

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**

**Curso de Biomedicina**

**Danielle Sammartino Soares Belo**

**NOVO DIAGNÓSTICO DA INCOMPATIBILIDADE RHD MATERNO-FETAL E SEU IMPACTO NA DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL: O PAPEL DA GENOTIPAGEM *RHD* FETAL**

**SÃO PAULO**

**2017**

**Danielle Sammartino Soares Belo**

**NOVO DIAGNÓSTICO DA INCOMPATIBILIDADE RHD MATERNO-FETAL E SEU IMPACTO NA DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL: O PAPEL DA GENOTIPAGEM *RHD* FETAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientada pela Profa. Dra. Juliana Vieira S. Bianchi, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**SÃO PAULO**

**2017**

**Danielle Sammartino Soares Belo**

**NOVO DIAGNÓSTICO DA INCOMPATIBILIDADE MATERNO-FETAL  
E SEU IMPACTO NA DOENÇA HEMOLÍTICA PERINATAL: O PAPEL  
DA GENOTIPAGEM *RHD* FETAL**

São Paulo, 25 de maio de 2017

---

Juliana Vieira S. Bianchi

---

Fabio Mitsuo Lima

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter trilhado esse caminho para mim e ter feito com que eu permanecesse nele apesar das dificuldades.

Aos meus pais, **Rosangela Maria Sammartino** e **Edson Valle Soares Belo**, pelo apoio incondicional, por me proporcionarem essa conquista e por terem feito de mim tudo que sou hoje.

A minha irmã, **Andrea Sammartino Soares Belo**, por ser minha grande inspiração pessoal e profissional.

Ao meu namorado e companheiro de vida, **Victor Eduardo Staconovexe**, por todo amor, cuidado, apoio e por estar ao meu lado, me ajudando e me amparando, durante toda minha graduação.

A minha orientadora, Profa. Dra. **Juliana Vieira S. Bianchi**, por me apresentar o maravilhoso mundo da Imunohematologia, pela confiança e pela dedicação.

A Profa. Ma. **Karen Nogueira Chinoca Ziza**, por todo conhecimento compartilhado e por autorizar a citação da sua dissertação nesse trabalho.

Aos meus avós, **Helena Valle Soares Belo** e **Felippe Sammartino**, por participarem da minha criação e educação com muito amor.

*In memoriam*, aos meus avós, **Palmyra de Jesus Ferreira Sammartino** e **Joaquim Maria Soares Belo**, por toda dedicação e por me guiarem do plano espiritual.

Aos meus padrinhos, **Mary Valle Soares Belo** e **Eduardo Valle Soares Belo**, aos meus tios, **Millena Conti Belo**, **Vanderlei Sammartino** e **Felippe Sammartino Junior** e aos meus primos, **Natália Amanda Sammartino**, **Henrique Valle Belo Ribeiro Angelo** e **Heloisa Conti Belo**, por todo amor, apoio e por entenderem todas as vezes que estive ausente para estudar e me dedicar a esse trabalho.

As amigas, **Priscila Signor Motta** e **Fabíola Leite Silva**, pelos conselhos e risadas compartilhadas, pelo companheirismo durante esses quatro anos de graduação e pela amizade sincera.

A equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital da Aeronáutica de São Paulo, **1º Ten. Vinicius Martins**, **1ª Ten. Larissa Milane**, **1ª Ten. Rogéria Vilani**, **1ª Ten. Melissa Medrano**, **1ª Lara Corrêa**, **1ª Ten. Cristiane Mendes**, **1º Ten. Wilton Cruz**, **1ª Ten. Cristiane Luize**, **3ª Sg. Priscila Sousa**, **3ª Sg. Julie Correa**, **3ª Sg. Poliana Brazolin**, **3º Sg. Rafael dos Santos** e **CB. Diego Pereira**, por todos os ensinamentos, pela confiança e por fazerem de mim uma verdadeira profissional.

A amiga, **Larissa Fernandes**, pela confiança, pelos conselhos, pelo apoio e pela amizade verdadeira.

BELO, Danielle Sammartino Soares. **Novo Diagnóstico da Incompatibilidade RhD materno-fetal e seu impacto na Doença Hemolítica Perinatal: o papel da genotipagem *RHD* fetal.** 2017. 88 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biomedicina) - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

A incompatibilidade materno-fetal ocorre quando a mãe possui um aloanticorpo contra uma proteína eritrocitária presente no feto e ausente nela, sendo que para isso, a mãe deve ter um contato prévio com essa proteína, o que pode acontecer por meio da transfusão de concentrado de hemácias ou de hemorragias materno-fetais comuns durante a gestação. Se o aloanticorpo presente na mãe for da classe IgG, ele é capaz de atravessar a barreira placentária e atingir a circulação fetal. Uma vez no feto, esses anticorpos se ligam aos eritrócitos, mediando sua destruição por meio da opsonização da fagocitose. A destruição das hemácias fetais leva a um quadro de anemia caracterizando a Doença Hemolítica Perinatal (DHPN), cuja gravidade é determinada pelo título do aloanticorpo na mãe e pela sua imunogenicidade. Nos casos mais graves a anemia está associada à congestão hepática, hidropsia, insuficiência cardíaca e à Kernicterus. Mais de 60% dos casos de DHPN tem por etiologia a destruição mediada pelo anticorpo contra a proteína D do sistema Rh. Na década de 1970 foi disponibilizada a única forma de profilaxia da doença, a imunoglobulina anti-D, para todas as mulheres RhD negativas com parceiro RhD positivo ou desconhecido. No entanto, cerca de 40% dessas mulheres acabam por administrar a imunoglobulina de forma desnecessária por estarem esperando um filho RhD negativo. Nesse contexto, a genotipagem *RHD* fetal a partir de amostra do plasma materno acaba por direcionar o uso da imunoglobulina anti-D somente para as gestantes RhD negativas que estiverem esperando um filho RhD positivo. A genotipagem *RHD* fetal é realizada por PCR em tempo real e diversos autores a descrevem como sensível, específica e com altos valores preditivos positivo e negativo. A fim de estudar a implementação da técnica na rotina pré-natal de gestantes RhD negativas, um total de 284 artigos em língua inglesa e portuguesa datados, em sua maioria, de 2000 a 2017 foram consultados no período de junho de 2016 a abril de 2017.

Descritores: Sistema Rh. Doença hemolítica do recém-nascido. Genotipagem *RHD* fetal. Profilaxia anti-D. Genotipagem pré-natal de sistemas sanguíneos. Imunoglobulina Rho(D). Diagnóstico da doença hemolítica perinatal. Tratamento da doença hemolítica perinatal.

BELO, Danielle Sammartino Soares. New Diagnosis of RhD Maternal-fetal Incompatibility and his impact on Hemolytic Disease of Fetus and Newborn: the role of fetal RHD genotyping. 2017. 88 f. Completion of Course Work (Bachelor of Biomedicine), Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

The maternal-fetal incompatibility occurs when the mother has an alloantibody against an erythrocyte protein present in the fetus and absent in her, and for this happen, the mother must have a previous contact with this protein, which can happen through the transfusion of red blood cells or maternal-fetal hemorrhages during gestation. If the alloantibody present in the mother is of the IgG class, it is able to cross the placental barrier and reach the fetal circulation. Once in the fetus, these antibodies bind to erythrocytes, mediating their destruction by opsonization of phagocytosis. The destruction of fetal red blood cells leads to anemia characterizing the Perinatal Hemolytic Disease (PHD), whose severity is determined by the alloantibody titre in the mother and by its immunogenicity. In severe cases, anemia is associated with hepatic congestion, hydrops, heart failure and Kernicterus. More than 60% of PHN cases have as their etiology the antibody-mediated destruction against the D protein of Rh system. In the 1970s the only prophylaxis form for the disease, the anti-D immunoglobulin, was made available to all RhD negative women with RhD partner positive or unknown. However, about 40% of these women end up taking the immunoglobulin unnecessarily because they are expecting a RhD negative child. In this context, fetal RhD genotyping through maternal plasma ends up directing anti-D immunoglobulin use only to RhD negative pregnant women who are expecting a RhD positive child. Fetal RHD genotyping is performed by real-time PCR and several authors describe it as sensitive, specific and with high positive and negative predictive values. In order to study the implementation of the technique in the prenatal routine of RhD negative pregnant women, a total of 284 articles in english and portuguese language dating, in their majority, from 2000 to 2017 were consulted from June 2016 to April 2017.

Keywords: Rh blood group. Hemolytic disease of the newborn. Fetal *RHD* genotyping. Anti-D prophylaxis. Antenatal genotyping of the blood groups. Rho(D) immune globulin. Diagnostic of hemolytic disease of the newborn. Treatment of hemolytic disease of the newborn.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização genômica do locus RH dos fenótipos RhD mais comuns.....	19
Figura 2 – Representação das proteínas RhAG, RhCE e RhD.....	21
Figura 3 – Representação das variações dos fenótipos RhD.....	22
Figura 4 - Esquema representativo dos processos envolvidos na aloimunização.....	30
Figura 5 – Fisiopatologia da DHPN no feto.....	31
Figura 6 – Metabolismo da bilirrubina a partir da degradação da hemoglobina e enzimas envolvidas no processo.....	32
Figura 7 – Teste de Kleihauer-Betke a partir de sangue materno aloimunizado após hemorragia fetomaterna.....	36
Figura 8 – Fluxograma demonstrando a aplicação da genotipagem RhD fetal na conduta clínica pré-natal de gestantes RhD negativas, se a técnica for implementada na rotina.....	40
Figura 9 – Representação do princípio do PCR em tempo real utilizando a tecnologia TaqMan.....	42
Figura 10 – Ultrassom de doppler da artéria cerebral média.....	51
Figura 11 – Extensão de sangue periférico de recém-nascido RhD negativo, de mãe aloimunizada, com numerosos eritroblastos circulantes, policromasia e esquisócitos.....	53
Figura 12 – Teste de antiglobulina direto.....	54
Figura 13 – Fórmula para determinação do volume de CH a ser transfundido na TIU.....	56

Figura 14 – Metabolismo normal da bilirrubina e metabolismo da bilirrubina durante a fototerapia.....59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Correlação dos aloanticorpos eritrocitários específicos com a ocorrência da doença hemolítica perinatal.....	27
Tabela 2 – Frequência em que os aloanticorpos causam a DHPN.....	28
Tabela 3 – Protocolo de profilaxia anti-D pré-natal de acordo com as principais recomendações internacionais.....	35
Tabela 4 – Número de anticorpos por 1000 amostras.....	37
Tabela 5 – Situações em que ocorre a amplificação dos éxons, de acordo com o gene presente.....	44
Tabela 6 – Comparação da sensibilidade e da especificidade dos resultados da genotipagem obtidos a partir de diferentes exons do gene <i>RHD</i> .....	44
Tabela 7 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da genotipagem <i>RHD</i> fetal realizada por diferentes autores utilizando diferentes protocolos.....	48
Tabela 8 – Diretrizes para o uso da fototerapia e da exsanguíneotransfusão.....	60

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVO.....	16
3 MÉTODOS .....	17
4 REVISÃO DA LITERATURA .....	18
4.1 Sistema Rh .....	18
4.1.1 Variações do fenótipo RhD.....	21
4.1.1.1 D fraco.....	22
4.1.1.2 D parcial.....	23
4.1.1.1 DEL.....	23
4.2 DHPN.....	24
4.2.1 Histórico.....	24
4.2.2 Etiologia.....	25
4.2.3 Fisiopatologia.....	29
4.2.3.1 Aloimunização materna.....	29
4.2.3.2 Fisiopatologia no feto.....	30
4.2.3.2 Fisiopatologia no neonato.....	32
4.2.4 Profilaxia.....	33
4.2.5 Diagnóstico.....	38
4.2.5.1 Diagnóstico da incompatibilidade materno fetal.....	38
4.2.5.2 Diagnóstico pré-natal.....	39
4.2.5.2.1 Genotipagem <i>RHD</i> por meio do plasma materno.....	39
4.2.5.2.1.1 Problemas da genotipagem e possíveis soluções.....	45
4.2.5.2.1.2 Vantagens da genotipagem <i>RHD</i> fetal.....	47
4.2.5.2.2 Diagnóstico pré-natal da DHPN.....	50
4.2.5.2.3 Diagnóstico pós-natal da DHPN.....	52

4.2.6 Tratamento da Doença Hemolítica Perinatal.....	55
4.2.6.1 Tratamento pré-natal.....	55
4.2.6.1 Tratamento pós-natal.....	57
5 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

## 1 INTRODUÇÃO

A doença hemolítica perinatal (DHPN) ou doença hemolítica do recém-nascido (DHRN), de acordo com Greer et al. (2014), resulta da destruição dos eritrócitos fetais pelos anticorpos maternos da classe IgG que ganham acesso à circulação fetal durante a gravidez, por atravessarem a placenta. Entretanto, esse processo somente ocorre quando a mãe foi previamente aloimunizada, sendo que o mecanismo mais importante para tal é a hemorragia materno-fetal e a exposição previa a transfusões de concentrado de hemácias, como afirmam Alarcón e Werner (2005). Akanmu et al. (2015) afirmam que a DHPN também pode ocorrer pela presença de anticorpos regulares ABO da classe IgG, em especial em mães do grupo O com filhos A ou B. De acordo com Vitorello et al. (1998), na forma grave da doença a hemólise acentuada leva à congestão hepática, hipoalbuminemia, hidropisia fetal, insuficiência cardíaca e à Kernicterus.

Quanto à etiologia da doença mais de cinquenta anticorpos específicos contra os sistemas sanguíneos podem levar ao desenvolvimento da DHPN, segundo afirma Eder (2006). Sendo que, de acordo com Malono et al. (2004), epidemiologicamente a incompatibilidade materno-fetal é mais frequentemente causada pelo sistema ABO (20 a 25% das gestações), entretanto, somente 10% destas levam ao desenvolvimento da DHPN. Por outro lado, o autor complementa que somente 10% das incompatibilidades materno-fetais são causadas pelo sistema Rh, sendo a aloimunização RhD correspondente a 95% dos casos de hemólise fetal. Fasano (2016) afirma que a presença de anticorpos contra outros antígenos, tanto do sistema Rh quanto de outros sistemas sanguíneos, pode levar ao quadro grave da DHPN, sendo os mais comuns anti-c, anti-E e anti-K, seguidos dos anticorpos dos sistemas Duffy, Kidd e MNS.

Dados do Manual Técnico de Gestação de Alto Risco do Ministério da Saúde (2012) mostram que a aloimuniza o materno-fetal afeta cerca de cinco a cada 1.000 gesta es. Estudo de Pavani, Locateli e Lieber (2016) demonstrou que a aloimuniza o ocorre em 6,1% das gesta es, sendo que em 65,4% desses casos há a presença de um anticorpo passível de levar ao desenvolvimento da DHPN. Desses anticorpos importantes clinicamente, 91,8% são contra antígenos do sistema

Rh, sendo que a incompatibilidade RhD está presente em 81,2% dos casos. Complementando essas informações, estudo realizado por Baiochi et al. (2007) com grávidas e seus recém-nascidos de São Paulo, constatou que 73% das mulheres RhD negativas deram a luz à uma criança RhD positiva.

De acordo com Chávez, Mulinare, Edmonds (1991), a única forma de prevenção contra a DHPN causada pela incompatibilidade RhD, a imunoglobulina RhD (RhIG), começou a ser disponibilizada em 1968. Delaney e Matthews (2015) ressaltam que a administração adequada da imunoglobulina faz com o que o risco de aloimunização materna caia de 13% para menos de 0,1%.

De acordo com Singla et al. (2010) o diagnóstico pré-natal da hipóxia fetal gerada pela intensa anemia pode ser feito por meio do ultrassom de Doppler da artéria cerebral média. Basu, Kaur e Kaur (2011), complementam que após o nascimento o teste sorológico mais importante para o diagnóstico da DHPN é o teste de antiglobulina direto (TAD).

Contudo, devido à gravidade da doença houve a necessidade de criar um método diagnóstico que pudesse “prever” se as mulheres RhD negativas estariam ou não em uma gestação de risco. Isso seria importante, segundo Minon et al. (2008), para diminuir a ansiedade dessas pacientes com relação ao desenvolvimento de uma gravidez de risco. Desse modo, estudo de Chan et al. (2001) relata o uso do PCR em tempo real para a determinação do genótipo *RHD* fetal a partir de amostra do líquido amniótico. Entretanto, Freeman, Szczepura e Osipenko (2009) afirmam que esse método é invasivo e pode promover hemorragia materno-fetal, além de estar associado ao risco de aborto. A possibilidade de diagnóstico pré-natal por meio de métodos não invasivos começou a surgir a partir do estudo realizado por Lo et al. (1997) com amostra de líquido amniótico e amostra de sangue periférico de mulheres grávidas, demonstrando de forma pioneira a presença de DNA fetal no plasma materno.

Wikman et al. (2012) afirmam que a determinação do genótipo *RHD* fetal no primeiro trimestre de gravidez tem por vantagem evitar que mulheres RhD negativas sejam expostas à doses desnecessárias de imunoglobulina RhD e tenham que passar por outros métodos mais invasivos, como a amniocentese. Sendo assim,

diversos pesquisadores como Daniels et al. (2004), Scheffer et al. (2011) e Moussa et al. (2012) estudam a utilização do PCR em tempo real para a determinação do genótipo *RHD* fetal a partir do plasma materno. Essa técnica, segundo Haas et al. (2012), está disponível na Holanda desde julho de 2011 para mães RhD negativas que tenham chance de ter uma criança RhD positiva e pode ser feita com 27 semanas de gestação. Chitty et al. (2014) complementam que o teste também já é realizado na Dinamarca na 26<sup>a</sup> semana de gestação. Sciellour et al. (2004) e Gautier et al. (2005) também estudam a acurácia da técnica na rotina de serviços de saúde na França e no Reino Unido, respectivamente. No Brasil, a técnica ainda não é realizada.

## 2 OBJETIVO

Discorrer sobre a técnica utilizada para a determinação do genótipo *RHD* fetal a partir de amostra de plasma materno, ressaltando a importância da sua implementação na rotina laboratorial.

São objetivos específicos:

- 1) Discorrer sobre as bases genéticas do sistema Rh e como elas interferem no fenótipo;
- 2) Discorrer sobre a Doença Hemolítica Perinatal;
- 3) Relacionar a técnica de genotipagem *RHD* fetal com o acompanhamento das gestações de risco para a Doença Hemolítica Perinatal.

### 3 MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido a partir de revisão bibliográfica no período de junho de 2016 a abril de 2017. Um total de 284 artigos e livros em língua inglesa e portuguesa, presentes na base de dados PubMed, no Google Acadêmico e na Biblioteca Padre Inocente Radrizzani do Centro Universitário São Camilo, foram consultados, dos quais 86 foram descartados, por estarem desatualizados (13) ou por não possuírem informações pertinentes ao trabalho (72).

Palavras chaves: Sistema Rh. Doença hemolítica do recém-nascido. Genotipagem *RHD* fetal. Profilaxia anti-D. Genotipagem pré-natal de sistemas sanguíneos. Imunoglobulina Rho(D). Diagnóstico da doença hemolítica perinatal. Tratamento da doença hemolítica perinatal.

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 Sistema Rh

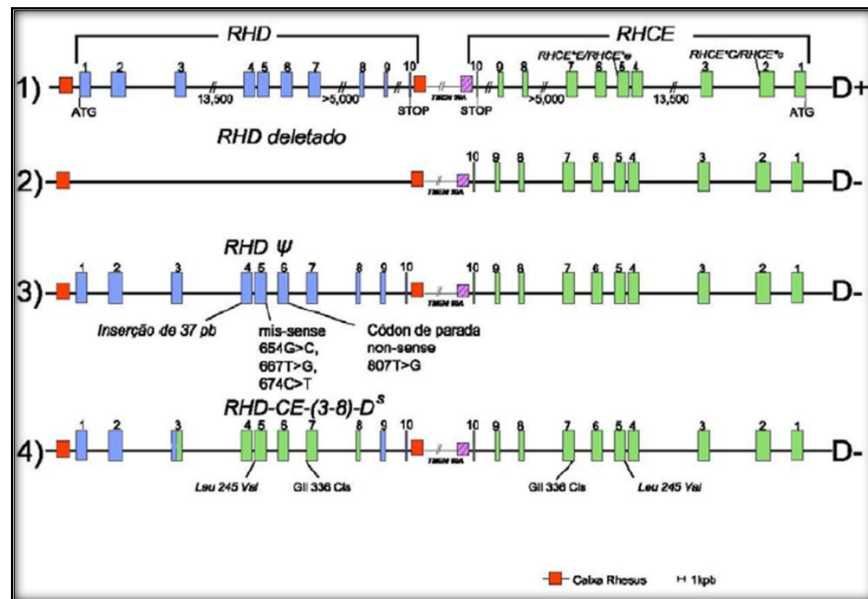
O sistema Rh é o mais complexo dos sistemas sanguíneos de acordo com Cartron (1999). Chérif-Zahar (1991) afirma que a expressão dos antígenos do sistema Rh é controlada por dois genes (*RHD* e *RHCE*) localizados no braço curto do cromossomo 1p34.3-1p36.1. Cartron (1994) explica que o gene *RHD* codifica a proteína RhD, enquanto o gene *RHCE* codifica a proteína RhCE. Segundo Westhoff (2004), esses genes possuem uma similaridade de 97%, sendo que ambos possuem 10 exons.

De acordo com Avent e Reid (2000), os genes *RHD* e *RHCE* codificam, mais frequentemente, 8 haplótipos: Dce, dce, DCe, dCe, DcE, dcE, DCE e dCE. Colin et al. (1991) complementam que presença da proteína RhD (representada por D) caracteriza o fenótipo RhD positivo, enquanto sua ausência (representada por d) caracteriza o fenótipo RhD negativo. É importante ressaltar que no fenótipo RhD negativo o gene *RHCE* ainda está presente. Estatisticamente, de acordo com Race e Sanger (1975), o fenótipo RhD negativo está presente em 15%-17% dos caucasianos, em 3%-5% dos africanos e em menos de 0.1% da população asiática.

Segundo Martin et al. (2013), a deleção total do gene *RHD* é o principal mecanismo do fenótipo RhD negativo, e é responsável por 70% dos fenótipos RhD negativos em asiáticos e por 10-23% em africanos. Entretanto, de acordo com Touinssi et al. (2009), há também outros dois mecanismos moleculares que inativam o gene *RHD* e foram descobertos em afrodescendentes. Kolialexi, Tounta e Mavrou (2010) afirmam que um deles é o *RHD pseudogene* (*RHD $\psi$* ), que possui uma duplicação de 37-bp entre o intron 3 e o exon 4, além de mutações missense no exon 5 e uma mutação nonsense no exon 6, o que leva a introdução de um stop códon, impedindo assim a transcrição e tradução do gene. Esse genótipo está presente em 66% dos africanos RhD negativos. O mesmo autor complementa que o outro mecanismo, presente em cerca de 15% dos africanos RhD negativos, é a

hibridização *RHD-CE-D*, que contém os exons 1, 2, parte do exon 3 e os exons 9 e 10 do gene *RHD* e parte do exon 3 e os exons 4, 5, 6, 7 e 8 do gene *RHCE*. Os fenótipos RhD negativo (deleção e pseudogene) e positivo estão representados na figura 1, assim como a organização dos genes *RHD* e *RHCE*.

**Figura 1 – Organização genômica do locus RH dos fenótipos RhD mais comuns.**



Fonte: (ZIZA, 2015)

Nota: 1) Representação dos genes *RHD* e *RHCE* em um RhD positivo. Ambos possuem organização semelhante de 10 exons cada, entretanto, o gene *RHD* orienta-se no sentido 5'-3' enquanto que o gene *RHCE* orienta-se no sentido 3'-5' e são separados por sete exons do gene *SMP1*.

2) Deleção do gene *RHD*, causa predominante do fenótipo RhD negativo.

3) *RHD pseudogene* (*RHDψ*) descoberto em afrodescendentes.

4) Estrutura do gene híbrido *RHD-RHCE-RHD*.

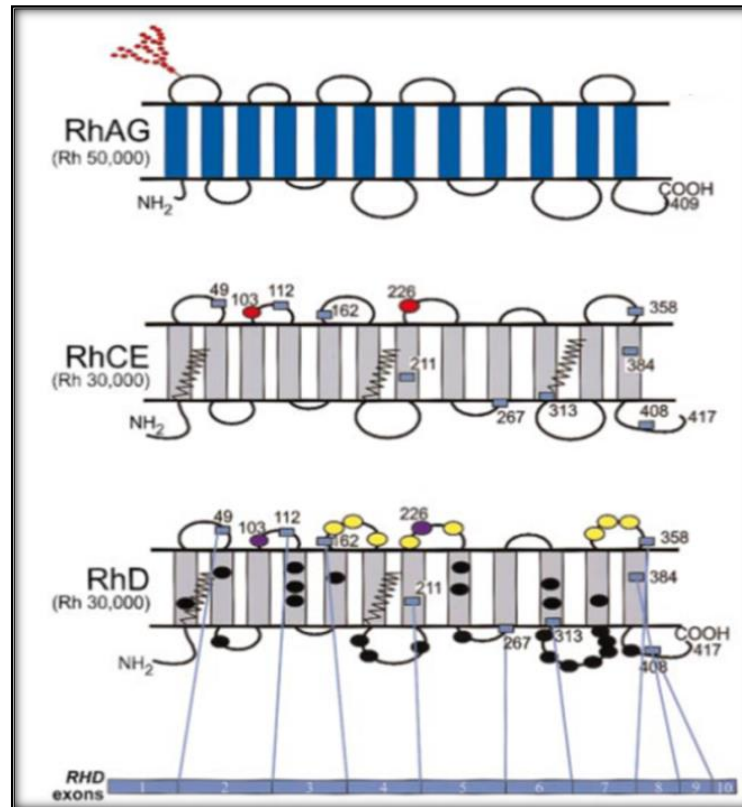
As proteínas RhD e RhCE, de acordo com Ridgwell et al. (1992), estão associadas à membrana dos eritrócitos e possuem tamanho aproximado de 30kDa e por isso são chamadas de polipeptídios Rh30. Segundo o modelo proposto por Hermand et al. (1993), essas proteínas atravessam a membrana do eritrócito 12 vezes, sendo que a porção amino terminal e a porção carboxila terminal estão voltadas para o meio intracelular. Além disso, segundo o mesmo modelo, tratam-se de proteínas não glicosiladas. Apesar de todas as semelhanças, Avent et al. (1996)

afirmam que essas proteínas diferem em 31 aminoácidos localizados entre as posições 121 e 354.

A expressão das proteínas do sistema Rh, de acordo com Chou e Westhoff (2010), depende da presença da proteína RhAG. Lögdberg, Reid e Zelinski (2011) explicam que essa “dependência” se dá pela associação de duas moléculas de RhAG com duas moléculas de RhD e/ou RhCE. Desde 2010 a proteína RhAG foi desmembrada do sistema Rh pela Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (*International Society of Blood Transfusion*), sendo considerada a partir de então o 30º grupo sanguíneo.

De acordo com Chérif-Zahar (1996), essa proteína é codificada pelo gene *RHAG* que está localizado no cromossomo 6p11-p21.1. O mapeamento desse gene, presente no estudo de Matassi et al. (1998), demonstrou que sua organização é semelhante a dos genes *RHD* e *RHCE*, possuindo também 10 exons. Com isso, Eysers et al. (1994) afirmam que a proteína RhAG é cerca de 38% semelhante as proteínas RhD e RhCE, sendo a principal diferença entre elas a presença de uma N-glicosidase no primeiro loop extracelular da proteína RhAG. A figura 2 representa o esquema das proteínas do sistema Rh (RhD e RhCE) e da proteína RhAG, evidenciando as diferenças entre elas.

**Figura 2 – Representação das proteínas RhAG, RhCE e RhD.**



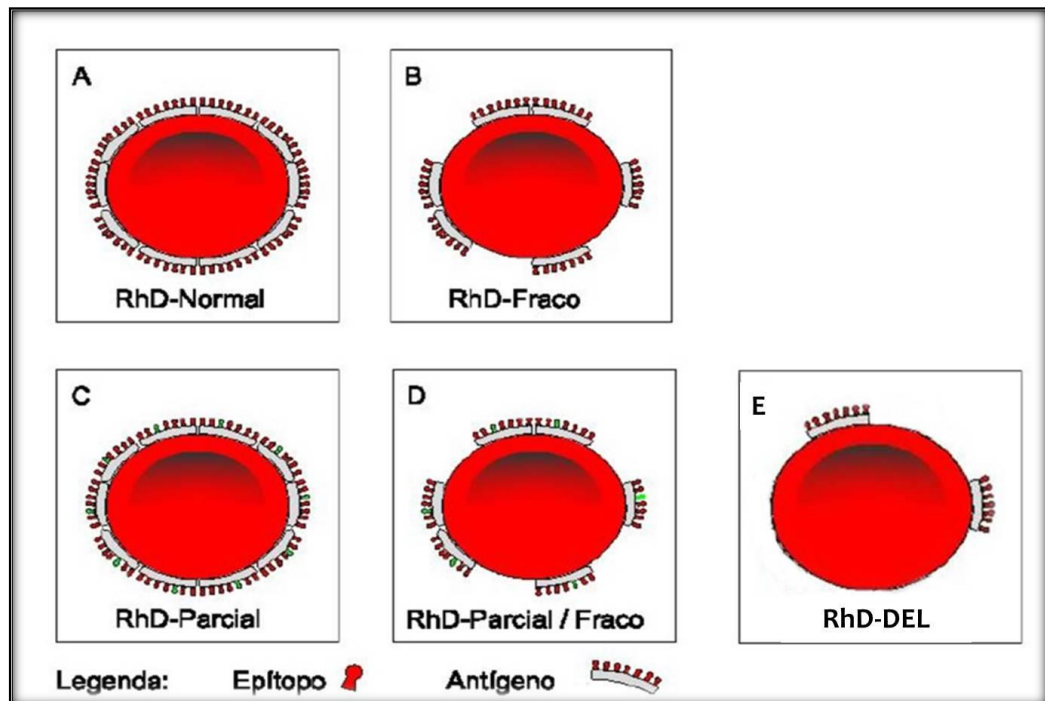
Fonte: (AVENT; REID, 2000)

Nota: Os círculos amarelos e pretos representam os aminoácidos específicos da proteína RhD. Os círculos vermelhos representam os aminoácidos que são cruciais para os antígenos C/c e E/e. As linhas em zigzag representam os aminoácidos Cys-Leu-Pro que provavelmente estão envolvidos no sítio de palmitoilação. A N-glicação da proteína RhAG está representada pela ramificação no primeiro loop da proteína.

#### 4.1.1 Variações do fenótipo RhD

Segundo Flegel (2017), atualmente são conhecidas mais de 500 variações do fenótipo RhD. De acordo com Tippett, Lomas-Francis e Wallace (1996), essas variações podem gerar alterações quantitativas e/ou qualitativas na proteína RhD (figura 3), e apesar da complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos, três fenótipos se destacam: D fraco, D parcial e DEL.

Figura 3 – Representação das variações dos fenótipos RhD.



Fonte: (ZIZA, 2015)

Nota: Em A está representado um RhD positivo normal com número adequado de antígenos e todos os epítomos. Em B está representado o fenótipo RhD fraco com diminuição do número de antígenos, mas com todos os epítomos presentes. Em C está representado o fenótipo RhD parcial com número adequado de antígenos, mas com alteração nos epítomos. Em D está representado a combinação dos fenótipos RhD fraco e parcial com diminuição do número de antígenos e alteração dos epítomos. E por fim, em E está representado o fenótipo DEL, caracterizado por quantidades muito baixas de proteína D por hemácia.

#### 4.1.1.1 D fraco

Gupta et al. (2016) explicam que o fenótipo D fraco é caracterizado pela redução do número de antígenos D por hemácia, mas com a presença de todos os epítomos. Segundo Rizzo et al. (2012) esse fenótipo está presente em cerca de 0,2% a 1% dos caucasianos. Rouillac et al. (1996) afirmam que o fenótipo D fraco é resultado de erros transcricionais (pareamento irregular) ou pós-transcricionais do gene *RHD*, o que, segundo Denomme et al. (2005), leva a mudança de um ou mais aminoácidos na região transmembrana ou citoplasmática do polipeptídeo D, o que acaba impedindo a fixação da proteína na membrana do eritrócito. Nesses casos,

Yazer et al. (2016) explicam que a aglutinação com o reagente anti-D monoclonal é mais fraca do que a esperada, ficando normalmente entre fraca e 2+.

De acordo com Nardoza et al. (2010), os tipos mais frequentes de D fraco são o 1 e o 2 com 70% e 18% dos casos, respectivamente. Flegel (2007) explica que clinicamente os tipos 1, 2, 3, 4.0, 4.1 e 5 podem ser tratados como RhD positivo, já que não aloimunizam em contato com RhD positivos normais, enquanto os tipos 4.2, 11 e 15 devem ser tratados como RhD negativos pois produzem anti-D em contato com RhD positivos normais.

#### **4.1.1.2 D parcial**

O fenótipo D parcial, segundo Issitt e Telen (1996), sempre envolve alterações qualitativas do antígeno D que, em alguns casos, podem estar combinadas com alterações quantitativas levando ao fenótipo D parcial fraco. Gorick et al. (1993) contam que o primeiro registro desse fenótipo foi feito por Argall et al. em 1953 quando uma pessoa RhD positiva produziu anti-D após receber uma transfusão de outra pessoa também RhD positiva. Wagner et al. (1999) explicam que várias mutações podem levar ao fenótipo D parcial, sendo que a principal é a hibridização entre os alelos *RHD* e *RHCE*. Essa mutação, de acordo com Westhoff (2007), pode causar mudanças de um ou mais aminoácidos na porção extracelular do polipeptídeo D, alterando ou criando novos epítomos e por esse motivo ocorre a produção de anti-D ao contato com RhD positivo.

#### **4.1.1.1 DEL**

Por fim, Wagner (2005) afirma que o fenótipo DEL é caracterizado por níveis tão baixos de antígenos D por hemácia que não podem ser detectados pelas técnicas sorológicas convencionais usadas na rotina, sendo necessária a realização de técnicas de adsorção e eluição para sua detecção. De acordo com Daniels (2013)

cerca de 10% a 33% dos asiáticos fenotipados como RhD negativo possuem, na verdade, essa variação. Clinicamente, Flegel (2011) afirma que pessoas com fenótipo DEL tem grande potencial de desenvolver anti-D quando em contato com RhD positivo, sendo recomendado que recebam transfusão de RhD negativos ou de outro DEL.

## **4.2 DHPN**

### **4.2.1 Histórico**

De acordo com Bowman (1997), o primeiro registro da doença ocorreu em 1609 por uma parteira francesa durante um parto de gêmeos em que um nasceu com hidropisia e o outro com icterícia grave.

Séculos depois, Diamond, Blackfan e Baty (1932) descreveram a anemia congênita, a icterícia grave e a hidropisia fetal como sintomas de uma mesma doença, a qual eles chamaram de eritroblastose fetal. O termo eritroblastose fetal foi substituído por Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) porque, de acordo com Urbaniak e Greiss (2000) melhor descreve à ocorrência da hematopoiese extramedular do que o quadro geral da doença.

Darrow (1938) foi o primeiro pesquisador a afirmar que a hemólise fetal era causada pela passagem transplacentária de anticorpos maternos. No ano seguinte, Levine e Stetson (1939) descobriram um anticorpo capaz de causar a hemólise fetal a partir de um relato de caso, em que uma paciente do grupo O apresentou reação pós-transfusional após receber concentrado de hemácias de seu marido também do grupo O, um pouco depois de ter dado a luz a um feto com eritroblastose, sugerindo que a criança teria herdado algum antígeno do pai que não estaria presente na mãe.

O próximo passo crucial para a determinação da etiologia e fisiopatologia da doença foi a descoberta do sistema Rh por Landsteiner e Weiner (1940). Os autores observaram que as hemácias de 85% dos humanos aglutinavam na presença do

soro do macaco rhesus, enquanto que 15% dos indivíduos que não tinham o antígeno em seus eritrócitos não apresentavam a aglutinação.

Apesar da importância dessa descoberta o entendimento final da fisiopatologia da DHPN se deu a partir do estudo de Chown (1954), em que o autor descreveu a sensibilização materna por meio da hemorragia fetomaterna, associando esse evento à estimulação da produção de anticorpos maternos pelo contato com hemácias fetais.

Nos anos seguintes, os esforços dos pesquisadores se voltaram para a descoberta e implementação de uma profilaxia para a doença, a qual será discutida no capítulo 4.2.4.

#### **4.2.2 Etiologia**

Segundo Schtmacher e Moise (1996), a incidência da doença hemolítica perinatal é de 1 a cada 1000 recém-nascidos vivos e, de acordo com Kapur et al. (2014), é causada por aloanticorpos maternos da classe IgG que atravessam a placenta e mediam a destruição dos eritrócitos fetais por meio da fagocitose. Os aloanticorpos são provenientes da aloimunização, que, segundo Davies et al. (2009), é o processo que ocorre em resposta à exposição de antígenos eritrocitários externos por meio de transfusões ou por meio da hemorragia feto-materna durante a gestação. Uma exceção a essa regra, segundo Basu, Kaur e Kaur (2011), é a DHPN causada por anticorpos regulares do sistema ABO, que ocorre quase que exclusivamente em mães do grupo O com fetos do grupo A ou B, já que nesses casos a ocorrência de anti-A e anti-B da classe IgG é mais comum.

A incompatibilidade materno-fetal é caracterizada pela presença de um anticorpo materno contra uma proteína eritrocitária que está presente no feto, entretanto, nem todos os casos de incompatibilidade levam ao desenvolvimento da DHPN.

De acordo com Bennardello et al. (2015) a incompatibilidade ABO é a mais comum, porém a menos importante do ponto de vista clínico. A maior responsável

por casos mais graves da DHPN é a incompatibilidade RhD, segundo Haas et al. (2015). Comprovando essa informação, estudo realizado por Kamp et al. (2005) demonstrou que 85% dos fetos com DHPN desenvolveram a doença devido a presença do anti-D. Wiener et al. (1988) explicam que isso ocorre devido a alta imunogenicidade desse anticorpo, já que a maior parte das imunoglobulinas anti-D pertencem as subclasse IgG1 e IgG3, sendo que a IgG3 é a mais potente em mediar a fagocitose. Os autores afirmam que isso ocorre devido a configuração estrutural do IgG3, que facilita a sua interação com os receptores da porção Fc dos macrófagos. Além disso, foi demonstrado que a IgG3 é capaz de mediar a fagocitose por um período de tempo maior que a IgG1.

Segundo Dajak et al. (2013), além do anti-D, aloanticorpos contra mais de 50 proteínas eritrocitárias também podem levar ao desenvolvimento da DHPN em diferentes níveis de gravidade, como demonstrado na tabela 1. De acordo com Koelewijn et al. (2009), depois do antígeno D, os antígenos mais imunogênicos em ordem decrescente são: K, E, c, Jk e Fy, e portanto, são capazes de levar ao desenvolvimento da DHPN nas formas moderada e grave.

A frequência com que esses anticorpos causam a DHPN é demonstrada por três estudos representados na tabela 2.

**Tabela 1 – Correlação dos aloanticorpos eritrocitários específicos com a ocorrência da doença hemolítica perinatal.**

Sistema sanguíneo	Anticorpo	Risco de desenvolver a DHPN em crianças positivas para o antígeno	Gravidade da doença
ABO	Anti-A	Baixo risco	Moderada
	Anti-B		
Rh	Anti-D	Alto risco	Muito grave
	Anti-c	Alto risco	Grave ou moderada
	Anti-E	Médio risco	Algumas vezes grave, mas a maioria moderada
	Outros	Médio risco	Majoria moderada
	Anti-K	Alto risco	Grave ou moderada
Kell	Outros	Médio risco	Grave
	Anti-Fy <sup>a</sup>	Médio risco	Moderada
Duffy	Anti-Fy <sup>b</sup>	Médio risco	Moderada
	Anti-Jk <sup>a</sup>	Baixo risco	Moderada
Kidd	Anti-Jk <sup>b</sup>	Baixo risco	Moderada
	Anti-M	Baixo risco	Majoria moderada
MNS	Anti-N	Baixo risco	Majoria moderada
	Anti-S	Baixo risco	Majoria moderada
	Anti-s	Baixo risco	Majoria moderada
	Outros	Baixo risco	Majoria moderada
	I	Anti-I	
Lewis	Anti-Le	Nenhum risco devido a baixíssima expressão desses antígenos pelos eritrócitos fetais	
P1PK	Anti-P1		
Lutheran	Anti-Lu		
Yt	Anti-Yt		
Outros		Risco muito baixo	Raramente é grave

Fonte: (HAAS et al., 2015)

**Tabela 2 – Frequência em que os aloanticorpos causam a DHPN.**

Anticorpos	Dajak, Stefanovic e Čapkun (2011)	Chinoca et al. (2012)	Hassan et al. (2014)
anti-D	63,10%	64,30%	21,42%
anti-c	18%	1,20%	7,14%
anti-C	3,60%	17,60%	-
anti-E	6,30%	4,10%	21,42%
anti-C <sup>w</sup>	0,90%	<1%	-
anti-Rh17	2,70%	-	-
anti-K	2,70%	2,50%	14,30%
anti-Kp <sup>a</sup>	-	<1%	-
anti-Fy <sup>a</sup>	0,90%	<1%	-
anti-S	0,90%	<1%	7,14%
anti-Jk <sup>a</sup>	-	<1%	-
anti-Jk <sup>b</sup>	-	<1%	-
anti-U	-	<1%	-
anti-Di <sup>a</sup>	-	2%	-
anti-V	-	<1%	-
alo IgG indeterminada	-	2%	-
autoanticorpo	0,90%	<1%	-
anti-E + anti-c	-	-	14,30%
anti-k + anti-Lu <sup>b</sup>	-	-	7,14%
anti-K + anti-Jk <sup>b</sup>	-	-	7,14%

Fonte: Autoria própria baseado em DAJAK; STEFANOVIC; CAPKUN, 2011; CHINOCA et al, 2012; HASSAN et al, 2014

### **4.2.3 Fisiopatologia**

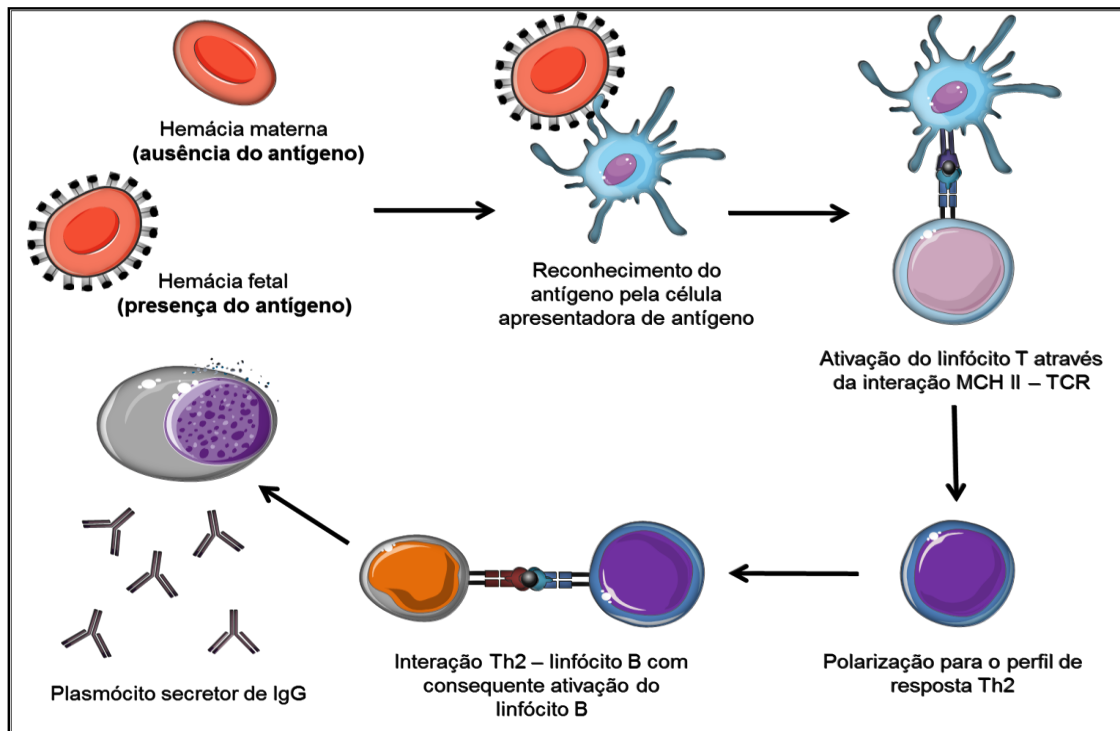
De acordo com Hadley (2002) a patogênese da DHPN pode ser dividida em quatro etapas: aloimunização da mãe, passagem dos anticorpos pela placenta, destruição dos eritrócitos fetais sensibilizados pelos anticorpos maternos e as manifestações clínicas causadas pela destruição das hemácias.

#### **4.2.3.1 Aloimunização materna**

Durante a gestação, segundo explica Dajak et al. (2013), o sangue fetal entra em contato com o sangue materno por meio de hemorragias fetomaternas, que ocorrem normalmente durante o terceiro trimestre da gravidez e imediatamente após o parto. Uma vez que os eritrócitos fetais entram em contato com o sangue materno os antígenos provenientes dos genes presente no pai são passíveis de levar ao desenvolvimento de anticorpos pela mãe.

Yazdanbakhsh, Ware e Noizat-Pirenne (2012) explicam que a aloimunização materna compreende várias etapas, sendo elas: reconhecimento do antígeno eritrocitário, processamento e apresentação do antígeno por meio da interação MHC classe II–TCR, ativação dos linfócitos TCD4 para o perfil Th2, interação desses linfócitos Th2 com os linfócitos B, diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e, por fim, secreção dos anticorpos contra o antígeno eritrocitário em questão. A figura 4 representa os processos envolvidos na aloimunização.

**Figura 4 - Esquema representativo dos processos envolvidos na aloimunização.**



#### 4.2.3.2 Fisiopatologia no feto

Uma vez formados, somente os anticorpos da classe IgG são capazes de atravessar a barreira placentária como já dito anteriormente. Isso porque, segundo afirmam Story, Mikulska e Simister (1994), os sinciciotrofoblastos expressam receptores para o domínio Fc dos anticorpos IgG (FcRn). Segundo Kohler e Farr (1966) a passagem do IgG pela placenta é lenta até aproximadamente 24 semanas de gestação, depois disso, a taxa de transferência aumenta exponencialmente até que os níveis de IgG no feto excedam os níveis de IgG na mãe.

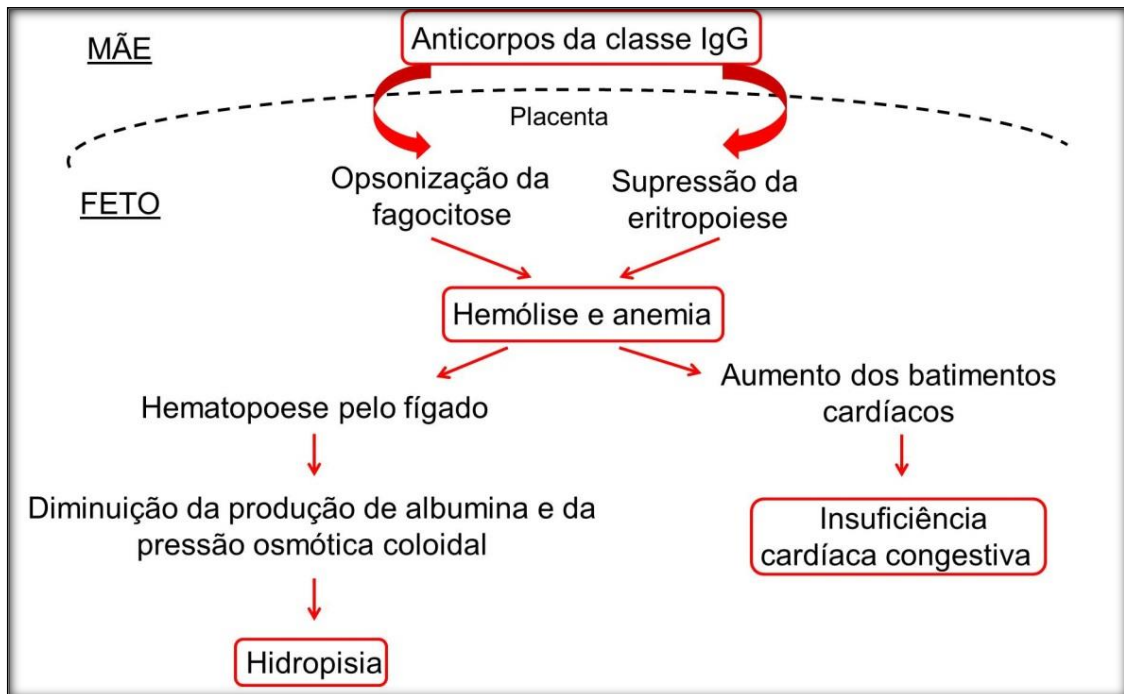
De acordo com Doyle et al. (2014), quando os anticorpos maternos atingem a circulação fetal e se ligam ao antígeno nos eritrócitos, são capazes de causar anemia por dois mecanismos: a hemólise extravascular que ocorre pela opsonização da fagocitose, por meio da ligação do receptor para a porção Fc dos anticorpos presentes nos macrófagos, e a supressão da eritropoiese. Esses mecanismos dependem do anticorpo presente, por exemplo, Lee (2007) e Tuson et al. (2011)

afirmam que o anti-K do sistema Kell é capaz de suprimir a eritropoiese por induzir a destruição de células progenitoras da linhagem eritróide. Heathcote, Carroll e Flower (2011) complementam ainda que o mesmo ocorre com o anti-GPMur do sistema MNS.

Uma vez que a anemia intensa está instalada, o organismo fetal desenvolve mecanismos compensatórios para suprir a falta de oxigenação, que, de acordo com Haas et al. (2015), envolvem a eritropoiese extramedular pelo fígado e o aumento dos batimentos cardíacos. Machin (1981) explica que a consequência da sobrecarga hepática é a diminuição da produção de albumina, levando à diminuição da pressão osmótica coloidal do plasma e ao quadro de hidropisia fetal, enquanto o resultado da sobrecarga cardíaca é a insuficiência cardíaca congestiva.

O resumo da fisiopatologia no feto está representado na figura 5.

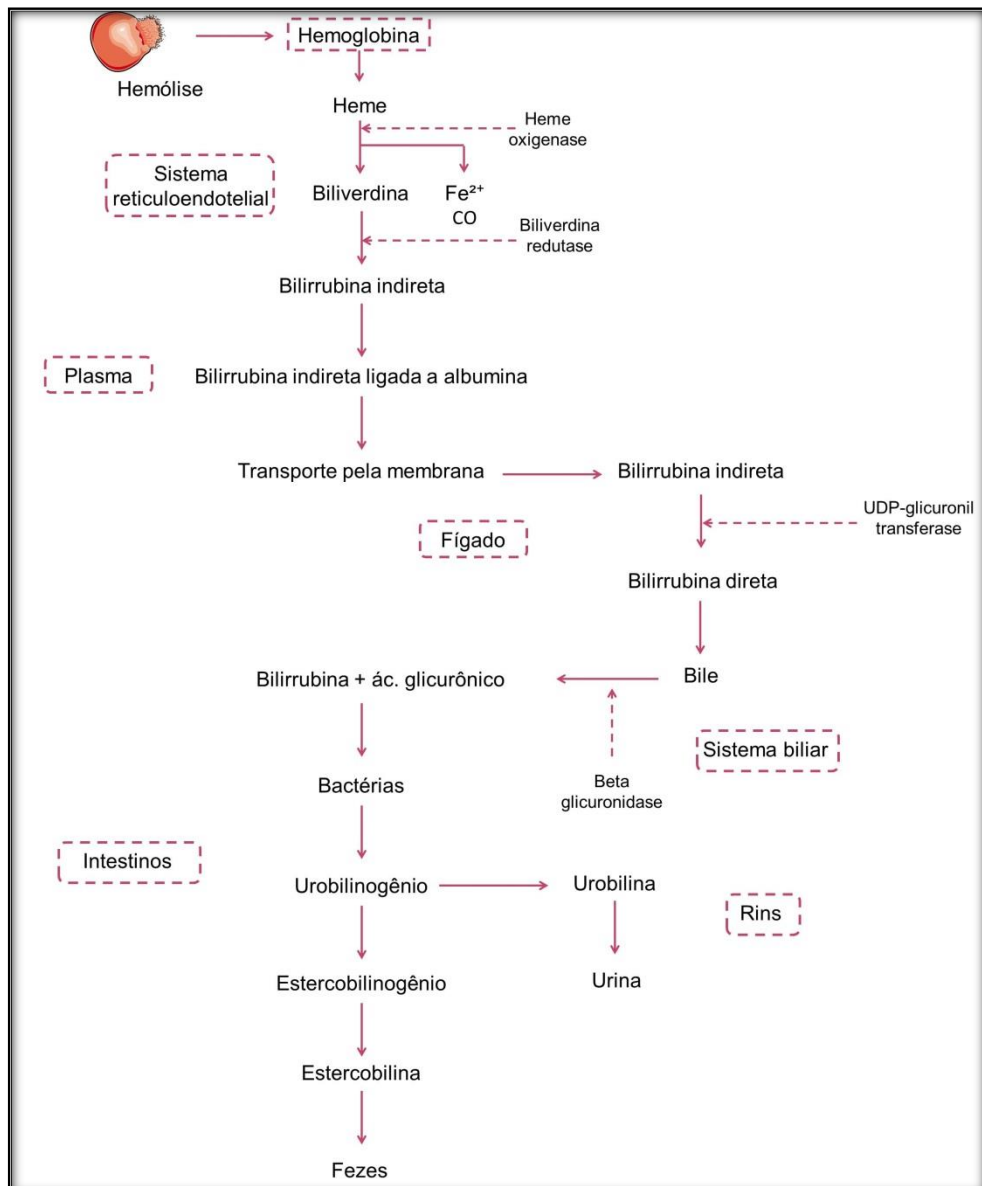
**Figura 5 – Fisiopatologia da DHPN no feto.**



#### 4.2.3.2 Fisiopatologia no neonato

No neonato o maior problema decorrente do quadro de anemia, segundo Akanmu et al. (2015), é a hiperbilirrubinemia. O aumento dos níveis séricos de bilirrubina ocorre porque, segundo explica Tenhunen, Marver e Schmid (1968), o grupo heme da hemoglobina liberada durante a hemólise é convertido em bilirrubina, como demonstrado na figura 6.

**Figura 6 – Metabolismo da bilirrubina a partir da degradação da hemoglobina e enzimas envolvidas no processo.**



Birchenall et al. (2013) explicam que a hiperbilirrubinemia traz mais prejuízos para o neonato do que para o feto porque durante a gestação a bilirrubina é conjugada pelo fígado materno, enquanto que após o nascimento o fígado infantil não é capaz de conjugar com eficiência o excesso de bilirrubina.

De acordo com Calkins et al. (2015), além de causar icterícia neonatal, o excesso de bilirrubina não conjugada pode atravessar a barreira hematoencefálica e se depositar no sistema nervoso central resultando na doença conhecida como Kernicterus. Os mesmos autores afirmam que a Kernicterus pode levar a perda da sensibilidade auditiva, atraso do desenvolvimento, paralisia cerebral e morte.

#### **4.2.4 Profilaxia**

Segundo contam McBain, Crowther e Middleton (2015), em 1961 o pesquisador Stern descobriu que a sensibilização pelo antígeno RhD poderia ser prevenida por meio da administração de anti-D. Consequente a essa descoberta dois estudos experimentais revelaram a eficácia da administração do anticorpo anti-D. No primeiro estudo, realizado por Finn et al. (1961), seis homens RhD negativos foram sensibilizados com 5 ml de sangue RhD positivo e, posteriormente, três deles receberam 10 ml de solução anti-D. Após a quantificação de eritrócitos RhD positivos nas amostras de sangue dos seis homens nos dias 2, 4 e 14, os autores concluíram que a administração de anti-D foi capaz de eliminar 50% desses eritrócitos no dia 2. No segundo estudo, feito por Freda, Gorman e Pollack (1965), nove homens RhD negativos receberam 2 ml de sangue RhD positivo uma vez por mês durante 5 meses. Quatro desses homens receberam 5 ml de anti-D a cada mês, 24 horas depois de receberam o sangue RhD positivo. Após a análise dos títulos de anti-D a cada mês nos nove homens, os autores concluíram que os que receberam a imunoglobulina não sofreram aloimunização, enquanto que quatro dos cinco homens do grupo controle formaram anti-D. Tendo em vista o sucesso dos experimentos, Kumpel (2006) afirma que imunoglobulina anti-D foi introduzida na rotina clínica na década de 1970.

Kumpel (2007) explica que a imunoglobulina anti-D é produzida a partir de pool de plasma de doadores com altos títulos de anti-D. Seu mecanismo de ação principal, segundo afirmam Yver et al. (2012), é reconhecer os eritrócitos fetais RhD positivos que ganham a circulação materna e mediar sua destruição por meio da fagocitose antes que possam estimular a proliferação de linfócitos B RhD-reativos.

O protocolo de quando a imunoglobulina deve ser administrada, assim como a dose de administração varia de país para país e de organização para organização. Esses protocolos estão representados na tabela 3.

No Brasil, o recomendado pela resolução SS-199, de 6/10/2010 da secretária de Saúde do Estado de São Paulo é que a administração da imunoglobulina anti-D seja feita em gestantes RhD negativo não sensibilizadas, se o parceiro for RhD positivo ou desconhecido, nas seguintes situações: 28ª semana de gestação, após o parto, nas síndromes hemorrágicas (abortamento, gestação ectópica, gestação molar, placenta de inserção baixa, descolamento prematuro de placenta, sangramentos inexplicados, etc.), após aborto ou óbito fetal, após trauma abdominal, após procedimento invasivo (cordocentese, amniocentese, biópsia de vilo corial) e após realização de versão cefálica externa.

Segundo Gómez-Arbonés (2002), para que a prevenção da aloimunização seja mais eficaz a dose de imunoglobulina administrada deve ser ajustada ao volume de hemorragia fetomaterna, sendo que 300 µg de RhIG é suficiente para proteger contra 15 mL de hemácias fetais.

**Tabela 3 – Protocolo de profilaxia anti-D pré-natal de acordo com as principais recomendações internacionais.**

	Dose recomendada (µg)	Semana
Canadá (SOGC)	300 (ou 100-120)	28 (ou 28 e 34) e pós parto
Itália (SIMTI-SIGO)	250-300	28 e pós parto
Estados Unidos (ASCP)	300	28-30 e pós parto
Estados Unidos (ACOG)	não especificado	28 e pós parto
Estados Unidos (USPSTF)	300	24-28 e pós parto
Reino Unido (NICE)	100	28, 34 e pós parto
Reino Unido (BCSH)	100	28, 34 e pós parto
Austrália (NHMRC)	125	28, 34 e pós parto
Austrália (RANZCOG)	125	28, 34 e pós parto
França (CNGOF)	300	28 e pós parto
Países Baixos (CHI)	200	30 e pós parto
Espanha (SETS-SEOG)	300	28 e pós parto

SOGC: Sociedade de Obstetras e Ginecologistas do Canadá

SIMTI: Sociedade Italiana de Medicina Transfusional e Imunohematologia

SIGO: Sociedade Italiana de Ginecologia e Obstetria

ASCP: Sociedade Americana de Patologia Clínica

ACOG: Associação Americana de Obstetras e Ginecologistas

USPSTF: Força Tarefa de Serviços Preventivos dos Estados Unidos

NICE: Instituto Nacional de Excelência Clínica

BCSH: Comitê Britânico para Padrões em Hematologia

NHMRC: Conselho Nacional de Saúde e Pesquisa Médica

RANZCOG: Associação Real Australiana e Neozelandês de Obstetras e Ginecologistas

CNGOF: Associação Nacional Francesa de Obstetras e Ginecologistas

CHI: Conselho de Seguro de Saúde

SETS: Sociedade Espanhola de Transfusão Sanguínea

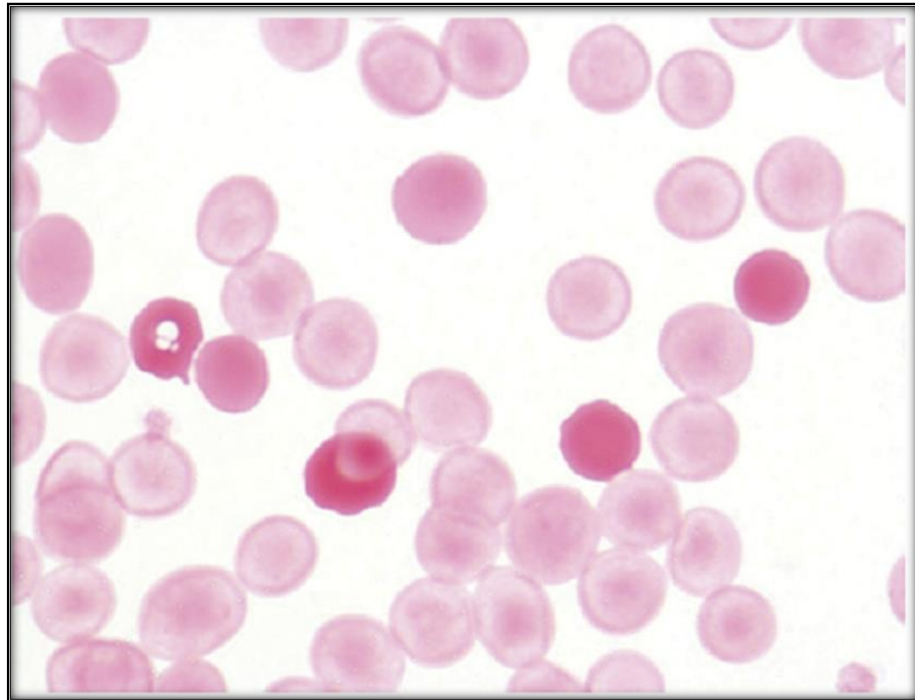
SEOG: Sociedade Espanhola de Obstetria e Ginecologia

Fonte: (LIUMBRUNO et al., 2010)

Dois métodos são utilizados para quantificar o grau de hemorragia: o teste de Kleihauer-Betke e a citometria de fluxo. De acordo com Kim e Makar (2012) o teste de Kleihauer-Betke baseia-se no princípio de que a hemoglobina fetal é resistente à eluição ácida enquanto que a hemoglobina adulta é sensível. Segundo Baiochi et al. (2004), o procedimento é realizado da seguinte forma: após a confecção do esfregaço de sangue periférico materno, a lâmina é fixada em álcool 80% e

posteriormente imergida em solução ácida de citrato tamponada com pH de 3,2 a 37°C por 5 minutos e a coloração subsequente da lâmina com hematoxilina permite diferenciar as hemácias fetais das hemácias maternas (figura 7). Já a citometria de fluxo, segundo explicam Dziegiel, Nielsen e Berkowicz (2006), tem por princípio a utilização de anticorpos anti-HbF conjugados com fluorocromos, que ao se ligarem à hemoglobina fetal, em eritrócitos previamente permeabilizados, geram uma luz fluorescente que é quantificada pelo citometro, permitindo então estimar a quantidade de hemácias fetais presentes no sangue materno.

**Figura 7 – Teste de Kleihauer-Betke a partir de sangue materno aloimunizado após hemorragia fetomaterna.**



Fonte: (GEAGHAN, 2011)

Nota: A resistência da hemoglobina fetal ao tratamento ácido destaca as células fetais na amostra de sangue materno: as células fetais (cor de rosa brilhante) aparecem mais escuras e as células maternas (“fantasmas”) aparecem mais claras.

Estudo realizado por Geifman-Holtzman et al. (1997) comprova a eficácia da utilização da imunoglobulina anti-D como forma de profilaxia, a partir de um conjunto de estudos de diferentes autores e anos, em que foram mensuradas as frequências de anticorpos irregulares em gestantes. O resultado encontra-se na tabela 4.

Esse estudo demonstra a diminuição da frequência do anti-D em gestantes ao longo dos anos: de 43.3 por 1000 amostras em 1967 para 2.6 por 1000 amostras em 1996. O autor afirma que a diminuição da aloimunização por anti-D é reflexo do uso generalizado da profilaxia RhIG como parte da rotina pré-natal de mulheres RhD negativas. Além disso, a análise desses dados revela que os antígenos K, E e c são as principais causas de aloimunização depois do antígeno D em gestantes.

**Tabela 4 – Número de anticorpos por 1000 amostras de mulheres aloimunizadas em idade reprodutiva.**

Anticorpo	Polesky (1967)	Queenan et al (1969)	Pepperell et al (1977)	Filbey et al (1995)	Geifman-Holtzman et al (1996)
D	43.3	16.5	1.3	1.4	2.6
E	1.9	1.9	1.0	0.5	2.0
c	1.6	0.7	0.8	0.3	0.7
K	2.2	1.6	0.5	0.4	3.2
Le <sup>a</sup> , Le <sup>b</sup>	2.2	2.8	2.4	2.2	3.0

Fonte: (GEIFMAN-HOLTZMAN et al., 1997)

Sabendo que os anticorpos contra esses antígenos também são passíveis de levar ao desenvolvimento da DHPN de forma moderada ou grave e que a imunoglobulina anti-D somente previne a aloimunização contra o antígeno D, medidas alternativas para evitar a formação de outros aloanticorpos clinicamente significantes têm sido tomadas em diversos países. Segundo Moise Junior (2000) e Koelewijn et al. (2009), na Austrália e nos Países Baixos respectivamente, somente concentrado de hemácias Kell negativo é transfundido em mulheres em idade reprodutiva. Ainda segundo Dajak et al. (2013), na Croácia, além de transfusão de sangue Kell negativo, as mulheres também devem receber sangue RhC, Rhc e RhE compatíveis desde 2006.

## **4.2.5 Diagnóstico**

### **4.2.5.1 Diagnóstico da incompatibilidade materno fetal**

A primeira etapa para o diagnóstico da incompatibilidade materno fetal é saber se a mãe possui algum aloanticorpo. De acordo com o Manual de Perinatologia (2012) a detecção de aloanticorpos se faz através da pesquisa de anticorpos irregulares (PAI). Oliveira, Ribeiro e Vizzoni (2013) explicam que essa detecção é feita a partir da reação do soro do paciente com duas ou três hemácias do grupo O e fenótipo conhecido. Os autores acrescentam ainda que toda pesquisa de anticorpos irregulares positiva deve ter a especificidade do anticorpo investigada por meio de um painel de hemácias industrializadas, contendo de 10 a 30 frascos de hemácias do grupo O de diferentes indivíduos, previamente fenotipados para os principais sistemas sanguíneos. Baiocchi e Nardoza (2009) afirmam que o teste deve ser realizado para todas as gestantes na primeira consulta pré-natal e caso seja negativo, repetido na 28ª semana de gestação.

Uma vez identificado, Moise (2005) afirma que o anticorpo deve ser titulado e a titulação deve ser repetida a cada 4 semanas até a 24ª semana de gestação e, a partir de então, a cada 2 semanas.

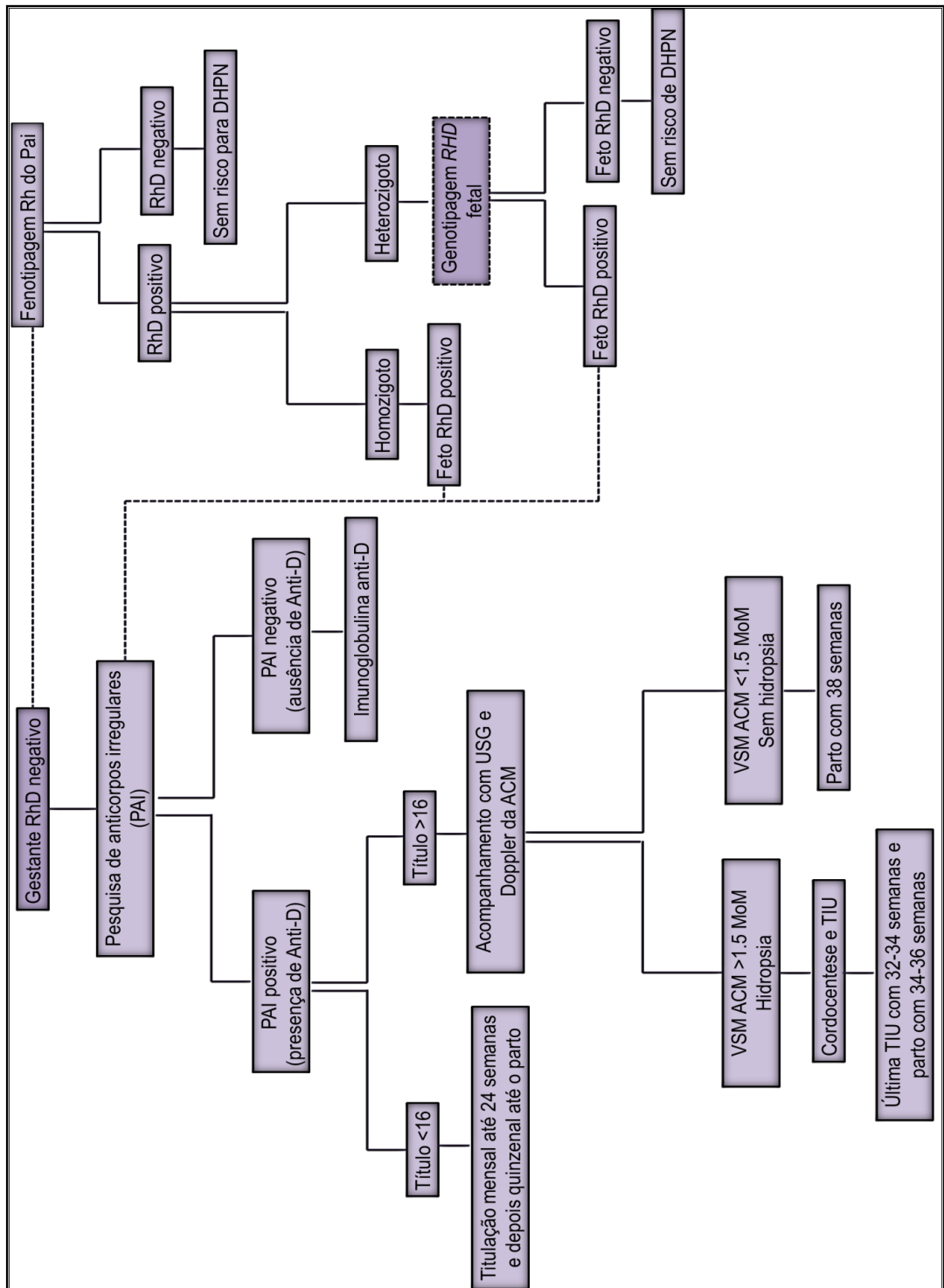
Em paralelo, Satake et al. (2010) recomendam que o pai seja testado para a presença do antígeno ao qual o anticorpo é dirigido, pois se o pai for negativo para o antígeno em particular então a avaliação posterior do feto é desnecessária, enquanto que se o pai for positivo para o antígeno o próximo passo geralmente requer acompanhamento fetal para possível anemia.

#### 4.2.5.2 Diagnóstico pré-natal

##### 4.2.5.2.1 Genotipagem *RHD* por meio do plasma materno

Bombard et al. (2011) explicam que a genotipagem *RHD* fetal é útil para estabelecer a conduta clínica do pré-natal de mulheres RhD negativas que tenham parceiro heterozigoto. Isso porque, segundo Schoot (2003), quando o parceiro é heterozigoto há 50% de chance de o feto ser RhD positivo, enquanto que quando o parceiro é homozigoto essa chance é de 100% e portanto, não há a necessidade de realizar a genotipagem. Quanto à conduta clínica, a técnica auxilia porque, de acordo com Bianchi et al. (2005), se for constatado que o feto é RhD negativo nenhum procedimento invasivo futuro será necessário, enquanto que se um feto RhD positivo for identificado a gestante terá que ser monitorada frequentemente para o risco de aloimunização e de anemia fetal. O esquema da aplicação da genotipagem na conduta pré-natal de gestantes RhD negativas está representado na figura 8.

Figura 8 – Fluxograma demonstrando a aplicação da genotipagem *RHD* fetal na conduta clínica pré-natal de gestantes RhD negativas, se a técnica for implementada na rotina.



Nota: As linhas pontilhadas representam a correlação dos exames, enquanto as linhas contínuas representam a conduta a ser seguida.

USG: ultrassonografia.

ACM: artéria cerebral média.

VSM: velocidade sistólica máxima.

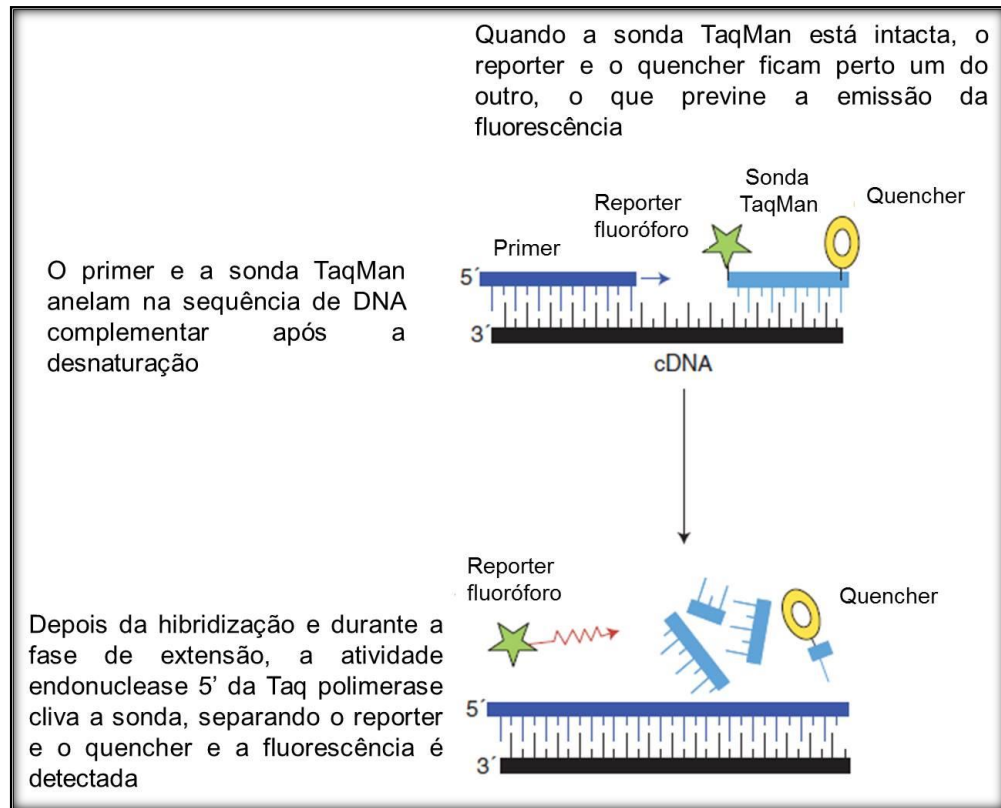
TIU: transfusão intrauterina.

Segundo Tounta et al. (2011), a genotipagem *RHD* fetal pode ser realizada utilizando DNA fetal proveniente do líquido amniótico (amniocentese) ou das vilosidades coriônicas, entretanto, esses procedimentos são invasivos e, além de aumentarem o risco de aloimunização materna devido à hemorragia materno-fetal, também podem levar ao aborto. A possibilidade de realizar a genotipagem por métodos não invasivos surgiu com a descoberta da presença de DNA fetal livre no soro ou plasma materno por Lo et al. (1997). Lo et al. (1998) também demonstram que a quantidade de DNA fetal livre no plasma materno é apropriada para a detecção e aumenta de 3,4% no primeiro trimestre de gestação para 6,2% no terceiro trimestre.

Apesar de alguns autores, como Machado et al. (2006), utilizarem o PCR convencional para a determinação do genótipo *RHD* fetal, o ideal segundo Schoot, Hahn e Chitty (2008) é utilizar o PCR em tempo real (tecnologia TaqMan) por ser uma plataforma confiável, robusta e permitir a análise de mais de um loci simultaneamente. De acordo com Arya et al. (2005) a técnica de PCR em tempo real utilizando a tecnologia TaqMan difere do PCR convencional pela adição de sondas complementares a sequência de interesse, não-extensíveis e que emitem fluorescência por possuírem um reporter fluorescente no sentido 5' e um quencher (absorve a fluorescência do reporter) no sentido 3'. O autor explica que a sonda hibridiza com a sequência alvo no sentido contrário ao anelamento do primer e é quebrada pela ação da enzima Taq polimerase (endonuclease 5'-3') durante a fase de extensão, fazendo com que o reporter se separe do quencher e a fluorescência seja emitida, aumentando de intensidade cada vez que a sequência alvo é amplificada. O princípio da técnica está esquematizado na figura 9.

De acordo com Dovic-Drnovšek et al. (2013), para que a genotipagem seja bem sucedida é necessário aumentar o rendimento do DNA fetal, selecionar as regiões apropriadas do gene *RHD* e incluir marcadores e controles adequados. Para tanto, diversos protocolos são empregados pelos pesquisadores. Estudo de Geifman-Holtzman, Grotegut e Gaughan (2006) constatou, a partir de 37 publicações em língua inglesa, um total de 44 protocolos diferentes.

**Figura 9 – Representação do princípio do PCR em tempo real utilizando a tecnologia TaqMan.**



Fonte: (ARYA et al., 2005)

A primeira mudança nos diversos protocolos é quanto ao tipo de amostra, seu preparo e sua estocagem. Estudo de Houfflin-Debarge et al. (2000) confirmou a presença de DNA fetal no soro e no plasma materno em quantidades suficientes para realizar o diagnóstico pré-natal por PCR. O mesmo estudo demonstrou, no entanto, uma maior sensibilidade no diagnóstico utilizando o plasma. Schoot, Hahn e Chitty (2008) afirmam que a desvantagem de utilizar o soro é que a camada leucoplaquetária não está disponível para eventual genotipagem materna. Sendo assim, o EDTA é normalmente o anticoagulante de escolha para as amostras de plasma, pois estudo de Lam et al. (2004) demonstrou que com o uso do EDTA os níveis de DNA livre sofrem menos variações (comparado ao uso de heparina ou citrato) se o sangue for armazenado por mais de 24 horas.

Quanto ao processamento da amostra, enquanto alguns autores como Costa et al. (2002) e Gautier et al. (2005) empregam uma única centrifugação, outros como

Hromadnikova et al. (2005a) e Moise et al. (2013) preferem utilizar duas centrifugações para que haja a remoção do material celular de forma mais eficaz. Quanto à estocagem, também há divergência entre os autores. Enquanto Müller et al. (2008) e Hromadnikova et al. (2005b) afirmam que a estocagem deve ser feita a  $-80^{\circ}\text{C}$ , Amaral et al. (2011) e Clausen et al. (2005) utilizam a estocagem a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Outra modificação do protocolo está na segunda etapa da genotipagem: a extração do DNA. De acordo com Dovc-Drnovšek et al. (2013) a extração pode ser manual ou automatizada. Clausen, Damkjar e Dziegiel (2014) afirmam que a extração automatizada do DNA é um método reprodutível, que aumenta o rendimento de DNA fetal e envolve menos erros de manipulação que o método manual. Além disso, Finning et al. (2008) complementam que trata-se de um método robusto, com capacidade para 88 amostras por corrida.

Quanto a seleção das regiões a serem amplificadas do gene *RHD*, Daniels et al. (2007) afirmam que os primers devem ser escolhidos de forma que o gene *RHCE* não seja amplificado e que não ocorra resultados falsos devido à presença do pseudogene (*RHD $\psi$* ) ou do gene híbrido *RHD-CE-D*. Segundo Sciellour et al. (2007) a primeira geração dos testes de PCR era baseada na amplificação de uma única região do gene *RHD*, entretanto, devido as diversas variantes apresentadas pelo gene os estudos subsequentes demonstraram ser importante o uso de primers para mais de uma região. Wang et al. (2009) afirmam ser possível amplificar os exons 4, 5, 7 e 10 e o intron 4 do gene *RHD*. A situação em que cada uma dessas regiões é amplificada, de acordo com o gene presente, está representada na tabela 5. Estudo de Johnson et al. (2003) comparou a sensibilidade e a especificidade da técnica utilizando: a) somente o exon 4, b) somente o exon 5, c) somente o exon 10 e d) múltiplos exons. Os valores maiores de sensibilidade e especificidade foram obtidos utilizando múltiplos exons, conforme demonstrado na tabela 6.

**Tabela 5 – Situações em que ocorre a amplificação dos éxons, de acordo com o gene presente.**

Região do gene	Gene <i>RHD</i> intacto	Deleção total do gene <i>RHD</i>	<i>RHD</i> $\psi$	<i>RHD-CE-D</i>
Exon 4	Amplificação	Não amplificação	Não amplificação	Não amplificação
Exon 5	Amplificação	Não amplificação	Não amplificação	Não amplificação
Exon 7	Amplificação	Não amplificação	Amplificação	Não amplificação
Exon 10	Amplificação	Não amplificação	Amplificação	Amplificação
Fenótipo	RhD positivo	RhD negativo	RhD negativo	RhD negativo

**Tabela 6 – Comparação da sensibilidade e da especificidade dos resultados da genotipagem obtidos a partir de diferentes éxons do gene *RHD*.**

	Exon 4	Exon 5	Exon 10	Múltiplos éxons
Sensibilidade	62	50	94	100
Especificidade	91	100	36	91

Fonte: (JOHNSON et al., 2003)

De acordo com Legler et al. (2009) o ideal é que sejam incluídos controles para a detecção do DNA fetal nos ensaios de genotipagem *RHD* fetal, em especial nas amostras em que não houve amplificação do gene (feto RhD negativo). Os vários protocolos também diferem quanto ao uso ou não desses marcadores, além do tipo de marcador escolhido. Uma possibilidade, segundo Minon et al. (2009), é utilizar o gene *SRY* presente no cromossomo Y, que entretanto, somente é útil nas gravidezes em que o feto é do sexo masculino. Brojer et al. (2005) afirmam que outra possibilidade é a pesquisa de polimorfismos de inserção ou deleção que estejam presentes no pai, mas que estejam ausentes na mãe. Essa técnica, segundo afirmam Daniels et al. (2009), possui uma série de desvantagens: não é

possível incorporar esses polimorfismos no multiplex junto com a amplificação do gene *RHD*; eles muitas vezes não são informativos, a menos que um grande número de polimorfismos seja empregado e torna o teste mais demorado e mais caro.

Por isso, Hyland et al. (2009) sugerem que, se um feto RhD negativo do sexo feminino for identificado, um ensaio de amplificação do gene supressor de tumor *RASSF1A* seja realizado. O autor explica que o promotor desse gene é hipermetilado no DNA proveniente do feto e hipometilado no DNA materno e, portanto, após o uso de uma enzima de restrição sensível a metilação (*Bst*UI) o DNA materno é removido e somente o gene proveniente do feto será amplificado.

#### **4.2.5.2.1.1 Problemas da genotipagem e possíveis soluções**

Segundo Turner, Martin e O'Leary (2003), no caso da genotipagem *RHD* fetal, os resultados falsos positivos não possuem tanto significado clínico, pois tem por consequência a administração desnecessária da imunoglobulina anti-D, não diferindo do protocolo seguido atualmente. Por outro lado, segundo afirmam Finning et al. (2008), os resultados falsos negativos são mais graves porque sem a administração da imunoglobulina RhD (RhIG) há um grande potencial de aloimunização e do feto desenvolver a Doença Hemolítica Perinatal na gravidez atual ou nas subsequentes.

Bianchi et al. (2005) afirmam que os resultados falsos negativos ocorrem principalmente pela baixa quantidade de DNA fetal presente na amostra materna devido ao início da gestação (primeiro trimestre) ou devido ao método escolhido não ser sensível o suficiente para detectar quantidades baixas de DNA fetal. Visando evitar o problema, Dovc-Drnovšek et al. (2013) recomendam o uso de marcadores de DNA fetal, como o gene *SRY* e o *RASSF1A*, para que sua presença na amostra seja confirmada.

Outro problema, de acordo com Cardo, García e Alvarez (2010), é que o excesso de DNA materno na amostra dificulta a detecção dos genes fetais. Daniels et al. (2004) explicam que esse excesso pode ocorrer devido à lise celular, que

acontece antes do plasma ser separado, em amostras que demoram muito para serem centrifugadas e armazenadas. Sendo assim, Müller et al. (2008) não recomendam que as amostras demorem mais de 5 dias para serem processadas. Uma forma de estimar a quantidade de DNA presente na amostra, e assim saber se há excesso de DNA materno, é pela amplificação de genes comuns tanto ao feto quanto a mãe, sendo exemplos o gene da  $\beta$ -globulina utilizado por Manzanares et al. (2014) e o gene *CCR5* utilizado por Daniels et al. (2004).

De acordo com Sedrak et al. (2011) os resultados falsos positivos podem ser atribuídos às variantes do gene *RHD*, como a presença de alguns tipos de D fraco e a presença do gene não funcional (pseudogene (*RHD $\psi$* ) e hibridização *RHD-CE-D*). Outro problema que pode levar a um resultado falso positivo, segundo afirmam Clausen et al. (2012), é a presença de uma das variantes citadas acima na mãe.

Sabendo que essas mutações estão presentes com maior frequência em determinadas populações, como o *RHD $\psi$*  em afrodescendentes, Finning et al. (2002) afirmam que para a realização da genotipagem é importante conhecer a etnia dos pais. Entretanto, no Brasil o desafio é ainda maior, porque de acordo com Machado et al. (2006) o intenso processo de miscigenação fez com a população brasileira fosse única em sua origem étnica sem qualquer distinção clara de raças no país.

Uma forma de resolver o problema, segundo Avent (2008) é utilizar primers para dois ou mais exons do gene *RHD* e nunca utilizar sozinho o exon 10, pois sua amplificação ocorre tanto no D positivo normal quanto nos genes não funcionais. Finning et al. (2002) recomendam ainda o uso combinado de primers para os exons 4 e/ou 5 com o exon 10, pois se houver a presença do *RHD $\psi$*  e/ou do *RHD-CE-D* a amplificação será negativa para os exons 4 e 5 e positiva para o exon 10.

Outra prática proposta por Tounta et al. (2011), para evitar tanto os resultados falsos negativos quanto falsos positivos, é utilizar duas alíquotas separadas de plasma da mesma amostra e analisa-las em duplicata, resultando em um total de quatro replicatas.

Estudo realizado por Ziza (2015) demonstra a eficácia da utilização dessas práticas, já que nenhum resultado falso positivo ou falso negativo foi encontrado. No

estudo a genotipagem *RHD* fetal foi realizada por meio da amplificação dos exons 5 e 7, escolhidos por permitirem distinguir o *RHD* $\psi$  (amplificação do exon 7 e ausência de exon 5) do gene *RHD* intacto (amplificação tanto do exon 5 quanto do exon 7). Além disso, a alta acurácia também se deu pela utilização de controles tanto para a quantidade de DNA total na amostra, por meio da amplificação do gene *CCR5*, quanto para a reação do PCR em tempo real, adicionando a cada reação uma amostra previamente caracterizada como RhD positivo, uma previamente caracterizada como RhD negativo e água. Todas as amostras foram analisadas em duplicata ou triplicata.

#### **4.2.5.2.1.2 Vantagens da genotipagem *RHD* fetal**

Estudo de diversos autores de diferentes nacionalidades comprovou que a técnica é sensível e específica, com pouca ocorrência de resultados falsos negativos e positivos, segundo demonstra a tabela 7.

**Tabela 7 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da genotipagem *RHD* fetal realizada por diferentes autores utilizando diferentes protocolos.**

	Akolekar <i>et al.</i> (2011)	Zhou <i>et al.</i> (2005)	Dovč-Drnovška <i>et al.</i> (2013)	Amaral <i>et al.</i> (2011)	Bombard <i>et al.</i> (2011)	Cardo, García e Alvarez (2010)	Wang <i>et al.</i> (2009)
País do estudo	Inglaterra	Estados Unidos	Eslovênia	Brasil	Estados Unidos	Espanha	China
Número de grávidas	591	98	153	88	236	100	78
Idade gestacional	11-13 semanas	10-42 semanas	7-38 semanas	11-39 semanas	12-13 semanas	9-13 semanas	14-40 semanas
Regiões do gene <i>RHD</i> amplificadas	exons 5 e 7	exons 4, 5 e 10	intron 4 e exons 5, 7 e 10	exons 4, 5 e 10	exons 4,5 e 7	exons 5 e 7	intron 4 e exons 5, 7 e 10
Estimativa da quantidade total de DNA	amplificação do gene <i>CCR5</i>	amplificação do gene <i>GAPD</i>	amplificação do gene da albumina ( <i>ALB</i> )	amplificação do gene <i>CCR5</i>	amplificação do gene <i>TGIF</i>	amplificação do gene da $\beta$ -globulina ( <i>GLO</i> )	amplificação do gene da $\beta$ -globulina ( <i>GLO</i> )
Marcador fetal	-	amplificação do gene <i>SRY</i>	amplificação do gene <i>SRY</i>	amplificação do gene <i>SRY</i>	amplificação dos genes <i>SRY</i> , <i>DBY</i> e <i>TTY2</i>	-	amplificação do gene <i>SRY</i>
Resultados inconclusivos	84 (14,3%)	6 (6,1%)	0 (0%)	3 (3,4%)	16* (6,8%)	2 (2%)	3 (3,8%)
Resultados conclusivos	502 (85,7%)	92 (93,9%)	153 (100%)	85 (96,6%)	207 (87,7%)	98 (98%)	75 (96,2%)
Resultados verdadeiros positivos	332	68	100	58	138	55	60
Resultados verdadeiros negativos	164	26	53	27	63	40	10
Resultados falsos positivos	0	0	0	0	2	3	5
Resultados falsos negativos	6	0	0	0	4	0	0
Sensibilidade	98,2%	100%	100%	100%	97,20%	100%	100%
Especificidade	100%	100%	100%	100%	96,90%	93%	66,60%
Valor preditivo positivo	100%	100%	100%	100%	98,60%	95%	92,30%
Valor preditivo negativo	96,50%	100%	100%	100%	94,00%	100%	100%

\*as outras 13 amostras restantes foram identificadas como portadoras do *RHD pseudogene*

Fonte: Autoria própria baseado em Akolekar *et al.* (2011), Zhou *et al.* (2005), Dovč-Drnovška *et al.* (2013), Amaral *et al.* (2011), Bombard *et al.* (2011), Cardo, García e Alvarez (2010), Wang *et al.* (2009)

Analisando esses dados vemos que cerca de 30% a 40% das mulheres RhD negativas recebem a imunoglobulina anti-D desnecessariamente, por estarem esperando uma criança também RhD negativa. Sendo assim, Freeman, Szczepura e Osipenko (2009) afirmam que a genotipagem *RHD* fetal tem o poder de permitir que a profilaxia pré-natal seja administrada somente em mulheres que estejam em uma gravidez de risco. Isso é importante porque, sabendo que a RhIG é produzida a partir de um pool de plasma de doadores, Sbarsi et al. (2012) explicam que sua administração está associada a desconforto e possível risco de infecção por vírus (Hepatite C, por exemplo) e príons (doença de Creutzfeldt-Jacob). Além disso, segundo Cardo, García e Alvarez (2010), em mulheres previamente aloimunizadas a genotipagem auxilia, uma vez que, a possibilidade do feto desenvolver DHPN por incompatibilidade RhD poderia ser descartada se um feto RhD negativo for identificado, aliviando a ansiedade da mãe, ou um acompanhamento mais próximo da gravidez poderia ser iniciado assim que a incompatibilidade materno-fetal for identificada.

Quanto às questões econômicas, levando em consideração as gestantes RhD negativas que esperam um filho também RhD negativo e portanto, não necessitam tomar a dose de imunoglobulina anti-D, Benachi et al. (2012) relatam que na França os custos com a aplicação da RhIG são de aproximadamente 237€ por paciente, enquanto que a genotipagem *RHD* fetal pode ser realizada por 150€ por exame. Manzanares et al. (2014) afirmam ainda que com a implementação da técnica na Europa economizaria 4.800€ a cada 1.000 mulheres que deixassem de administrar a imunoglobulina de forma desnecessária. Além disso, o autor complementa que a técnica automatizada custa aproximadamente um terço do valor da RhIG. No Brasil, Ziza (2015) afirma que, levando em conta os insumos e equipamentos utilizados para a realização da técnica, o teste pode ser realizado por R\$59,50, preço semelhante ao dos testes sorológicos já implementados na rotina e muito inferior ao preço de uma dose de imunoglobulina anti-D (R\$160,55).

Outra vantagem, é que a técnica pode ser aplicável tanto para outras proteínas do sistema Rh, quanto para outros sistemas sanguíneos. Daniels et al. (2004) afirmam que além do genótipo *RHD*, o PCR em tempo real também pode ser utilizado para determinar o genótipo Rhc, RhE e Kell. No estudo de Scheffer et al.

(2011) os resultados da genotipagem fetal das proteínas c e E, do sistema Rh, e da proteína K, do sistema Kell, estavam de acordo com os resultados sorológicos dos recém-nascidos, resultando em uma sensibilidade de 100%. Essa aplicação da técnica é extremamente importante para grávidas que possuem anticorpos contra essas proteínas, já que eles são capazes de levar ao desenvolvimento da DHPN de forma grave.

Outra aplicação da técnica é a investigação pré-natal de outras doenças. Os autores Hyland et al. (2009) e Sedrak et al. (2011) afirmam que a técnica, por meio da amplificação do gene *SRY* presente no cromossomo Y, pode ser útil para identificar doenças genéticas ligadas ao cromossomo X, como a hemofilia. Schoot (2003) acrescenta que em transtornos autossômicos dominantes, tais como distrofia miotônica e acondroplasia, o DNA fetal anormal herdado do pai pode ser corretamente diagnosticado a partir do plasma materno. Chiu e Lo (2011) complementam ainda que o DNA fetal presente no plasma materno pode ser utilizado para diagnosticar doenças monogênicas, como as talassemias e a fibrose cística, e as aneuploidias cromossômicas, como a trissomia do cromossomo 21.

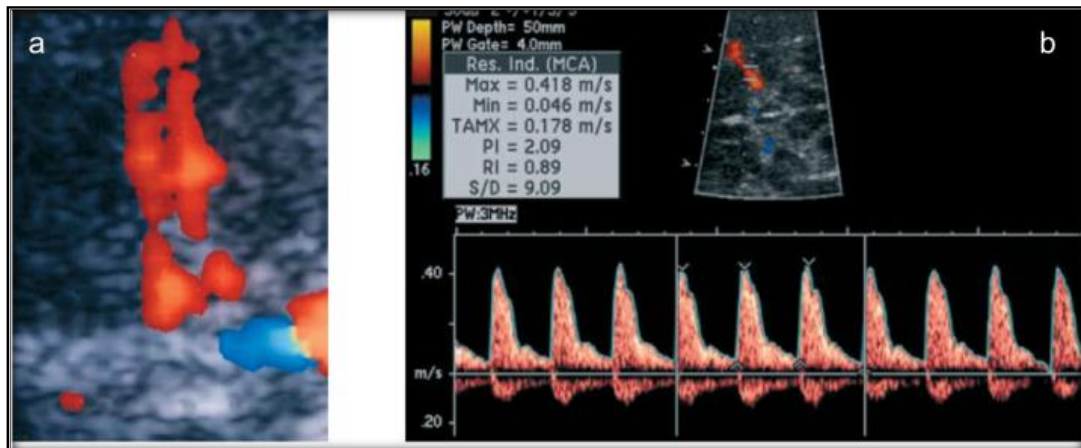
#### **4.2.5.2.2 Diagnóstico pré-natal da DHPN**

Durante a vida fetal o monitoramento da anemia se dá por principalmente dois métodos diagnósticos, segundo Singla et al. (2010): quantificação da bilirrubina no líquido amniótico e ultrassonografia de Doppler. De acordo com Oepkes et al. (2006) o nível de bilirrubina no líquido amniótico é quantificado por espectrofotometria e expresso como a variação na densidade óptica no comprimento de onda de 450 nm e seus valores são utilizados para estimar a severidade da anemia. Entretanto, o método é invasivo e está associado ao risco ruptura da membrana, infecção e perda fetal.

A ultrassonografia de Doppler, por outro lado, segundo Moise (2008), é um método não invasivo e que pode evitar em até 70% dos casos a realização da aminocentese. Mari (2000) explica que o procedimento consiste na avaliação da

velocidade máxima do fluxo sanguíneo sistólico arterial do feto, sendo que a principal artéria de escolha é a artéria cerebral média, já que responde rapidamente a hipóxia devido à forte dependência do tecido cerebral sobre o oxigênio. A interpretação do resultado segundo descrito por Mari (2005) se dá por meio do valor de corte de 1.5 MoM, sendo o fluxo arterial  $<1.5$  MoM considerado normal, enquanto que o feto que apresenta fluxo arterial  $>1.5$  MoM é considerado anêmico, já que, devido ao estado de hipóxia, há uma redistribuição do fluxo sanguíneo fetal, priorizando o fluxo em determinados órgãos e sistemas. O doppler da artéria cerebral média pode ser visto na figura 10.

**Figura 10 – Ultrassom de doppler da artéria cerebral média.**



Fonte: (MARI, 2005)

Nota: A) Artéria cerebral média (ACM) vista no ultrassom.

B) Doppler colorido da ACM (acima) e velocidade de fluxo da artéria (abaixo).

Além desses dois métodos, Dukler et al. (2003) acrescentam ainda que as medidas do fígado fetal e do perímetro do baço por meio da ultrassonografia, também são parâmetros valiosos para diagnosticar a anemia.

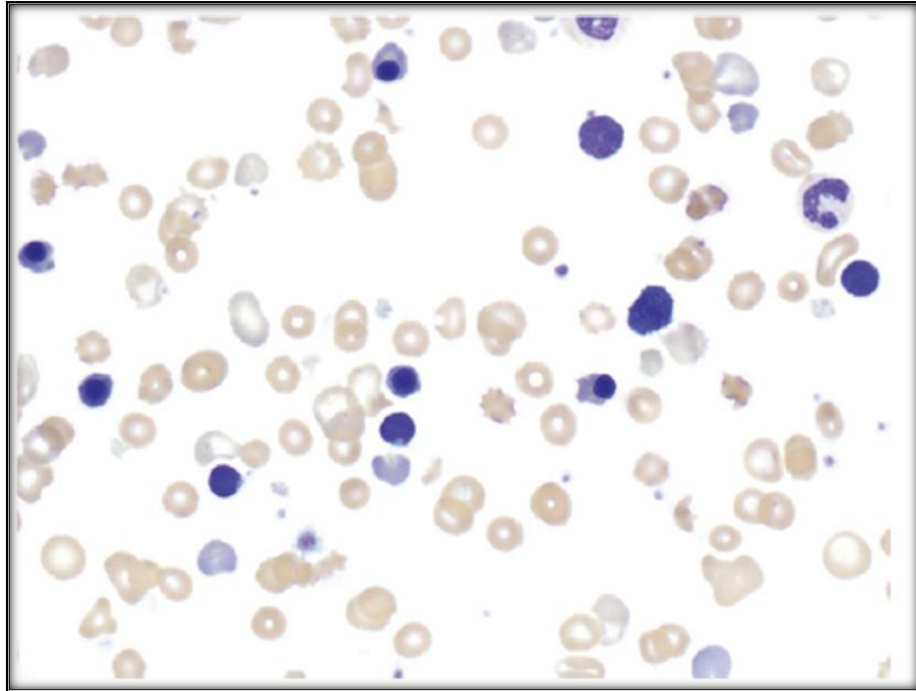
#### 4.2.5.2.3 Diagnóstico pós-natal da DHPN

Após o nascimento, para confirmar o diagnóstico, avaliar a eficácia de qualquer tratamento pré-natal e prever a provável necessidade de tratamento pós-natal, Murray e Roberts (2012) afirmam que os recém-nascidos em risco devem ter o sangue do cordão umbilical testado para os níveis de hemoglobina e bilirrubina, e utilizado para a realização do TAD e da tipagem sanguínea. O esperado nos recém-nascidos afetados é que haja uma hiperbilirrubinemia em conjunto com um declínio da hemoglobina.

De acordo com Almeida (2004) a hiperbilirrubinemia em recém-nascidos é caracterizada por níveis de bilirrubina total acima de 12 mg/dL até o quinto dia de vida. Newman et al. (2006) acrescentam ainda que a exsanguineotransfusão é recomendada quando os níveis de bilirrubina total atingem mais de 20-25 mg/dL e que níveis maiores que 30 mg/dL estão relacionados ao desenvolvimento da kernicterus. Quanto ao declínio da hemoglobina, na anemia grave é caracterizado por níveis menores que 10 g/dL, segundo afirmam Murray e Roberts (2012).

Outras alterações hematológicas encontradas em recém-nascidos com doença hemolítica, além da queda da hemoglobina e do hematócrito, podem ser evidenciadas na extensão sanguínea em lâmina. Segundo Geaghan (2011) são elas: presença de hemácias nucleadas e policromasia, devido à resposta medular à anemia, e presença de esferócitos, esquisócitos e fragmentos, causados pela hemólise e destruição imunomediada (figura 11).

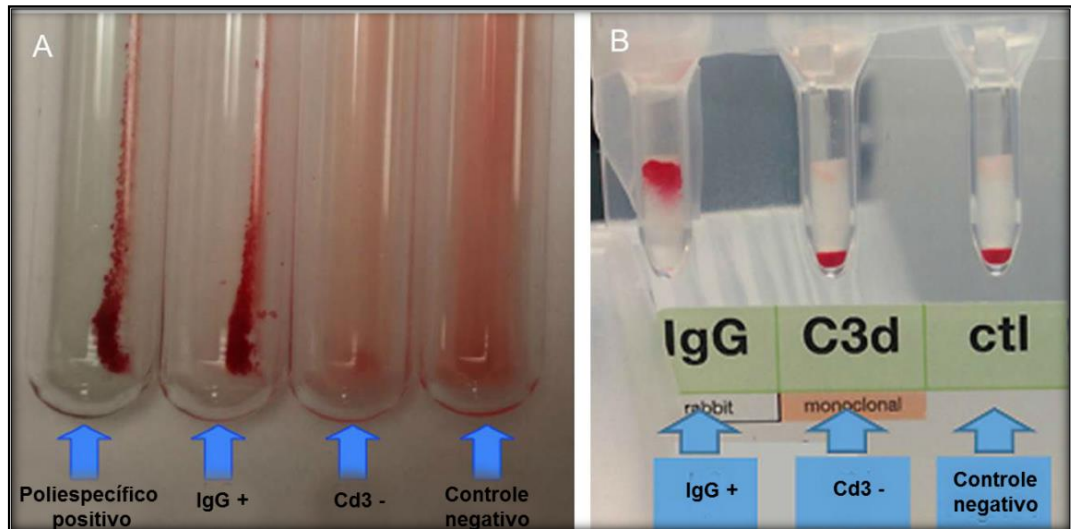
**Figura 11 – Extensão de sangue periférico de recém-nascido RhD negativo, de mãe aloimunizada, com numerosos eritroblastos circulantes, policromasia e esquisócitos.**



Fonte: (GEAGHAN, 2011)

O complemento do diagnóstico pós-natal da DHPN se dá por meio da realização do teste de antiglobulina direto (TAD). O TAD, segundo Valsami et al. (2015), é um teste de rastreio para anticorpos aderidos a membrana dos eritrócitos e é utilizado para diagnosticar a etiologia de anemias hemolíticas. Segundo explicam Zantek et al. (2012), o teste inicia-se com um soro anti-globulina humana (AHG) poliespecífico contendo anti-IgG, que reconhece a porção gama da cadeia pesada da molécula de IgG, e anti-complemento, que normalmente contém anti-C3d. Os testes positivos são repetidos com AHG monoespecíficos para IgG e complemento separadamente, sendo que a reação positiva para anti-C3d pode indicar a presença de IgM ligada ao eritrócito. A figura 12 demonstra a técnica em tubo e em gel.

**Figura 12 – Teste de antglobulina direto.**



Fonte: (KEIR et al., 2014)

Nota: A) Técnica em tubo. O AHG poliespecífico encontra-se positivo, assim como o mono específico para IgG.

B) Técnica em gel utilizando os soros mono específicos para IgG (positivo) e para C3d (negativo).

O TAD positivo indica que a hemólise é imunomediada e a especificidade do anticorpo pode ser identificada pela técnica de eluato, que é semelhante ao painel de hemácias previamente descrito. Entretanto, Dillon et al. (2010) afirmam que o TAD possui uma elevada porcentagem de falsos negativos, especialmente nos casos de incompatibilidade ABO. Por isso, dependendo do caso clínico o eluato deve ser realizado mesmo quando o TAD está negativo, como no caso relatado por Kumar et al. (2015).

Sendo assim, Peeters et al. (2016) afirmam que a combinação da análise da hemoglobina, da bilirrubina, a realização da tipagem sanguínea e do TAD, em recém-nascidos de risco, é essencial para prever a gravidade da doença e a evolução do quadro nos primeiros dias de vida.

## 4.2.6 Tratamento da Doença Hemolítica Perinatal

### 4.2.6.1 Tratamento pré-natal

Durante a vida fetal a transfusão intrauterina (TIU) é a principal intervenção terapêutica em fetos com anemia grave e, segundo Ruma et al. (2007), desde a sua introdução na década de 1960 aumentou notavelmente a sobrevida fetal nos casos de aloimunização materna.

De acordo com Rijo et al. (2016), a TIU é indicada para fetos com idade gestacional entre 18 e 35 semanas e pode ser realizada por via intravascular ou intraperitoneal, sendo que esta última permite acesso indireto à circulação fetal por meio da absorção linfática, e é recomendada em fetos com idades gestacionais mais precoces, mas com utilização limitada em fetos com hidrôpsia. Mesogitis et al. (2005) complementam que a via intravascular é a mais utilizada por permitir a correção da anemia de forma mais rápida. Oepkes e Van Scheltema (2007) explicam ainda que a escolha do sítio de transfusão depende também da posição fetal, da localização da placenta e da preferência pessoal do operador, sendo as veias umbilical e intra-hepática as principais vias de escolha para a transfusão intravascular.

Moise (2005) explica que o passo inicial do procedimento é introduzir a agulha sob orientação do ultrassom na veia umbilical e retirar uma amostra de sangue fetal para a determinação do hematócrito inicial. Em seguida um agente paralítico de curto prazo é administrado no feto para que não haja movimentação durante o procedimento. Segundo Papantoniou, Sifakis e Antsaklis (2013), a transfusão é então realizada com uma velocidade média de 5-10 mL/min e o volume de sangue a ser transfundido é calculado com base na estimativa do peso fetal e volume fetoplacentário, no hematócrito inicial, nos valores pós-transfusão desejados e no valor do hematócrito da bolsa (entre 75 e 85%) e dado pela fórmula representada na figura 13. Baiochi e Nardoza (2009) afirmam que o objetivo da TIU é elevar o

hematócrito fetal para 30 a 60% e a hemoglobina para 14 a 18 g/dL e para tanto o procedimento pode ser realizado mais de uma vez durante a gestação.

**Figura 13 – Fórmula para determinação do volume de CH a ser transfundido na TIU.**

$\text{Volume (mL)} = \frac{\text{Hematócrito desejado} - \text{Hematócrito inicial} \times 150 \text{ mL/Kg}}{\text{Hematócrito da bolsa}}$
--

Fonte: (PAPANTONIOU; SIFAKIS; ANTSAKLIS, 2013)

Segundo recomendações da Portaria 158 de 04 de fevereiro de 2016, o sangue do doador utilizado na transfusão intrauterina deve seguir uma série de exigências, sendo elas: possuir sorologia negativa para hepatite B, C, HIV, sífilis, chagas, malária e citomegalovírus; ser compatível com o sangue materno (prova cruzada negativa); ser lavada, para remoção de proteínas plasmáticas e filtrada e irradiada para a remoção de leucócitos; o concentrado de hemácias deve ser do grupo O e RhD negativo reconstituído com plasma AB; e ter sido doado até 5 dias e irradiado até 24 horas antes da realização da transfusão.

Apesar da alta eficácia da TIU, o procedimento possui diversos riscos. Rijo et al. (2016) afirmam que as principais complicações descritas são bradicárdia fetal (5%), necessidade de cesariana de emergência (2%), morte fetal (1,6%), infecção (0,3%), ruptura pré-termo de membranas (RPPM) (0,1%).

Segundo Houston et al. (2015) quando a anemia grave é constatada no início da gestação e houver a necessidade da TIU nesses casos, terapias imunomoduladoras, como a plasmaferese e a imunoglobulina intravenosa (IVIG), podem ser utilizadas como alternativa para adiar a realização da TIU para uma idade gestacional mais avançada.

Arora et al. (2015) afirmam que a plasmaferese consiste na substituição direta do plasma materno afim de reduzir o título do aloanticorpo presente. Enquanto que, de acordo com Alba et al. (2015), a imunoglobulina intravenosa diminui a síntese do

aloanticorpo na mãe e pode atravessar a placenta, atingindo a circulação fetal. Uma vez no feto, Gottstein e Cooke (2003) explicam que a IVIG bloqueia a porção Fc dos anticorpos no sistema reticulo-endotelial, impedindo a fagocitose dos eritrócitos fetais sensibilizados.

#### **4.2.6.1 Tratamento pós-natal**

Após o nascimento o principal problema é a hiperbilirrubinemia originada pela hemólise acentuada e, portanto, os métodos de tratamento nesse período baseiam-se na correção dos níveis de bilirrubina. Nesse contexto, a exsanguíneotransfusão e a fototerapia são os tratamentos mais comuns utilizados na rotina.

Segundo contam Schwartz, Haberman e Ruddy (2011), a exsanguíneotransfusão foi inicialmente introduzida no final da década de 1940 para diminuir a morbidade e a mortalidade associada à DHPN, e na época era recomendada para neonatos com níveis de bilirrubina total maior ou igual a 20mg/dL.

De acordo com Mabogunje, Olaifa e Olusanya (2016), o procedimento tem por objetivo remover ou reduzir os eritrócitos revestidos com anticorpos circulantes e/ou produtos da hemólise. Segundo afirmam Pugni et al. (2016), a exsanguíneotransfusão consiste na substituição do sangue do neonato por sangue do doador, por meio da remoção e substituição, simultâneas e repetidas, de pequenas alíquotas (5-10 mL, sendo o volume máximo de 160 mL/kg) por um curto período de tempo (90 a 150 minutos).

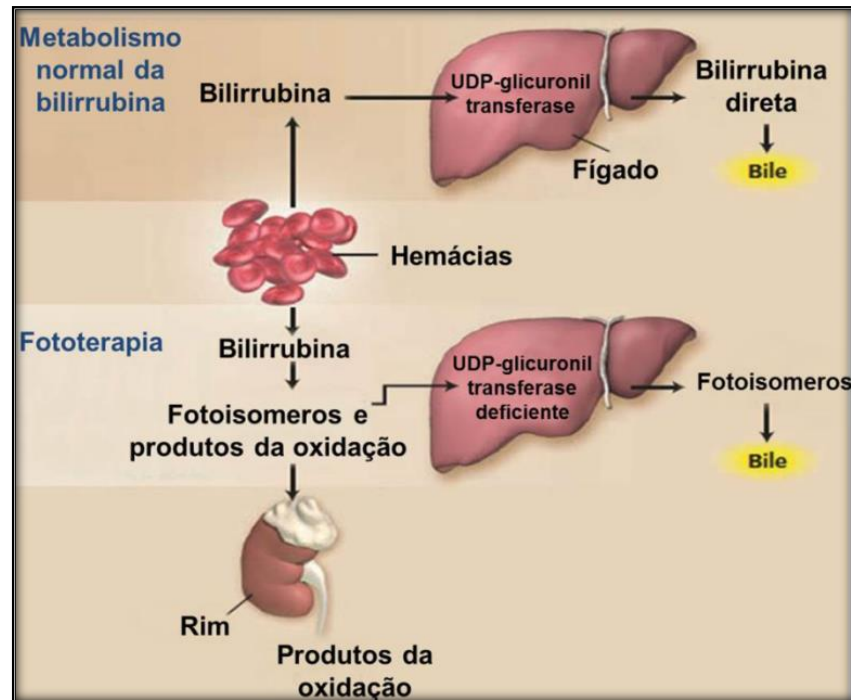
A Portaria 158 de 04 de fevereiro de 2016 recomenda que o sangue de doador utilizado no procedimento deve ser fresco (coletado não mais que cinco dias - preferencialmente 48 horas - antes da transfusão) e filtrado e irradiado para remover os leucócitos, além de possuir sorologia negativa para hepatite B, C, HIV, sífilis, chagas, malária e citomegalovírus. Além disso, o concentrado de hemácias do tipo O RhD negativo deve ser reconstituído com plasma AB a fim de reduzir o hematócrito para 40-60%.

O procedimento, apesar de ser considerado seguro, é delicado e, segundo Owa e Ogunlesi (2009), está associado a diversas complicações como: arritmias cardíacas, hipoglicemia, acidose, hipocalcemia, hipercalemia, transmissão de doenças infecciosas como hepatites virais, HIV, malária, sífilis e reações pós-transfusionais. Sá et al. (2009) complementam que os índices de mortalidade da exsanguíneotransfusão variam entre 0,5 e 3,3%.

Segundo contam Murray e Roberts (2007), a fototerapia foi introduzida como tratamento da hiperbilirrubinemia neonatal no final da década de 1950 e, desde então, sofreu avanços consideráveis para aumentar a sua eficácia. Atualmente, Bhutani (2011) afirma que a implementação difundida da fototerapia tem reduzido à necessidade da exsanguíneotransfusão e a neurotoxicidade associada à bilirrubina.

De acordo com Maisels e McDonagh (2008), no metabolismo normal a bilirrubina lipofílica é convertida em bilirrubina direta (solúvel) no fígado pela enzima UDP- glicuronil transferase, podendo então ser excretada pela bile e pela urina. Entretanto, em recém-nascidos a atividade hepática da enzima é deficiente, levando ao acúmulo de bilirrubina não-conjugada. Os autores explicam que a fototerapia converte a bilirrubina indireta em fotoisômeros amarelos e produtos de oxidação incolores que são menos lipofílicos do que a bilirrubina não-conjugada e não necessitam de conjugação hepática para excreção, sendo que os fotoisômeros são excretados principalmente na bile e os produtos de oxidação predominantemente na urina (figura 14). Segundo Hansen (2010), isso ocorre porque o isômero da bilirrubina presente no soro do recém-nascido absorve a luz de comprimento de onda de 460 nm (espectro azul), fazendo com que a molécula se reorganize formando isômeros estruturais ou configuracionais, que são mais polares que o composto original.

**Figura 14 – Metabolismo normal da bilirrubina e metabolismo da bilirrubina durante a fototerapia.**



Fonte: (MAISELS; MCDONAGH, 2008)

Segundo Vreman, Wong e Stevenson (2004), a eficácia terapêutica da fototerapia depende principalmente dos seguintes fatores: as qualidades espectrais da luz entregue (faixa de comprimento de onda e pico), intensidade de luz (irradiância), área superficial exposta, espessura e pigmentação da pele, bilirrubina total na apresentação clínica e duração da exposição.

Sherbiny et al. (2016) afirmam que a taxa de declínio da bilirrubina nas primeiras 24 horas é importante para determinar a eficácia da fototerapia, uma vez que inclui o período mais crítico. Stokowski (2006) complementa ainda que o declínio mais significativo do nível de bilirrubina ocorre nas primeiras 4 a 6 horas após o início da fototerapia, sendo que a fototerapia convencional (única) pode diminuir a bilirrubina sérica em até 22% nas primeiras 24 horas de tratamento, enquanto que a fototerapia dupla pode produzir uma queda de até 29% no mesmo período.

As indicações para a realização da exsanguíneotransfusão e da fototerapia estão representadas na tabela 8.

**Tabela 8 – Diretrizes para o uso da fototerapia e da exsanguíneotransfusão.**

A) Nível de bilirrubina total (mg/dL (µmol/L))			
Peso ao nascer (g)	Fototerapia	Exsanguíneo transfusão	
< 1500	5 - 8 (85 - 140)	13 - 16 (220 - 275)	
1500 - 1999	8 - 12 (140 - 200)	16 - 18 (275 - 300)	
2000 - 2499	11 - 14 (190 - 240)	18 - 20 (300 - 340)	

B) Nível de bilirrubina total (mg/dL (µmol/L))			
Idade gestacional (semanas)	Fototerapia	Exsanguíneo transfusão	
		Doente	Bem
36	14.6 (250)	17.5 (300)	20.5 (350)
32	8.8 (150)	14.6 (250)	17.5 (300)
28	5.8 (100)	11.7 (200)	14.6 (250)
24	4.7 (80)	8.8 (150)	11.7 (200)

Fonte: (MAISELS, 2003)

Nota: A) Baseada nos níveis de bilirrubina total no soro e peso ao nascer.  
B) Baseada nos níveis de bilirrubina total no soro e idade gestacional.

## 5 CONCLUSÃO

A Doença Hemolítica Perinatal pode se apresentar com vários níveis de gravidade, dependendo do aloanticorpo presente. Na forma mais grave a doença está associada à alta morbidade e mortalidade fetal. O anti-D ainda é o maior responsável pelos casos mais graves da doença, apesar do uso disseminado da imunoglobulina RhD.

O sistema Rh é o mais complexo dos sistemas sanguíneos, porque a proximidade dos genes *RHD* e *RHCE* facilita a ocorrência de mutações. Atualmente, são descritas mais de 500 variações do fenótipo RhD, além do pseudogene *RHDψ* e do gene híbrido *RHD-CE-D*. O conhecimento dessas mutações e das frequências com que elas ocorrem na população estudada é extremamente importante para a realização da genotipagem *RHD* fetal, pois impacta diretamente na escolha dos exons utilizados na técnica, com o intuito de diminuir a ocorrência de resultados falsos positivos.

O uso do PCR em tempo real para a determinação do genótipo *RHD* fetal a partir da amostra do plasma materno foi descrito por diversos autores como uma técnica de alta acurácia. Os valores de sensibilidade e especificidade de 100% foram relatados quando utilizada a amplificação de mais de um exon, sendo os mais indicados para diferenciar todos os tipos de genes *RHD* os exons 5, 7 e 10, e quando utilizado os genes *SRY* e *RASSF1A* como marcadores de DNA fetal para confirmação da sua presença na amostra.

Quando implementada na conduta clínica pré-natal de gestantes RhD negativas em risco para DHPN, a técnica permite direcionar o uso da imunoglobulina RhD somente quando um feto RhD positivo for identificado. Além disso, nesses casos a gestante poderá iniciar o monitoramento pré-natal de risco o quanto antes. No entanto, se for constatado que o feto é RhD negativo nenhum procedimento invasivo futuro será necessário e a gestante não precisará administrar a RhIG.

## REFERÊNCIAS

AKANMU, A. S. et al. Estimating the Risk of ABO Hemolytic Disease of the Newborn in Lagos. **Journal Of Blood Transfusion**, Lagos, v. 2015, n. 1, p.1-5, set. 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jbt/2015/560738/>>. Acesso em: 20 set. 2016.

AKOLEKAR, R. et al. Fetal RHD Genotyping in Maternal Plasma at 11-13 Weeks of Gestation. **Fetal Diagnosis And Therapy**, Londres, v. 29, n. 4, p.301-306, jan. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21212654>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

ALARCÓN, P. A. de; WERNER, E. J.. **Neonatal Hematology**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 452 p. Disponível em: <<http://www.cambridge.org/gb/academic/subjects/medicine/hematology/neonatal-hematology-pathogenesis-diagnosis-and-management-hematologic-problems-2nd-edition?format=HB>>. Acesso em: 20 maio 2016.

ALBA, J. J. F. et al. Treatment of D alloimmunization in pregnancy with plasmapheresis and intravenous immune globulin: case report. **Transfusion And Apheresis Science**, v. 51, n. 1, p.70-72, ago. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25312036>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

ALMEIDA, M. F. B. de. Quando devemos iniciar a fototerapia em recém-nascidos pré-termo? **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 4, p.256-258, ago. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jped/v80n4/v80n4a03.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2017.

AMARAL, D. R.t. et al. Fetal RHD genotyping by analysis of maternal plasma in a mixed population. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, Campinas, v. 25, n. 2, p.100-104, jan. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.20440/full>>. Acesso em: 30 nov. 2016.

ARYA, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review Of Molecular Diagnostics**, Londres, v. 5, n. 2, p.209-219, mar. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15833050>>. Acesso em: 04 dez. 2016.

ARORA, S. et al. Maternal anti-M induced hemolytic disease of newborn followed by prolonged anemia in newborn twins. **Asian Journal Of Transfusion Science**, v. 9, n. 1, p.98-101, jan. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4339947/>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

AVENT, N. D.. RHD Genotyping from Maternal Plasma: Guidelines and Technical Challenges. **Prenatal Diagnosis**, Bristol, v. 444, n. 1, p.185-201, jan. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425481>>. Acesso em: 04 dez. 2016.

AVENT, N. D.; REID, M. E.. The Rh blood group system: a review. **Blood Journal**, Nova York, v. 95, n. 2, p.375-387, jan. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627438>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

AVENT, N. D. et al. Immunochemical Analysis of the Human Erythrocyte Rh Polypeptides. **The Journal Of Biological Chemistry**, Bristol, v. 271, n. 24, p.14233-14239, jun. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663003>>. Acesso em: 27 ago. 2016.

BAIOCHI, E.; NARDOZZA, L. M. M.. Aloimunização. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 6, p.311-319, jun. 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-72032009000600008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032009000600008)>. Acesso em: 05 mar. 2017.

BAIOCHI, E. et al. Frequências dos grupos sanguíneos e incompatibilidade ABO e RhD em puérperas e seus recém-nascidos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 53, n. 1, p.44-46, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ramb/v53n1/18.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2016.

BAIOCHI, E. et al. Por que Usamos Imunoglobulina Anti-D em Excesso no Abortamento Precoce? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 5, p.363-367, abr. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-72032004000500004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032004000500004)>. Acesso em: 10 abr. 2017.

BASU, S.; KAUR, R.; KAUR, G.. Hemolytic disease of the fetus and newborn: Current trends and perspectives. **Asian Journal Of Transfusion Science**, Chandigarh, v. 5, n. 1, p.3-7, jan. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3082712/>>. Acesso em: 04 out. 2016.

BENACHI, A. et al. Impact of non-invasive fetal RhD genotyping on management costs of rhesus-D negative patients: results of a French pilot study. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, Paris, v. 162, n. 1, p.28-32, maio 2012. Disponível em: <[http://www.ejog.org/article/S0301-2115\(12\)00068-1/abstract](http://www.ejog.org/article/S0301-2115(12)00068-1/abstract)>. Acesso em: 10 dez. 2016.

BENARDELLO, F. et al. Recommendations for the prevention and treatment of haemolytic disease of the foetus and newborn. **Blood Transfusion**, Milão, v. 13, n. 1, p.109-134, jan. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4317097/>>. Acesso em: 04 out. 2016.

BHUTANI, V. K.. Phototherapy to Prevent Severe Neonatal Hyperbilirubinemia in the Newborn Infant 35 or More Weeks of Gestation. **Pediatrics**, v. 128, n. 4, p.1046-1052, set. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21949150>>. Acesso em: 08 mar. 2017.

BIANCHI, D. W. et al. Noninvasive Prenatal Diagnosis of Fetal Rhesus D: Ready for Prime(r) Time. **Obstetrics & Gynecology**, Bristol, v. 106, n. 4, p.841-844, out. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16199645>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

BIRCHENALL, K. A. et al. Neonatal outcomes of pregnancies affected by haemolytic disease of the foetus and newborn and managed with intrauterine transfusion: a service evaluation. **Blood Transfusion**, Bristol, v. 11, n. 1, p.548-552, maio 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3827399/>>. Acesso em: 25 set. 2016.

BOMBARD, A. T. et al. Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negative women. **Prenatal Diagnosis**, San Diego, v. 31, n. 8, p.802-808, maio 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21626507>>. Acesso em: 02 dez. 2016.

BOWMAN, J.. The Management of Hemolytic Disease in the Fetus and Newborn. **Seminars In Perinatology**, Manitoba, v. 21, n. 1, p.39-44, fev. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9190032>>. Acesso em: 20 maio 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 158, de 04 de fevereiro de 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, nº 25, Seção 1, p. 37, 2016. Disponível em: <[http://www.hemocentro.unicamp.br/dbarquivos/portaria\\_ms\\_n\\_158\\_de\\_04\\_de\\_fevereiro\\_2016.pdf](http://www.hemocentro.unicamp.br/dbarquivos/portaria_ms_n_158_de_04_de_fevereiro_2016.pdf)>. Acesso em: 13 mar. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Gestação de alto risco**: manual técnico. 5 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2012. 302 p. Série A. Normas e Manuais Técnicos Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/gestacao\\_alto\\_risco.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/gestacao_alto_risco.pdf)>. Acesso em: 21 maio 2016.

BROJER, E. et al. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. **Transfusion**, Varsóvia, v. 45, n. 9, p.1473-1480, set. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16131380>>. Acesso em: 30 nov. 2016.

BUJANDRIC, N.; GRUJIC, J.. Exchange Transfusion for Severe Neonatal Hyperbilirubinemia: 17 Years Experience from Vojvodina, Serbia. **Indian Journal Of**

**Hematology And Blood Transfusion**, v. 32, n. 2, p.208-214, abr. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27065585>>. Acesso em: 24 fev. 2017.

CALKINS, K. et al. Predictive value of cord blood bilirubin for hyperbilirubinemia in neonates at risk for maternal-fetal blood group incompatibility and hemolytic disease of the newborn. **Journal Of Neonatal-perinatal Medicine**, Los Angeles, v. 8, n. 3, p.243-250, out. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26518407>>. Acesso em: 27 set. 2016.

CARDO, L.; GARCÍA, B. P.; ALVAREZ, F. V.. Non-invasive fetal RHD genotyping in the first trimester of pregnancy. **Clinical Chemistry And Laboratory Medicine**, Oviedo, v. 48, n. 8, p.1121-1126, jan. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20482298>>. Acesso em: 03 dez. 2016.

CARTRON, J. P.. Defining the Rh Blood Group Antigens: Biochemistry and Molecular Genetics. **Blood Reviews**, Paris, v. 8, n. 1, p.199-212, jan. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7888828>>. Acesso em: 25 ago. 2016.

CARTRON, J. P.. RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. **Baillière's Clinical Haematology**, Paris, v. 12, n. 4, p.655-689, jan. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521692699900476>>. Acesso em: 23 ago. 2016.

CHAN, F. Y. et al. Prenatal RHD gene determination and dosage analysis by PCR: clinical evaluation. **Prenatal Diagnosis**, Brisbane, v. 21, n. 4, p.321-326, abr. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11288127>>. Acesso em: 30 nov. 2016.

CHÁVEZ, G. F.; MULINARE, J.; EDMONDS, L. D.. Epidemiology of Rh Hemolytic Disease of the Newborn in the United States. **The Journal Of The American Medical Association**, San Diego, v. 24, n. 265, p.3270-3274, jun. 1991. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=386296>>. Acesso em: 21 maio 2016.

CHÉRIF-ZAHAR, B. et al. Candidate gene acting as a suppressor of the RH locus in most cases of Rh-deficiency. **Nature Genetics**, Paris, v. 12, n. 1, p.168-173, fev. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8563755>>. Acesso em: 27 ago. 2016.

CHÉRIF-ZAHAR, B. et al. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p36.1 by in situ hybridization. **Human Genetics**, Paris, v. 86, n. 1, p.398-400, jan. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1900257>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

CHINOCA, K. N. et al. Caracterização imunohematológica de gestantes aloimunizadas da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da FMUSP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR (HEMO 2012), 2012, Rio de Janeiro. **Anais...** São Paulo: ABHH, 2012.

CHITTY, L. S. et al. Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. **British Medical Journal**, Londres, v. 349, n. 1, p.1-7, set. 2014. Disponível em: <<http://www.bmj.com/content/349/bmj.g5243>>. Acesso em: 21 maio 2016.

CHIU, R. W. K.; LO, Y. M. D. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. **Seminars In Fetal And Neonatal Medicine**, Shatin, v. 16, n. 2, p.88-93, abr. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21075065>>. Acesso em: 30 nov. 2016.

CHOU, S. T.; WESTHOFF, C. M.. The Rh and RhAG blood group systems. **Immunohematology**, Washington, v. 26, n. 4, p.178-186, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22356455>>. Acesso em: 28 ago. 2016.

CHOWN, B.. Anemia from bleeding of the fetus into the mother's circulation. **Lancet**, v. 266, n. 12, p.1213-1215, jun. 1954.

CLAUSEN, F. B.; DAMKJAER, M. B.; DZIEGIEL, M. H.. Noninvasive fetal RhD genotyping. **Transfusion and Apheresis Science**, Copenhagen, v. 50, n. 2, p.154-162, abr. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24642067>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

CLAUSEN, F. B. et al. Reliable test for prenatal prediction of fetal RhD type using maternal plasma from RhD negative women. **Prenatal Diagnosis**, Copenhagen, v. 25, n. 11, p.1040-1044, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16231312>>. Acesso em: 04 dez. 2016.

CLAUSEN, F. B. et al. Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in D- pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. **Transfusion**, Copenhagen, v. 52, n. 4, p.752-758, out. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21995641>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

COLIN, Y. et al. Genetic Basis of the RhD-Positive and RhD-Negative Blood Group Polymorphism as Determined by Southern Analysis. **Blood Journal**, Paris, v. 78, n. 10, p.2747-2752, nov. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1824267>>. Acesso em: 27 ago. 2016.

COSTA, J. M. et al. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. **British Journal Of Haematology**, Paris, v. 119, n. 1, p.255-260, out. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12358932>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

DANIELS, G. et al. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. **Vox Sanguinis**, Bristol, v. 87, n. 4, p.225-232, nov. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585017>>. Acesso em: 02 dez. 2016.

DANIELS, G. et al. Fetal RhD genotyping: A more efficient use of anti-D immunoglobulin. **Transfusion Clinique Et Biologique**, Bristol, v. 14, n. 6, p.568-571, dez. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18436463>>. Acesso em: 03 dez. 2016.

DANIELS, G. et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. **Prenatal Diagnosis**, Bristol, v. 29, n. 2, p.101-107, fev. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19085963>>. Acesso em: 04 dez. 2016.

DANIELS, G.. Rh and RHAG Blood Group Systems. In: DANIELS, Geoff. **Human Blood Groups**. 3. ed. Bristol: Wiley-blackwell, 2013. Cap. 5. p. 182-258. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781118493595>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

DAJAK, S.; STEFANOVIC, V.; CAPKUN, V.. Severe hemolytic disease of fetus and newborn caused by red blood cell antibodies undetected at first-trimester screening (CME). **Transfusion**, v. 51, n. 7, p.1380-1388, jan. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21214583>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

DAJAK, S. et al. Relationship between previous maternal transfusions and haemolytic disease of the foetus and newborn mediated by non-RhD antibodies. **Blood Transfusion**, Split, v. 11, n. 1, p.528-532, jan. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3827396/>>. Acesso em: 24 set. 2016.

DAVIES, J. et al. Haemolytic disease of the foetus and newborn caused by auto anti-LW. **Transfusion Medicine**, Basingstoke, v. 19, n. 4, p.218-219, ago. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706140>>. Acesso em: 24 set. 2016.

DARROW, R. R.. Icterus Gravis (Erythroblastosis) Neonatorum: An Examination of Etiologic Considerations. **Archives Of Pathology**, v. 25, n. 1, p.378-417, jan. 1938. Disponível em: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-6138-1\\_1](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-6138-1_1)>. Acesso em: 12 set. 2016.

DELANEY, M.; MATTHEWS, D. C.. Hemolytic disease of the fetus and newborn: managing the mother, fetus, and newborn. **American Society Of Hematology**, Seattle, v. 2015, n. 1, p.146-151, dez. 2015. Disponível em: <<http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2015/1/146.long?hw-tma-check=true>>. Acesso em: 21 maio 2016.

DENOMME, G. A. et al. Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. **Transfusion**, Toronto, v. 45, n. 1, p.1554-1560, out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16181204>>. Acesso em: 27 ago. 2016.

DIAMOND, L. K.; BLACKFAN, K. D.; BATY, J. M.. Erythroblastosis Fetalis and Its Association with Universal Edema of the Fetus, Icterus Gravis Neonatorum and Anemia of the Newborn. **The Journal Of Pediatrics**, Boston, v. 1, n. 3, p.270-309, set. 1932. Disponível em: <[http://www.jpeds.com/article/S0022-3476\(32\)80057-0/abstract](http://www.jpeds.com/article/S0022-3476(32)80057-0/abstract)>. Acesso em: 20 maio 2016.

DILLON, A. et al. Has anti-D prophylaxis increased the rate of positive direct antiglobulin test results and can the direct antiglobulin test predict need for phototherapy in Rh/ABO incompatibility? **Journal Of Paediatrics And Child Health**, v. 47, n. 1, p.40-43, 26 out. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20973864>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

DOVČ-DRNOVŠEK, T. et al. Reliable Determination of Fetal RhD Status by RHD Genotyping from Maternal Plasma. **Transfusion Medicine And Hemotherapy**, Ljubljana, v. 40, n. 1, p.37-43, jan. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3636019/>>. Acesso em: 06 dez. 2016.

DOYLE, B. et al. A correlation between severe haemolytic disease of the fetus and newborn and maternal ABO blood group. **Transfusion Medicine**, Dublin, v. 24, n. 4, p.239-243, jun. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24975587>>. Acesso em: 26 set. 2016.

DUKLER, D. et al. Noninvasive tests to predict fetal anemia: A study comparing Doppler and ultrasound parameters. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, v. 188, n. 5, p.1310-1314, maio 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748504>>. Acesso em: 24 fev. 2017.

DZIEGIEL, M. H.; NIELSEN, L. K.; BERKOWICZ, A.. Detecting fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. **Current Opinion In Hematology**, v. 13, n. 6, p.490-495, nov. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053464>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

EDER, A. F.. Update on HDFN: new information on long-standing controversies. **Immunohematology: Journal of Blood Group Serology and Education**, Washington, v. 22, n. 4, p.188-195, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17430078>>. Acesso em: 20 maio 2016.

EYERS, S. A. C. et al. Topology and Organization of Human Rh (Rhesus) Blood Group-related Polypeptides. **The Journal Of Biological Chemistry**, Bristol, v. 269, n. 9, p.6417-6423, mar. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8119991>>. Acesso em: 27 ago. 2016.

FASANO, R. M.. Hemolytic disease of the fetus and newborn in the molecular era. **Seminars In Fetal & Neonatal Medicine**, Atlanta, v. 21, n. 1, p.28-34, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26589360>>. Acesso em: 21 maio 2016.

FINN, R. et al. Experimental Studies on The Prevention of Rh Haemolytic Disease. **British Medical Journal**, Liverpool, v. 5238, n. 1, p.1486-1490, maio 1961. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1954586/>>. Acesso em: 08 out. 2016.

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, n. 7648, p.816-818, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.bmj.com/content/336/7648/816>>. Acesso em: 02 dez. 2016.

FINNING, K. 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, ago. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12385421>>. Acesso em: 11 dez. 2016.

FLEGEL, W. A.. Blood group genotyping in Germany. **Transfusion**, Württemberg, v. 47, n. 1, p.47-53, jul. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17593286>>. Acesso em: 27 ago. 2016.

FLEGEL, W. A.. Molecular genetics and clinical applications for RH. **Transfusion And Apheresis Science**, Bethesda, v. 44, n. 1, p.81-91, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3042511/>>. Acesso em: 28 ago. 2016.

FLEGEL, W. A.. **The human RhesusBase**: versão 2.0. 2017. Último update em 19/02/2017. Disponível em: <<http://www.rhesusbase.info/>>. Acesso em: 17 mar. 2017.

FREDA, V. J.; GORMAN, J. G.; POLLACK, W.. Successful Prevention of Experimental Rh Sensitization in Man with an Anti-Rh Gamma2-Globulin Antibody Preparation: A Preliminary Report. **Transfusion**, Nova York, v. 4, n. 1, p.26-32, jan. 1964. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14105934>>. Acesso em: 08 out. 2016.

FREEMAN, K.; SZCZEPURA, A.; OSIPENKO, L.. Non-invasive fetal RHD genotyping tests: A systematic review of the quality of reporting of diagnostic accuracy in published studies. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, Coventry, v. 142, n. 2, p.91-98, fev. 2009. Disponível em: <[http://www.ejog.org/article/S0301-2115\(08\)00391-6/abstract](http://www.ejog.org/article/S0301-2115(08)00391-6/abstract)>. Acesso em: 04 dez. 2016.

GAUTIER, E. et al. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: A two-year experience. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, Paris, v. 192, n. 1,

p.666-669, jan. 2005. Disponível em: <[http://www.ajog.org/article/S0002-9378\(04\)01865-4/abstract](http://www.ajog.org/article/S0002-9378(04)01865-4/abstract)>. Acesso em: 21 maio 2016.

GEAGHAN, S. M.. Diagnostic Laboratory Technologies for the Fetus and Neonate with Isoimmunization. **Seminars In Perinatology**, v. 35, n. 3, p.148-154, jun. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641488>>. Acesso em: 08 fev. 2017.

GEIFMAN-HOLTZMAN, O.; GROTEGUT, C. A.; GAUGHAN, J. P.. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood: a meta-analysis. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, Filadelfia, v. 195, n. 4, p.1163-1173, out. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17000250>>. Acesso em: 06 dez. 2016.

GEIFMAN-HOLTZMAN, O. et al. Female Alloimmunization With Antibodies Known to Cause Hemolytic Disease. **Obstetrics & Gynecology**, Nova York, v. 89, n. 2, p.272-275, fev. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9015034>>. Acesso em: 10 out. 2016.

GÓMEZ-ARBONÉS, X. et al. Quantification of foetomaternal haemorrhage.: An analysis of two cytometric techniques and a semiquantitative gel agglutination test. **Clinical And Laboratory Haematology**, v. 24, n. 1, p.47-53, fev. 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2257.2002.00146.x/abstract>>. Acesso em: 24 mar. 2017.

GORICK, B. et al. Quantitation of D Sites on Selected 'Weak D' and 'Partial D' Red Cells. **Vox Sanguinis**, Londres, v. 65, n. 1, p.136-140, jan. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7692673>>. Acesso em: 28 ago. 2016.

GOTTSTEIN, R. Systematic review of intravenous immunoglobulin in haemolytic disease of the newborn. **Archives Of Disease In Childhood - Fetal And Neonatal Edition**, v. 88, n. 1, p.6-10, 1 jan. 2003. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1755998/>>. Acesso em: 06 mar. 2017.

GREER, J. P. et al. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 13. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2014. 2278 p.

GUPTA, A. et al. Enigmatic Weak D antigen: An Experience in a Tertiary Care Hospital of East Delhi. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, Delhi, v. 10, n. 6, p.12-15, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27504293>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

HAAS, M. de et al. Anti-D prophylaxis: past, present and future. **Transfusion Medicine**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p.1-7, jan. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25121157>>. Acesso em: 10 out. 2016.

HAAS, M. de et al. A nation-wide fetal RHD screening programme for targeted antenatal and postnatal anti-D. **International Society Of Blood Transfusion**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p.164-167, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-2824.2012.01600.x/abstract>>. Acesso em: 20 maio 2016.

HAAS, M. de et al. Haemolytic disease of the fetus and newborn. **Vox Sanguinis**, Amsterdam, v. 109, n. 2, p.99-113, abr. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25899660>>. Acesso em: 22 set. 2016.

HADLEY, A. G.. Laboratory assays for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. **Transplant Immunology**, Bristol, v. 10, n. 1, p.191-198, jan. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12216949>>. Acesso em: 26 set. 2016.

HANSEN, T. W. R.. Phototherapy for Neonatal Jaundice: Therapeutic Effects on More Than One Level?. **Seminars In Perinatology**, v. 34, n. 3, p.231-234, jun. 2010.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20494740>>. Acesso em: 19 fev. 2017.

HASSAN, M. et al. Hemolytic disease of fetus and newborn due to maternal red blood cell alloantibodies in the Malay population. **Asian Journal Of Transfusion Science**, v. 8, n. 2, p.113-117, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25161351>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

HEATHCOTE, D. J.; CARROLL, T. E.; FLOWER, R. L.. Sixty Years of Antibodies to MNS System Hybrid Glycophorins: What Have We Learned?. **Transfusion Medicine Reviews**, Melbourne, v. 25, n. 2, p.111-124, abr. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21345645>>. Acesso em: 22 set. 2016.

HERMAND, P. et al. Immunochemical Characterization of Rhesus Proteins With Antibodies Raised Against Synthetic Peptides. **Blood Journal**, Nova York, v. 82, n. 2, p.669-676, jul. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8329720>>. Acesso em: 27 ago. 2016.

HOUFFLIN-DEBARGE, V. et al. High Sensitivity of Fetal DNA in Plasma Compared to Serum and Nucleated Cells Using Unnested PCR in Maternal Blood. **Fetal Diagnosis Therapy**, Londres, v. 15, n. 2, p.102-107, mar. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720875>>. Acesso em: 02 dez. 2016.

HOUSTON, B. L. et al. Severe Rh alloimmunization and hemolytic disease of the fetus managed with plasmapheresis, intravenous immunoglobulin and intrauterine transfusion: A case report. **Transfusion And Apheresis Science**, v. 53, n. 3, p.399-402, dez. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473050215001469>>. Acesso em: 02 mar. 2017.

HROMADNIKOVA, I. et al. Non-invasive Fetal RHD and RHCE Genotyping Using Real-time PCR Testing of Maternal Plasma in RhD-negative Pregnancies. **Journal Of Histochemistry & Cytochemistry**, Praga, v. 53, n. 3, p.301-305, mar. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15750007>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

HROMADNIKOVA, I. et al. Non-Invasive Fetal RHD Exon 7 and Exon 10 Genotyping Using Real-Time PCR Testing of Fetal DNA in Maternal Plasma. **Fetal Diagnosis And Therapy**, Praga, v. 20, n. 4, p.275-280, jun. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980640>>. Acesso em: 30 nov. 2016.

HYLAND, C. A. et al. Evaluation of non-invasive prenatal RHD genotyping of the fetus. **The Medical Journal Of Australia**, Brisbane, v. 191, n. 1, p.21-25, jul. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19580531>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

ISSITT, P. D.; TELEN, Marilyn J.. D, weak D (D<sup>w</sup>), and partial D: the molecular story unfolds. **Transfusion**, Nova York, v. 36, n. 2, p.97-100, fev. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8614975>>. Acesso em: 28 ago. 2016.

JOHNSON, L. et al. Variation in the reliability of RHD antenatal genotyping using the polymerase chain reaction and targeting multiple exons of the RHD gene. **Vox Sanguinis**, Brisbane, v. 85, n. 3, p.222-223, out. 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1423-0410.2003.00350.x/abstract>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

KAMP, I. L. V. et al. Complications of intrauterine intravascular transfusion for fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, Amsterdam, v. 192, n. 1, p.171-177, jun. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15672021>>. Acesso em: 22 set. 2016.

KAPUR, R. et al. Low anti-RhD IgG-Fc-fucosylation in pregnancy: a new variable predicting severity in haemolytic disease of the fetus and newborn. **British Journal Of Haematology**, Amsterdam, v. 166, n. 6, p.936-945, jun. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4282073/>>. Acesso em: 24 set. 2016.

KEIR, A. et al. How to use: the direct antiglobulin test in newborns. **Archives Of Disease In Childhood - Education & Practice Edition**, v. 100, n. 4, p.198-203, nov. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25395493>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

KIM, Y. A.; MAKAR, R. S.. Detection of fetomaternal hemorrhage. **American Journal Of Hematology**, v. 87, n. 4, p.417-423, jan. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22231030>>. Acesso em: 22 fev. 2017.

KOELEWIJN, J. M. et al. Risk factors for the presence of non-rhesus D red blood cell antibodies in pregnancy\*. **Bjog: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, Amsterdam, v. 116, n. 5, p.655-664, fev. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210505>>. Acesso em: 23 set. 2016.

KOHLER, P. F.; FARR, R. S.. Elevation of Cord over Maternal IgG Immunoglobulin: Evidence for an Active Placental Transport. **Nature**, Berlin, v. 210, n. 5040, p.1070-1071, jun. 1966. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v210/n5040/abs/2101070a0.html>>. Acesso em: 28 set. 2016.

KOLIALEXI, A.; TOUNTA, G.; MAVROU, A.. Noninvasive fetal RhD genotyping from maternal blood. **Expert Review Of Molecular Diagnostics**, Athenas, v. 10, n. 3, p.285-296, abr. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370586>>. Acesso em: 03 dez. 2016.

KUMAR, R. et al. Severe ABO Hemolytic Disease of Newborn with High Maternal Antibody Titres in a Direct Antiglobulin Test Negative Neonate. **The Indian Journal Of Pediatrics**, v. 83, n. 7, p.740-741, nov. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26558916>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

KUMPEL, B. M.. Efficacy of RhD monoclonal antibodies in clinical trials as replacement therapy for prophylactic anti-D immunoglobulin: more questions than answers. **Vox Sanguinis**, Bristol, v. 93, n. 2, p.99-111, jun. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17683353>>. Acesso em: 10 out. 2016.

KUMPEL, B. M.. On the immunologic basis of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis. **Transfusion**, Bristol, v. 46, n. 1, p.1271-1275, ago. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16965599>>. Acesso em: 12 out. 2016.

KUMPEL, B. M.; ELSON, C. J. Mechanism of anti-D-mediated immune suppression: a paradox awaiting resolution?. **Trends In Immunology**, Bristol, v. 22, n. 1, p.26-31, jan. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11286688>>. Acesso em: 12 out. 2016.

LAM, N. Y. I. et al. EDTA Is a Better Anticoagulant than Heparin or Citrate for Delayed Blood Processing for Plasma DNA Analysis. **Clinical Chemistry**, Shatin, v. 50, n. 1, p.256-257, jan. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14709670>>. Acesso em: 18 dez. 2016.

LANDSTEINER, K.; WIENER, A. S.. An Agglutinable Factor in Human Blood Recognized by Immune Sera for Rhesus Blood. **Proceedings Of The Society For Experimental Biology And Medicine**, Maywood, v. 223, n. 43, p.223, jan. 1940. Disponível em: <<http://ebm.sagepub.com/content/43/1/223.extract>>. Acesso em: 09 jun. 2016.

LEE, S.. The value of DNA analysis for antigens of the Kell and Kx blood group systems. **Transfusion**, v. 47, n. 1, p.32-39, jul. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17593284>>. Acesso em: 25 fev. 2017.

LEVINE, P.; STETSON, R. E.. An Unusual Case of Intra-Group Agglutination. **The Journal Of The American Medical Association**, Nova York, v. 113, n. 2, p.126-127, jul. 1939. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=290521>>. Acesso em: 20 maio 2016.

LEGLER, T. J. et al. Prenatal RhD Testing: A Review of Studies Published from 2006 to 2008. **Transfusion Medicine And Hemotherapy**, Berlin, v. 36, n. 3, p.189-198, maio 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2980527/>>. Acesso em: 14 dez. 2016.

LIUMBRUNO, G. M. et al. The role of antenatal immunoprophylaxis in the prevention of maternal-foetal anti-Rh(D) alloimmunisation. **Blood Transfusion**, Roma, v. 8, n. 1, p.8-16, jan. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20104273>>. Acesso em: 12 out. 2016.

LO, Y. M. D. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. **The Lancet**, Oxford, v. 350, n. 1, p.485-487, ago. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9274585>>. Acesso em: 21 maio 2016.

LO, Y. M. D. et al. Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. **The American Journal Of Human Genetics**, Shatin, v. 62, n. 4, p.768-775, abr. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529358>>. Acesso em: 19 nov. 2016.

LÖGDBERG, L.; REID, M. E.; ZELINSKI, T.. Human Blood Group Genes 2010: Chromosomal Locations and Cloning Strategies Revisited. **Transfusion Medicine Reviews**, Nova York, v. 25, n. 1, p.36-46, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21134625>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

MABOGUNJE, C. A.; OLAIFA, S. M; OLUSANYA, B. O. Facility-based constraints to exchange transfusions for neonatal hyperbilirubinemia in resource-limited settings. **World Journal Of Clinical Pediatrics**, v. 5, n. 2, p.182-190, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27170928>>. Acesso em: 05 mar. 2017.

MACHADO, I. N. et al. Fetal RHD Genotyping From Maternal Plasma In a Population with a Highly Diverse Ethnic Background. **Revista Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 52, n. 4, p.232-235, jul. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16967140>>. Acesso em: 29 dez. 2016

MACHIN, G. A.. Differential Diagnosis of Hydrops Fetalis. **American Journal Of Medical Genetics**, Calgary, v. 9, n. 1, p.341-350, fev. 1981. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6794370>>. Acesso em: 28 set. 2016.

MAISELS, M. J.; MCDONAGH, A. F.. Phototherapy for Neonatal Jaundice. **New England Journal Of Medicine**, v. 358, n. 9, p.920-928, fev. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305267>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

MAISELS, M J. Treatment of jaundice in low birthweight infants. **Archives Of Disease In Childhood - Fetal And Neonatal Edition**, v. 88, n. 6, p.459-463, 1 nov. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1763233/>>. Acesso em: 04 mar. 2017.

MALONO, J. et al. Doença Hemolítica do Recém Nascido. **Consensos em Nacionais em Neonatologia**, Coimbra, p.139-142, 2004. Disponível em: <[http://www.lusoneonatologia.com/admin/ficheiros\\_projectos/201107201730-consensos\\_neonatologia\\_\\_2004.pdf](http://www.lusoneonatologia.com/admin/ficheiros_projectos/201107201730-consensos_neonatologia__2004.pdf)>. Acesso em: 20 maio 2016.

MANUAL de Perinatologia. 1 ed. Rio de Janeiro: Perinatal, 2012. 300 p. Disponível em: <[http://www.perinatal.com.br/pdf/manual-perinatologia\\_perinatal.pdf](http://www.perinatal.com.br/pdf/manual-perinatologia_perinatal.pdf)>. Acesso em: 23 fev. 2017.

MANZANARES, S. et al. Noninvasive Fetal RhD Status Determination in Early Pregnancy. **Fetal Diagnosis And Therapy**, Armilla, v. 35, n. 1, p.7-12, dez. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24335165>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

MARI, G.. Middle cerebral artery peak systolic velocity for the diagnosis of fetal anemia: the untold story. **Ultrasound In Obstetrics And Gynecology**, v. 25, n. 4, p.323-330, abr. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15789353>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

MARI, G. et al. Noninvasive Diagnosis by Doppler Ultrasonography of Fetal Anemia Due to Maternal Red-Cell Alloimmunization. **New England Journal Of Medicine**, v. 342, n. 1, p.9-14, jan. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10620643>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

MARTIN, F. O. et al. RHD gene polymorphisms in alloimmunized RhD-negative individuals with high rate of racial admixture. **Transfusion And Apheresis Science**, São Paulo, v. 48, n. 1, p.113-116, fev. 2013. Disponível em: <[http://www.trasci.com/article/S1473-0502\(12\)00236-4/abstract](http://www.trasci.com/article/S1473-0502(12)00236-4/abstract)>. Acesso em: 05 dez. 2016.

MATASSI, G. et al. Organization of the Human RH50A Gene (RHAG) and Evolution of Base Composition of the RH Gene Family. **Genomics**, Paris, v. 47, n. 1, p.286-293, jan. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9479501>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

MCBAIN, R. D; CROWTHER, C. A.; MIDDLETON, P.. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, Adelaide, v. 9, n. 1, p.1-31, set. 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD000020.pub3/pdf>>. Acesso em: 15 out. 2016.

MESOGITIS, S. et al. Fetal Intravascular Transfusion for Hydropic Disease due to Rhesus Isoimmunization. **Fetal Diagnosis And Therapy**, v. 20, n. 5, p.431-436, ago. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113567>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

MINON, J. M. et al. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. **Transfusion**, Liège, v. 48, n. 1, p.373-381, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039319>>. Acesso em: 20 maio 2016.

MINON, J. M. et al. Rh D Foeto-Maternal Alloimmunization Prophylaxis With Anti-D Immunoglobulins Reviewed In The Era Of Foetal RHD Genotyping. **Acta Clinica Belgica**, Liège, v. 64, n. 3, p.195-202, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/acb.2009.035>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

MOISE, K. J. et al. Circulating cell-free fetal DNA for the detection of RHD status and sex using reflex fetal identifiers. **Prenatal Diagnosis**, Houston, v. 33, n. 1, p.95-101, dez. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23225162>>. Acesso em: 03 dez. 2016.

MOISE, Kenneth J.. Non-anti-D antibodies in red-cell alloimmunization. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, Chapel Hill, v. 92, n. 1, p.75-81, jan. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10986438>>. Acesso em: 08 out. 2016.

MOISE, K. J.. Red Blood Cell Alloimmunization in Pregnancy. **Seminars In Hematology**, v. 42, n. 3, p.169-178, jul. 2005. Disponível em: <[http://www.seminhematol.org/article/S0037-1963\(05\)00060-0/abstract](http://www.seminhematol.org/article/S0037-1963(05)00060-0/abstract)>. Acesso em: 20 fev. 2017.

MOISE, K. J.. The usefulness of middle cerebral artery Doppler assessment in the treatment of the fetus at risk for anemia. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, v. 198, n. 2, p.161-164, fev. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18226612>>. Acesso em: 27 fev. 2017.

MOUSSA, H. et al. Fetal RhD genotyping by real time quantitative PCR in maternal plasma of RhD-negative pregnant women from the Sahel of Tunisia. **Annales de Biologie Clinique**, Tunisia, v. 70, n. 6, p.683-688, jan. 2012. Disponível em: <[http://www.jle.com/fr/revues/abc/e-docs/fetal\\_rhd\\_genotyping\\_by\\_real\\_time\\_quantitative\\_pcr\\_in\\_maternal\\_plasma\\_of\\_rhd\\_negative\\_pregnant\\_women\\_from\\_the\\_sahel\\_of\\_tunisia\\_292881/article.phtml](http://www.jle.com/fr/revues/abc/e-docs/fetal_rhd_genotyping_by_real_time_quantitative_pcr_in_maternal_plasma_of_rhd_negative_pregnant_women_from_the_sahel_of_tunisia_292881/article.phtml)>. Acesso em: 20 maio 2016.

MÜLLER, S. P. et al. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. **Transfusion**, Hamburgo, v. 48, n. 11, p.2292-2301, nov. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18694461>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

MURRAY, N. A.; ROBERTS, I. A G. Haemolytic disease of the newborn. **Archives Of Disease In Childhood: Fetal and Neonatal Edition**, v. 92, n. 2, p.83-88, fev. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17337672>>. Acesso em: 25 out. 2016.

NARDOZZA, L. M M. et al. Bases moleculares do sistema rh e suas aplicações em obstetrícia e medicina transfusional. **Revista da Associação Médica Brasileira**,

São Paulo, v. 56, n. 6, p.724-728, ago. 2010. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302010000600026](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302010000600026)>. Acesso em: 18 ago. 2016.

NEWMAN, T. B. et al. Outcomes among Newborns with Total Serum Bilirubin Levels of 25 mg per Deciliter or More. **New England Journal Of Medicine**, v. 354, n. 18, p.1889-1900, maio 2006. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672700>>. Acesso em: 23 fev. 2017.

OEPKES, D.; VAN SCHELTEMA, P. A.. Intrauterine fetal transfusions in the management of fetal anemia and fetal thrombocytopenia. **Seminars In Fetal And Neonatal Medicine**, v. 12, n. 6, p.432-438, dez. 2007. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17706475>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

OEPKES, D. et al. Doppler Ultrasonography versus Amniocentesis to Predict Fetal Anemia. **The New England Journal Of Medicine**, v. 355, n. 1, p.156-164, jul. 2006. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa052855#t=article>>. Acesso em: 22 fev. 2017.

OLIVEIRA, M. B. S. C. de; RIBEIRO, F. C.; VIZZONI, A. G.. **Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia**. Rio de Janeiro: Epsjv, 2013. 156 p. Disponível em:  
<[http://www.retsus.fiocruz.br/sites/default/files/publicacoes/arquivos/livro\\_conceitos\\_basicos\\_e\\_aplicados\\_em\\_imuno-hematologia.pdf](http://www.retsus.fiocruz.br/sites/default/files/publicacoes/arquivos/livro_conceitos_basicos_e_aplicados_em_imuno-hematologia.pdf)>. Acesso em: 19 fev. 2017.

OWA, J. A.; OGUNLESI, T. A.. Why we are still doing so many exchange blood transfusion for neonatal jaundice in Nigeria. **World Journal Of Pediatrics**, v. 5, n. 1, p.51-55, jan. 2009. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19172333>>. Acesso em: 24 fev. 2017.

PAPANTONIOU, N.; SIFAKIS, S.; ANTSAKLIS, A.. Therapeutic management of fetal anemia: review of standard practice and alternative treatment options. **Journal Of Perinatal Medicine**, v. 41, n. 1, p.71-82, jan. 2013. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23093258>>. Acesso em: 23 fev. 2017.

PAVANI, J. M.; LOCATELI, M. F.; LIEBER, S. R.. Caracterização de Anticorpos Contra Antígenos Eritrocitários na Doença Hemolítica Perinatal (DHPN). **Sínteses: Revista Eletrônica SIMTEC**, Campinas, v. 1, n. 6, p.257-257, set. 2016. Disponível em: <<http://www.sbu.unicamp.br/seer/ojs/index.php/simte/article/view/8625>>. Acesso em: 22 fev. 2017.

PEETERS, B. et al. Post-test probability for neonatal hyperbilirubinemia based on umbilical cord blood bilirubin, direct antiglobulin test, and ABO compatibility results. **European Journal Of Pediatrics**, v. 175, n. 5, p.651-657, jan. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26782094>>. Acesso em: 03 mar. 2017.

PUGNI, L. et al. Exchange Transfusion in the Treatment of Neonatal Septic Shock: A Ten-Year Experience in a Neonatal Intensive Care Unit. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p.695-707, maio 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27171076>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

QURESHI, A.; SALMAN, M.; MOIZ, B.. Rhnull: a rare blood group phenotype. **Journal Of Pakistan Medical Association**, Karachi, v. 60, n. 11, p.960-961, nov. 2010. Disponível em: <[http://jpma.org.pk/full\\_article\\_text.php?article\\_id=2399](http://jpma.org.pk/full_article_text.php?article_id=2399)>. Acesso em: 26 ago. 2016.

RACE R. R., SANGER R.. Blood groups in man. 6th ed. Oxford: Blackwell; 1975.

RIDGWELL, K. et al. Isolation of cDNA clones for a 50 kDa glycoprotein of the human erythrocyte membrane associated with Rh (Rhesus) blood-group antigen expression. **Biochemical Journal**, Bristol, v. 287, n. 1, p.223-228, mar. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1417776>>. Acesso em: 27 ago. 1993.

RIJO, C. et al. Transfusão intra-uterina para o tratamento de anemia fetal grave: experiência de 14 anos de um centro de diagnóstico pré-natal em Portugal. **Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa**, Coimbra, v. 10, n. 2, p.102-109, jun. 2016.

Disponível em: <[http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1646-58302016000200004](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1646-58302016000200004)>. Acesso em: 03 mar. 2017.

RIZZO, C. et al. Weak D and partial D: our experience in daily activity. **Blood Transfusion**, Palermo, v. 10, n. 1, p.235-236, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320789/>>. Acesso em: 28 ago. 2016.

ROUILLAC, C. et al. Molecular Basis of the Altered Antigenic Expression of RhD in Weak D (D<sup>w</sup>) and RhC/e in RN Phenotypes. **Blood Journal**, Paris, v. 87, n. 11, p.4853-4861, jun. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8639859>>. Acesso em: 28 ago. 2016.

SÁ, C. A. M. et al. Eventos adversos associados à exsanguíneotransusão: experiência de dez anos. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v. 27, n. 2, p.168-172, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rpp/v27n2/08.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

RUMA, M. S. et al. Combined plasmapheresis and intravenous immune globulin for the treatment of severe maternal red cell alloimmunization. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, v. 196, n. 2, p.138-144, fev. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17306655>>. Acesso em: 02 mar. 2017.

SATAKE, Y. et al. Middle cerebral artery-peak systolic velocity in dizygotic twins with anti-E alloimmunization. **Journal Of Obstetrics And Gynaecology Research**, v. 36, n. 6, p.1236-1239, out. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21040209>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

SBARSI, I. et al. Implementing non-invasive RHD genotyping on cell-free foetal DNA from maternal plasma: the Pavia experience. **Blood Transfusion**, Pavia, v. 10, n. 1, p.34-38, jan. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3258987/>>. Acesso em: 30 nov. 2016.

SCHEFFER, P. G. et al. Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience. **Journal Of Obstetrics And Gynaecology**, Amsterdam, v. 118, n. 11, p.1340-1348, jun. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0528.2011.03028.x/full>>. Acesso em: 20 maio 2016.

SCHOOT, C. E. D.; HAHN, S.; CHITTY, L. S.. Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status. **Seminars In Fetal And Neonatal Medicine**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p.63-68, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1744165X07001588>>. Acesso em: 12 dez. 2016.

SCHOOT, C. E. D. et al. Prenatal Typing of Rh and Kell Blood Group System Antigens: The Edge of a Watershed. **Transfusion Medicine Reviews**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p.31-44, jan. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12522770>>. Acesso em: 07 dez. 2016.

SCHUMACHER, B; MOISE, K. J. Fetal transfusion for red blood cell alloimmunization in pregnancy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 88, n. 1, p.137-150, jul. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8684747>>. Acesso em: 04 mar. 2017.

SCHWARTZ, H. P.; HABERMAN, B. E.; RUDDY, R. M.. Hyperbilirubinemia. **Pediatric Emergency Care**, v. 27, n. 9, p.884-889, set. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21926893>>. Acesso em: 02 mar. 2017.

SCIELLOUR, C. R. et al. Large-Scale Pre-Diagnosis Study of Fetal RHD Genotyping by PCR on Plasma DNA from RhD-Negative Pregnant Women. **Molecular Diagnosis**, Paris, v. 8, n. 1, p.23-31, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15230639>>. Acesso em: 21 maio 2016.

SCIELLOUR, C. R. et al. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. **Transfusion Clinique Et Biologique**, Paris, v. 14, n. 6, p.572-577, dez. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18375165>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Resolução nº SS - 199, de 06 de outubro de 2010. Estabelece condições para dispensação de Imunoglobulina anti D para prevenção da Isoimunização Rh em Gestantes, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS do Estado de São Paulo, e dá outras providências. Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, Seção I, p. 25, 7 de outubro de 2010. Disponível em:

<[http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/assiste\\_ncia\\_farmaceutica/protocolos-e-normas-tecnicas-estaduais/resolucao\\_ss\\_199\\_06\\_10\\_10.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/assiste_ncia_farmaceutica/protocolos-e-normas-tecnicas-estaduais/resolucao_ss_199_06_10_10.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2016.

SEDRAK, M. et al. Use of Free Fetal DNA in Prenatal Noninvasive Detection of Fetal RhD Status and Fetal Gender by Molecular Analysis of Maternal Plasma. **Genetic Testing And Molecular Biomarkers**, Alexandria, v. 15, n. 9, p.627-631, set. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21488716>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

SHERBINY, H. S. et al. High-intensity light-emitting diode vs fluorescent tubes for intensive phototherapy in neonates. **Paediatrics And International Child Health**, v. 2, n. 1, p.1-7, jan. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25844870>>. Acesso em: 02 mar. 2017.

SINGLA, S. et al. Severe hydrops in the infant of a Rhesus D-positive mother due to anti-c antibodies diagnosed antenatally: a case report. **Journal Of Medical Case Reports**, Nova Deli, v. 57, n. 4, p.1-4, fev. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2830983/>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

STOKOWSKI, L. A.. FUNDAMENTALS OF PHOTOTHERAPY FOR NEONATAL JAUNDICE. **Advances In Neonatal Care**, v. 6, n. 6, p.303-312, dez. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17208161>>. Acesso em: 02 mar. 2017.

STORY, C. M.; MIKULSKA, J. E.; SIMISTER, N. E.. A Major Histocompatibility Complex Class I-like Fc Receptor Cloned from Human Placenta: Possible Role in Transfer of Immunoglobulin G from Mother to Fetus. **The Journal Of Experimental**

**Medicine**, Nova York, v. 180, n. 1, p.2377-2381, dez. 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7964511>>. Acesso em: 25 set. 2016.

TENHUNEN, R.; MARVER, H. S.; SCHMID, R.. The Enzymatic Conversion of the Heme to Bilirubin by Microsomal Heme Oxygenase. **Biochemistry**, São Francisco, v. 61, n. 1, p.748-755, jul. 1968. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC225223/>>. Acesso em: 24 set. 2016.

TIPPETT, P.; LOMAS-FRANCIS, C.; WALLACE, M.. The Rh Antigen D: Partial D Antigens and Associated Low Incidence Antigens. **Vox Sanguinis**, Londres, v. 70, n. 1, p.123-131, jan. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8740002>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

TOUNTA, G. et al. A Multiplex PCR for Non-invasive Fetal RHD Genotyping Using Cell-free Fetal DNA. **In Vivo**, Atenas, v. 25, n. 3, p.411-417, maio 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576416>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

URBANIAK, S. J.; GREISS, M. A.. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. **Blood Reviews**, Aberdeen, v. 14, n. 1, p.44-61, jan. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268960X99901236>>. Acesso em: 20 maio 2016.

TOUINSSI, M. et al. Molecular analysis of inactive and active RHD alleles in native Congolese cohorts. **Transfusion**, Brazzaville, v. 49, n. 7, p.1353-1360, jul. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19351380>>. Acesso em: 18 dez. 2016.

TURNER, M. J.; MARTIN, C. M.; O'LEARY, J. J.. Detection of fetal Rhesus D gene in whole blood of women booking for routine antenatal care. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, Dublin, v. 108, n. 1, p.29-32, maio 2003. Disponível em: <[http://www.ejog.org/article/S0301-2115\(02\)00356-1/abstract](http://www.ejog.org/article/S0301-2115(02)00356-1/abstract)>. Acesso em: 13 dez. 2016.

TUSON, M. et al. Possible suppression of fetal erythropoiesis by the Kell blood group antibody anti-Kp(a). **Immunohematology**, v. 27, n. 2, p.58-60, dez. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22356520>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

VALSAMI, S. et al. Importance of Direct Antiglobulin Test (DAT) in Cord Blood: Causes of DAT (+) in a Cohort Study. **Pediatrics & Neonatology**, v. 56, n. 4, p.256-260, ago. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25637293>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

VITORELLO, D. A. et al. Transfusão Intra-uterina em Fetos Afetados pela Doença Hemolítica Perinatal Grave: Um Estudo Descritivo. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Florianópolis, v. 20, n. 3, p.137-144, 1998. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-72031998000300003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72031998000300003)>. Acesso em: 20 maio 2016.

VREMAN, H. J.; WONG, R. J.; STEVENSON, D. K.. Phototherapy: Current methods and future directions. **Seminars In Perinatology**, v. 28, n. 5, p.326-333, out. 2004. Disponível em: <[http://www.seminperinat.com/article/S0146-0005\(04\)00071-0/abstract](http://www.seminperinat.com/article/S0146-0005(04)00071-0/abstract)>. Acesso em: 02 mar. 2017.

WAGNER, F. F. et al. Molecular Basis of Weak D Phenotypes. **Blood Journal**, Nova York, v. 93, n. 1, p.385-393, jan. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9864185>>. Acesso em: 28 ago. 2016.

WAGNER, T. et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. **Transfusion**, Vienna, v. 45, n. 1, p.520-526, abr. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15819672>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

WANG, X. D. et al. Non-invasive foetal RHD genotyping via real-time PCR of foetal DNA from Chinese RhD-negative maternal plasma. **European Journal Of Clinical Investigation**, Changsha, v. 39, n. 7, p.607-617, jul. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19545247>>. Acesso em: 18 dez. 2016.

WESTHOFF, C. M.. Rh complexities: serology and DNA genotyping. **Transfusion**, Philadelphia, v. 47, n. 1, p.17-22, jul. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17593281>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

WESTHOFF, C. M.. The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. **Transfusion**, Philadelphia, v. 44, n. 1, p.1663-1673, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504174>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

WIENER, E. et al. Differences between the activities of human monoclonal IgG1 and IgG3 anti-D antibodies of the Rh blood group system in their abilities to mediate effector functions of monocytes. **Immunology**, Bristol, v. 65, n. 1, p.159-163, jun. 1988. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1384907/>>. Acesso em: 25 set. 2016.

WIKMAN, A. T. et al. Noninvasive Single-Exon Fetal RHD Determination in a Routine Screening Program in Early Pregnancy. **American College Of Obstetricians And Gynecologists**, Karolinska, v. 120, n. 2, p.227-234, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22776962>>. Acesso em: 20 maio 2016.

YAZDANBAKHSI, K.; WARE, R. E.; NOIZAT-PIRENNE, F.. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. **Blood**, Nova York, v. 120, n. 3, p.528-537, maio 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3401213/>>. Acesso em: 25 set. 2016.

YAZER, M. H. et al. Low incidence of D alloimmunization among patients with a serologic weak D phenotype after D+ transfusion. **Transfusion**, Pittsburgh, v. 00, n.1, p.1-8, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27401270>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

YVER, A. et al. Pharmacokinetics and safety of roledumab, a novel human recombinant monoclonal anti-RhD antibody with an optimized Fc for improved engagement of FCγRII, in healthy volunteers. **Vox Sanguinis**, Paris, v. 103, n. 3, p.213-222, maio 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22568808>>. Acesso em: 12 out. 2016.

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**, Cleveland, v. 193, n. 6, p.1966-1971, dez. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325598>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

ZANTEK, N. D. et al. The direct antiglobulin test: A critical step in the evaluation of hemolysis. **American Journal Of Hematology**, v. 87, n. 7, p.707-709, 6 maio 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.23218/abstract>>. Acesso em: 24 fev. 2017.

ZIZA, K. N. C.. **Determinação do genótipo RHD fetal no plasma materno: acurácia do teste semiautomatizado**. 2015. 151 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Obstetrícia e Ginecologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.