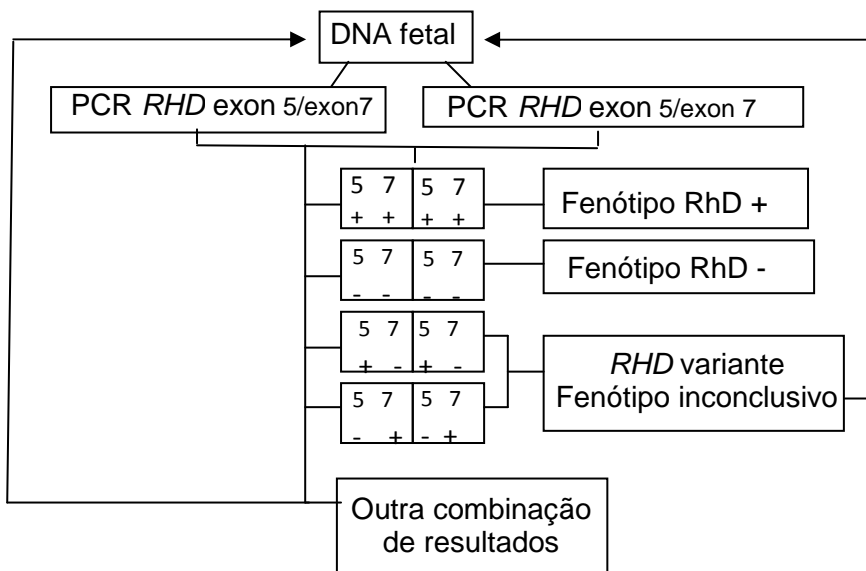


Figura 13- Critérios de interpretação dos resultados da genotipagem *RHD* fetal

Se a amostra testada em duplicata apresentar amplificação dos exons 5 e 7 do gene *RHD*, o fenótipo será considerado RhD positivo. Se não houver amplificação em ambos os exons na duplicata, o fenótipo RhD será considerado negativo. Caso ocorra amplificação em apenas um exon, o resultado será considerado inconclusivo. Se ocorrer amplificação de um exon em pelo menos uma replicata, o resultado será considerado positivo. Se qualquer outra combinação de resultados ocorrer, nova purificação de DNA fetal e nova PCR para *RHD* deverá ser realizada.

4.10 Avaliação do limite mínimo de detecção da PCR para o gene *RHD*

Para avaliar o limite mínimo de detecção do gene *RHD* na PCR em tempo real foi feita uma diluição em série (10 X) do DNA obtido a partir de sangue total de uma amostra com fenótipo RhD positivo. As quantidades de DNA avaliadas na PCR foram de 40 ng a 4 pg de DNA, equivalente ao DNA genômico de 6.500 células a 0,65 células, considerando-se que uma célula eucariótica possui 6,16 pg de DNA. A figura 14 e a tabela 8 mostram o

resultado de amplificação dessa curva padrão para os exons 5 e 7 do gene *RHD*, e as figuras 15 e 16, os valores do slope e R^2 obtidos.

Devido ao efeito estocástico, que pode acontecer para amostras com muito pouco DNA, como as representadas pelas duplicatas com 4 pg de DNA, foi considerado como 40 pg de DNA o limite mínimo de detecção para a PCR *RHD*, o que corresponde teoricamente a 13 cópias do gene *RHD* (em homozigose). Até esta concentração, a eficiência da PCR para amplificação do exon 5 e 7 do gene *RHD* foi de 109% e 107%, respectivamente, de acordo com os valores de slope encontrados (-3,12 para o exon 5 e -3,17 para o exon 7). Um slope de -3,32 compreende uma PCR com eficiência de 100%, ou seja, em que há duplicação do material alvo a cada ciclo de amplificação.

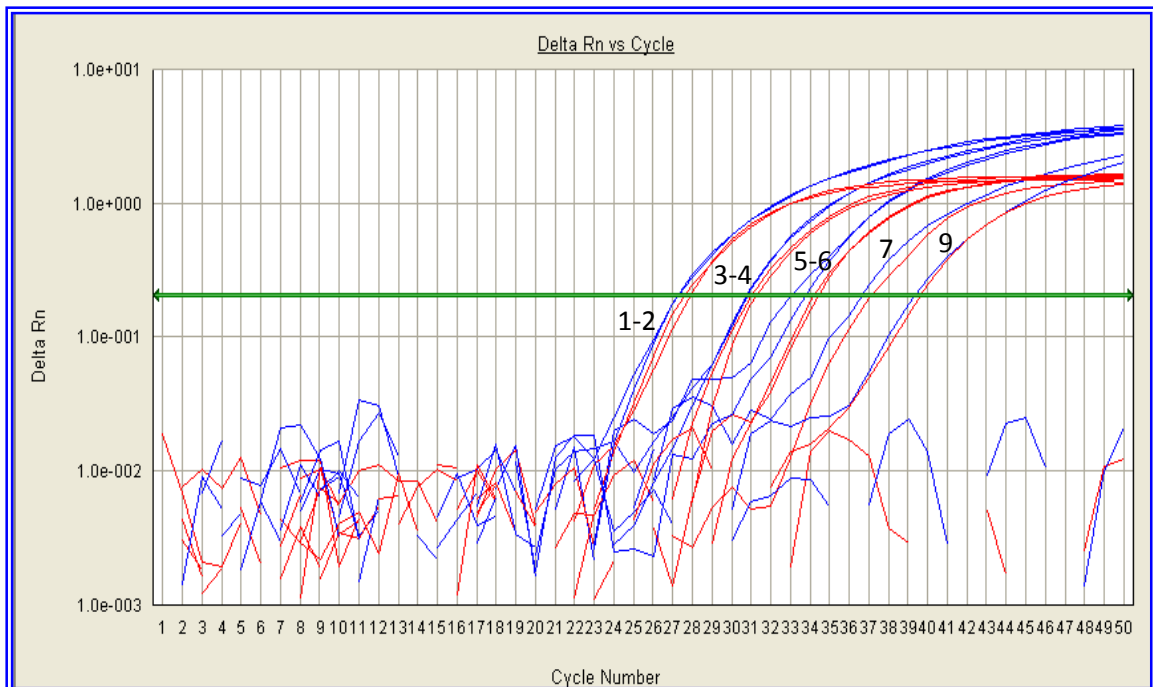


Figura 14 - Avaliação do limite mínimo de detecção do gene *RHD* na PCR em tempo real.

Amplificação do exon 5 (azul) e 7 (vermelho) do gene *RHD* de uma amostra RhD positivo em diluição seriada (40 ng, 4 ng, 400 pg, 40 pg e 4 pg de DNA). Os números 1-9 se referem aos valores de Ct para as referidas concentrações e são apresentados na tabela 8. Baseline: 3-20.

Tabela 8 - Avaliação do limite mínimo de detecção do gene *RHD* na PCR em tempo real.

DILUIÇÕES	QUANTIDADE DE DNA	GENOTIPAGEM <i>RHD</i> (Ct)	
		Exon 5	Exon 7
1	40 ng	27,52	28,06
2		27,46	27,80
3	4 ng	31,01	31,46
4		30,95	31,22
5	400 pg	33,97	34,57
6		33,32	34,37
7	40 pg	36,83	37,36
8		40,37	38,33
9	4 pg	39,54	39,83
10		-	-

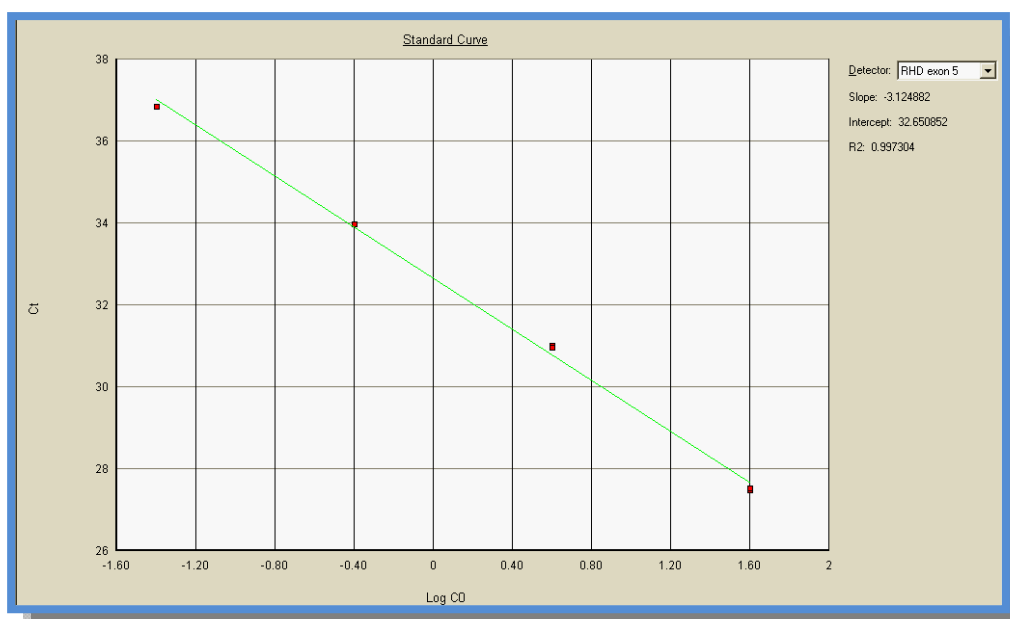


Figura 15 – Curva padrão obtida na avaliação do limite mínimo de detecção do gene *RHD* (exon 5) na PCR em tempo real.

Para avaliação da eficiência da PCR foram utilizadas as quatro primeiras diluições (40 ng a 40 pg) de DNA de uma amostra RhD positivo. O slope encontrado foi de -3,125 e o R^2 foi de 0,997.

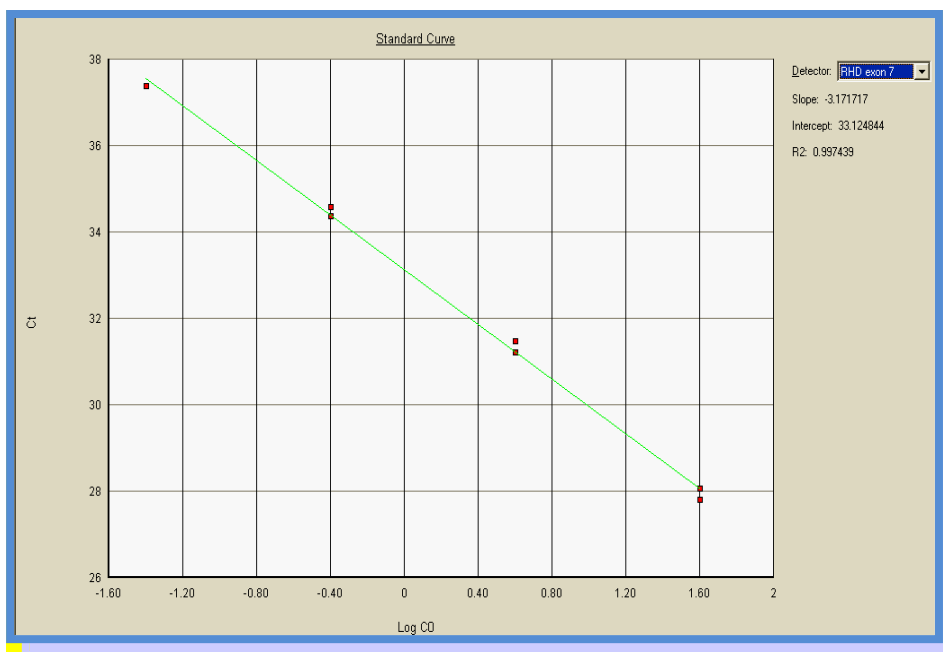


Figura 16 – Curva padrão obtida na avaliação do limite mínimo de detecção do gene *RHD* (exon 7) na PCR em tempo real.

Para avaliação da eficiência da PCR foram utilizadas as quatro primeiras diluições (40 ng a 40 pg) de DNA de uma amostra RhD positivo. O slope foi de -3,172 e o R^2 de 0,997.

4.11 PCR em tempo real para detecção do gene *SRY*

Para confirmação da recuperação de DNA fetal a partir do plasma materno, foi desenvolvida uma PCR em tempo real usando o sistema TaqMan, para detecção do gene *SRY*, presente em fetos masculinos. A reação foi feita em um sistema de PCR em tempo real (modelo 7300, Applied Biosystems, EUA), utilizando-se o kit TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA). Foram utilizados 200 nM dos iniciadores *SRY-F* (5'-TCCTCAAAGAAACCGTGCAT-3') e *SRY-R* (5'-AGATTAATGGTTGCTAAGGACTGGAT-3'), 100 nM da sonda *SRY-P* marcada com FAM (5'-FAM-CACCAGCAGTAACTCCCCACAACCTCTTT-MGB-3'), cujo produto final consistiu de 78 pb, e 5 µL da amostra de DNA fetal, com um volume final de reação de 25 µL. Os ciclos de temperatura consistiram de uma fase inicial à 50°C por 2 minutos e à 95°C por 10 minutos, seguida por 45 ciclos à 95°C por 15 segundos e à 60°C por 1 minuto. Amostras com Ct superior a 45 foram consideradas negativas.

4.12 Avaliação do limite mínimo de detecção do gene *SRY* na PCR em tempo real

Para se avaliar o limite mínimo de detecção do gene *SRY* na PCR em tempo real foi feita uma diluição em série (10 X) do DNA obtido a partir de sangue total de um indivíduo do sexo masculino. As quantidades de DNA avaliadas na PCR foram de 40 ng a 4 pg. A figura 17 e a tabela 9 mostram o resultado de amplificação dessa curva padrão para o gene *SRY*, e a figura 18, os valores do slope (-3,41) e R^2 (0,997) obtidos.

O limite mínimo de detecção do gene *SRY* considerado para esta PCR foi de 400 pg, devido ao efeito estocástico observado nas duplicatas com 40 pg de DNA. Até a concentração de 400 pg, a eficiência da PCR para amplificação do gene *SRY* foi de 96%, de acordo com o valor de slope encontrado (-3,41).

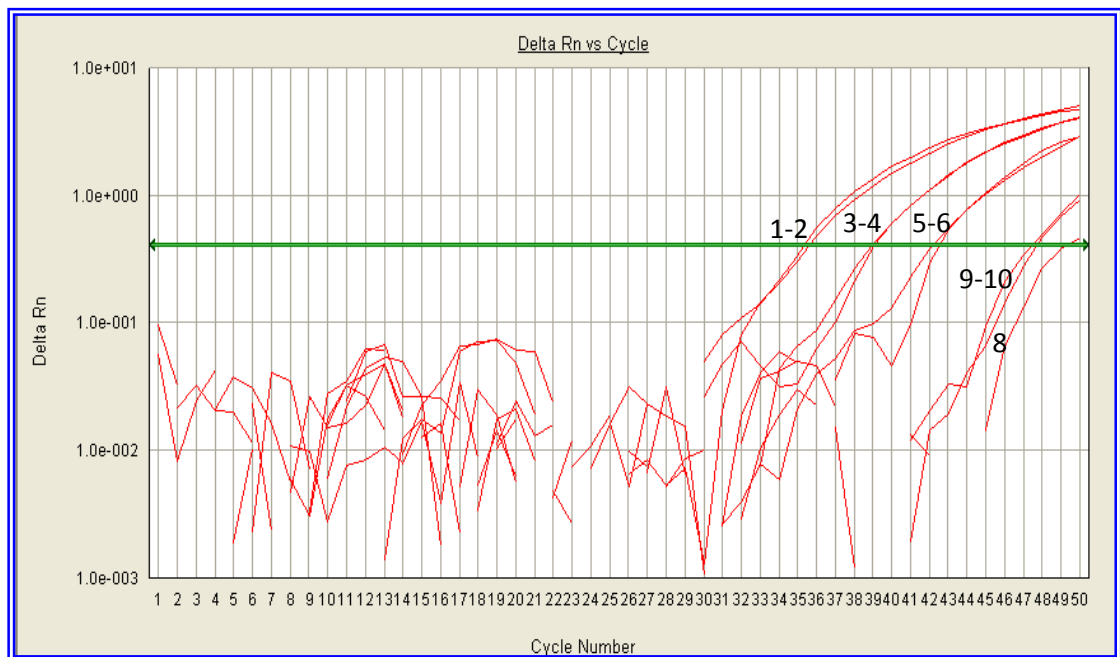


Figura 17- Avaliação do limite mínimo de detecção do gene *SRY* na PCR em tempo real.

Amplificação do gene *SRY* de amostras de DNA em diluição seriada (40 ng, 4 ng, 400 pg, 40 pg e 4 pg) de um indivíduo do sexo masculino. Os números 1-10 se referem aos valores de Ct para as referidas concentrações e são apresentados na tabela 9. Baseline: 3-30.

Tabela 9 - Avaliação do limite mínimo de detecção do gene SRY na PCR em tempo real.

DILUIÇÕES	QUANTIDADE DE	PCR SRY (Ct)
1	40 ng	35,49
2		35,27
3	4 ng	38,97
4		38,80
5	400 pg	42,08
6		42,38
7	40 pg	-
8		49,12
9	4 pg	47,30
10		47,62

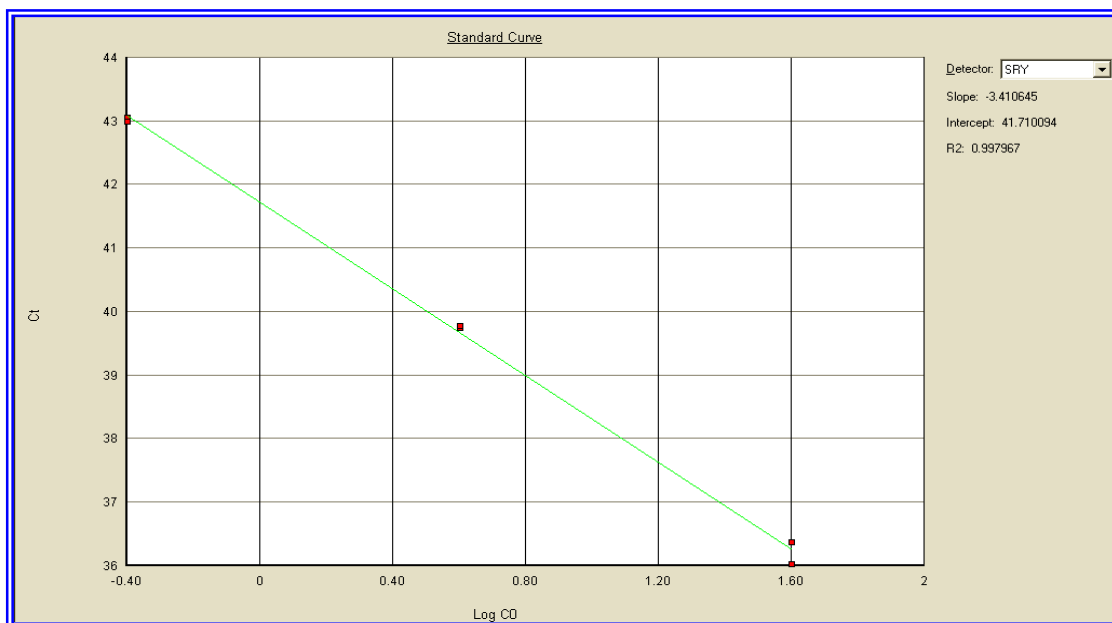


Figura 18 – Curva padrão obtida na avaliação do limite mínimo de detecção do gene SRY na PCR em tempo real.

Para avaliação da eficiência da PCR foram utilizadas as três primeiras diluições (40 ng a 400 pg) de DNA de uma amostra de um indivíduo do sexo masculino. O slope encontrado foi de -3,41 e o R^2 foi de 0,997.

4.13 PCR para determinação da zigozidade *RHD* em amostras paternas

Para a determinação da zigozidade *RHD* de amostras paternas, foi realizada uma PCR convencional, usando os iniciadores específicos para detecção da *Rhesus box* híbrida, descritos por Perco e colaboradores (2003). Para a PCR, foram usados 100 ng de DNA genômico como molde numa reação de 20 µL contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 3,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, EUA), e 500 nM dos iniciadores rnb31 (5'-GTTTTTTTGTGGCGGTGC-3') e u1-s (5'-TGAGCCTATAAAATCCAAAGCAAGTTAG-3'). A reação foi realizada em termociclador (PTC-100 MJ Research, USA ou Gradient Thermal Cycler- Biocycler, Reino Unido) usando-se uma fase inicial de desnaturação à 95°C por 10 min., seguindo-se 40 ciclos à 95°C por 20 seg., 64°C por 30 seg., e 68°C por 5 min, com uma fase de extensão final de 72°C por 5 min. O produto da amplificação da PCR (2.778 pb) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, em solução-tampão eletrolítica TAE 1X (40 mM Tris base, 1 mM EDTA e 0,11 mL ácido acético), à uma voltagem de 80V durante 2 h. O gel foi visualizado por coloração com Brometo de Etídeo (10 µg/mL), sob luz ultravioleta no aparelho Image Master VDC (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia).

4.14 PCR multiplex para genotipagem *RHD* de amostras maternas e paternas

Quando necessário, foi realizada a genotipagem *RHD* materna e/ou paterna para verificar se era possível interpretar o resultado da genotipagem *RHD* fetal, quando esta foi inconclusiva (amplificação de apenas um exon do gene *RHD*). Para tal, foi realizada uma PCR multiplex para detecção dos exons 3, 4, 5, 7 e 9 do gene *RHD*, permitindo a detecção de amostras D variantes (MARTINS et al., 2009). A amplificação do gene *RHD* foi realizada utilizando-se 100 ng de DNA genômico em uma reação de 25 µL contendo 1X QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN Multiplex PCR Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) e 2 µM de cada iniciador (Tabela 10) (MAASKANT-VHAN, 1998; SINGLETON et al., 2000). A PCR foi feita em termociclador (Modelo PTC 100, MJ Research, Watertown, USA), nas seguintes condições de temperatura: uma fase inicial a 95°C por 15 min, seguida por 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 90 seg e 72°C por 90 seg, com uma fase de extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, em TBE 1X (45 mM Tris base, 1 mM EDTA e 55,6 mM ácido bórico)

à 80 V por 2 h e 30 min. O gel foi visualizado por coloração com Brometo de Etídeo (10µg/mL), sob luz ultravioleta no aparelho Image Master VDC System (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia).

A fim de evitar resultados falso-positivos para o gene *RHD*, foi também realizada a PCR para a identificação do pseudogene *RHD*. Para essa PCR, 100 ng de DNA genômico foram usados como molde numa reação de 20 µL contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 0.5 U Taq DNA Polimerase (Invitrogen, EUA), e 8 pmol dos iniciadores RHDi3F (5'-GTGAACCTGGGAGGCAAATG-3') e RHDψ4R (5'-AATAAAACCCAGTAAGTTCATGTGG - 3'). A reação foi realizada em termociclador (PTC-100 MJ Research e Gradient Thermal Cycler - Biocycler) usando-se uma fase inicial de desnaturação à 94°C por 5 min., seguindo-se 30 ciclos à 94°C por 45 seg., 58°C por 1 min., e 72°C por 1, com uma fase de extensão final de 72°C por 7 min. O produto da amplificação da PCR para gene *RHDψ* foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, em solução-tampão eletrolítica TAE 1X (40 mM Tris base, 1 mM EDTA e 0,11 mL ácido acético), à uma voltagem de 55V durante 1 h. O gel foi visualizado por coloração com Brometo de Etídeo (10 µg/mL), sob luz ultravioleta no aparelho Image Master VDC System (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia).

Tabela 10 - Iniciadores usados na PCR multiplex para detectar os exons 3, 4, 5, 7 e 9 do gene *RHD*.

Exon	Iniciadores	Sequência (5' – 3')	Posição	Tamanho do produto
3	R364	TCGGTGCTGATCTCAGTGGA	364-383	111 pb
	R474M	ACTGATGACCATCCTCAI GT	455-474	
4	R496	CACATGAACATGATGCACA	496-514	126 pb
	R621	CAAACCTGGGTATCGTTGCTG	602-621	
5	R648	GTGGATGTTCTGGCCAAGTT	648-667	157 pb
	Rex5AD2	cacCTTGCTGATCTTACC	787-801	

Exon	Iniciadores	Sequência (5' – 3')	Posição	Tamanho do produto
7	R973	AGCTCCATCATGGGCTACAA	973-992	96 pb
	R1068	ATTGCCGGCTCCGACGGTATC	1048-1068	
9	Rex9SD2	AACAGGT TTG CTC CTA AAT <u>ATT</u>	1154-1170	71 pb
	R1219M	AAACTTGGTCATCAAAATATTTA <u>ACCT</u>	1193-1219	

Bases em negrito: específicas de *RHD*
Bases sublinhadas (mismatched bases): usadas para aumentar a especificidade do iniciador.

4.15 – Análise da performance da PCR em tempo real para a genotipagem *RHD* fetal e para a detecção do gene *SRY*

Por comparação dos resultados conclusivos da genotipagem *RHD* fetal com os resultados do fenótipo RhD dos recém-nascidos, foi feita a determinação da sensibilidade, especificidade, acurácia do teste, valor preditivo negativo e valor preditivo positivo. A mesma análise foi feita para o teste da PCR para o gene *SRY*, comparando-se o resultado da PCR com o sexo do recém-nascido.

Sensibilidade = Total de resultados positivos na genotipagem *RHD* / total de recém-nascidos com fenótipo RhD positivo x 100.

Especificidade = Total de resultados negativos na genotipagem *RHD* / total de recém-nascidos com fenótipo RhD negativo x 100.

Acurácia do teste = Total de resultados da genotipagem *RHD* fetal concordantes com o resultado do fenótipo RhD do recém-nascido / total de resultados comparados x 100.

Valor preditivo positivo = Total de recém-nascidos RhD positivo com resultado positivo na genotipagem *RHD* / total de resultados positivos na genotipagem *RHD* fetal x 100

Valor preditivo negativo = Total de recém-nascidos RhD negativo com resultado negativo na genotipagem *RHD* / total de resultados negativos na genotipagem *RHD* fetal x 100.

5 Resultados

5.1 Características gerais da população de estudo

Foram obtidas amostras de plasma de 55 gestantes RhD negativo com idade gestacional média de 27 semanas. A idade gestacional mínima foi de 12 semanas e a máxima foi de 39 semanas.

A idade média das gestantes participantes do estudo foi de 30 anos, com a idade mínima de 20 anos e a máxima de 42 anos. A paridade média das gestantes foi de duas, sendo que o número máximo foi de nove. Um total de 16 (29%) gestantes estavam na primeira gestação, a mesma quantidade na segunda, 8 (15%) na terceira e as 15 (29%) restantes estavam na quarta gestação ou mais.

Vinte e oito (51%) gestantes eram aloimunizadas. Conforme mostrado na figura 19, o aloanticorpo mais frequente foi o anti-D, presente em 79% dos casos. O anti-C foi o segundo aloanticorpo mais frequente, produzido por 43% das gestantes aloimunizadas, sendo que em todos os casos estava acompanhado do anti-D. Os outros aloanticorpos encontrados foram o anti-E, o anti-M, o anti-Le^b e o anti-Di^a, todos com 7% de frequência. O anti-K e o anti-S foram os menos frequentes (4% cada).

Das 39 (71%) gestantes com mais de uma gestação, 20 (51%) já tiveram história de aborto. Destas, oito (40%) tinham o coombs indireto para pesquisa de anticorpos irregulares negativo. Todavia, 12 (60%) tinham o coombs indireto positivo, sendo que em 10 (83%) o anti-D estava presente, em uma (8,5%) o anti-S e em outra (8,5%) o anti-Le^b (figura 20).

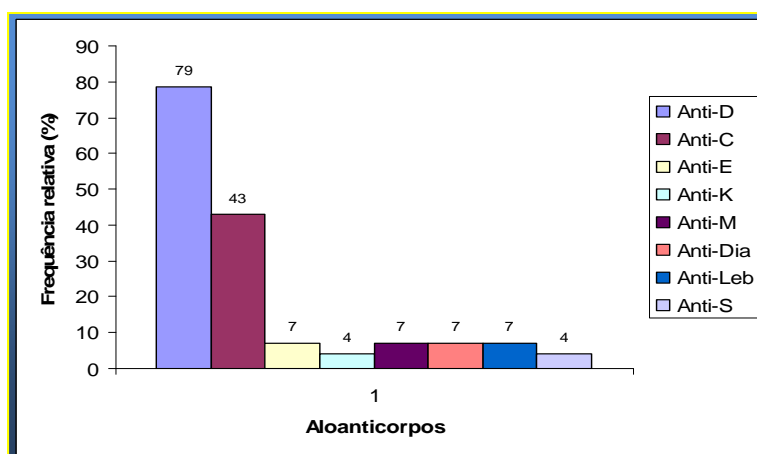


Figura 19 – Frequência de aloanticorpos produzidos por gestantes RhD negativo aloimunizadas.

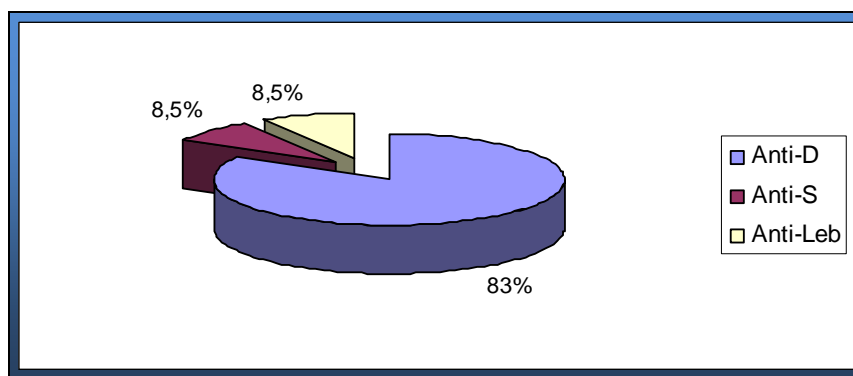


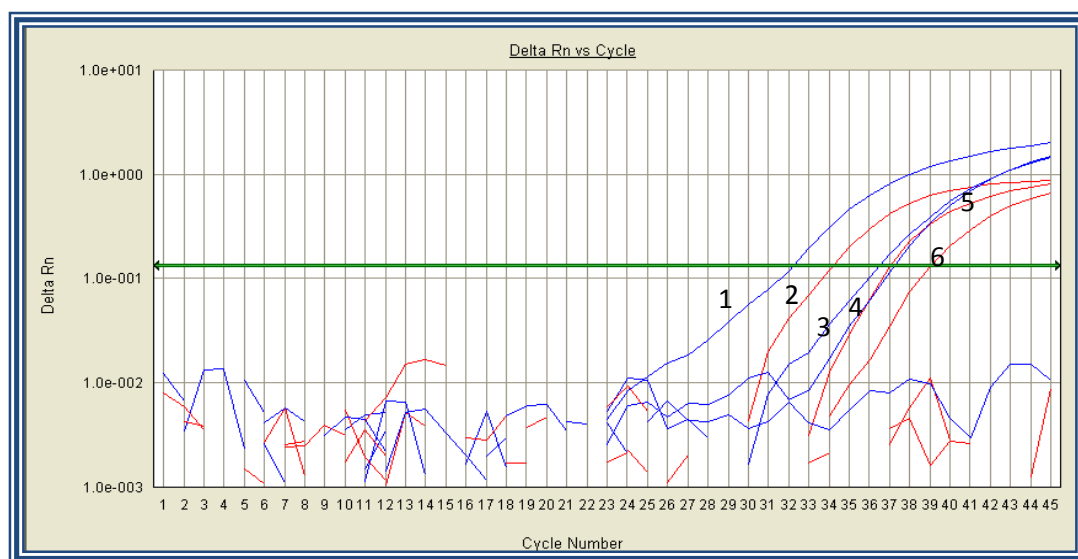
Figura 20 – Frequência de aloanticorpos produzidos por gestantes RhD negativo com histórico de aborto.

5.2 Resultados da PCR em tempo real para o gene *RHD* e comparação com o fenótipo RhD dos recém-nascidos

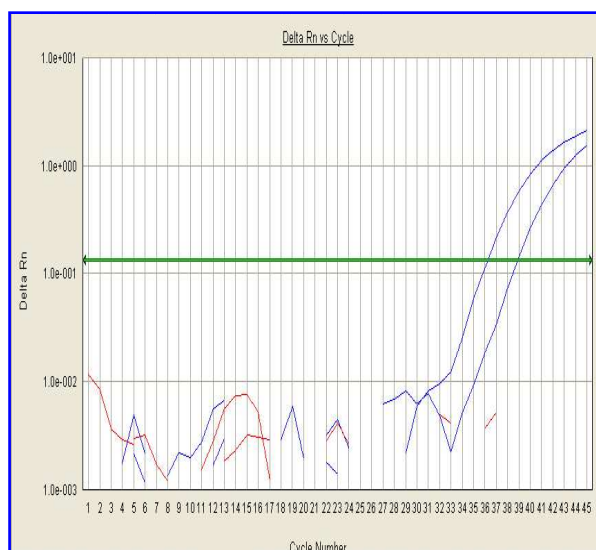
Foi realizada PCR em tempo real para genotipagem *RHD* das amostras de DNA fetal obtido a partir do plasma materno (figura 21). Os resultados só foram considerados se a amostra mostrou amplificação para o gene albumina humana (figura 22). Das 55 amostras de DNA fetal genotipadas para o gene *RHD*, 32 (64%) foram *RHD* positivas, 18 (36%) foram *RHD* negativas e cinco (9,1%) foram inconclusivas, devido à amplificação de apenas um exon do gene *RHD* (quatro amostras amplificaram apenas o exon 7, e uma amostra apenas o exon 5).

Sete (12,7%) das 55 amostras genotipadas não puderam ter os resultados da genotipagem comparados com o fenótipo RhD dos recém-nascidos, pois em cinco casos (9,1%) não foi possível obter a informação do fenótipo (não houve seguimento de caso) e em dois casos (3,6%) houve interrupção da gestação, não sendo realizada a fenotipagem RhD do concepto. Sete (12,7%) das 55 amostras genotipadas não puderam ter os resultados da genotipagem comparados com o fenótipo RhD dos recém-nascidos, pois em cinco casos (9,1%) não foi possível obter a informação do fenótipo (não houve seguimento de caso) e em dois casos (3,6%) houve interrupção da gestação, não sendo realizada a fenotipagem RhD do concepto. Considerando-se ainda que cinco (9,09%) amostras tiveram resultado inconclusivo, apenas 43 amostras puderam ter o resultado da genotipagem *RHD* fetal com o fenótipo RhD do recém-nascido.

(A)



(B)



(C)

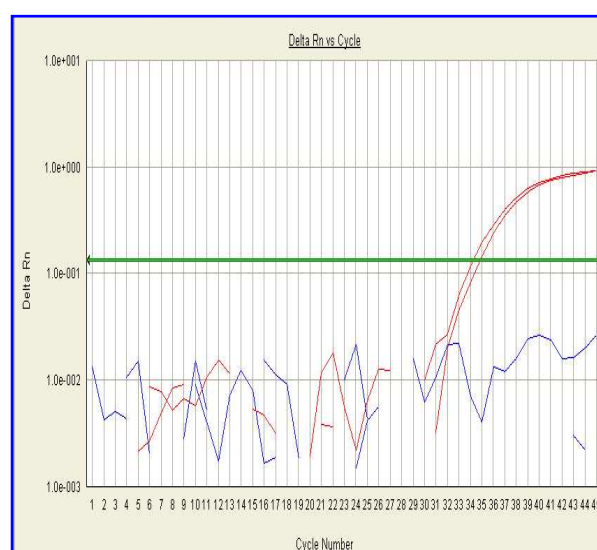


Figura 21- PCR em tempo real para o gene *RHD*.

Figura representativa de um teste de PCR em tempo real para detecção dos exons 5 (azul) e 7 (vermelho) do gene *RHD* em amostras de DNA fetal obtido a partir do plasma materno. (A) Teste de uma amostra de DNA fetal em duplicata, mostrando amplificação dos dois exons (curvas 3, 4, 5 e 6). As curvas 1 e 2 representam a amplificação do controle positivo (DNA de sangue total de um indivíduo RhD positivo). Como controle negativo foi utilizado DNA de sangue total de um indivíduo RhD negativo, além do controle do mix (sem adição de DNA). (B) Amostra de DNA fetal, que mostrou amplificação apenas para o exon 5. (C) Amostra de DNA fetal, que mostrou amplificação apenas para o exon 7.

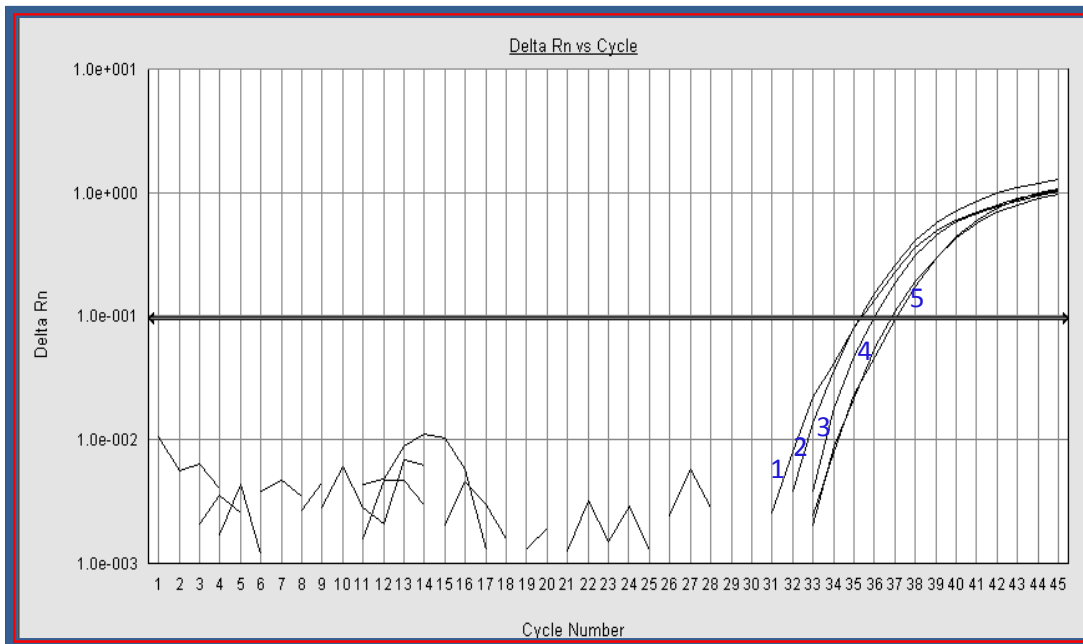


Figura 22- PCR em tempo real para o gene da albumina humana.

Figura representativa de um teste de PCR em tempo real para detecção do gene da albumina humana em amostras de DNA fetal obtido a partir do plasma materno, para comprovar a recuperação de DNA. As curvas 3, 4 e 5 se referem a 03 amostras de DNA fetal, mostrando a amplificação do gene. As curvas 1 e 2 se referem aos dois controles positivos (DNA de sangue total de um indivíduo RhD positivo e de um RhD negativo, usados como controles na PCR para o gene *RHD*). Mix sem amostra de DNA foi usado como controle negativo.

Tabela 11 – Resultados da PCR *RHD* fetal e comparação com o fenótipo RhD dos recém-nascidos.

Amostra	Replicatas				Fenótipo RhD inferido do genótipo	Fenótipo RhD dos recém-nascidos
	Exons <i>RHD</i>					
	5	7	5	7		
1	-	-	-	-	Negativo	Negativo
2	+	+	+	+	Positivo	Não houve seguimento de caso
3	+	+	+	+	Positivo	Não houve seguimento de caso
4	+	+	+	+	Positivo	Positivo
5	+	-	-	-	Negativo	Negativo
6	+	+	+	+	Positivo	Positivo
7	+	+	+	+	Positivo	Positivo
8	+	+	+	+	Positivo	Positivo
9	-	-	-	-	Negativo	Negativo
10	-	+	+	+	Positivo	Positivo
11	-	-	-	-	Negativo	Negativo
12	-	-	-	-	Negativo	Negativo
13	-	-	-	-	Negativo	Negativo
14	-	-	-	-	Negativo	Não houve seguimento de caso

Amostra	Replicatas				Fenótipo RhD inferido do genótipo	Fenótipo RhD dos recém-nascidos
	Exons <i>RHD</i>					
	5	7	5	7		
15	+	+	+	+	Positivo	Positivo
16	+	+	+	+	Positivo	Positivo
17	-	-	-	-	Negativo	Negativo
18	+	+	+	+	Positivo	Positivo
19	+	+	+	+	Positivo	Positivo
20	-	-	-	-	Negativo	Negativo
21	+	+	+	+	Positivo	Positivo
22	+	+	+	+	Positivo	Positivo
23	-	-	-	-	Negativo	Negativo
24	-	+	-	+	Inconclusivo	Positivo
25	+	+	+	+	Positivo	Positivo
26	+	-	+	-	Inconclusivo	Positivo
27	-	+	-	+	Inconclusivo	Negativo
28	-	-	-	-	Negativo	Negativo
29	+	+	+	+	Positivo	Positivo
30	+	+	+	+	Positivo	Positivo
31	-	-	-	-	Negativo	Negativo
32	+	+	+	+	Positivo	Positivo
33	+	+	+	+	Positivo	Positivo
34	+	+	+	-	Positivo	Positivo

Amostra	Replicatas				Fenótipo RhD inferido do genótipo	Fenótipo RhD dos recém-nascidos
	Exons <i>RHD</i>					
	5	7	5	7		
35	+	+	+	-	Positivo	Positivo
36	+	+	+	+	Positivo	Positivo
37	+	+	+	+	Positivo	Gestação interrompida
38	+	+	+	+	Positivo	Positivo
39	+	+	+	+	Positivo	Positivo
40	+	+	+	+	Positivo	Positivo
41	-	-	-	-	Negativo	Negativo
42	-	-	-	-	Negativo	Negativo
43	-	-	-	-	Negativo	Negativo
44	+	+	+	-	Positivo	Positivo
45	-	+	-	+	Inconclusivo	Positivo
46	+	+	+	+	Positivo	Positivo
47	+	+	-	+	Positivo	Não houve seguimento de caso
48	+	+	+	+	Positivo	Negativo*
49	+	+	+	+	Positivo	Positivo
50	+	+	+	+	Positivo	Positivo
51	-	-	-	-	Negativo	Negativo
52	-	+	-	+	Inconclusivo	Positivo

Amostra	Replicatas				Fenótipo RhD inferido do genótipo	Fenótipo RhD dos recém-nascidos
	Exons <i>RHD</i>					
	5	7	5	7		
53	+	+	+	+	Positivo	Gestação interrompida
54	-	-	-	-	Negativo	Não houve seguimento de caso
55	+	+	+	+	Positivo	Positivo
NI(37): O fenótipo RhD não consta na documentação do recém-nascido.						
* (48): A análise do DNA da mucosa bucal do recém-nascido confirmou o resultado do genótipo fetal <i>como RHD</i> positivo.						

A análise dos resultados da genotipagem *RHD* fetal apresentados na tabela 11 mostra que dos 43 resultados que puderam ser comparados, 42 (97,7%) foram concordantes com os fenótipos RhD dos recém-nascidos e um foi discordante (tabela 12). Para esse caso foi coletada amostra da mucosa bucal do recém-nascido e o DNA coletado foi submetido à PCR para *RHD*. O resultado da genotipagem *RHD* do recém-nascido também foi positivo, indicando que provavelmente houve erro na fenotipagem RhD do recém-nascido. Desta forma, se for considerado o resultado da genotipagem *RHD* fetal a partir de DNA da mucosa bucal do recém-nascido, obtém-se 100% de concordância entre os resultados da genotipagem e do fenótipo do RN.

Tabela 12 – Resultados da genotipagem *RHD* fetal utilizando PCR em tempo real e comparação com o fenótipo do recém-nascido.

	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Resultados que puderam ser comparados com o fenótipo do recém-nascido	43	100,0

Resultados concordantes entre a genotipagem <i>RHD</i> fetal e a fenotipagem RhD do recém-nascido	42*	97,7*
Resultados discordantes entre a genotipagem <i>RHD</i> fetal e a fenotipagem RhD do recém-nascido	1*	2,3*

* Se for considerado como correto o resultado da fenotipagem RhD do recém-nascido da mãe nº 48 (Tabela 11) .

Conforme a tabela 13, a sensibilidade do teste de genotipagem *RHD* fetal foi de 100% e a especificidade foi de 94,1%, se for considerado como correto o fenótipo do único resultado discordante (recém-nascido da mãe nº 48). Se for considerado como verdadeiro o resultado da genotipagem *RHD* do recém-nascido a partir de seu DNA obtido da mucosa bucal, a especificidade do teste molecular foi de 100%, assim como a acurácia e os valores preditivos positivo e negativo.

Tabela 13 - Cálculo da sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da genotipagem *RHD* fetal em relação ao fenótipo do recém-nascido.

Fenotipagem RhD dos recém-nascidos			
Genotipagem <i>RHD</i>	Positivo	Negativo	Total
Positivo	26	1*	27
Negativo	0	16	16
Total	26	17	43
Sensibilidade: 100%			
Especificidade: 94,1%* / 100% **			
Acurácia do teste: 97,7%* / 100%**			
Valor preditivo positivo: 96,3%* / 100%**			
Valor preditivo negativo: 100%			
* Se for considerado que o resultado da fenotipagem RhD do recém-nascido da mãe nº 48			

ao nascimento está correto.

** Se for considerado que o resultado da fenotipagem RhD do recém-nascido da mãe nº 48 ao nascimento está incorreto.

5.3 Resultados das PCR convencional multiplex para o gene *RHD* em amostras materna e paterna (se disponível) realizadas para os casos inconclusivos na genotipagem *RHD* fetal

Para tentar inferir o fenótipo RhD fetal em cinco casos com genotipagem *RHD* inconclusiva, em que houve amplificação de apenas um dos exons do gene *RHD* analisados, foi feita uma PCR multiplex (figura 23) que amplifica cinco regiões do gene *RHD* (exons 3, 4, 5, 7 e 9), a partir do DNA de sangue total obtido das amostras maternas e paternas (quando disponível). Também foi feita, para dois casos, uma PCR convencional específica para o gene *RHD Ψ* , uma vez que na genotipagem *RHD* fetal utilizada nesse estudo, a amplificação do exon 7, com ausência de amplificação do exon 5, pode ser resultante da presença do alelo *RHD Ψ* .

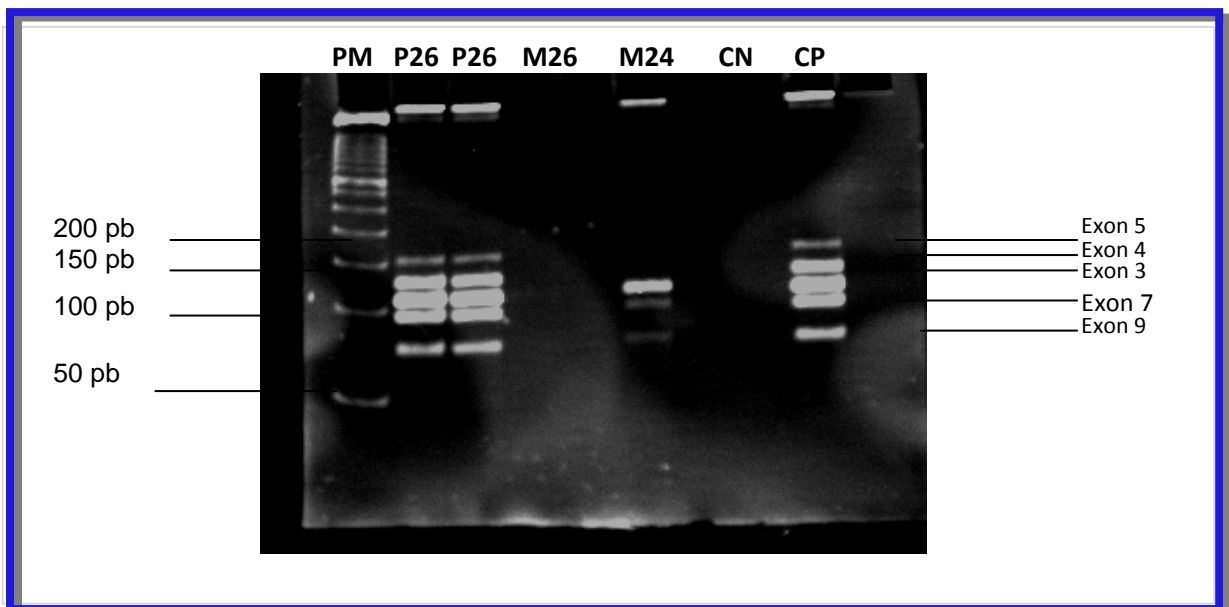


Figura 23 – Genotipagem *RHD* materna e paterna por PCR convencional.

PCR multiplex para amplificação dos exons 3, 4, 5, 7 e 9 do gene *RHD*. A figura mostra uma eletroforese em gel de poliacrilamida corado com brometo de etídeo dos produtos da PCR. P26: Amostra paterna com amplificação de todos os exons. M26: amostra materna

com ausência de amplificação. M24: amostra materna com amplificação para os exons 3, 7 e 9. CN: controle negativo. CP: controle positivo. PM: 50 pb DNA ladder (Invitrogen).

Dos cinco resultados da genotipagem *RHD* fetal inconclusivos, quatro apresentaram fenótipo RhD positivo, e um, fenótipo RhD negativo, quando tipados ao nascimento. O único caso *RHD* fetal inconclusivo pela amplificação apenas do exon 5 do gene *RHD*, apresentou fenótipo RhD positivo. Todos os outros casos com genotipagem inconclusiva apresentaram amplificação apenas do exon 7.

A tabela 14 apresenta os resultados das PCR para os genes *RHD* e *RHDΨ* das amostras maternas e paternas testadas. Para a amostra nº 24, o resultado da genotipagem *RHD* materna foi concordante com a presença do alelo *RHDΨ*, já que não houve amplificação dos exons 4 e 5 do gene *RHD* na PCR multiplex (figura 23). Para a amostra nº 26, o resultado da genotipagem materna demonstrou que o fenótipo RhD negativo materno se deve à deleção do gene *RHD*. Todavia, a amostra paterna apresentou amplificação de todos os exons *RHD* testados pela PCR *RHD* convencional (figura 23). Para a amostra nº 27 houve amplificação apenas do exon 3 do gene *RHD* na amostra materna, com a presença do alelo *RHDΨ*. As amostras nº 45 e 52 mostraram que o fenótipo RhD negativo materno se deve à deleção do gene *RHD*. Para os casos nº 24, 27, 45 e 52 não foram disponibilizadas amostras de DNA paterno.

Tabela 14- Resultado das genotipagens *RHD* materna e paterna (quando disponível) realizadas nos casos inconclusivos de genotipagem *RHD* fetal.

Amostra	Genotipagem <i>RHD</i> fetal		Fenótipo RhD do recém-nascido	Genotipagem <i>RHD</i> materna						Genotipagem <i>RHD</i> paterna					
	Exon 5	Exon 7		Exons						Exons					
				3	4	5	7	9	Ψ	3	4	5	7	9	Ψ
24	-	+	Positivo	+	-	-	+	+	+	Não realizada					
26	+	-	Positivo	-	-	-	-	-	N R	+	+	+	+	+	-
27	-	+	Negativo	+	-	-	-	-	+	Não realizada					

45	-	+	Positivo	-	-	-	-	-	N R	Não realizada
52	-	+	Positivo	-	-	-	-	-	N R	Não realizada

NR: Não realizada

Para o único caso inconclusivo em que foi possível genotipar tanto a amostra materna quanto a paterna, os resultados não ajudaram a inferir o fenótipo do recém-nascido. Assim, à despeito da genotipagem das amostras maternas e paternas, não foi possível inferir o fenótipo do recém-nascido com genotipagem *RHD* fetal inconclusiva. A descrição de alelos *RHD* variantes que implicam em fenótipos RhD positivo ou negativo e a diferença das regiões de anelamento dos iniciadores e sondas usadas na genotipagem *RHD* fetal em comparação aos iniciadores utilizados na PCR multiplex do gene *RHD* (tabela 15) inviabilizam a inferência do fenótipo fetal através da análise das amostras parentais, uma vez que um mesmo polimorfismo pode impedir a amplificação de um exon numa PCR, mas não na outra.

Tabela 15 – Localização dos iniciadores dos exons 5 e 7 na PCR convencional e em tempo real para o gene *RHD*, incluindo a sonda.

<i>RHD</i> EXON 5	
PCR <i>RHD</i> em tempo real (82 pb) EX5F (636-654) EX5P (656-681) EX5R (697-717)	PCR <i>RHD</i> convencional (157 pb): R648 (648-667) Rex5AD2 (787-801)
<p>gtaaaatgtggttagctggtatcagcttgagagctcggaggggagacgtgactccccatctaactctaagtgacaaggctgaga ctctccagccctaggattctcatcaaaaaccctcgaggctcagaccttggagcaggagtgtgattctggccaaccaccctctcg gccccag</p> <p>GCGCCCTCTTCTTGATGTTCTGGCCAAGTTTCAACTCTGCTCTGCTGAGAAGTCC</p> <p>AATCGAAAGGAAGAATGCCGTGTTCAACACCTACTATGCTGTAGCAGTCAGCGTGGT</p> <p>GACAGCCATCTCAGGGTCATCCTTGGCTCACCCCAAGGGAAGATCAGCAAG</p> <p>gtgagcagggcgctgccctggcagcactgggttaacaggactagcacacatattatgccctccccacccaggccagcgtgggtg ggagagggcatgccgggtggagctgcctgcctctacagtggagctctaggtagaatgctgggtgtcacagtggcctggga</p>	
<i>RHD</i> EXON 7	
PCR <i>RHD</i> em tempo real (75 pb) EX7F (972-992) EX7P (997-1023) EX7R (1025-1046)	PCR <i>RHD</i> convencional (96 pb): R973 (973-992) R1068 (1048-1068)

```

tcattcaacaaactccccgatgatgtgagtgacattcaagctgagaagggctctttgaggtgagccttagtgccatccccctt
ggtggccccggataccaaggggtgtgaaaggggtggtagggaatatgggtctcacctgccaatctgctataataacactgtc
cacag
GGGTGTTGTAACCGAGTGCTGGGGATTCCCCACAGCTCCATCATGGGCTACAACTTCA
GCTTGCTGGGTCTGCTTGGAGAGATCAATCTACATTGTGCTGCTGGTCTTGATACCGT
CGGAGCCGGCAATGGCAT
gtgggtcactgggctacccccatccccttaacactcccctccaactcaggaagaaatgtgtgcagagtccttagctggggcgtg
gcactcggggccaggtgctcagtaggctcgggtgaatattgtggctgattattcagaaattctgcccagcccctacctggatgat
tta

```

5.4 Resultados da PCR em tempo real para o gene *SRY* e comparação com o sexo dos recém-nascidos

Das 47 genotipagens fetais realizadas para o gene *SRY*, 19 (40,4%) foram positivas e 28 (59,6%) foram negativas (tabela 16). Quatro (8,5%) das amostras genotipadas não puderam ter os resultados comparados com o sexo do recém-nascido, pois em três (6,4%) casos não foi possível obter a informação do recém-nascido e em um (2,1%) caso, devido à uma má-formação congênita, o sexo do recém-nascido não pôde ser determinado. Sendo assim, apenas 43 resultados da genotipagem *SRY* puderam ser comparados com o sexo dos recém-nascidos (tabela 17) e utilizados para o cálculo da sensibilidade, especificidade e acurácia do teste molecular. Destes, 42 (97,7%) foram concordantes com o sexo do recém-nascido e um (2,3%) foi discordante (amostra 40).

Tabela 16 - Resultados da PCR *SRY* fetal e comparação com o sexo dos recém-nascidos.

Amostra	<i>SRY</i>	Sexo do recém-nascido
1	Negativo	Feminino
2	Positivo	Não houve seguimento de caso
3	Positivo	Não houve seguimento de caso
4	Positivo	Masculino
5	Negativo	Feminino

Amostra	SRY	Sexo do recém-nascido
6	Negativo	Feminino
7	Negativo	Feminino
8	Positivo	Masculino
9	Negativo	Feminino
10	Negativo	Feminino
11	Negativo	Feminino
12	Negativo	Feminino
13	Positivo	Masculino
14	Negativo	Masculino
15	Positivo	Não houve seguimento de caso
16	Positivo	Masculino
17	Negativo	Feminino
18	Positivo	Masculino
19	Negativo	Feminino
20	Negativo	Feminino
21	Negativo	Feminino
22	Positivo	Masculino
23	Positivo	Masculino
24	Positivo	Masculino
25	Positivo	Masculino
26	Positivo	Masculino
27	Negativo	Feminino

Amostra	SRY	Sexo do recém-nascido
28	Negativo	Feminino
29	Negativo	Feminino
30	Positivo	Masculino
31	Negativo	Feminino
32	Negativo	Feminino
33	Negativo	Indeterminado
33	Negativo	Indeterminado
34	Negativo	Feminino
35	Positivo	Masculino
36	Positivo	Masculino
37	Negativo	Feminino
38	Negativo	Feminino
39	Negativo	Feminino
40	Negativo	Feminino
41	Positivo	Masculino
42	Não realizado	Masculino
43	Não realizado	Masculino
44	Negativo	Feminino
45	Negativo	Feminino
46	Não realizado	Masculino
47	Negativo	Feminino
48	Negativo	Feminino

Amostra	SRY	Sexo do recém-nascido
49	Positivo	Masculino
50	Positivo	Masculino

Conforme mostrado na tabela abaixo, a sensibilidade da PCR SRY foi de 93,8% e a especificidade foi de 100%. O valor preditivo positivo foi de 100% e o valor preditivo negativo foi de 96,4%. A acurácia foi de 97,7%.

Tabela 17 - Sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da genotipagem SRY fetal.

Genotipagem SRY	Sexo dos recém nascidos		
	Masculino	Feminino	Total
Positivo	15	0	15
Negativo	1	27	28
Total	16	27	43
Sensibilidade: 93,8%			
Especificidade: 100%			
Acurácia do teste: 97,7%			
Valor preditivo para o sexo masculino: 100%			
Valor preditivo para o sexo feminino: 96,4%			

5.5 Resultados dos testes para avaliar a zigozidade *RHD* paterna e comparação com o fenótipo do recém-nascido

Para avaliar a chance do feto ser RhD positivo, foi feito o teste para determinação da zigozidade *RHD* paterna (gene *RHD* em homozigose ou heterozigose), o que implica em 100% ou 50%, respectivamente, de chance do feto ser RhD positivo.

Foram testadas 14 amostras para a determinação da zigozidade *RHD* paterna. Oito amostras (57,1%) apresentaram amplificação da Rhesus box híbrida, indicando heterozigose do gene *RHD* e seis não apresentaram amplificação, indicando homozigose do gene *RHD*, conforme mostrado na tabela 18. Foi possível comparar 13 resultados da zigozidade *RHD* paterna com o fenótipo RhD do recém-nascido, tendo-se obtido 100% de concordância com o fenótipo RhD esperado do recém-nascido quando o pai era homozigoto para o gene *RHD*. Todos os filhos dos pais heterozigotos para o gene *RHD* foram RhD negativo.

Tabela 18 – Resultado da zigozidade *RHD* paterna e comparação com o fenótipo RhD do recém-nascido.

Número da amostra	Amplificação da Rhesus box híbrida	Zigozidade <i>RHD</i> paterna	Fenótipo RhD do recém-nascido
P2	+	Heterozigoto	Não houve seguimento de caso
P3	-	Homozigoto	Positivo
P4	-	Homozigoto	Positivo
P5	+	Heterozigoto	Negativo
P7	-	Homozigoto	Positivo
P9	+	Heterozigoto	Negativo
P12	+	Heterozigoto	Negativo
P13	+	Heterozigoto	Negativo
P21	-	Homozigoto	Positivo
P22	-	Homozigoto	Positivo

P23	+	Heterozigoto	Negativo
P26	-	Homozigoto	Positivo
P28	+	Heterozigoto	Negativo
P51	+	Heterozigoto	Negativo

(+) positiva

(-) negativa

5.6 Custo da genotipagem *RHD* fetal não invasiva

Com a finalidade de avaliar a viabilidade financeira da implantação da genotipagem *RHD* fetal a partir de plasma materno no serviço público de saúde, foi calculado o custo do teste, levando-se em conta apenas o custo dos reagentes, conforme mostrado abaixo. O custo da genotipagem *RHD* fetal por amostra (PCR para albumina humana e PCR para *RHD*, em duplicata) ficou em torno de R\$ 26,97. Adicionando-se a PCR para *SRY*, o total ficou por volta de R\$ 32,68.

Tabela 19 – Custo da genotipagem *RHD* fetal não invasiva (dados de março de 2009).

DESCRIÇÃO DO REAGENTE	VALOR	VALOR POR REAÇÃO
Kit purificação DNA Núcleo Spin Plasma XS (50 extrações)	R\$ 561,85	R\$ 11,24
Caixa tubo óptico 8 strip com 125 unidades	R\$ 420,00	R\$ 0,42
Caixa cap óptico 300 strips (com 8)	R\$ 286,00	R\$ 0,12
TaqMan Universal PCR Master Mix (5 mL)	R\$ 1.688,75	R\$ 4,22
Iniciador EX5F – 19 mer (200 nM)	R\$ 76,00	R\$ 0,02
Iniciador E5R – 21 mer (200 nM)	R\$ 84,00	R\$ 0,02

Iniciador EX7F - 21 mer (200 nM)	R\$ 84,00	R\$ 0,02
Iniciador EX7R – 22 mer (200 nM)	R\$ 88,00	R\$ 0,02
Iniciador ALB-F – 24 mer (200 nM)	R\$ 96,00	R\$ 0,02
Iniciador ALB-R – 25 mer (200 nM)	R\$ 100,00	R\$ 0,02
Iniciador SRY-F – 21 mer (400 nM)	R\$ 84,00	R\$ 0,04
Iniciador SRY-R – 26 mer (400 nM)	R\$ 104,00	R\$ 0,04
Sonda EX5P (100 nM)	R\$ 598,57	R\$ 0,25
Sonda EX7P (100 nM)	R\$ 598,57	R\$ 0,25
Sonda ALB-P (100 nM)	R\$ 598,57	R\$ 0,25
Sonda SRY-P (350 nM)	R\$ 598,57	R\$ 0,87
Custo da PCR RHD + PCR ALB		
Purificação de DNA		R\$ 11,24
PCR RHD		R\$ 5,34/reação
PCR ALB		R\$ 5,05/reação
Total		R\$ 26,97
Custo da PCR RHD + PCR ALB +PCR SRY		
PCR SRY		R\$ 5,71/reação
Total		R\$ 32,68

6 Discussão

A genotipagem *RHD* fetal não invasiva permite a predição do fenótipo RhD do feto a partir da análise de DNA fetal livre no plasma materno. Essa abordagem fornece uma total segurança ao feto e à gestante, ao contrário das genotipagens *RHD* invasivas. Além disso, não é influenciada por gestações prévias, já que o DNA fetal livre desaparece da circulação materna poucas horas após o parto. Todavia, o sucesso do teste está relacionado à quantidade de DNA fetal presente na amostra, que em geral é muito baixa, o que pode causar resultados falso-negativos.

Para as gestantes participantes do presente estudo, a idade média gestacional à época da coleta de sangue foi de 27 semanas, semelhante à de outros estudos previamente publicados (FINNING et al., 2008; BROJER et al., 2005; AVENT & REID, 2000). A idade gestacional mínima foi de 12 semanas e mesmo neste período precoce foi possível detectar a presença do gene *RHD* fetal na amostra de plasma materna coletada, evidenciando a sensibilidade do teste.

A frequência de gestantes na primeira gestação (29%) foi inferior à frequência de gestantes com mais de uma gestação (71%). Dentre estas, 51% tinham histórico de aborto em gestações passadas, mostrando uma taxa relativamente alta de abortos. Dentre as gestantes com histórico de aborto, 40% tinham coombs indireto negativo e 60% tinham coombs indireto positivo, como resultado de aloimunização. Destas, 83% tinham produzido o anti-D, o que mostra a alta morbidade associada ao anti-D (MOLLISON et al., 1997) e a importância da determinação precoce do fenótipo RhD fetal, ainda durante a gestação, para o adequado acompanhamento gestacional. Por outro lado, a frequência de 40% de gestantes com histórico de aborto com coombs indireto negativo chama a atenção para a possibilidade desses resultados serem falso-negativos, possivelmente em virtude da ausência do antígeno correspondente nas hemácias utilizadas para a realização do coombs indireto. Como exemplo, pode-se observar na tabela 19, que dentre os anticorpos produzidos pelas gestantes aloimunizadas estão o anti-K e o anti-Di^a, anticorpos esses capazes de causar a doença hemolítica perinatal, cuja frequência dos antígenos correspondentes (K e Di^a) é baixa na maioria das populações (8,8% e 0,01%, respectivamente). Por isso, hemácias contendo esses antígenos nem sempre são disponibilizadas para a realização do teste de coombs indireto em gestantes, levando a resultados falso-negativos.

O anti-C foi o segundo aloanticorpo mais frequente, sendo que em todos os casos estava acompanhado do anti-D. Esse achado pode estar relacionado à alta frequência do

antígeno C em indivíduos com fenótipo RhD positivo (em torno de 67%) (COLIN et al., 1991).

Entre as gestantes aloimunizadas, quatro (14,3%) estavam em sua primeira gestação, quando não se espera aloimunização. Todavia, 50% delas tinham recebido transfusão sanguínea previamente, sendo que metade delas desenvolveram anti-D e anti-C, e a outra metade, anti-M. Esse fato leva à observação de que mulheres RhD negativo têm recebido transfusão de componentes RhD positivo, comprometendo gestações futuras. Provavelmente, esses hemocomponentes foram erroneamente fenotipados como RhD negativo, ilustrando as discrepâncias de fenotipagem causadas pelo antígeno D (WESTHOFF, 2007). Enfim, o aloanticorpo mais frequente entre as gestantes aloimunizadas ainda é o anti-D (CORREA, 2004), embora, com a introdução da imunoprofilaxia anti-D há cerca de 40 anos, era de se esperar que a frequência de DHPN associada a esse anticorpo fosse diminuir. Essa realidade sugere que possivelmente as gestantes RhD negativo não estejam sendo apropriadamente acompanhadas, nem recebendo a imunoprofilaxia anti-D adequadamente. Isto é reforçado pela frequência de DHPN relatada no Brasi, que é cerca de 10 vezes mais elevada que a encontrada na Europa (em 2006, a incidência de DHPN por nascidos vivos foi de 10,5:21.000 no Brasil, contra 1:21.000 na Europa).

Em conjunto, do total de gestantes analisadas, 51% estavam aloimunizadas e 49% não. Para as gestantes aloimunizadas, a introdução do teste de genotipagem *RHD* fetal ajudaria a definir se seu acompanhamento deveria ser considerado de risco, caso o feto seja genotipado como *RHD* positivo, e para as gestantes não aloimunizadas, o conhecimento do genótipo fetal poderia ser utilizado para orientar a necessidade do uso ou não da imunoprofilaxia anti-D, ainda durante a gestação.

A frequência encontrada de 64% de fetos com fenótipo RhD positivo e 36% com fenótipo RhD negativo estão em consonância com os dados relatados na literatura, que estão em torno de 60% para o fenótipo RhD positivo e 40% para o RhD negativo (FINNING et al., 2008; MARTINE et al., 2006; AVENT & REID, 2000). Considerando-se essa frequência, 64% das gestantes RhD negativo deveriam receber a imuno-profilaxia anti-D antenatal, caso não estivessem sensibilizadas, enquanto que 36% poderiam ter sido consideradas sem risco de DHPN, e feito um pré-natal padrão, com diminuição de sobrecarga do sistema de saúde especializado e economia de recursos.

Neste estudo, a concordância da genotipagem *RHD* fetal realizada a partir de DNA fetal livre no plasma materno com o fenótipo do recém-nascido foi de 97,7%, se considerarmos que no único caso discordante, o resultado da fenotipagem RhD do recém-nascido estava correto. A concordância obtida foi similar aos dados de estudos previamente publicados, conforme mostrado na tabela 4 da introdução. Todavia, essa concordância

poderia ser considerada de 100%, caso a fenotipagem do recém-nascido (amostra nº 48) fosse considerada incorreta, o que parece ser o caso, pois o resultado da genotipagem *RHD* fetal concordou com o resultado da genotipagem *RHD* realizada a partir de DNA da mucosa bucal do recém-nascido, tendo o fenótipo sido inferido como RhD positivo. Esse caso leva a uma necessária discussão sobre as metodologias e os reagentes que têm sido utilizados para a fenotipagem de recém-nascidos. A partir da investigação desse caso, foi possível detectar uma possível falha no processo de fenotipagem de recém-nascidos. Segundo a resolução federal, RDC 153, de 2004, a fenotipagem de todo recém-nascido filho de mãe RhD negativo deve ser levada à fase antiglobulínica, para detectar a presença do antígeno D fracamente expresso (www.anvisa.gov.br). Entretanto, o teste do recém-nascido foi realizado em cartela gel teste (Diamed), apenas à temperatura ambiente, não sendo o teste levado à fase antiglobulínica. Foi utilizado ainda, um reagente que não detecta o D parcial mais frequente em caucasianos, o D^{VI} (WESTHOFF, 2004). Essa informação, aliada aos achados da genotipagem *RHD* do recém-nascido, nos leva a suspeitar que o conceito possui um fenótipo D fraco ou parcial de baixa densidade antigênica e por isso, a presença do antígeno D não foi detectada no teste realizado à temperatura ambiente. Ainda há a possibilidade de erro na execução do teste de fenotipagem do recém-nascido ou de troca de amostra.

A sensibilidade de 100% para a genotipagem *RHD*, encontrada nesse estudo, foi superior à encontrada para a genotipagem *RHD* fetal a partir de DNA extraído de amniócitos (98,7%) (AVENT & REID, 2000). A especificidade de 97,7% (se considerarmos que o resultado da fenotipagem RhD da amostra nº 48 estava correta), assim como o valor preditivo positivo, de 96,3%, são menores que os reportados para a genotipagem *RHD* invasiva (100%). Todavia, se considerarmos como verdadeiro o resultado da genotipagem *RHD* do recém-nascido a partir de DNA da mucosa bucal a especificidade do teste foi de 100%, assim como o valor preditivo positivo.

O valor preditivo negativo encontrado para a genotipagem *RHD* foi de 100%. Esse valor está acima daquele atribuído à genotipagem invasiva (96,9%). Esses achados confirmam, portanto, a genotipagem *RHD* não invasiva uma ferramenta bastante útil no acompanhamento de gestantes RhD negativo. Todavia, seria prudente, em casos de genotipagem *RHD* fetal negativa, repetir o teste em estágios mais avançados da gestação.

O presente estudo não apresentou nenhum resultado falso-negativo para a genotipagem *RHD* fetal, indicando que a metodologia utilizada é capaz de amplificar o DNA fetal presente em baixas concentrações. Foi encontrado um único resultado falso-positivo para a genotipagem *RHD* fetal, se considerarmos que a fenotipagem RhD fetal da amostra nº 48 estava correta, o que é pouco provável, como já explicado anteriormente.

É importante ressaltar que um alto valor preditivo negativo tem uma grande importância clínica, pois reflete uma baixa proporção de falso-negativos, que no caso do acompanhamento de gestantes RhD negativo, têm uma grande importância clínica, pois podem contribuir para o aumento da morbidade da doença hemolítica perinatal, por desconsiderarem a necessidade de cuidados necessários, como por exemplo, da administração da imunoprofilaxia anti-D antenatal e de recomendarem a retirada da gestante do grupo de gestações de risco. Por outro lado, um resultado falso positivo não representa um grande impacto no acompanhamento à gestante RhD negativo, pois nesse caso, a gestante será considerada como gestante de alto risco, caso já esteja sensibilizada ou poderá receber a imunoprofilaxia anti-D desnecessariamente. Entretanto, essa última alternativa não é amplamente adotada no Brasil. Em suma, simplesmente seria mantido o protocolo de acompanhamento que é adotado atualmente.

Por ser altamente polimórfico, a análise do gene *RHD* envolve a pesquisa de mais de uma região do gene, pois numerosas variantes *RHD* já foram descritas, como *RHD Ψ* e genes híbridos *RHD-CE-D*. Devido à ocorrência dessas variantes, o fenótipo RhD do recém-nascido pode ser positivo ou negativo, dependendo do reagente ou da metodologia utilizada e do genótipo dos pais. Por isso, no teste desenvolvido neste estudo, se na genotipagem *RHD* fetal houve amplificação de apenas uma região do gene *RHD*, esta foi considerada inconclusiva, a fim de evitar inferências errôneas, que poderão impactar de forma drástica o acompanhamento clínico das gestantes RhD negativo. Neste estudo, houve cinco resultados inconclusivos de genotipagem *RHD* fetal devido à amplificação de apenas um exon do gene *RHD*, o que implica em uma taxa de 9,09% de resultados inconclusivos. Essa taxa é mais alta do que as relatadas em estudos realizados no Reino Unido, China e Estados Unidos, que variou de 3,4 a 6% (FINNING et al., 2008; ATAMANIUK et al., 2009; GEIFMAN-HOLZMAN et al., 2006). Isto provavelmente se deve ao alto nível de miscigenação encontrada em nosso país, o que aumenta a frequência de alelos *RHD* variantes, raros em outros países (RODRIGUES, 2002). No entanto, esta frequência não invalida a grande utilidade do teste na prática clínica, mesmo em países com população miscigenada.

Para se tentar entender qual a base genética dos resultados inconclusivos da genotipagem *RHD* fetal, foi realizada a análise de cinco regiões do gene *RHD* em amostras maternas e paternas, quando disponível, buscando-se identificar os genes *RHD Ψ* e *RHD* variantes.

O primeiro resultado inconclusivo da genotipagem *RHD* fetal, observado para a amostra nº 24 (tabela 14) foi devido à amplificação apenas do exon 7. O fenótipo do recém-nascido foi RhD positivo. Quando foi realizada a genotipagem *RHD* materna, observou-se amplificação dos exons 3, 7 e 9 e ausência de amplificação dos exons 4 e 5 e amplificação

positiva para o pseudogene *RHD* (*RHDΨ*). Esses achados são compatíveis com a presença do alelo *RHDΨ*, um alelo não funcional, que determina um fenótipo RhD negativo. A amostra paterna não estava disponível e não pôde ser testada. O fenótipo RhD positivo do recém-nascido pode ser explicada pela herança do alelo *RHDΨ* da mãe e de um alelo variante do pai, que apesar de expressar o antígeno D, possui um polimorfismo que impede sua amplificação nas regiões de anelamento dos iniciadores e sondas usados para amplificação do exon 5 neste estudo (tabelas 15). Conforme a tabela 6, alguns D variantes, como o D categoria Va (Kou, Hus. e TO), DCS, D categoria Va-like, e D categoria V tipo VII possuem um polimorfismo na primeira base 5' (posição 697) da sonda para o exon 5, o que pode levar à incapacidade de anelamento da sonda e ausência de detecção da fluorescência mesmo havendo amplificação durante os ciclos de PCR. Além disso, vários outros alelos híbridos *RHD-CE-D* apresentam o fenótipo D parcial e não possuem o exon 5 do gene *RHD*.

O segundo resultado inconclusivo foi encontrado após a genotipagem *RHD* fetal da amostra nº 26, que apresentou ausência de amplificação do exon 7. O fenótipo do recém-nascido foi RhD positivo. A análise do DNA materno revelou total ausência do gene *RHD*. A análise do DNA paterno revelou a presença do gene *RHD*, com amplificação de todos os exons testados na PCR *RHD* convencional, e ausência do *RHDΨ*. O teste da zigozidade demonstrou ausência de amplificação da “*Rhesus box*” híbrida, indicando homoziguidade paterna. Considerando-se que o DNA fetal apresentou amplificação em apenas um exon, pode-se supor que um dos alelos paternos, o qual foi transmitido ao filho, seja um alelo *RHD* variante, como o híbrido *RHD-CE-D* ou com polimorfismo de SNP na região de anelamento dos iniciadores e/ou sonda do exon 7 para a PCR em tempo real, como descrito na tabela 7, associados aos fenótipos D fraco ou D parcial. Desta forma, não foi possível inferir o fenótipo RhD fetal. Além disso, há a possibilidade de que a amostra colhida não seja de fato paterna.

O caso referente à amostra nº 26, (tabela 14) leva ao questionamento da eficácia do teste da zigozidade *RHD*, uma vez que na teoria, sendo o pai considerado homozigoto para o gene *RHD*, considera-se que há 100% de chance do filho ser RhD positivo e, portanto, possuir todos os exons do gene *RHD*. Entretanto, se um dos alelos paternos for um alelo variante ou um *RHDΨ*, o recém-nascido poderá ter o fenótipo RhD negativo, caso herde o alelo variante do pai, que resulte na ausência de expressão do antígeno D (tabelas 6 e 7).

O terceiro resultado inconclusivo (amostra nº 27) na genotipagem fetal foi devido à amplificação apenas do exon 7 (tabela 14). O fenótipo do recém-nascido foi RhD negativo. A análise do DNA materno revelou a presença do *RHDΨ*, com amplificação apenas do exon 3. O fenótipo informado do pai foi RhD negativo, porém a amostra paterna não foi

disponibilizada. Considerando-se que a mãe não apresentou amplificação para o exon 7, conclui-se que o alelo fetal amplificado é de origem paterna. Sendo o pai RhD negativo, pode-se inferir que possui um alelo *RHD* híbrido ou o gene *RHD Ψ* , explicando a amplificação apenas do exon 7. No primeiro caso, o fenótipo RhD do recém-nascido poderia ser D negativo, D fraco ou D parcial, e no segundo caso, D negativo, conforme tabela 6.

Quanto aos outros resultados inconclusivos por amplificação única do exon 7 do gene *RHD*, relativos às amostras nº 45 e 52 (tabela 6) ambas amostras maternas revelaram ausência do gene *RHD* e as amostras paternas não foram disponibilizadas. Como os recém-nascidos apresentaram um fenótipo RhD positivo, pode-se inferir que herdaram um alelo variante do pai, que não amplifica o exon 5 do gene *RHD* ou que possui um polimorfismo de SNP na região do anelamento dos iniciadores e/ou sonda para o exon 5, mas dá origem a um fenótipo D variante (D fraco ou D parcial), detectado pelo reagente e pela metodologia utilizada na fenotipagem do recém-nascido.

A análise dos resultados inconclusivos na genotipagem *RHD* fetal não permite inferir com acurácia o fenótipo RhD fetal. Como pode ser observado na tabela 6, uma amplificação apenas do exon 7 pode estar associada tanto ao fenótipo RhD positivo quanto ao fenótipo RhD negativo. Isso comprova que muitos alelos variantes e genes não-funcionais presentes em humanos podem levar a inferências errôneas (LO et al., 1997), mostrando a importância de se avaliar mais de uma região do gene *RHD* para sua genotipagem. Assim, diante da falta de resolução desses casos, mesmo se a amostra materna e paterna também estejam disponíveis para teste de genotipagem *RHD*, os resultados de genotipagem *RHD* fetal, com amplificação de um só exon, devem ser considerados inconclusivos.

Os resultados da zigozidade paterna foram concordantes com o fenótipo dos recém-nascidos. Entretanto existem alguns estudos que tornam essas técnicas pouco confiáveis para indivíduos de descendência africana, devido à existência de *Rhesus box* híbridas, encontradas com frequência nesses indivíduos (WAGNER et al., 2003; MATHESON & DENOMME, 2002) que podem levar a erros na faixa de 1% (GROOTKERK-TAX et al., 2005). Esses mesmos estudos relataram ter detectado consideráveis variações alélicas entre as sequências *upstream* e *downstream* da *Rhesus box*. Os pesquisadores encontraram evidências de recombinações entre alelos, conversão gênica, substituições únicas de nucleotídeos, pequenas inserções e deleções no segmento das *Rhesus box*. Além disso, encontraram quatro diferentes *Rhesus box* híbridas fora do padrão, indicativas de deleção do gene *RHD*, sem que de fato existisse deleção do gene. Outro fator importante a ser considerado é que nem sempre a amostra paterna está disponibilizada para os testes de zigozidade. Nesse estudo, para 55 amostras maternas colhidas, só em 25% delas foi disponibilizada a amostra paterna. Além disso, não se pode descartar a possibilidade de que

a amostra coletada supostamente como paterna não seja de fato paterna. Alguns protocolos sugerem que em presença de homozigotidade *RHD* paterna, a tipagem *RHD* fetal não seria necessária. Todavia, de acordo com as abordagens levantadas acima, é desaconselhável que esse teste faça parte do protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo como determinante para a realização da genotipagem *RHD* fetal.

A genotipagem para o gene *SRY* foi desenvolvida neste estudo apenas para certificar a recuperação de DNA fetal em casos de feto do sexo masculino. O teste mostrou-se menos sensível que o teste para o gene *RHD*, mas ele não é essencial para a genotipagem *RHD* fetal, visto que para fetos do sexo feminino este controle de recuperação do DNA fetal está ausente. Este ainda é um desafio da técnica de genotipagem *RHD* fetal, e na prática clínica, métodos para controle de detecção de DNA fetal não vêm sendo adotados.

Para a genotipagem *SRY* foi encontrado um resultado positivo após amplificação do gene por volta do 43º ciclo. Esse achado levou à consideração de que seria necessário aumentar o número de ciclos da PCR *SRY*, de 45 para 50 ciclos e considerar um Ct de até 45 como uma amplificação positiva. Observou-se ainda que os resultados dos primeiros 35 testes foram concordantes com o sexo do recém-nascido e que as discordâncias começaram a ocorrer a partir do 36º teste, contribuindo assim, para uma baixa sensibilidade do teste, quando comparado com os relatos da literatura (GUPTA et al., 2004; JOHNSON et al., 2004). Isto pode ter sido devido à queda da qualidade dos iniciadores e/ou sonda, após um maior período em estoque.

Testes moleculares são geralmente considerados como de alto custo para os gestores de saúde pública, que muitas vezes associam inovação com grandes investimentos em equipamentos e insumos. No entanto, a análise do custo da genotipagem *RHD* fetal não invasiva revelou que o teste pode ser realizado a um baixo custo (em torno de R\$ 30,00, considerando-se apenas os reagentes). Consta do protocolo de atendimento à gestantes RhD negativo a solicitação de pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), por volta da 20ª semana de gestação, cujo custo, pela tabela da AMB, está em torno de R\$ 20,00. Caso a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) pelo teste indireto da antiglobulina humana (AGH) seja positiva é realizado o teste para identificação do anticorpo irregular, a um custo de R\$ 80,00, em média. Uma vez constatada a presença do anti-D no soro materno, são realizados testes de coombs indireto, com a titulação do anticorpo, periodicamente, até o término da gestação, para acompanhar os níveis do anticorpo durante a gestação. O custo desse teste é de aproximadamente R\$ 90,00. Sendo assim, estima-se um custo de aproximadamente R\$ 1.000,00 por gestação, apenas com testes laboratoriais. Se compararmos o custo da genotipagem *RHD* fetal não invasiva com o custo dos testes

laboratoriais atualmente utilizados para as gestantes RhD negativo, pode-se concluir que é mais viável economicamente realizar a genotipagem *RHD* fetal e definir se o acompanhamento da gestante RhD negativo deve ser considerado de risco ou não. Isto traz grandes vantagens aos serviços públicos de saúde, desafogando os serviços especializados, com conseqüente diminuição de custos e de procedimentos médicos e laboratoriais ao se definir que o feto é também RhD negativo, como aconteceu em 36% dos casos analisados neste estudo. Para os casos com feto RhD positivo, a conduta pode ser definida precocemente, trazendo maior benefício à saúde da gestante e do feto, e também diminuição de custos por procedimentos médicos e laboratoriais que seriam decorrentes de complicações que podem ser evitadas pelo diagnóstico precoce de risco de DHPN.

Face aos resultados obtidos neste estudo, propomos que o fluxograma abaixo (figura 8) seja utilizado para o acompanhamento de gestantes RhD negativo.

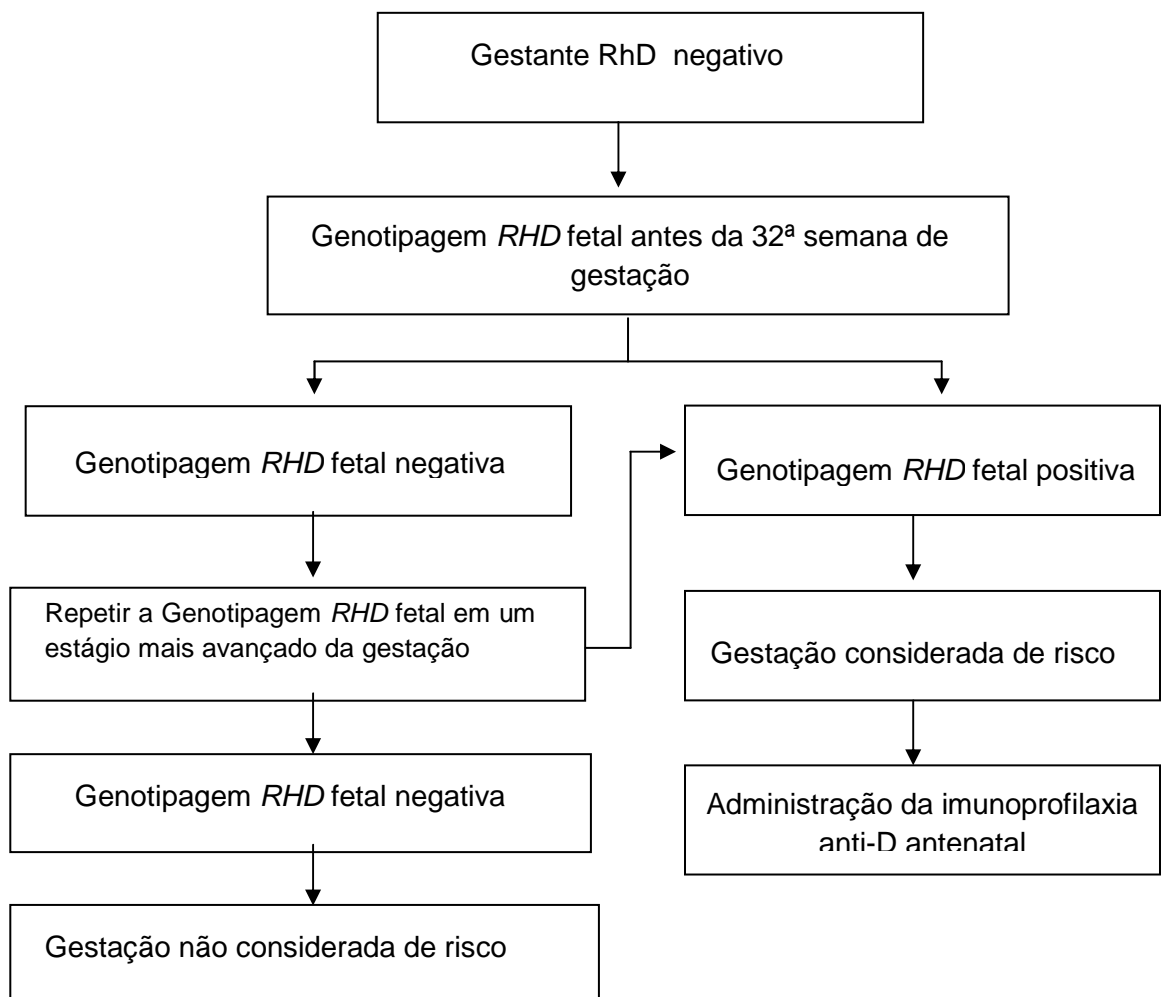


Figura 24– Proposta de protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo utilizando a genotipagem *RHD* fetal como ferramenta diagnóstica.

Após confirmar o fenótipo RhD negativo materno, deve ser realizada a genotipagem *RHD* fetal não invasiva, entre a 12^a e a 32^a semana, para inferência do fenótipo RhD fetal. Caso o fenótipo fetal inferido seja D positivo, a imunoprofilaxia anti-D deve ser administrada e a gestante deve ser incluída no grupo de gestações de risco e receber o acompanhamento médico apropriado. Caso o fenótipo RhD fetal inferido seja negativo, o teste deve ser repetido em um estágio mais avançado da gestação. Caso o resultado negativo se confirme não deve ser administrada a imunoprofilaxia anti-D e a gestante não deve ser incluída no grupo de gestações de risco.

Pelo nosso conhecimento, o estudo de genotipagem *RHD* fetal a partir de plasma materno é o segundo realizado no Brasil pela metodologia de PCR em tempo real, sendo inédito em Minas Gerais. O primeiro estudo brasileiro que descreveu um estudo de genotipagem *RHD* fetal a partir do plasma materno em tempo real utilizou como regiões de amplificação do gene *RHD* os exons 7 e 10 (CHINEN e colaboradores, 2010). Todavia, neste estudo, a interpretação da genotipagem *RHD* fetal considerou que um resultado positivo em apenas um exon é suficiente para inferir o fenótipo RhD fetal, o que é uma prática arriscada, dada a discussão dos resultados inconclusivos das PCR *RHD* fetal apresentados neste trabalho. Além disso, sabe-se que amplificação isolada do exon 10 do gene *RHD* pode se tratar de um pseudogene ou D parcial, podendo gerar inferência errônea do fenótipo RhD fetal (falso-positivo). Enfim, foi possível utilizar a PCR em tempo real para prever o fenótipo RhD fetal, e embora os métodos possam não ser perfeitos, eles são viáveis de serem utilizados na prática clínica como uma ferramenta diagnóstica.

7 Conclusão

Conclui-se que 64% das gestantes RhD negativo gestavam fetos RhD positivos e deveriam receber a imunoprofilaxia anti-D antenatal, caso não estivessem sensibilizadas, reduzindo as chances de aloimunização materna. Outras 36% das gestantes gestavam fetos RhD negativo e poderiam ter sido consideradas sem risco, evitando seu desnecessário acompanhamento em serviço médico especializado.

A presença do anti-D em gestantes na primeira gestação com histórico de transfusões sanguíneas prévias demonstra que hemocomponentes RhD positivo estão sendo transfundidos em pacientes RhD negativo. Esse fato provavelmente tem ocorrido devido a fenotipagens RhD errôneas.

A genotipagem *RHD* fetal não invasiva, desenvolvida e analisada neste estudo, apresentou uma sensibilidade superior àquela apresentada para a genotipagem *RHD* fetal invasiva, podendo ser realizada a partir da 12^a semana de gestação. Por ser uma metodologia sensível, de baixo custo e não invasiva, o teste da genotipagem *RHD* fetal a partir do plasma materno tem grande potencial de uso na prática clínica, podendo ser considerada uma importante ferramenta no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo.

Para garantir a acurácia do teste de genotipagem *RHD* é fundamental analisar mais de uma região do gene *RHD* para evitar inferências errôneas do fenótipo RhD fetal.

8 Referências bibliográficas

ALIZADEH, M. et al.. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*, Rennes, v.99, n.12, p. 4618-4625, Jun., 2002.

ALLEN, C. et al.. Hypermethylated RASSF1A em Maternal Plasma: A Universal fetal DNA Marker that Improves the Reliability of Noninvasive Prenatal Diagnosis. *Clinical Chemistry*., v. 52, p. 2211-2218, Oct., 2006.

ATAMANIUK, J. et al.. Comparison of PCR Methods for Detecting Fetal RHD in maternal Plasma. *Clin. Lab. Anal.*, Vienna, v. 23, n.1, p. 24-28, 2009.

AVENT, N.D. et al.. Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and evolving applications. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, Bristol, v.21, n.2, p. 175-179, April, 2009.

AVENT, N.D.; REID, M.E. The Rh blood group system: a review. *Blood*, New York, v. 95, n. 02, p. 375-387, Jan. 2000.

AVENT, N.D.; REID, M.E. The Rh blood group system: a review. *Blood*, Bristol, v. 95, n. 2, p. 375-387, Jan., 2000.

BELIARD, R. Monoclonal anti-D antibodies to prevent alloimmunization: lessons from clinical trials. *Transfus Clin Biol.*, França, v. 13, n. 1-2, p. 58-64, Mar-Apr. 2006.

BENNET, P.R. et al.. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *New England Journal Medicine*, London, v. 329, n.9, p. 607-610, Aug. 1993.

BIANCHI, D.W. et al.. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc National Academy of Science USA*, Boston, v.93, n.2, p.705-708, Jan., 1996.

BOWMAN, J. The management of hemolytic disease in the fetus and newborn. *Semin Perinatol*, Manitoba, v. 21, n. 1, p. 39-44, Febr. 1997.

BOWMAN, J.M. Treatment options for the fetus with alloimmune hemolytic disease. *Transfus Med Rev*, Manitoba, v. 4, n.3, p. 191-207, Jul. 1990.

BROJER, E. et al.. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion*, Warsaw, v. 45, n.9, p. 1473-1480, Sept., 2005.

CARBONNE, B. et al.. Non invasive fetal RhD genotyping using maternal blood: time for use in all RhD negative pregnant women. *Gynecol Obstet Fertil*, Paris, v. 36, n. 2, p. 200-203, Feb., 2008.

CHAN, K.C. et al.. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.*, Hong Kong, v.50, n. 1, p. 88-92, Jan., 2004.

CHEN, Q.; FLEGEL, W.A. Random survey for RHD alleles among D+ European persons. *Transfusion*, Ulm v. 45, n. 7, p. 1183-1191, Jul. 2005.

CHINEN, P.A. et al.. Noninvasive Determination of fetal Rh blood group, D antigen status by cell-free DNA analysis in maternal plasma: Experience in a Brazilian population. *Am. J. Perinatol.*, New York, *Am J Perinatol*, v.20, Apr, 2010.

CHIU, RW; MURPHY, MF; FIDLER, C. et al.. Determination of RhD zygosity with three different methods revealed altered Rhesus boxes and a new weak D type. *Transfusion* 2003; 43: 335-9.

COLIN, Y. et al.. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by southern analysis. *Blood*, Paris, v. 78, n. 10, p. 2747-2752, Nov. 1991.

CORREA, M. et al.. *Noções práticas de Obstetrícia*. 3. ed. Belo Horizonte: Coopmed; 2004. 915 p.

COSTA, J.M et al.. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *British Journal of Haematology*, França, v. 119, n. 1, p. 255-260, Oct. 2002.

DANIELS, G. et al.. Fetal blood group genotyping from DNA plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn (Review). *Vox Sanguinis*, Bristol, v. 87, n.4, p. 225-232, Nov. 2004.

DATASUS. Disponível em: <<http://w3.datasus.gov.br/datasus/index.php>>. Acesso em 06 jan.2010.

DENOMME, G.A; FERNANDES, B.J. Fetal blood group genotyping. *Transfusion*, Toronto, v.47, n.1S, p.64-68S, Jul., 2007.

FAAS, BH; BECKERS, EA; WILDOER P, et al.. Molecular back-ground of VS and weak C expression in blacks. *Transfusion* 1997; 37:38-44.

FINNING, K. et al.. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ, Bristol*, v. 336, p. 816-18, April. 2008

FINNING, K.; MARTIN, P.; DANIELS, G. A Clinical Service in the UK to Predict Fetal Rh (Rhesus) D Blood Group Using Free Fetal DNA in Maternal Plasma. *Ann. NY. Acad. Sci.*, Bristol, v. 1022, p. 119 – 123, Jun., 2004.

FINNING, K.M et al.. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*, Bristol , v.42, n. 8, p.1079-1085, Aug. 2002.

FLEGEL WA. Blood group genotyping in Germany. *Transfusion* (47S): 47-53S, 2007.

FLEGEL, W.A.; WAGNER, F.F. Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clin Lab*, Germany, v. 48, n. 1-2, p. 53-58, 2002

GAUTIER et al.. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: A two-year experience. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Neuilly, v. 192, n. 3, p. 666-669, Mar., 2005.

GEIFMAN-HOLTZMAN, O.; GROTEGUT, C.A.; GAUGHAN, J.P. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood- a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.*, Philadelphia, v. 195, n. 4, p. 1163-1173, Oct., 2006.

GOODSTEIN, M. *Neonatal red cell transfusion*. In: HERMAN JH, MANNO CS. *Pediatric transfusion therapy*. Bethesda: MD: AABB Press, 2002. p. 39-91.

GROOTKERK-TAX, M.G. et al.. The highly variable RHD locus in non white persons hampers RHD zygosity determination but yields more insight into RH-related evolutionary events. *Transfusion*, Amsterdam, v. 45, n. 3, p.327-337, Mar., 2005.

GROOTKERK-TAX, M.G.H.M. et al.. Evaluation of prenatal *RHD* strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion*, Amsterdam, v. 46, n. 12, p. 2142-2148, Dec., 2006.

GUPTA, A.K. et al.. Detection of fetal DNA and RNA in placenta-derived syncytiotrophoblast microparticles in vitro. *Clin Chem.*, Basel, v.50, n.11, p. 2187-21890, Nov., 2004.

HARMENING, D.M. *Modern Blood Banking and Transfusion Practices*. In: KENNEDY MS, KRUGH D. *Hemolytic Disease of Newborns and Fetus*. 15th edition Philadelphia: , F>A> Davis Company, 2005. Cap. 20, p. 383-395.

<http://www.anvisa.gov.br/sangue/legis/resolucoes.htm>. Acesso em 21 de jun.2010.

<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-pcr-vs-traditional-pcr.html>

JOHNSON, K.L. et al.. Interlaboratory Comparison of Fetal Male DNA detection from Common Maternal Plasma samples by Real-Time PCR. *Clinical Chemistry*, v. 50, n.3, p. 516-521, 2004.

KUMPEL, B.M. Monoclonal anti-D development programme. *Transpl Immunol.*, Reino Unido, V. 10, N. 2-3, p. 199-204, Aug. 2002.

LEGLER, T.J. et al.. Specific magnetic bead-based capture of free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion Apheres Sci*, Göttingen, v.40, n.3, p.153-157, Jun., 2009.

LO, D. et al.. Prenatal Diagnosis of Fetal RhD Status by Molecular Analysis of Maternal Plasma. *N. Eng. J Med.*, Hong Kong, v. 339, n. 24, p. 1734-1738, Dec., 1998.

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

LOBATO, M.M. et al.. Blood group genotyping to solve inconclusive phenotyping cases of patients from the Hemominas Foundation. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 252-259, Aug. 2009.

MAASKANT-VAN W.P.A. et al.. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion*, Rotherdan, v.38, n. 11-12, p.1015-1021, 1998.

MACHADO, I.N. et al.. Fetal RHD genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse ethnic background. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, Campinas, v.52, n.4, p.232-235, Aug, 2006.

MANNIING, F. *Medicina Fetal: Perfil Biofísico. Princípios e aplicabilidade*. 1.ed. São Luiz: Revinter; 2000.

MARTINE, G.H.M. et al.. Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion*, Amsterdam, v.46, n.12, p.2142-2148, Dec., 2006.

MATHESON, K.A., DENOMME, G.A. Novel 3' Rhesus box sequences confound RHD zygosity assignment. *Transfusion*, Ontario, v. 42, n. 5, p. 645-650, May., 2002.

MINON, J.M. et al.. Routine fetal *RHD* genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion*, Liège, v. 48, n.2, p. 373-381, Feb., 2008.

MOLLISON, P.L.; ENGELFRIET, C.P.; CONTRERAS, M. *Blood Transfusion In Clinical Medicine*. In: *Haemolytic disease of the fetus and the newborn*. 10th edition. Oxford: England: Blackwell Science, 1997. Cap. 12, p. 390-424.

MÜLLER, S.P. et al.. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion*, Göttingen, v.48, n.11, p.2292-2301, Nov., 2008.

PERCO, P. et al.. Testing for the D zygosity with three different methods revealed altered Rhesus boxes and a new weak D type. *Transfusion*, Vienna, v. 43, n. 3, p. 335-339, Mar., 2003.

REID, M.E.; CHRISTINE, L. *Blood Group Antigen Facts Book*. 2nd ed. New York: Elsevier Academic Press, 2004. 561 p.

RODRIGUES, A. Presence of the RHD pseudogene and the hybrid RHD-CE-Ds gene in Brazilians with the D-negative phenotype. *Braz J Med Biol Res*, Brazil, v.35, n.7, p.767-73, 2002.

SCOTT, M.L. Monoclonal anti-D for immunoprophylaxis. *Vox Sang.*, Bristol, v. 81, n. 4, p. 213-218, Nov. 2001.

SESARINI, C. et al.. Diagnóstico genético prenatal no invasivo de factor Rh y sexo fetal a través del análisis de ADN fetal libre en plasma materno. *Arch Argent Pediatr*. v.107, n.5, p. 405-409, Buenos Aires, Sep./Oct., 2009.

SINGLETON, B.K. et al.. The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the RhD-negative blood group phenotype. *Blood*, Bristol, v. 95, n. 1, p. 12-18, Jan. 2000.

- TABOR, A.; BANG, J.; NORGAARD-PEDERSEN, B. Feto-maternal haemorrhage associated with genetic amniocentesis: results of a randomized trial. *Br J Obstet Gynaecol*, v. 94, n.6, p. 528-534, Jun, 1987.
- VAUGHN, J.I. et al.. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. *N Engl J Med*, London, v. 338, n.12, p. 798-803, March. 1998.
- WAGNER, F.F. et al.. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*, Ulm, v.93, n.1, p. 385-93, Jan. 1999.
- WAGNER, F.F. et al.. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*, Ulm, v. 95, n. 8, p. 2699-2708, Apr., 2000.
- WAGNER, F.F.; LADEWIG, B.; FLEGEL, W.A. The RHCE allele ceRT: D epitope 6 expression does not require D-specific aminoacids. *Transfusion*, Ulm, v. 43, n,9, p.1248-1254, Sep., 2003.
- WEINER, C.P.; OKAMURA, K. Diagnostic fetal blood sampling-technique related losses. *Fetal Diagn Ther*, Iowa, v. 11, n.3, p.169-175, 1996.
- WESTHOFF, C. The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. *Transfusion*, Philadelphia, v.94, n. 11 , p. 1663-1673, Dec., 2004.
- WESTHOFF, C.M. Rh complexities: serology and DNA genotyping. *Transfusion*, Pennsylvania, v. 47, n. 1 S, p. 17-22 S, Jul. 2007.
- WILSON, R.D. Amniocentesis and chorionic villus sampling. *Curr Opin Obstet Gynecology*, Vancouver, v. 12, n.2, p. 81-86, Apr. 2000.
- Yu X, Wagner FF Witter B, Flegel WA. Outliers in RhD membrane integration are explained by variant RH haplotypes. *Transfusion* 2006; 46:1343-51.
- ZHOU, L. et al.. Noninvasive prenatal *RHD* genotyping by real time polymerase chain reaction using plasma from D-negative pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, MI, v. 193, n. 6, p. 1966-1971, Dec., 2005.