

Manejo de la severa inmunización RhD accediendo al diagnóstico preimplantatorio

Roberto Coco, Judith Mincman, Valeria Longobucco, Felicitas Noblía, Alicia Gallo, Fernando Gismondi, Nicolás Neuspiller

Fecunditas-Instituto de Medicina Reproductiva afiliado a la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

Reproducción 2008;23:107-112

Resumen

A pesar de que la incidencia de la severa alloinmunización ha disminuido después del uso de la anti-D inmunoglobulina, un pequeño grupo de mujeres producen altas tasas de anticuerpo RhD. Dichas mujeres con un nuevo embarazo RhD-positivo pueden ocasionar una enfermedad hemolítica en el feto y en el recién nacido. Con el propósito de evitar la incompatibilidad sanguínea materno-fetal, el diagnóstico preimplantatorio para seleccionar a los embriones RhD-negativo es una alternativa válida. Comunicamos la realización de un PGD para elección de embriones RhD-negativo en una pareja donde la mujer era RhD-negativo con alta tasa de anticuerpos RhD y el marido RhD-positivo heterocigota. La pareja tiene un hijo que padeció la enfermedad hemolítica y tres abortos, dos de ellos por ser ectópicos. La mujer es portadora del virus HIV. Se realizó una estimulación ovárica estándar con agonistas y gonadotrofinas recombinantes. Se aspiraron 20 ovocitos, 16 fueron inyectados con los espermatozoides procesados del marido y 8 de los evolutivos fueron biopsiados en día 3. Luego del análisis cinco resultaron RhD-negativo y tres RhD-positivo. Dos embriones RhD-positivo tenían trisomía del par 21. Tres embriones fueron transferidos al útero en día 5, dos al estado de blastocisto incipiente y uno eclosionando. La transferencia dio lugar a un embarazo de trillizos con tres nacidos vivos, dos niñas y un niño, todos RhD-negativo. El

análisis se realizó con una PCR directa múltiple con tres pares de primers de los genes rhesus y un STR del cromosoma 21. En la madre los amplificones RHD estuvieron ausentes y en el padre tuvieron 163, 103 y 132 pares de bases. Los amplificones correspondientes al microsatélite del par 21 fueron 179/195 en la madre y 179/183 en el padre. El estudio en los embriones consistió en elegir a aquellos embriones que no amplificaban el RhD, pero sí el RHCE, y además, que no tuvieran aneuploidía del cromosoma 21. La enfermedad hemolítica puede ser tratada intraútero, pero la muerte fetal no siempre puede ser prevenida. Esta fue la razón que motivó a la pareja para el PGD. Si bien el PGD fue designado para el diagnóstico de enfermedades genéticas, hoy además del uso para la elección del género, el tipificado de HLA y/o determinar la ausencia de genes con predisposición a desarrollar enfermedades en vida adulta, puede ser usada para seleccionar a los embriones que no ocasionen incompatibilidad sanguínea materno-fetal, tal como ocurre con el factor RhD y grupo Kell.

Palabras claves: PGD, Inmunización RHD, genotipación RHD.

Management of severe rhesus isoimmunization by preimplantation genetic diagnosis (PGD)

Summary

Although the incidence of severe RhD alloimmunization has decreased with anti-D immunoglobulin antepartum and postpartum administration, sensitization still occurs in a small

Correspondencia: Roberto Coco
Fecunditas, Larrea 790, 1030. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
E-mail: robertococo@fecunditas.com.ar

group of women. Such women with a new pregnancy in which the fetal RhD blood is positive may cause haemolytic disease of the fetus and newborn. With the purpose to avoid the materno-fetal blood group incompatibility in an RhD-sensitized woman, the PGD for select the RhD group is a valid alternative. We present the case report of a preimplantation diagnosis for election of RhD negative embryos, because the mother was highly sensitive with anti RhD. The young couple had an affected child with haemolytic disease and two ectopic pregnancies. She is also carrier of the virus HIV. The woman underwent a routine ovarian stimulation with gonadotropins and after retrieval of oocytes an ICSI procedure was performed. Twenty oocytes were aspirated, 16 were fertilized and 8 embryos were biopsied on day 3. After analysis five of them resulted RhD negative and three RhD positive. Two of the RhD positive embryos resulted to have a trisomy 21. Three embryos on day 5 were transferred (one expanded, and two incipient blastocyst). The embryo transfer resulted in a clinical pregnancy of triplets and concluded with the birth of three RhD negative babies, one male and two females. The analysis was performed with a multiplex PCR using three paired primers for the Rhesus genes and one STR for the chromosome 21 labeled with different fluorochromes. The amplification of RhD in the mother was absent and in the father was 163, 103 y 132 bp, while the STR for chromosome #21 were 179/195 and 179/ 183 bp respectively. The analysis of amplicons was done with capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 genetic analyzer. The study consisted on choosing those embryos without amplification of RhD but with amplification of RhCE, and besides without trisomy 21. Although the PGD was designed for the diagnosis of genetic diseases, today may be used for other reasons, such as the election of the sex of the embryos, the HLA typing and/or the absence of genes with predisposition to develop diseases in adult life. Although that haemolytic disease can be treated intrauterine, the fetal death cannot always be prevented. This was the reason to consent to the PGD.

Key words: PGD, rhesus isoimmunization, RhD genotype.

Introducción

La isoimmunización RhD en mujeres RhD-negativo puede causar enfermedad hemolítica del feto y recién nacido, si el factor Rh del feto o nacido fuera positivo.

Si bien es cierto que hay varios antígenos de los glóbulos rojos implicados en la enfermedad hemolítica, el antígeno RhD es el más común (Avent & Reid, 2000). Como resultado de la destrucción de los glóbulos rojos el feto puede desarrollar anemia hemolítica, la cual cuando es severa conduce al *hidrops fetalis* y/o muerte fetal intrauterina.

Las proteínas RhD y RhCE están codificadas en dos genes altamente homólogos, RHD y RHCE, respectivamente, los cuales mapean en 1p34.3-1p36.13 (Figura 1).

A pesar de la gran homología de las proteínas RhD y RhCE, la proteína RhD no expresa ni al antígeno C/c ni al E/e como así la proteína RhCE no expresa al antígeno D. El gen que codifica al polipéptido D está presente en las personas RhD- positivo y ausente en las RhD-negativo (Figura 2).

Cerca del 57% de los caucásicos son heterocigotos para el RhD. Alrededor del 83% de las mujeres caucásicas son RhD-positivo, significando que cerca del 17% de las embarazadas son RhD-negativo. Aproximadamente 60% de las mujeres RhD-negativo tienen niños RhD-

Figura 1. Mapeo genes RHD y RHCE.

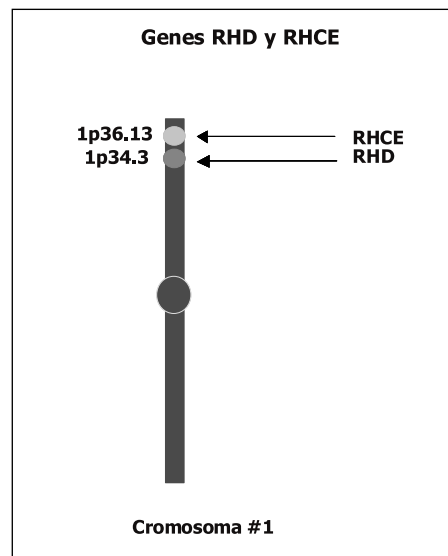
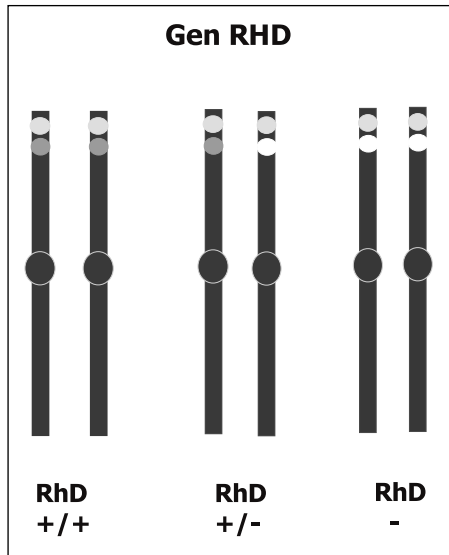


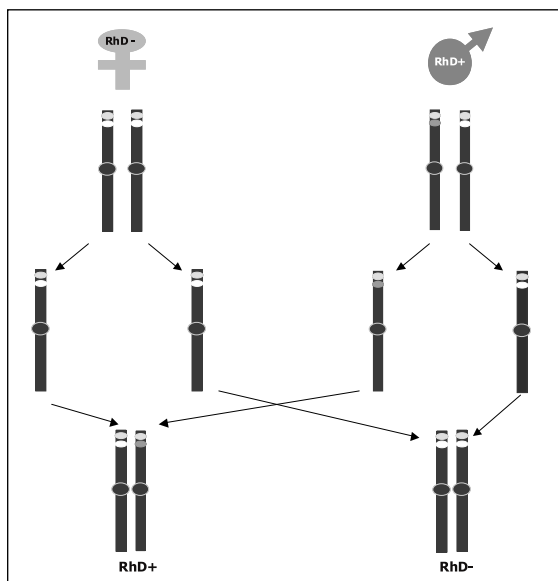
Figura 2. Expresión de la proteína RhD de acuerdo a la presencia o ausencia del gen RHD.



positivo en su primer embarazo, que podrían inmunizarlas y en los subsecuentes embarazos tener riesgo de enfermedad hemolítica, si gestaran fetos-RhD positivo (NHMRC, 1999).

Un padre RhD heterocigota con una madre RhD negativa tienen un 50% de chance para tener un hijo RhD negativo (Figura 3).

Figura 3. Factor RhD en la descendencia de una pareja donde la mujer es RhD-negativo y el varón RhD-positivo heterocigota.



En cambio, un padre RhD homocigota con una madre RhD-negativo no tiene chance de tener hijos RhD-negativo (Figura 4).

La severa isoinmunización RhD hoy en día no es frecuente debido a la utilización de la inmunoglobulina anti-D antes y después del parto (NHMRC, 2003). Sin embargo, a pesar de la clara reducción con la inmunización, puede llegar a ocurrir.

Comunicamos la realización de un PGD para selección de embriones RhD-negativo, debido a que la mujer RhD- negativo tenía una alta tasa de anticuerpos RhD y su pareja RhD-positivo heterocigota (Figura 5).

Figura 4. Factor RhD en la descendencia de una pareja donde la mujer es RhD-negativo y el varón RhD-positivo homocigota.

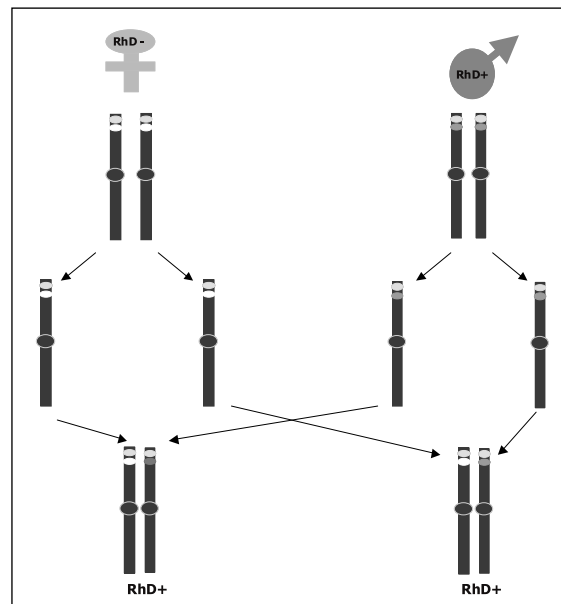
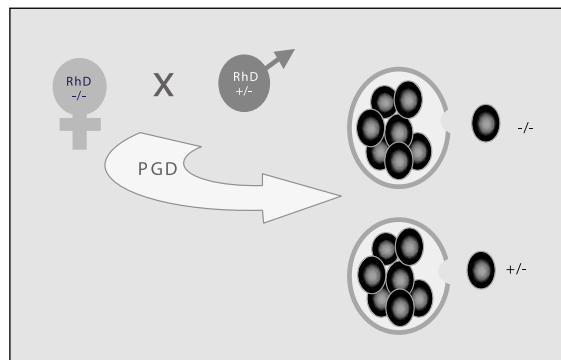


Figura 5. Esquema de la selección embrionaria de acuerdo a la presencia o ausencia del gen RHD.



Paciente y métodos

Se trata de una mujer de 33 años, portadora asintomática del virus HIV tratada con antivirales, factor RhD-negativo y con alta tasa de anticuerpos anti-RhD. Su marido 34 años es heterocigota para el factor RhD. La pareja tuvo cuatro embarazos, de los cuales solo llegó a término el segundo que dio lugar a un nacido RhD-positivo con enfermedad hemolítica. Los otros tres fueron abortados, dos de ellos por haberse implantado en las trompas. Como la mujer continuó teniendo una alta tasa de anticuerpos anti-D, la pareja fue alertada respecto a la inmunización anti-D sobre la potencialidad de tener embarazos más severamente afectados si los fetos heredaban el factor RhD-positivo. Habiendo entendido y queriendo evitar una posible incompatibilidad sanguínea materno-fetal deciden realizar el PGD para transferir al útero embriones RhD-negativo. La mujer fue estimulada para la realización de un ICSI+PGD con un protocolo estándar con agonistas y gonadotrofinas recombinantes. Se aspiraron 20 ovocitos de los cuales fueron inyectados 16 con los espermatozoides procesados del marido. Al tercer día post-ICSI, se practicó la biopsia a ocho de ellos por tener una historia y desarrollo evolutivo adecuado. De los ocho embriones biopsiados, cinco resultaron RhD-negativo. Tres de ellos, los que alcanzaron el estado de blastocisto, fueron transferidos a pedido de la pareja, luego de entender y aceptar la posibilidad de un embarazo múltiple. La transferencia dio lugar a un embarazo de

trillizos. A las 32.3 semanas de gestación se efectuó operación cesárea previa maduración pulmonar, naciendo dos niñas y un niño con pesos de 1700, 1733 y 1656 gramos, respectivamente. La prueba Coomb directa en los nacidos dio negativa y no hubieron complicaciones importantes en la terapia neonatal intensiva. Los exámenes obstétricos, de laboratorio y ecográficos durante todo el embarazo fueron sin relevancia.

La biopsia embrionaria se efectuó perforando la membrana pelúcida con tres microdisparos de rayos láser utilizando el **software** del microláser computarizado **Octax**. Se aspiró una célula nucleada de cada uno de los embriones y luego fue lisada con proteinasa K. Se realizó una PCR directa múltiple con tres pares de **primers** marcados que amplifican parte del gen RHD y RHCE, a la que se adicionó un STR correspondiente al cromosoma 21, como control de la amplificación y además enumerar al cromosoma 21. En la Tabla 1 figuran los pares de **primers** del gen RHD y RHCE, el STR del cromosoma 21 y el tamaño de los amplicones en pares de bases (bp). Los amplicones fluorescentes fueron analizados por electroforesis capilar usando el analizador genético ABI prism 310.

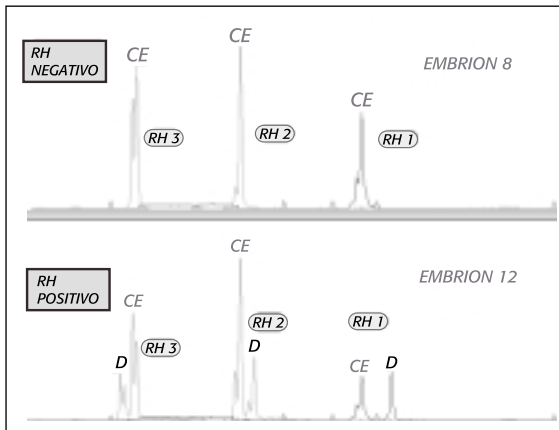
La amplificación se realizó a 94°C durante 30 segundos, y a 60°C durante 120 horas durante 45 ciclos.

En la Figura 6 se muestra el electroferograma de los tres *primers* del gen RHD y RHCE de los embriones #8 y #12, en el que se puede observar que el embrión #8 solo tiene se-

Tabla 1. Pares de *primers* para los genes RHCE y RHD, STR para el cromosoma 21 y tamaño de los amplicones en bp de la pareja.

Locus	Primer F	Primer R	Madre	Padre
Rh38446d6	6FAM- TCTGGGTGTTGGTTATGTGGG	GCAGTCAGCAGGTTTGGGTT	157 (CE)	157/163 (CE/D)
Rh41712d4	VIC- CCCTATGATGAGACTGGTGGC	CATGCTGCTGGCATCTGTTG	106 (CE)	106/103 (CE/D)
Rh48925d3	VIC- CAGGCGCCAGAGATCATTACT	TCGTATTTCCCTTTCGTGGTG	129 (CE)	129/132 (CE/D)
D21S1411	6FAM- TATGTGAGTCAATCCCCAAGTGA	GTTGTATTAGTCAATGTTCTCCAG	179/195	179/183

Figura 6. Electroferograma correspondiente a dos embriones, uno RHD negativo y otro RHD positivo.



ñal correspondiente al gen RHCE, mientras que el embrión # 12 tiene señales para ambos RHD y RHCE.

En la Tabla 2 se muestra la evolución y el resultado de cada uno de los embriones biopsiados-analizados. Se puede observar que los embriones que alcanzaron mayor desarrollo evolutivo corresponden a los números 1, 8, 10, 11 y 17. De estos cinco, el #1 resultó RHD-positivo y trisómico 21. Los restantes fueron RHD-negativo y euploides para el cromosoma 21. De los cuatro euploides 21 y RHD-negativo se eligieron a los enumerados como #8, #10 y #11 para ser transferidos por ser los más evolutivos, siendo el #8 y el #10 blastocistos incipientes (clase A) y el #11 expandido casi eclosionando.

Tabla 2. Resultado del factor RhD y la evolución posterior luego de la biopsia.

# embrión	3er día	4to día	5to día	RhD	Aneuploidía 21
2				+	+21
3				+	+21
8				-	N
10				-	N
11				-	N
12				+	N
16				-	N
17				-	N

Discusión

Desde la aplicación de la vacunación anti-D en mujeres RhD-negativo durante o después del embarazo ha disminuido sustancialmente la incidencia de mujeres con anticuerpos anti-RhD. Sin embargo, como la eficacia de la profilaxis no es del 100%, las mujeres con anticuerpos anti-D pueden padecer serios inconvenientes con la anemia hemolítica del gestante, la cual en grado extremo puede terminar con la muerte del mismo. También conviene señalar que cuando una embarazada RhD-negativo cuenta con el antecedente de enfermedad hemolítica el pronóstico es peor para los futuros embarazos de fetos RhD-positivo. Muchas mujeres en esta situación se enfrentan con la terrible decisión de no tener más hijos por el temor a padecer una complicación mayor. Sin embargo, en la actualidad con la disponibilidad del diagnóstico preimplantatorio, si sus maridos son RhD heterocigota, pueden seleccionar a los embriones RhD-negativo y de esta manera evitar las complicaciones de la incompatibilidad sanguínea materno-fetal.

Si bien es cierto que los fetos de las mujeres embarazadas con riesgo de incompatibilidad sanguínea pueden ser tratados intraútero, la muerte fetal podría no ser evitada. Esta fue la razón que motivó a la pareja a acceder al programa de diagnóstico preimplantatorio.

La posibilidad diagnóstica-terapéutica del PGD se ha incrementado muchísimo en estos últimos 10 años. Es cierto que en sus inicios la mayoría de las parejas accedían por tener riesgo genético aumentado tanto de enfermedades cromosómicas como las génicas. En los últimos años fue aumentado su empleo por otras razones, tales como el sexado de los embriones, ahora denominado PGSS, el tipificado de HLA para programar el nacimiento de una persona histocompatible a otra ya nacida que presumiblemente necesitará de trasplante celular para sobrevivir, la

selección de embriones sin genes predisponentes para el desarrollo de tumores, como así también para las enfermedades genéticas que aparecen en vida tardía. La incompatibilidad sanguínea por RhD o grupo Kell son ejemplos de enfermedades sin defectos genéticos, pero en las que la elección de los embriones con ausencia de determinados genes previene la enfermedad hemolítica materno-fetal (VII Registro del Consorcio de PGD de la ESHRE, 2008).

La utilización del PGD para evitar la incompatibilidad sanguínea materno-fetal ha sido propuesta desde los inicios de la aplicación del procedimiento, sin embargo, de acuerdo con nuestro conocimiento, el presente caso constituiría el segundo de los comunicados con nacidos no afectados, correspondiendo el primero al grupo de Seeho y col. A diferencia del caso comunicado por Seeho y col, en el presente se usó un marcador del cromosoma 21, el cual nos permitió enumerar a dicho cromosoma, de hecho dos embriones, el #1 y el #2, resultaron tener una trisomía 21.

Referencias

- Avent ND and Reid ME: The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000;95:375-387.
- NHMRC (1999): Guidelines on the prophylactic use of RhD immunoglobulin (anti-D) in obstetrics.
- NHMRC (2003): Guidelines on the prophylactic use of RhD immunoglobulin (anti-D) in obstetrics.
- Harper JC, de Die-Smulders C, Goossens V, Harton G, Montou C, Repping S, Scriven PN, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, Van Rij MC, Viville S, Wilton L, and Sermon KD (2008): ESHRE PGD consortium data collection VII: cycles from January to December 2004 with pregnancy follow-up to October 2005. *Human Reproduction* 23(4):741-755.
- Seeho SKM, Burton G, Leigh D, Marshall JT, Persson JW, Morris JM. The role of preimplantation genetic diagnosis in the management of severe rhesus alloimmunization: first unaffected pregnancy: case report. *Human Reproduction* 2005;20(3):697-701.