

ESTELA NAOMI NISHIE

**Predição da hemólise fetal em
gestantes aloimunizadas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Adolfo Wenjaw Liao

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nishie, Estela Naomi

Predição da hemólise fetal em gestantes aloimunizadas / Estela Naomi Nishie. --
São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Adolfo Wenjaw Liao.

Descritores: 1.Hemólise 2.Anemia hemolítica 3.Isoimunização Rh 4.Transfusão
de sangue intra-uterina 5.Eritroblastose fetal 6.Ultrassonografia doppler 7.Teste de
Coombs 8.Gestantes 9.Feto

USP/FM/DBD-170/11

A persistência é o caminho do êxito.

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Luiza e Litsuci** que sempre me
incentivaram e acreditaram. Pelo seu carinho,
amor e esforços despendidos na minha formação.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Emmanuel** que a cada dia admiro mais. Pelo seu amor, incentivo,
dedicação e companheirismo.

À **Sheila e ao Eduardo Nishie**, pela amizade, apoio e carinho.

Ao **Prof.Dr. Adolfo Wenjaw Liao**, meu orientador, pelo incentivo, pela
amizade, pelos ensinamentos de pesquisa científica, pela dedicação e
cuidado na orientação deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Marcelo Zugaib**, digníssimo Professor Titular de Obstetrícia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio e oportunidade de realizar esta tese neste departamento.

À **Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot**, pelos ensinamentos de vida e de pesquisa científica, pela amizade, pelo incentivo, pelas valiosas observações na fase da qualificação, pelo exemplo de caráter, minha enorme admiração e gratidão.

À **Profa. Dra. Roseli M. Y. Nomura**, pelo cuidado e pelas observações na avaliação desta tese na fase da qualificação.

Ao **Dr. Mário Macoto Kondo**, pelo esmero e atenção dispensados a este estudo na fase da qualificação.

Ao **Prof. Dr. Mário Henrique Burlacchini de Carvalho**, pela atenção dispensada na fase da qualificação, pelos ensinamentos médicos e pela amizade.

Ao **Dr. Nilton H. Takiuti**, pela atenção dispensada na fase da qualificação, pelo incentivo e pelos ensinamentos de vida e de pesquisa científica.

Ao **Dr Osvaldo T. Toma**, pelos ensinamentos de procedimentos invasivos e
pela amizade.

À **Dra Joelma Queiroz, Prof.Dr. Marco Antônio B. Lopes, Dr. Javier Miguelez** pela amizade e ensinamentos de medicina fetal.

À **Dra. Luciana de Freitas Garcia, Dra. Renata de Almeida de Assunção, Dra. Milena Ninno Nozaki, Dra. Marina Yamamoto Kiyohara, Dra. Clarissa Oliveira Lamberty, Dra Julianny C. Nery**, pela amizade e companheirismo no atendimento às gestantes no ambulatório.

À **Dra Tatiana Benath Liao, Dra Verbenia Nunes Costa e Dra Eliane A. Hase** pela amizade e incentivo nos momentos difíceis.

Aos **amigos da medicina fetal e pós-graduandos** do departamento, pela amizade e companheirismo.

Às **Sras. Soraia Cristina F. Silva, Claudia Vieira, Miriam R.R. Souto, Marina M. Silva, Maria Aparecida Domingues e ao Sr. Amadeu F. dos Santos**, pela ajuda administrativa e apoio.

Aos **Srs. Alan Garcia, William Santos e Alexandre Emmanoel**, pela ajuda e conhecimentos de informática.

À **CAPES**, pelo auxílio financeiro para execução deste estudo.

À **Sra Mitsuko Miyadahira**, pelo auxílio da correção e revisão gramatical.

Às **gestantes**, pacientes da clínica obstétrica, motivo deste estudo.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO.....	8
3	REVISÃO DA LITERATURA	10
3.1	Transfusão intrauterina.....	11
3.1.1	Histórico.....	11
3.1.2	Tipos de transfusão intrauterina	12
3.1.3	Aspectos técnicos da transfusão intrauterina	15
3.1.3.1	Preparo do sangue da bolsa	15
3.1.3.2	Cálculo do volume a ser transfundido	17
3.1.3.3	Imobilização fetal.....	18
3.1.4	Efeitos fisiológicos da transfusão fetal.....	19
3.1.5	Dinâmica das hemácias transfundidas na circulação fetal.....	21
3.1.6	Complicações na transfusão intrauterina.....	23
3.2	Parâmetros para indicação das transfusões uterinas subsequentes	26
4	MÉTODOS	32
4.1	Casuística.....	33
4.2	Métodos.....	33
4.2.1	Crerios de inclusão	33
4.2.2	Protocolo de assist4ncia à gestante com aloimunização.....	34
4.2.2.1	Teste de Coombs indireto	36
4.2.2.2	Ultrassonografia	36
4.2.2.3	Diferença de densidade óptica a 450nm	36

4.2.2.4	Dopplervelocimetria da artéria cerebral média	37
4.2.2.5	Procedimento invasivo	39
4.2.2.6	Transfusão intrauterina.....	40
4.2.2.7	Seguimento pós-transfusão intrauterina.....	41
4.2.3	Coleta de dados.....	41
4.2.3.1	Antecedente obstétrico relacionado à aloimunização	42
4.2.3.2	Teste de Coombs indireto	42
4.2.3.3	Dopplervelocimetria da artéria cerebral média	43
4.2.3.4	Definição de anemia.....	43
4.2.3.5	Transfusão intrauterina.....	45
4.2.4	Cálculo do tamanho amostral	45
4.2.5	Análise estatística.....	47
5	RESULTADOS	48
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	75
8	ANEXOS.....	77
9	REFERÊNCIAS	81

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	anticorpo
ACM	artéria cerebral média
bpm	batimentos por minuto
DDO 450	diferença de densidade óptica a 450nm
DP	desvio padrão
et al.	e outros
EXP	exponencial
Hb	concentração de hemoglobina
Ht	hematócrito
IG	idade gestacional
IC	intervalo de confiança
Log	logaritmo
MoM	múltiplo da mediana
n	número de casos
p	probabilidade
Rh	Rhesus
r	índice de correlação
TIU	transfusão intrauterina
VFP	volume fetoplacentário
VT	volume transfundido
Vmáx	velocidade sistólica máxima

LISTA DE SÍMBOLOS

cm/s	centímetro por segundo
g	grama
g/dl	grama por decilitro
g/dl/d	grama por decilitro por dia
Gy	gray
kg	kilograma
mg	miligrama
MHz	mega hertz
mmHg	milímetro de mercúrio
ml	mililitro
nm	nanômetro
=	igual
+	mais
-	menos

LISTA DE SIGLAS

CAPPesq Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CDC Centers for Disease Control and Prevention

HCFMUSP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fluxograma do Protocolo de assistência à gestante aloimunizada no HCFMUSP35
- Figura 2** - Corte transverso do pólo cefálico fetal com visibilização, pelo mapeamento colorido, da artéria cerebral média e do polígono de Willis.38
- Figura 3** - Sonograma da artéria cerebral média com medida da velocidade sistólica máxima39

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Distribuição dos títulos de anticorpos antieritrocitários anti-D em 40 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 201051
- Gráfico 2** - Correlação entre concentração da hemoglobina fetal, expressa em múltiplos do desvio padrão, e velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média, expressa em múltiplos da mediana em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 201054
- Gráfico 3** - Correlação entre taxa de hemólise, expressa em g/dl/d, e concentração de hemoglobina pré 1ª TIU, expressa em múltiplos do desvio padrão (Hb DP) em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010 ($r = 0,327$, $p = 0,037$)58
- Gráfico 4** - Correlação entre taxa de hemólise, expressa em g/dl/d, e intervalo de tempo entre 1ª e a 2ª TIU, expresso em dias em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010 ($r = 0,413$, $p = 0,007$)59
- Gráfico 5** - Correlação entre taxa de hemólise, expressa em g/dl/d, e velocidade sistólica máxima sistólica máxima da artéria cerebral média pré 2ª TIU, expressa em múltiplos da mediana ($r = -0,531$, $p < 0,001$) em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro 2010.....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tamanho amostral conforme diferentes valores esperados de coeficiente de correlação	46
Tabela 2 -	Distribuição da especificidade dos tipos de anticorpos antieritrocitários encontrados em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010	51
Tabela 3 -	Características da primeira transfusão intrauterina em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010.....	52
Tabela 4 -	Características da segunda transfusão intrauterina em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010.....	53
Tabela 5 -	Médias da hemólise em distintos grupos conforme o antecedente obstétrico em relação à doença hemolítica perinatal em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010	55
Tabela 6 -	Médias da hemólise em distintos grupos conforme o tipo de punção uterina em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010	56
Tabela 7 -	Análise de regressão linear simples na correlação entre hemólise e as variáveis abaixo em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010	61
Tabela 8 -	Análise multivariada anterógrada na correlação entre hemólise e variáveis abaixo em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010	62

RESUMO

Nishie EN. *Predição da hemólise fetal em gestantes aloimunizadas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 99p.

OBJETIVO: O objetivo deste estudo foi avaliar fatores clínicos, laboratoriais, dopplervelocimétricos e hematimétricos preditivos da velocidade de hemólise entre a primeira e a segunda transfusões intrauterinas em gestantes aloimunizadas. **MÉTODOS:** Este estudo retrospectivo compreendeu gestações únicas, com fetos não hidrópicos, submetidos à primeira e à segunda transfusões intrauterinas pela técnica intravascular direta simples, acompanhadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram coletados os seguintes dados das gestantes: idade materna, antecedente obstétrico, antecedente obstétrico relacionado à aloimunização (classificado em grave, moderado, leve e nenhum), tipos e títulos dos anticorpos antieritrocitários e dados da transfusão intrauterina (TIU) (idade gestacional da TIU, valores da concentração da hemoglobina antes e depois da primeira e antes da segunda TIU, medida da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média antes da primeira e da segunda TIUs, volume de sangue infundido, concentração de hemoglobina do sangue transfundido, intervalo de tempo entre as transfusões e o tipo de punção uterina transplacentária ou não). Foram calculados a razão entre a quantidade de hemoglobina endógena em relação à quantidade total de hemoglobina após a primeira transfusão, a expansão de volume e taxa de hemólise. **RESULTADOS:** Quarenta e uma gestantes foram incluídas e apresentaram na primeira TIU, idade gestacional média de $26,1 \pm 4,6$ semanas, média de volume de sangue infundido de $44,4 \pm 23,5$ ml e média de expansão de volume de $51,3 \pm 14,5\%$. A média do intervalo entre as transfusões foi de $15,7 \pm 6,5$ dias. A média da taxa de hemólise foi de $-0,40 \pm 0,25$ g/dl/d entre a primeira e a segunda transfusões e não houve diferença estatisticamente significativa da taxa de hemólise nos distintos grupos de antecedente obstétrico relacionado à aloimunização ($p = 0,21$). Não houve diferença significativa entre a média da hemólise e o tipo de punção intrauterina ($p = 0,387$). A análise multivariada anterógrada demonstrou correlação significativa da taxa de hemólise com a concentração de hemoglobina depois da 1ª TIU ($r = -0,60$, $p < 0,001$), o intervalo de tempo entre as transfusões ($r = 0,64$, $p < 0,001$) e a $V_{m\acute{a}x}$ ACM antes da segunda TIU ($r = -0,56$, $p < 0,001$). A equação encontrada que melhor representa a taxa de hemólise foi: $-0,31517 + 0,03463 \times \text{Intervalo} - 0,314038 \times V_{m\acute{a}x} \text{ ACM pré } 2 - 0,068719 \times \text{Hb DP pós } 1$ ($r^2 = 0,58$). **CONCLUSÃO:** A taxa de hemólise fetal entre a primeira e a segunda transfusões intrauterinas em gestantes aloimunizadas pode ser predita pela combinação da concentração de hemoglobina após a primeira TIU, do intervalo de tempo entre as transfusões e medida da $V_{m\acute{a}x}$ ACM antes da segunda TIU.

Descritores: 1.Hemólise 2.Anemia hemolítica 3.Isoimunização Rh 4.Transfusão de sangue intrauterina 5.Eritroblastose fetal 6.Ultrassonografia doppler 7.Teste de Coombs 8.Gestantes 9.Feto

SUMMARY

Nishie EN. *Prediction of fetal hemolysis in alloimmunized pregnancies* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 99p.

OBJECTIVE: To evaluate clinical and laboratory factors, dopplervelocimetric and hematimetric values in the prediction of fetal hemolysis between first and second intrauterine transfusion in alloimmunized pregnant women. **METHODS:** This retrospective study involved singleton pregnancies with non hydropic fetus, that underwent to first and second intrauterine transfusions (IUT) by simple direct intravascular technique, accompanied at "Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo". The following data were collected: maternal age, obstetric history, previous history of alloimmunization (classified in severe, moderate, mild and none), antibodies type and titre and data from the IUT (gestational age, hemoglobin levels before and after first IUT and before second IUT, middle cerebral artery peak systolic velocity before first and second IUT, transfused blood volume, transfused blood hemoglobin concentration, time interval between transfusions and type of intrauterine puncture). The ratio between amount of endogenous hemoglobin and total amount of hemoglobin after IUT, volume expansion and hemolysis rate were calculated. **RESULTS:** Forty-one pregnant women were included and presented at first IUT, mean gestational age of 26.1 ± 4.6 weeks, mean of transfused blood volume of 44.4 ± 23.5 ml and mean expansion volume of $51.3 \pm 14.5\%$. The mean interval between the transfusions was 15.7 ± 6.5 days. The mean hemolysis rate was -0.40 ± 0.25 g/dl/d between the first and second transfusions and there was not significant difference between the distinct groups of previous history of alloimmunization ($p = 0.21$). There was not significant difference between mean hemolysis rate and the type of intrauterine puncture ($p = 0.387$). Stepwise multiple regression analysis demonstrated that hemolysis correlated significantly with hemoglobin levels after the first transfusion ($r = -0.60$, $p < 0,001$), the interval of time between transfusions ($r = 0.64$, $p < 0,001$) and middle cerebral artery peak systolic velocity before the second transfusion ($r = -0.56$, $p < 0.001$). The best-fit equation for hemolysis rate was: $-0.31517 + 0.03463 \times \text{Interval} - 0.314038 \times \text{MCA PSV pre 2} - 0.068719 \times \text{Hb zeta pos1}$ ($r^2 = 0.58$). **CONCLUSION:** Fetal hemolysis rate between first and second transfusions in alloimmune disease can be predicted by a combination of hemoglobin levels after the first transfusion, interval between both procedures and middle cerebral artery peak systolic velocity before the second transfusion.

Descriptors: 1.Hemolysis 2.Anemia, hemolytic 3.Rh isoimmunization 4.Blood transfusion, intrauterine 5.Erythroblastosis, fetal 6.Ultrasonography, Doppler 7.Coombs test 8.Pregnant women 9.Fetus

1 INTRODUÇÃO

A incidência de aloimunização Rh tem diminuído após a implementação de programas para a profilaxia da doença com a imunoglobulina anti-D ¹. Contudo, continua sendo causa de morbidade e mortalidade perinatais, tanto pela falta, quanto pela falha da referida profilaxia. Além disso, alguns fetos são acometidos pela doença hemolítica devido à sensibilização materna por outros antígenos não D ².

Em 1968, a imunoglobulina Rh se torna disponível para a prevenção da doença hemolítica perinatal. Nos Estados Unidos, o Centro de Controle de Doenças de Atlanta (CDC - "Centers for Disease Control and Prevention") relata que, entre 1970 e 1975, com a prevenção por meio do uso da imunoglobulina anti-D, houve diminuição das taxas de incidência da doença hemolítica perinatal de 45,1 para 20,6, por 10.000 nascimentos. Em 1986, a taxa se reduz para 10,6 casos por 10.000 nascimentos ¹.

Em países ocidentais, a incidência da aloimunização varia de 10 a 35 por 10.000 nascidos vivos ^{3,4}. O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), centro de referência terciário na atenção à saúde nacional, ainda recebe, aproximadamente, 50 casos novos de gestantes aloimunizadas a cada ano.

A mulher Rh negativa é sensibilizada após exposição ao antígeno D durante a gestação. Os anticorpos produzidos pelo organismo materno

atravessam a placenta e, em casos de feto Rh positivo, ocorre hemólise fetal que, por sua vez, leva à anemia. Então, para compensar essa perda, inicia-se no feto a eritropoiese extramedular (no fígado e baço). Quando o quadro de anemia é grave, a eritropoiese no fígado fetal acarreta disfunção hepática e, conseqüentemente, hipoproteinemia e diminuição da pressão oncótica. Esse quadro favorece o desenvolvimento da hidropisia fetal, que pode evoluir para óbito. Além disso, os fetos gravemente acometidos podem apresentar insuficiência cardíaca de alto débito, outro fator desencadeante da hidropisia fetal.

Dessa forma, o diagnóstico precoce e o tratamento da anemia fetal, de preferência, antes da evolução para formas graves como a hidropisia, tornam-se imprescindíveis no acompanhamento da gestante aloimunizada e permitem a redução da mortalidade fetal por essa causa. Fretts et al.⁵ relatam queda de 83% nos anos 70 (de 4,3 para 0,7 por 10.000 nascimentos) e de 95% nos anos 80. No Brasil na década de 80, Duarte et al.⁶ encontram 4,5% de aloimunização como causa de óbito fetal, em gestantes com perdas repetitivas.

O tratamento dos fetos anêmicos das gestantes com aloimunização grave se faz por meio da transfusão intrauterina (TIU) que permite restaurar os níveis de concentração de hemoglobina e assim melhorar a oxigenação dos tecidos fetais, impedindo ou revertendo a hidropisia, além de suprimir a eritropoiese fetal com a infusão de concentrado de hemácias. A transfusão intrauterina poderá assim prolongar a gestação, permitindo o parto na maturidade fetal, ou o mais próximo dela.

A primeira transfusão intrauterina foi intraperitoneal realizada por Liley, em 1963⁷⁻¹⁰. Em 1981, Rodeck¹¹ transfunde diretamente na circulação sanguínea fetal por fetoscopia e, no ano seguinte, Bang¹² realiza a primeira transfusão intravascular guiada por ultrassonografia.

Os fetos de gestantes aloimunizadas que necessitam de tratamento intrauterino, frequentemente, são submetidos a mais de uma transfusão durante a gestação, pois a hemólise fetal se mantém mesmo com a realização do tratamento. Contudo, a transfusão intrauterina, devido ao seu caráter invasivo, apresenta risco de algumas complicações¹³, tais como: bradicardia fetal (5%), óbito fetal (1,6%), infecção (0,3%) e rotura prematura de membranas (0,1%). Portanto, no seguimento das gestantes aloimunizadas graves, torna-se importante indicar o momento mais apropriado da próxima transfusão intrauterina para reduzir o número de exposições da gestante e do feto a possíveis complicações.

É prática comum programar as transfusões intrauterinas subsequentes a cada uma a três semanas, dependendo da concentração da hemoglobina pós transfusional e considerando uma taxa de hemólise de 0,3 g/dl por dia¹⁴. Entretanto, é difícil prever com acurácia o ritmo da hemólise fetal, principalmente entre a primeira e a segunda transfusões intrauterinas.

Mari et al.¹⁵, avaliando 39 fetos com duas transfusões intrauterinas prévias, constata, por meio do Teste de Kleihauer Betke, que as células fetais representam 100% das células sanguíneas em fetos nunca transfundidos, 3 a 82% nos fetos transfundidos uma vez, e 0 a 34% de

células fetais naqueles transfundidos duas vezes. Assim, após duas ou três transfusões, a queda do hematócrito fetal passa a ser mais dependente da duração da vida média dos eritrócitos doados e da taxa de crescimento fetal, do que da hemólise decorrente da ação dos anticorpos maternos propriamente ditos ¹⁶.

A meia-vida dos eritrócitos adultos na circulação fetal é controversa. Jones et al.¹⁷ relatam meia-vida de apenas 30 dias em fetos do segundo trimestre da gestação, enquanto na circulação do adulto, é de aproximadamente 60 dias. Contudo, Pattison e Roberts ¹⁸ encontram que a sobrevivência da hemácia adulta na circulação fetal seja semelhante ao que ocorre no adulto.

Estudos dopplervelocimétricos, na tentativa de predição de anemia fetal em gestantes aloimunizadas, revelam que a artéria cerebral média (Vm_{max} ACM) apresenta correlação com concentração de hemoglobina fetal ¹⁹. Mari et al.²⁰ encontram sensibilidade de 100% com falso positivo de 12%, utilizando o corte de 1,5MoM para Vm_{max} ACM, para predizer anemia moderada e grave em fetos antes da primeira transfusão intrauterina.

Diversos estudos ^{15,21-23} têm investigado a utilidade da dopplervelocimetria da artéria cerebral média (Vm_{max} ACM) na predição de anemia moderada e grave em fetos previamente transfundidos. No entanto, nesses casos, a Vm_{max} ACM parece ter acurácia menor, devido à menor correlação entre a velocidade da circulação do sangue e a concentração de hemoglobina. Isso pode ser atribuído à mudança das características físicas do sangue fetal com a infusão de hemácias adultas. Quando comparadas

com hemácias fetais, as adultas têm menor tamanho, menor rigidez celular e maior propensão à agregação, além de menor capacidade de transportar oxigênio^{24,25}.

Deren e Onderoglu^{22,26} relatam, com a utilização da Vmax ACM para detecção de 100% dos fetos com anemia grave sem transfusão prévia, taxa de falso positivo de 9,1%, enquanto em fetos com uma ou mais transfusões intrauterinas anteriores, para sensibilidade de 100%, é encontrada taxa de falso positivo de 21,4%. Outros estudos revelam que, para a detecção de 100% dos fetos com anemia moderada e grave sem transfusão prévia, a taxa de falso positivo é de 12%²⁰ e naqueles com uma ou duas transfusões anteriores, para sensibilidade de 100%, falsos positivos de 6%²³ e 53%¹⁵, respectivamente.

Após duas transfusões intrauterinas, 58 a 100% das hemácias da circulação fetal são de origem adulta²⁷. Nessa circunstância, em que grande parte das hemácias fetais foram substituídas por adultas, a Vmáx ACM perde a capacidade de discriminar anemia moderada/grave de anemia leve. Estudos para avaliação do desempenho da Vmáx ACM (maior ou igual a 1,5 MoM), na predição de anemia com transfusões anteriores, demonstram redução de 20 a 30% na sensibilidade para os casos de anemia grave^{15,21}, ratificando menor acuracidade desse método na predição da anemia após múltiplas transfusões intrauterinas.

Assim, os estudos anteriores para a predição de anemia em fetos previamente transfundidos baseiam-se ou na taxa de hemólise ou na utilização da medida da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral

média. Porém, não há trabalhos que avaliem a influência de outros fatores, presentes na primeira transfusão intrauterina, para a indicação do momento mais oportuno da segunda transfusão, e consequente redução do número de transfusões necessárias, bem como das possíveis complicações associadas.

Dessa maneira, o presente estudo tem como objetivo avaliar os fatores preditivos da velocidade de hemólise fetal, entre a primeira e a segunda transfusões intrauterinas em gestações aloimunizadas.

2 OBJETIVO

O presente estudo, envolvendo gestações únicas com doença aloimune materna, tem como objetivo identificar fatores clínicos, laboratoriais, dopplervelocimétricos e hematimétricos preditivos da velocidade de hemólise fetal, entre a primeira e a segunda transfusões intrauterinas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Transfusão intrauterina

3.1.1 Histórico

Em 1963, Liley realiza a primeira transfusão intrauterina intraperitoneal no tratamento da doença hemolítica perinatal causada pela aloimunização eritrocitária⁷⁻¹⁰. Ao realizar uma amniocentese, Liley punciona acidentalmente a cavidade peritoneal fetal. Como um dos seus colaboradores havia retornado da África, onde a transfusão intraperitoneal era comumente realizada no tratamento da anemia falciforme em crianças, Liley percebe que essa via poderia ser viável para transfusão fetal^{28,29}. Inicialmente, uma substância radiopaca era injetada no líquido amniótico, que era deglutida e concentrada no trato gastrointestinal fetal. Em seguida, era introduzida, na cavidade peritoneal fetal, uma agulha de punção 16 Gauge dentro da qual um catéter de epidural era avançado. Por meio desse catéter eram aspirados 200 ml de líquido ascítico e infundidos 100 ml de concentrado de hemácias. O posicionamento da agulha era monitorizado por fluoroscopia ou radiografia. Dessa forma, iniciou-se o procedimento de transfusão fetal.

Em 1975, é descrita a primeira transfusão intrauterina com auxílio da ultrassonografia, que reduzia a exposição fetal à radiação ³⁰. O uso da ultrassonografia, em tempo real, para guiar a agulha de punção na transfusão intraperitoneal é descrito em 1977 ³¹⁻³³.

Em 1981, Rodeck et al.¹¹ realizam a primeira transfusão intravascular, posicionando a agulha de punção em vaso da placa coriônica sob visão fetoscópica. No ano seguinte, Bang et al.¹² realizam a transfusão fetal por acesso na veia umbilical sob visão ultrassonográfica.

3.1.2 Tipos de transfusão intrauterina

A partir da década de 80, sete modalidades de transfusão intrauterina são descritas:

1. Intraperitoneal;
2. Intravascular no cordão umbilical:
 - 2a. Exsanguíneo transfusão
 - 2b. Transfusão direta simples
3. Intravascular com punção da veia umbilical na porção intra-hepática
 - 3a. Transfusão direta simples
4. Intracardiaca
 - 4a. Transfusão direta simples

5. Vias combinadas

- 5a. Exsanguíneo transfusão com transfusão intraperitoneal subsequente
- 5b. Intravascular direta simples seguida de transfusão intraperitoneal.

Vários estudos são realizados para comparar as diversas técnicas de transfusão intrauterina. Comparando-se a exsanguíneo transfusão com a transfusão intravascular direta simples, percebe-se que para se atingir uma mesma correção da anemia, a primeira ³⁴⁻³⁷ permite expansões volumétricas menores com menor sobrecarga de volume para o feto, enquanto a segunda demanda menor tempo de duração do procedimento e o volume circulatório aumentado é absorvido pelo leito vascular placentário sem danos fetais. No decorrer do tempo e com a experiência dos vários centros especializados, a transfusão intravascular simples no cordão umbilical se torna o método de escolha para a transfusão intrauterina.

A transfusão intraperitoneal é reservada para os casos em que o acesso ao cordão umbilical não é possível devido à idade gestacional precoce. Nos fetos hidróticos, por sua vez, a transfusão intravascular é importante, pois a absorção peritoneal de hemácias é lenta, podendo exigir várias semanas ³⁸⁻⁴⁰. Harman et al. ⁴¹ comparam o resultado neonatal após transfusão intravascular com a intraperitoneal, usando grupos controles históricos, e encontram que a primeira melhora a sobrevida dos fetos hidróticos, sendo de 86% na intravascular, enquanto na segunda, apenas

de 48%, com mais complicações (12,5% de complicações por procedimento na intraperitoneal versus 3% na intravascular).

A combinação da transfusão intravascular e intraperitoneal é avaliada em alguns estudos ⁴²⁻⁴⁴. Nessa técnica, concentrado de hemácias com hematócrito de 80% ou mais é administrado por via intravascular para aumentar o hematócrito fetal até aproximadamente 40%. A transfusão intraperitoneal é então realizada para criar um reservatório de hemácias para ser lentamente absorvido no período entre as transfusões. A queda diária do hematócrito fetal é de 0,01%, enquanto na intravascular isolada é de 1,14% ⁴².

A transfusão na veia umbilical intra-hepática é uma alternativa nos casos de acesso difícil da veia umbilical na inserção da placenta ⁴⁵⁻⁴⁷. Nicolini et al. ⁴⁶ relatam taxa de sucesso de 90%, com essa técnica, em 72 fetos anêmicos graves. Raras complicações descritas incluem a bradicardia e o sangramento intraperitoneal. A bradicardia, quando ocorre durante uma cordocentese, parece ser devida à punção inadvertida da artéria umbilical com subsequente vasoespasmo ^{48,49}. Portanto, a baixa incidência de bradicardia durante a punção intra-hepática se deve à ausência da artéria umbilical próxima do local da punção. O sangramento intraperitoneal nesse tipo de transfusão, por sua vez, tem poucas consequências, pois o sangue extravasado é absorvido em todos os fetos, segundo Nicolini et al. ⁴⁶

A transfusão intracardíaca é a técnica descrita por Westgren et al. ⁵⁰ em gestantes com aloimunização grave. São tratados seis fetos com idade gestacional entre 19 e 31 semanas. Vinte e cinco transfusões intrauterinas

são realizadas com taxa de complicação de 20% por procedimento. Dessa forma, a transfusão intracardíaca pode ser uma alternativa quando a intravascular não é possível. Harman ⁴⁸ descreve a realização de transfusão intracardíaca para ressuscitação de cinco fetos que apresentaram exsanguinação por sangramento do local da punção do cordão umbilical.

Em algumas circunstâncias especiais, como em fetos com ascite, deve-se atentar ao fato de que o sangue transfundido por via intraperitoneal poderá ser absorvido mais lentamente. Assim, nesses casos deve ser realizada a transfusão intrauterina com punção do cordão umbilical, da veia umbilical na sua porção intra-hepática ou, em casos extremos, do coração fetal.

3.1.3 Aspectos técnicos da transfusão intrauterina

3.1.3.1 Preparo do sangue da bolsa

O concentrado de hemácias utilizado para a transfusão intrauterina deve passar pelos mesmos testes destinados ao preparo de bolsas para outros tipos de transfusão. Para as transfusões intrauterinas especificamente deve se ter alguns cuidados adicionais como:

- sangue do tipo O Rh negativo;
- unidades doadoras devem ser negativas para citomegalovírus;
- sangue relativamente fresco para aumentar o nível de 2-3 difosfoglicerato. No Hemocentro do Hospital das Clínicas da FMUSP, as

bolsas de sangue usadas para a transfusão intrauterina não podem estar estocadas por mais do que cinco dias. A importância do sangue fresco é evitar bolsas de sangue com níveis altos de potássio que podem causar arritmias cardíacas fetais ^{51, 52}.

- “British Blood Transfusion Task Force” ⁵³ e “American Association of Blood Banks” ⁵⁴ padronizam a irradiação das bolsas de sangue para transfusão intrauterina com 25 Gy de radiação gama, na porção central da bolsa doadora, para evitar a reação do tipo enxerto hospedeiro com inativação dos linfócitos.
- A leucodepleção é requerida no preparo das bolsas para transfusão intrauterina, no Reino Unido, mas não rotineiramente nos Estados Unidos. A retirada dos leucócitos da bolsa ocorre durante o processo da filtração. A irradiação da bolsa de sangue no Hemocentro do Hospital das Clínicas é realizada após a filtração, uma vez que a irradiação pode promover a lesão da parede da hemácia e assim favorecer a hemólise durante a filtração.
- As bolsas doadoras são lavadas para remover proteínas e anticorpos, e concentradas para atingir hematócrito final de 75 a 85%, minimizando o volume de sangue a ser administrado ao feto na transfusão intrauterina.

Estudos relatam que cerca de 25% das mulheres que são submetidas à transfusão intrauterina produzem anticorpos antieritrocitários adicionais devido à exposição aos antígenos do sangue transfundido, ou de origem paterna que estão na circulação fetal e que são estranhos à gestante ⁵⁵⁻⁵⁷. Esse risco é maior quando a punção é transplacentária. A realização de

provas cruzadas entre o sangue da bolsa e o da gestante para antígenos *D*, *E*, *e*, *C*, *c*, e *K*, não diminui o risco de formação de novos anticorpos, uma vez que ainda existem diferenças em outros antígenos menores ⁵⁶.

3.1.3.2 Cálculo do volume a ser transfundido

O volume de sangue a ser transfundido na técnica intravascular depende do hematócrito (Ht) fetal pré-transfusional (inicial), da idade gestacional, do peso fetal estimado, do hematócrito do concentrado de hemácias e do hematócrito desejado ao final da transfusão.

O hematócrito final desejado na transfusão intrauterina varia entre os diferentes centros. Quando apenas a transfusão intravascular é realizada, o hematócrito final a ser atingido é de aproximadamente 60%. O aumento na viscosidade do sangue fetal durante a transfusão pode ser minimizado, usando sangue doador com hematócrito maior do que 90% e restringindo o hematócrito final em aproximadamente 50-55% ²⁴. Quando se utiliza a técnica combinada, o hematócrito final desejado é geralmente de 40%. Esse número se aproxima mais do hematócrito fetal normal que varia de 33% com 17 semanas a 47% com 40 semanas ⁵⁸.

Para o cálculo do volume a ser transfundido é utilizado o volume fetoplacentário, o qual é baseado no peso fetal estimado pela ultrassonografia, é uma constante ao longo da gestação ⁵⁹ e pode ser estimado pela seguinte fórmula:

$$\text{Volume fetoplacentário (ml)} = 1,046 + \text{peso estimado fetal (g)} \times 0,14.$$

O volume a ser transfundido durante a transfusão intravascular, por sua vez, pode ser calculado pela fórmula:

$$\text{Volume transfundido (ml)} = \left\{ \left[\text{Volume fetoplacentário} \times (\text{Ht final} - \text{Ht inicial}) \right] / \text{Ht transfundido} \right\}$$

onde Ht = hematócrito.

O volume transfundido em excesso pode representar piora da sobrevida dos fetos. Geralmente, a maioria dos fetos cuja pressão na veia umbilical é normal antes da transfusão intravascular, no final do procedimento, apresenta pressão menor do que 10 mmHg⁶⁰. Alguns estudos⁶⁰⁻⁶² relatam que o aumento da pressão, na veia umbilical, superior a 10mmHg pode predizer óbito fetal, dentro de 24 horas após o procedimento, com sensibilidade de 80%. Portanto, é importante limitar o volume de sangue infundido. Radunovic et al.⁶² recomendam que o hematócrito pós-transfusional não ultrapasse 25% ou que o valor pré-transfusional não aumente mais do que quatro vezes. Selbing et al.⁶³, por sua vez, preferem volumes transfusionais não superiores a 20% do volume sanguíneo fetoplacentário.

3.1.3.3 Imobilização fetal

A movimentação fetal, descrita desde a primeira transfusão intrauterina por Liley, em 1963⁹, durante o procedimento, pode interferir no seu sucesso. Liggins, em 1966⁶⁴, descreve técnica para imobilização fetal na transfusão intraperitoneal. Posteriormente, a promoção da paralisia do feto durante o procedimento se faz por meio do uso de algumas drogas

introduzidas primeiramente, na Austrália, em 1985 ⁴⁵. Nos Estados Unidos, a injeção de D-tubocurarina na coxa do feto, sob visão ultrassonográfica, é relatada ⁶⁵. Em seguida, é descrito a administração intravascular no cordão umbilical do pancurônio bromide ^{66,67}. Contudo, a absorção das hemácias doadas da cavidade peritoneal é diminuída após a administração do pancurônio bromide ⁶⁸. Dessa forma, drogas com ação curta como o atracurônio besilato e vecurônio bromide são agora utilizadas ⁶⁹⁻⁷¹. Tanto o pancurônio como o vecurônio são bloqueadores neuromusculares competitivos. O pancurônio apresenta propensão à estimulação simpática e ação vagolítica, sendo descrito taquicardia após seu uso ⁷². O vecurônio, por sua vez, não apresenta efeito simpático ou bloqueio vagal ⁷³. O vecurônio e o atracurônio são substâncias que apresentam a vantagem de não causar taquicardia fetal ou perda da variabilidade da frequência cardíaca fetal, que ocorrem com pancurônio. O uso de vecurônio bromida na dose de 0,1 mg/kg de peso fetal estimado por via intravascular leva à parada quase que imediata dos movimentos fetais com duração do efeito por cerca de duas horas, sem efeitos neonatais observados.

3.1.4 Efeitos fisiológicos da transfusão fetal

A transfusão intravascular provoca mudanças na hemodinâmica fetal pelo aumento de volemia, assim como da viscosidade sanguínea. A pressão na veia umbilical aumenta em 1,7 a 4,6 mmHg ^{60,74,75}, logo após a transfusão

intrauterina. Esse aumento é espontaneamente resolvido na semana seguinte ao procedimento. O débito cardíaco, por sua vez, diminui 25% e começa a retornar aos níveis anteriores em duas horas, normalizando em 24 horas⁷⁶. Acredita-se que, para responder ao aumento na pós-carga cardíaca por aumento da viscosidade sanguínea, ocorre diminuição do volume de ejeção, levando à redução do débito cardíaco, aumento da pressão no átrio direito e veia umbilical e conseqüente diminuição da frequência cardíaca fetal^{48,75}. Por meio da avaliação dopplervelocimétrica da artéria umbilical e de outros vasos fetais, como a femoral, renal e cerebral, demonstra-se que ocorre vasodilatação fetoplacentária generalizada em resposta ao aumento da pós-carga cardíaca^{77,78}. É descrito o aumento de prostaglandinas vasodilatadoras fetais, após a transfusão, assim como do peptídeo atrial natriurético, o que provoca diminuição do tônus vascular, permitindo que o feto tolere melhor os aumentos de volemia⁷⁹⁻⁸².

Nos fetos, ocorrem alterações no metabolismo secundário à transfusão intravascular. Nicolini et al.⁸³ encontram diminuição do pH da veia umbilical e do excesso de base, enquanto a pressão parcial de CO₂ aumenta agudamente após o procedimento. A curva de dissociação de oxigênio da hemoglobina fetal favorece a captação de oxigênio na placenta. Dessa forma, ao substituir as hemácias fetais por adultas, a liberação de oxigênio aos tecidos pode ser prejudicada. Contudo, acredita-se que mecanismos compensatórios fetais, como aumento do fluxo uteroplacentário, devam ocorrer. Em adultos, há aumento da concentração sérica de 2,3-difosfoglicerato que reduz a afinidade do oxigênio à hemoglobina adulta,

facilitando a liberação de oxigênio nos tecidos. Soothill et al.⁸⁴ relatam aumento de 2,3-difosfoglicerato sérico fetal diretamente proporcional ao grau de anemia fetal, permitindo melhor oxigenação do tecido fetal.

3.1.5 Dinâmica das hemácias transfundidas na circulação fetal

Os primeiros trabalhos estudam a absorção de hemácias infundidas na cavidade peritoneal fetal^{38,85}. Os estudos iniciais relatam que os fetos hidróticos seriam incapazes de absorver as hemácias doadas após a transfusão intraperitoneal³⁸. Contudo, Montague et al.⁸⁶ relatam que, após duas horas da transfusão intraperitoneal, 18% das hemácias da circulação fetal são compostos de células adultas. Por meio da utilização de hemácias marcadas com cromo, estudos observam que mesmo os fetos hidróticos absorvem as hemácias doadas da cavidade peritoneal, porém após várias semanas^{39,40}.

Comparadas às hemácias fetais, as adultas têm menor tamanho e rigidez, e maior capacidade de agregação^{24,25}. O sangue do adulto difere do sangue fetal pela capacidade arterial total de transportar oxigênio e de liberar oxigênio aos tecidos²⁴. A hemoglobina adulta tem afinidade menor pelo oxigênio, portanto, a sua concentração total de oxigênio na circulação fetal é menor com as hemácias adultas doadas do que com as fetais, na mesma concentração de hemoglobina. A hemoglobina adulta tem a tendência de se ligar menos ao oxigênio, aumentando a capacidade de

liberá-lo para os tecidos. Porém, na circulação fetal, as hemácias adultas têm capacidade total diminuída de liberar oxigênio. Fumia et al.⁸⁷ atribuem também a redução na liberação de oxigênio aos tecidos às mudanças da viscosidade do sangue fetal e aos mecanismos compensatórios vasomotores da perfusão.

A meia-vida dos eritrócitos adultos na circulação fetal é controversa. Jones et al.¹⁷ relatam meia-vida de apenas 30 dias em fetos do segundo trimestre da gestação, enquanto na circulação do adulto, aproximadamente 60 dias. Contudo, Pattison e Roberts¹⁸ constatam que a duração da hemácia adulta na circulação fetal é semelhante na da adulta. Os linfócitos adultos na circulação fetal, por sua vez, podem persistir por mais de dois anos na circulação periférica das crianças submetidas à transfusão intrauterina. A sobrevivência das hemácias doadas independe da via de transfusão intrauterina, da idade gestacional ou da presença de hidropisia¹⁸.

O desaparecimento de hemácias doadas após a transfusão intrauterina não ocorre de forma linear¹⁷. Nos primeiros dias após a transfusão, as células doadas desaparecem mais rapidamente que nos dias subsequentes¹⁷ devido aos efeitos mecânicos lesivos à parede da hemácia pela hemoconcentração.

A redução da meia-vida da hemácia doada pode ser devida à irradiação gama utilizada no preparo das bolsas de sangue a serem transfundidas, que produz elementos oxidativos os quais aumentam a peroxidação lipídica e proteica da membrana do eritrócito⁸⁸. O sangue irradiado apresenta aumento da hemólise, dos níveis de substâncias reativas

a tiobarbitúricos e diminuição da capacidade de se deformar das hemácias⁸⁹⁻⁹³. A diminuição da meia-vida da hemácia doada ainda ocorre por fatores fetais desfavoráveis. Luykx et al.⁹⁴ demonstram que amostras de plasma de fetos D+ têm diminuição da capacidade antioxidante. Além disso, nesses fetos há aumento de ferro não ligado à proteína que é um forte prooxidante. Esses dois fatores resultam em oxidação lipídica e proteica da membrana do eritrócito doado na circulação fetal, o que pode levar, por sua vez, à redução da capacidade de se deformar dessas células^{95,96}.

Egberts et al.²⁷, na tentativa de determinar a proporção de redução de hemácias fetais e doadas da circulação fetal, após as transfusões intrauterinas, encontram que, após a primeira transfusão intrauterina, a velocidade de desaparecimento das hemácias fetais é maior do que das doadas. Após a segunda transfusão intrauterina, o sangue resultante da mistura entre células fetais e doadas apresenta velocidade de hemólise semelhante à das células doadas. Antes da primeira transfusão intrauterina, observa-se 100% de hemácias fetais que decai para 15% (após a primeira transfusão) e para aproximadamente 5 a 7% (após a segunda transfusão).

3.1.6 Complicações na transfusão intrauterina

Atualmente, a transfusão intravascular é considerada segura com taxas de perdas fetais que variam de 1 a 3%^{49,97,98}, mas esses riscos podem ser maiores em fetos prematuros ou hidrópicos^{98,99}. Na punção do cordão

umbilical, podem ocorrer hematomas com comprometimento fetal. As coleções perifuniculares podem, por sua vez, levar a vasoespasmo e bradicardia fetal subsequente. Caso ocorra associação com trombose da veia umbilical, há aumento do risco de óbito fetal ¹⁰⁰. Dessa forma, o sangramento do local da punção do cordão umbilical pode levar ao aparecimento de hematoma, piora da anemia e a exsanguinação do feto. Assim é importante observar o turbilhonamento do sangue injetado sob visão ultrassonográfica no interior da veia umbilical, durante a transfusão intrauterina, que é a imagem característica da passagem do sangue no cordão. A parada da visualização dessa imagem pode ser indicativa da perda do local da punção ¹⁰¹.

A bradicardia fetal transitória pode ocorrer em 4% a 5% das transfusões intravasculares por vasoespasmo da artéria umbilical ^{13,48,49}, e pode apresentar incidência de até 30% quando a artéria umbilical é puncionada. A veia umbilical é, portanto, o vaso ideal para transfusão intravascular ⁹⁸. Se a artéria umbilical for inadvertidamente acessada, alguns autores recomendam a retirada imediata da agulha, enquanto outros mantêm o procedimento, contudo monitorizando a frequência cardíaca fetal. Na ocorrência da bradicardia fetal, recomenda-se diminuir a velocidade de infusão de sangue ou suspendê-la. Também se preconiza a administração de oxigênio à gestante. Na persistência da bradicardia fetal, deve-se suspender o procedimento com retirada da agulha e mudança de decúbito materno para lateral esquerdo. Em fetos viáveis, caso persista a bradicardia, deve se considerar a realização do parto de urgência.

No passado, foram descritos casos de infecção congênita por vírus como citomegalovírus¹⁰². Além disso, são descritas, apesar de raras, lesões cerebrais fetais graves após o procedimento^{103,104}. Dildy et al.¹⁰³ relatam um caso de cisto porencefálico fetal após o procedimento. O aumento da viscosidade do sangue fetal associado à bradicardia, durante a transfusão, pode ter contribuído para essa complicação.

Antes da introdução de drogas que promovem a paralisia do feto nas transfusões intrauterinas, há descrições de lesão de vísceras e trauma do cordão umbilical durante o procedimento. Chaim et al.¹⁰⁵ descrevem uma transfusão intraperitoneal com herniação subsequente do omento através do local da punção da agulha.

A punção transplacentária na transfusão intrauterina aumenta o risco de laceração de vasos fetoplacentários com possibilidade de subsequente exsanguinação do feto¹⁰⁶. A hemorragia fetomaterna pode também ocorrer com potencial de piorar a doença hemolítica fetal na gestação em curso ou nas futuras¹⁰⁷. A hemorragia fetomaterna é descrita em até 40% das transfusões intrauterinas¹⁰⁷, sendo mais comum com placenta anterior (66%) do que posterior (17%). Moise et al.¹⁰⁸ descrevem uma gestante aloimunizada que teve aumento dos títulos de anticorpos antieritrocitários após a realização de biópsia de vilo corial. Por essa razão, a punção transplacentária deve ser evitada na transfusão intrauterina. Nicolini et al.¹⁰⁷ documentam hemorragia fetomaterna, com volume médio de 2,4 ml, em 21 de 32 pacientes submetidas à transfusão intravascular com placenta de

localização anterior. É relatado aumento dos títulos dos anticorpos sempre que o volume estimado de hemorragia fetomaterna ultrapassa 1,0 ml¹⁰⁷.

Van Kamp et al.¹³ descrevem os riscos da transfusão intrauterina num único centro, numa série de 740 transfusões intravasculares realizadas em 254 gestantes. A taxa, por procedimento, de óbito perinatal é de 1,6%, de cesárea de emergência de 2%, infecção de 0,3%, rotura prematura de membranas amnióticas de 0,1%, punção inadvertida da artéria umbilical de 3% e sangramento do local da punção de 0 a 17 minutos.

3.2 Parâmetros para indicação das transfusões uterinas subsequentes

Após a transfusão intrauterina, a circulação fetal é composta por hemácias fetais e adultas. Enquanto as hemácias fetais sofrem ação dos anticorpos maternos, as adultas têm a taxa de hemólise dependente da sua meia-vida na circulação fetal. A taxa de hemólise varia conforme se seguem as transfusões intrauterinas, podendo ser previsível. Após as primeiras duas transfusões, espera-se que a hemólise promova queda aproximada diária de 1% do hematócrito ou 0,3 a 0,4 g/dl de concentração de hemoglobina¹⁴. Contudo, antes das duas primeiras transfusões, a hemólise esperada pode variar e ser menos previsível, devido à persistência ainda de células de origem fetal em quantidades diferentes em cada feto. Além disso, predizer o

hematócrito antes da próxima transfusão intrauterina é processo complexo, uma vez que vários fatores podem interferir: trocas de fluidos entre os compartimentos intra e extravascular, sangramento do local da punção quando a agulha é retirada e possível diminuição da sobrevivência dos eritrócitos adultos na circulação sanguínea fetal.

O momento para realizar a transfusão fetal subsequente varia conforme os diferentes centros. Em alguns, após a primeira transfusão, os fetos anêmicos são transfundidos em 1 a 2 semanas e, após as duas primeiras, esse intervalo pode ser aumentado para cada 3 a 4 semanas, quando a eritropoiese fetal já está inibida. Losinska¹⁰⁹ relata que a hematopoiese fetal é suprimida pela transfusão intrauterina, o que é demonstrado pelo teste de Kleihauer e contagem de reticulócitos. Os fetos com anemia grave de início precoce no segundo trimestre são exceção a esse protocolo. Inicialmente, esses fetos são transfundidos para atingir um hematócrito de 25%. Uma segunda transfusão intrauterina é realizada em 48 horas com objetivo de atingir o hematócrito final de 35%. Equações para prever o hematócrito, no início da transfusão subsequente, e o momento para repetir as transfusões podem ser estimadas^{16,48,110}, baseadas em valores de hematócrito inicial e final da primeira transfusão intrauterina e pesos fetais estimados nas transfusões. O objetivo é manter a concentração de hemoglobina fetal acima de 7,0 g/dl para impedir a evolução para formas graves da doença, ou seja, a hidropisia fetal.

Nos fetos anêmicos, a diminuição do hematócrito leva à diminuição da viscosidade sanguínea com prejuízo da liberação de oxigênio nos

tecidos ^{87,111}. Para compensar e manter a oxigenação e o equilíbrio metabólico, o feto se vale do aumento do débito cardíaco e da vasodilatação ¹¹². O estado hipercinético da circulação desses fetos pode ser avaliado por meio da dopplervelocimetria que, como método propedêutico, tem demonstrado aplicação prática no diagnóstico da anemia fetal.

A avaliação dopplervelocimétrica de vários vasos como a veia umbilical, artéria esplênica, aorta, ducto venoso e a artéria cerebral média, tem sido objeto de estudo na tentativa de prever a anemia fetal ^{19,23,76,113-119}. Entre todos os vasos sanguíneos, a artéria cerebral média é o que tem mostrado a melhor correlação com a anemia fetal, sendo a medida da V_{máx} ACM útil em identificar fetos anêmicos sem transfusão intrauterina prévia ^{20,26,120,121}.

Após a transfusão intrauterina com a infusão de sangue adulto, o hematócrito fetal aumenta, com o aumento da viscosidade sanguínea e conseqüentemente, ocorre diminuição do valor da V_{máx} ACM ¹²². Nesses fetos previamente transfundidos, a V_{máx} ACM pode ter acurácia menor para predição de anemia, pois a correlação entre a velocidade sanguínea e a concentração de hemoglobina parece ser mais fraca.

Estudos dopplervelocimétricos com medida da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média têm sido realizados para tentar prever o momento da segunda transfusão intrauterina. Detti et al.²³ avaliam 64 fetos submetidos a uma transfusão intrauterina prévia e relatam que o valor da V_{máx} ACM de 1,69 MoM prediz 100% de todos os casos de anemia grave com falso positivo de 6%, enquanto o valor de 1,32 MoM, todos os fetos com

anemia moderada com falso positivo de 37%. Dessa forma, esses autores concluem que valores maiores da $V_{\text{máx ACM}}$ podem ser usados na predição da anemia grave, em casos já transfundidos, comparados com fetos que nunca foram submetidos à transfusão intrauterina quando é utilizado o valor de 1,5 MoM²⁰. Para explicar os valores mais altos da $V_{\text{máx ACM}}$, são citadas mudanças na reologia do sangue fetal devido à presença da hemoglobina adulta, assim como alterações na circulação cerebral fetal devido à diferença na capacidade de ligação do oxigênio às hemácias transfundidas.

Deren e Onderoglu²² também encontram valores de $V_{\text{máx ACM}}$ maiores no grupo de fetos previamente transfundidos. Em gestantes sem transfusão prévia, para predição de anemia grave com 100% de sensibilidade com falso positivo de 9,1%, o valor da $V_{\text{máx ACM}}$ é de 1,35 MoM, enquanto no grupo de pacientes com uma ou mais transfusões intrauterinas, o valor de $V_{\text{máx ACM}}$ para sensibilidade de 100% com taxa de falso positivo de 21,4% é de 1,40 MoM.

Em estudo sobre a utilização da $V_{\text{máx ACM}}$ para predição de anemia em fetos com duas transfusões intrauterinas prévias, Mari et al.¹⁵ avaliam 39 gestações e observam que a correlação entre os valores da $V_{\text{máx ACM}}$ e a concentração da hemoglobina fetal persiste após duas transfusões prévias. Nesse estudo, o valor da $V_{\text{máx ACM}}$ maior ou igual a 1,5 MoM para indicar a próxima transfusão, não detectaria um caso de anemia grave em cinco e quatro casos de anemia moderada em sete.

Dados publicados e experiência clínica não sustentam o uso da dopplervelocimetria da artéria cerebral média após as duas primeiras transfusões intrauterinas ¹²³, pois 66 a 100% do sangue circulante no feto contêm hemácias adultas e, nessa situação, a V_{máx} ACM perde a habilidade de discriminar anemia fetal moderada e grave, da leve. Alguns estudos, realizando cordocentese e dopplervelocimetria com valor de corte da V_{máx} ACM maiores ou iguais a 1,5 MoM, não detectam de 20 a 33% dos casos de anemia grave ^{15,21}. Em fetos que foram transfundidos uma vez, a predição da anemia fetal por meio da V_{máx} ACM é semelhante à estimativa da concentração de hemoglobina, utilizando a estimativa de hemólise de 0,4 g/dl por dia. Scheier et al.²¹ relatam que, na terceira transfusão intrauterina, a predição da concentração da hemoglobina fetal se faz melhor com estimativa da concentração da hemoglobina baseada na taxa de hemólise de 0,3 g/dl por dia do que pela V_{máx} ACM.

A V_{máx} ACM tem baixa acurácia, após múltiplas transfusões, presumivelmente porque as hemácias adultas são menores, menos rígidas, demonstram maior agregação eritrocitária comparada aos eritrócitos fetais e, portanto, a relação entre a concentração de hemoglobina e velocidade do sangue deve ser diferente.

Atualmente, a determinação do momento de se repetir a transfusão intrauterina está baseada em intervalos empíricos, acima descritos, empregados por especialistas ou na medida da V_{máx} ACM que, por sua vez, não tem dados suficientes que sustentem a sua utilização.

Dessa forma, é essencial analisar a predição da velocidade de hemólise em fetos com transfusão intrauterina prévia, por meio de outros parâmetros além da dopplervelocimetria da artéria cerebral média.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

Trata-se de estudo retrospectivo compreendendo gestantes aloimunizadas, acompanhadas no Setor de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de janeiro de 1999 a setembro de 2010, e submetidas à transfusão intrauterina.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Projeto nº CAPPesq: 1166/07) (Anexos A e B).

4.2 Métodos

4.2.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos os seguintes casos:

- Mulheres aloimunizadas com gestação única e feto não hidrópico, submetidas à primeira e à segunda transfusões intrauterinas pela técnica intravascular direta simples;

- Com resultados das concentrações de hemoglobina da bolsa de sangue transfundida, assim como do sangue fetal no início da 1ª e da 2ª TIU e no final da 1ª transfusão intrauterina.

4.2.2 Protocolo de assistência à gestante com Aloimunização

Na Clínica Obstétrica do HCFMUSP, as gestantes Rh negativas são seguidas com a realização da pesquisa de anticorpos irregulares mensalmente e aquelas com títulos de anticorpos maiores ou iguais a 16 são consideradas de risco para anemia fetal ¹²⁴. Estas são seguidas com exames ultrassonográficos seriados, identificação e dosagem de títulos de anticorpos irregulares (teste de Coombs indireto). Na presença de sinais ultrassonográficos sugestivos de anemia fetal (como ascite, derrame pericárdico ou hidropisia) e ou de alterações dopplervelocimétricas da artéria cerebral média, a paciente era submetida à cordocentese para a determinação da hemoglobina fetal. Quando a concentração de hemoglobina fetal se encontrava abaixo do 5º percentil da curva de Nicolaidis¹²⁵, era realizada a transfusão intrauterina. A figura 1 mostra o fluxograma do protocolo atual de assistência à gestante aloimunizada no HCFMUSP.

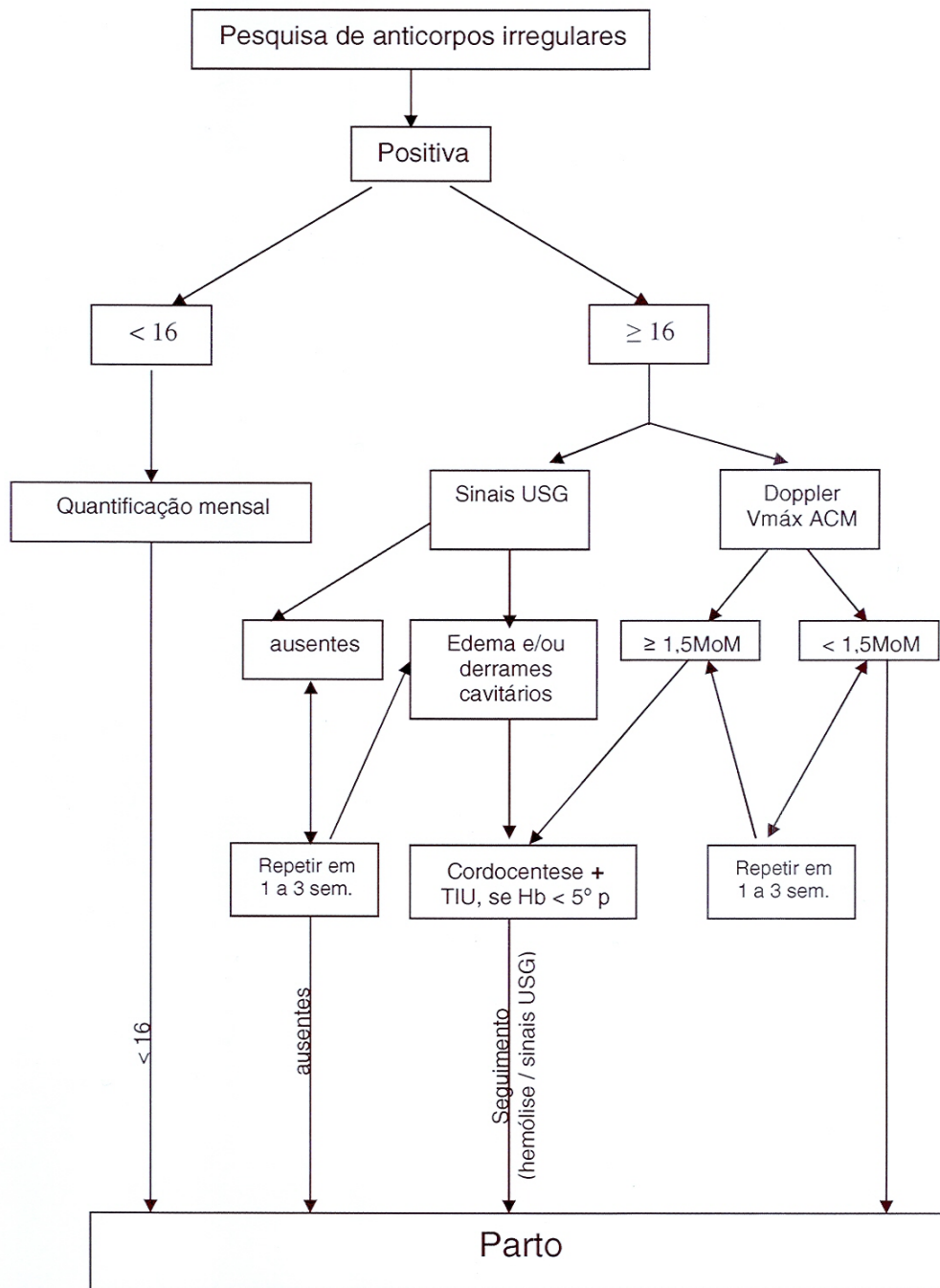


Figura 1 - Fluxograma do Protocolo de assistência à gestante aloimunizada no HCFMUSP

4.2.2.1 Teste de Coombs indireto

O teste de Coombs indireto foi realizado no soro materno, segundo a técnica descrita por Coombs et al.¹²⁶, no banco de sangue da Fundação Pró-sangue (método em tubo em meio salino). Os títulos de anticorpos foram considerados de risco quando maior ou igual a 16. Nesses casos, o teste foi repetido a cada quatro semanas.

4.2.2.2 Ultrassonografia

O exame ultrassonográfico das gestantes foi realizado para avaliação biométrica e morfológica fetais, com ênfase na pesquisa de sinais sugestivos de anemia fetal: presença de ascite, derrame pericárdico, hidropisia, aumento do líquido amniótico e alterações da espessura placentária. O exame foi repetido em uma a quatro semanas, de acordo com o antecedente obstétrico, título de anticorpos e achados ultrassonográficos.

4.2.2.3 Diferença de densidade óptica a 450nm

Até 2002, as gestantes foram seguidas com amniocentese com determinação da diferença de densidade óptica a 450nm (DDO 450), sendo indicada a transfusão intrauterina quando esta se encontrava na zona II superior ou zona III da curva de Bowman (Liley modificada)⁴⁸. No HCFMUSP, Nishie et al.¹²⁷, comparando a dopplervelocimetria da artéria cerebral média com medida da V_{máx} ACM e a DDO 450 no líquido

amniótico, relatam sensibilidades semelhantes dos dois métodos na predição de anemia fetal em gestantes aloimunizadas. Como a dopplervelocimetria da artéria cerebral média se trata de método não invasivo, ela começou a ser empregada no protocolo assistencial das gestantes aloimunizadas a partir de 2002.

4.2.2.4 Dopplervelocimetria da Artéria Cerebral Média

A cada avaliação ultrassonográfica, foi realizado estudo dopplervelocimétrico da artéria cerebral média com uso de transdutor curvilíneo de 3,5MHz (Corevision e Ecco Cee, Toshiba, Japão) ou multifrequencial (Envisor, Philips, Andover, MA, EUA.), segundo a técnica preconizada por Mari et al.¹⁹. Para obtenção do sonograma da artéria cerebral média, realizava-se um corte transversal do cérebro fetal, incluindo o tálamo e o cavum do septo pelúcido. Em seguida, movia-se o transdutor caudalmente sendo visibilizadas as asas do osso esfenoide. A artéria cerebral média era identificada com Doppler colorido no seu trajeto, ao longo da asa maior do osso esfenoide (Figura 2).

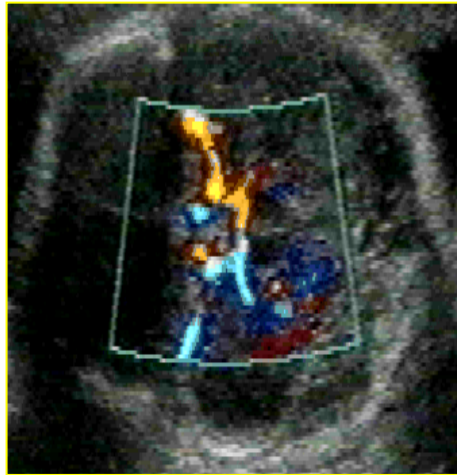


Figura 2 - Corte transverso do pólo cefálico fetal com visualização, pelo mapeamento colorido, da artéria cerebral média e do polígono de Willis

A artéria cerebral média foi insonada na janela anterior (têmporo-occipital) ou posterior (occipito-temporal). Para obtenção do sonograma, a janela do Doppler pulsado foi posicionado no terço proximal do vaso. O ângulo entre os eixos do vaso e do feixe de ultrassom foi mantido menor do que 20 graus. Foram obtidos de pelo menos cinco sonogramas consecutivos e uniformes, em período de apneia, na ausência de movimentos fetais e de contração uterina, diante de frequência cardíaca fetal fisiológica (120 - 160 bpm) e evitando-se pressão excessiva sobre o abdome materno. O cálculo da velocidade máxima da artéria cerebral média foi obtido automaticamente pelo aparelho (Figura 3). Foram realizadas três medidas da velocidade sistólica máxima, sendo registrada a maior.

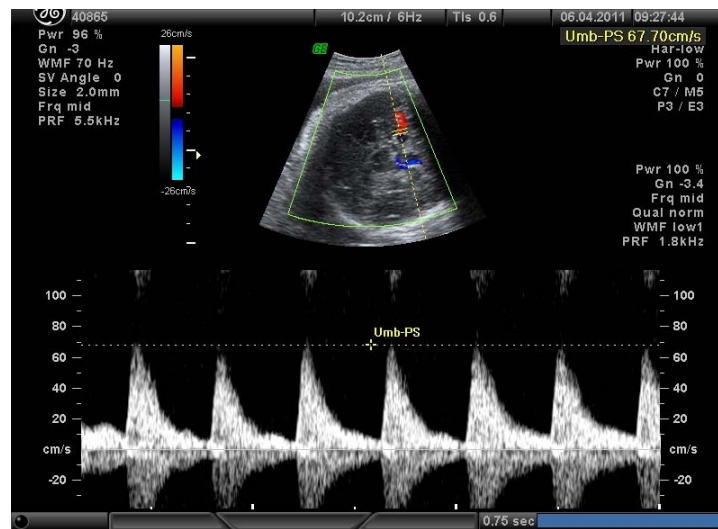


Figura 3 - Sonograma da artéria cerebral média com medida da velocidade sistólica máxima

As medidas foram obtidas na ausência de contração uterina, diante de frequência cardíaca fisiológica (120 - 160 bpm), evitando-se pressão excessiva sobre o abdome materno e na ausência de movimentos respiratórios fetais.

4.2.2.5 Procedimento invasivo

A cordocentese foi indicada se o feto apresentasse sinais ultrassonográficos sugestivos de anemia fetal, pela medida da $V_{máx}$ ACM maior ou igual a 1,5 MoM (curva de Mari)¹⁹ ou quando a DDO 450 apresentasse valor na zona II superior ou na zona III da curva de Bowman.

A cordocentese, guiada pela ultrassonografia, foi realizada com uso de agulha de calibre 20 Gauge, sob anestesia local, puncionando-se

preferencialmente a veia umbilical, junto à sua inserção placentária⁵⁰. Após a punção, foram aspirados 2ml de sangue fetal. As amostras de sangue fetal, assim obtidas, foram submetidas à determinação da concentração de hemoglobina utilizando-se o hemoglobinômetro (Hemocue, Ängelholm, Sweden). O valor foi confirmado pelo hemograma completo realizado no laboratório Central do Hospital.

Quando a medida da concentração da hemoglobina fetal encontrava-se abaixo do 5º percentil (ou abaixo de -1,64 DP) para a idade gestacional pela curva de Nicolaidis et al.¹²⁵, o feto era submetido à transfusão intrauterina.

4.2.2.6 Transfusão intrauterina

Após o diagnóstico de anemia fetal, a agulha da punção foi mantida no vaso e realizado teste pela infusão de soro fisiológico, sob visão ultrassonográfica, para confirmar sua localização na veia umbilical. Nos casos em que se observou movimentação fetal ou quando a placenta era de localização posterior, foi administrado pancurônio (0,1 mg/kg de peso fetal) para imobilizar o feto.

Foi infundido concentrado de hemácias preparadas pelo Hemocentro de São Paulo. Foram utilizadas bolsas O Rh negativo, frescas (até cinco dias da coleta), irradiadas (até 24 horas) com 25 Gy de radiação gamma e lavadas.

O volume de sangue da bolsa a ser infundido foi calculado por meio de programa computadorizado, levando-se em consideração a concentração

de hemoglobina fetal e da bolsa de sangue, com objetivo de atingir o 95º percentil da concentração de hemoglobina para a idade gestacional e não ultrapassar a expansão volêmica fetal de 50%.

Ao término da transfusão intrauterina, foi colhida nova amostra de sangue fetal para dosagem da concentração de hemoglobina fetal. Uma amostra do sangue da bolsa doadora também foi enviada ao laboratório para determinação da concentração de hemoglobina.

4.2.2.7 Seguimento pós-transfusão intrauterina

Após a primeira transfusão intrauterina, as gestantes foram seguidas periodicamente, com retornos programados a cada sete ou catorze dias para avaliações ultrassonográficas. A transfusão subsequente foi indicada com base nos seguintes parâmetros:

1. Estimativa de queda da concentração de hemoglobina fetal, seguindo a hemólise de pelos menos 0,3g/dl por dia¹⁴;
2. Presença de novos sinais ultrassonográficos sugestivos de anemia fetal (ascite, derrame pericárdico, edema de subcutâneo ou hidropisia).

4.2.3 Coleta de dados

As gestantes incluídas neste estudo foram identificadas de levantamento em banco de dados informatizados. Os dados coletados foram obtidos de prontuários hospitalares assim como do banco informatizado e

armazenados e, posteriormente, analisados em planilha eletrônica (Microsoft® Office Excel 2003).

4.2.3.1 Antecedente Obstétrico em relação à aloimunização

As gestantes foram classificadas quanto ao antecedente obstétrico, em relação à aloimunização^{128,129}, em:

1. Doença leve: recém-nascido de termo que necessitou apenas de fototerapia.
2. Doença moderada: recém-nascido de termo submetido à exsanguíneo transfusão neonatal.
3. Doença grave: história de óbito intrauterino ou transfusão intrauterina ou recém-nascido pré-termo submetido à exsanguíneo transfusão.

4.2.3.2 Teste de Coombs indireto

Os títulos e os tipos de anticorpos da gestante foram coletados. Para a análise estatística dos títulos de anticorpos foi utilizado o logaritmo do título (log AC) das gestantes com anticorpo anti-D isolado ou associado a outro anticorpo.

4.2.3.3 Dopplervelocimetria da Artéria Cerebral Média

Os valores da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média (Vm_{max} ACM), antes da 1^a e da 2^a transfusões intrauterinas, foram coletados e transformados em múltiplos da mediana (MoM) para a idade gestacional

(ACM MoM = Vm_{max} ACM / mediana da Vm_{max} ACM para a idade gestacional),

onde mediana da Vm_{max} ACM = $[EXP ^ (2,30921 + 0,0463954 * IG)]$.

Para interpretação foi utilizada a curva de normalidade da velocidade máxima da artéria cerebral média do estudo de Mari et al.¹⁹.

Foram consideradas as seguintes definições:

Vm_{max} ACM pré1 = Vm_{max} ACM imediatamente antes da 1^a TIU;

Vm_{max} ACM pré 2 = Vm_{max} ACM imediatamente antes da 2^a TIU;

ACM MoM pré 1 = múltiplos da mediana da Vm_{max} ACM antes da 1^a TIU;

ACM MoM pré 2 = múltiplos da mediana da Vm_{max} ACM antes da 2^a TIU.

4.2.3.4 Definição de anemia

Os valores de referência para o diagnóstico de anemia fetal basearam-se na curva descrita por Nicolaidis et al.¹²⁵.

Os valores da concentração da hemoglobina (Hb) da amostra de sangue fetal antes da 1^a e da 2^a TIU, pós 1^a TIU e do sangue da bolsa foram coletados. Esses valores foram convertidos em múltiplos do desvio padrão (DP)

$[Hb DP = (Hb medida - Hb média para a idade gestacional) / DP]^{130}$,

onde Hb média = $[(8,15544 + (0,15578 x IG)]$, DP = 0,93907 e IG= idade gestacional.

Foram consideradas as seguintes definições:

- Hb pré 1 = concentração de hemoglobina antes da primeira transfusão intrauterina;
- Hb pré 2 = concentração de hemoglobina antes da segunda transfusão intrauterina;
- Hb pós 1 = concentração de hemoglobina após a primeira transfusão intrauterina;
- Hb DP pré 1 = concentração de hemoglobina antes da primeira transfusão intrauterina em múltiplos do desvio padrão;
- Hb DP pré 2 = concentração de hemoglobina antes da segunda transfusão intrauterina em múltiplos do desvio padrão;
- Hb DP pós 1 = concentração de hemoglobina após a primeira transfusão intrauterina em múltiplos do desvio padrão.

Foram calculadas as quantidades de hemoglobina endógena inicial, de hemoglobina exógena infundida, a razão entre Hb endógena e a quantidade de hemoglobina pós TIU, e a taxa de hemólise das seguintes formas:

- Quantidade de hemoglobina endógena inicial (Hb endógena) (expresso em gramas) = Hb pré X VFP, onde Hb pré= concentração de hemoglobina no sangue fetal pré transfusional e VFP = volume fetoplacentário.
- Quantidade de hemoglobina exógena infundida (Hb exógena) (expresso em gramas) = Hb da bolsa X Volume infundido, onde Hb da bolsa = concentração de hemoglobina na bolsa doadora.

- Razão entre quantidade de Hb endógena em relação à quantidade total de hemoglobina pós TIU = Hb endógena / (Hb endógena + Hb exógena infundida).
- Taxa de hemólise (expresso em gramas/dl/ dia): Hb pré 2ª TIU – Hb pós 1ª TIU / intervalo (em número de dias).

O volume fetoplacentário (VFP) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{VFP (expresso em ml)} = 10^{(-0,28725 + 0,11263 * \text{IG} - 0,0011 * \text{IG}^2)},$$

onde IG = idade gestacional ¹³¹

O volume de expansão foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Volume de expansão (expresso em \%)} = [\text{volume transfundido (ml)/VFP médio para IG (ml)}] \times 100,$$

onde VFP = volume fetoplacentário e IG = idade gestacional.

4.2.3.5 Transfusão intrauterina

Foram coletados os seguintes dados da transfusão intrauterina: idade gestacional no momento do procedimento, intervalo de tempo entre a 1ª e a 2ª transfusões intrauterinas e volume de sangue transfundido.

4.2.4 Cálculo do tamanho amostral

Estudo na literatura para avaliar hemólise, após a primeira transfusão intrauterina, em gestantes aloimunizadas, encontra coeficiente de correlação

de 0,82¹³², ao avaliar a influência da hidropisia fetal e outras variáveis, como títulos dos anticorpos, idade gestacional da transfusão intrauterina e intervalo entre as transfusões na queda do hematócrito após a primeira transfusão intrauterina.

O presente estudo tem por objetivo investigar fatores adicionais que venham aprimorar a predição de hemólise fetal em gestações previamente transfundidas. Para tanto, as variáveis adicionais a serem investigadas para obter o mesmo coeficiente de correlação descrito por Lobato e Soncini, deve compreender tamanho amostral de 10 gestações com transfusão prévia (poder do teste de 80%, erro alfa de 5%). Outros tamanhos amostrais, segundo diferentes coeficientes de correlação com poder do teste de 80% (com erro alfa fixo de 5%), estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Tamanho amostral conforme diferentes valores esperados de coeficiente de correlação

Coficiente de correlação	n
0,40	48
0,50	30
0,60	20
0,70	14
0,80	10
0,90	7

n = número de pacientes

4.2.5 Análise estatística

Foi utilizado o teste de Mann-Whitney U para avaliar a diferença de significância entre hemólise e o tipo de punção intrauterina (transplacentária ou não transplacentária).

Para avaliar a diferença entre hemólise e distintos grupos de antecedente obstétrico em relação à aloimunização (grave, moderado, leve, nenhum e não grave) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

A regressão linear simples foi usada para examinar a correlação entre a hemólise e as variáveis uma a uma a seguir:

- Idade materna;
- Logaritmo dos títulos dos anticorpos;
- Idade gestacional da 1^a e da 2^a TIU;
- Hb DP pré 1 e Hb DP pós 1;
- volume de expansão da TIU;
- razão entre quantidade de Hb endógena em relação à quantidade total de Hb pós TIU;
- ACM MoM ACM pré 1 e ACM MoM pré 2;
- intervalo entre a 1^a e a 2^a TIU .

Foi realizada a análise multivariada para avaliar a significância entre a hemólise em relação a Hb DP pós 1, intervalo entre a 1^a e a 2^a TIU e V_{máx} ACM pré 2.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Durante o período do estudo, 64 gestantes aloimunizadas com fetos únicos não hidrópicos foram submetidos à primeira e à segunda transfusões intrauterinas intravasculares. Vinte e três (36%) foram excluídas por:

1. Não obtenção da concentração de hemoglobina das bolsas de sangue transfundidas (n=14);
2. Incongruência dos resultados laboratoriais da concentração de hemoglobina (Hb):
 - a) discordância entre os valores da Hb pós-transfusionais aferidos pelo laboratório e os estimados (n=4);
 - b) Discrepância dos valores da Hb pós 1ª TIU e pré 2ª TIU:
 - b.1)** Caso 1: Hb pós 1ª TIU de 10g/dl e Hb pré 2ª TIU de 4,9g/dl em 1 dia) (n= 1)
 - b.2)** Caso 2: Hb pré 1ª TIU de 0,1g/dl (n=1)
 - b.3)** Caso 3: Hb pós 1ª TIU = Hb pré 2ª TIU (n=2)
 - b.4)** Caso 4: Hb pós 1ª TIU com medida próxima da Hb pré 2ª TIU no intervalo de 49 dias (n=1)

Portanto, quarenta e uma gestantes constituem o grupo de estudo. Os dados referentes à idade materna, antecedente obstétrico, antecedente de aloimunização, tipo e título dos anticorpos, idade gestacional da 1ª TIU,

V_{máx} ACM pré1, concentração de hemoglobina antes e depois da 1ª TIU, volume transfundido, idade gestacional da 2ª TIU, V_{máx} ACM pré2, concentração de hemoglobina antes e depois da 2ª TIU e dados do parto e recém-nascido dessas 41 gestantes se encontram descritos no Anexo C.

A média da idade materna foi de $32,6 \pm 5,2$ anos.

Em relação ao antecedente obstétrico, a média do número de gestações foi de $4,5 \pm 1,8$, número médio da paridade de $3,1 \pm 1,7$ e $0,5 \pm 0,7$ de abortamentos anteriores.

No grupo estudo, em relação ao antecedente obstétrico de aloimunização, 27 (65,9%) gestantes apresentavam história grave, quatro (9,7%), moderada, três (7,3%), leve e sete (17,1%), nenhuma história prévia relacionada.

Quanto à especificidade dos anticorpos antieritrocitrários (tabela 2), quarenta (97,6%) gestantes apresentavam anti-D. No gráfico 1, está descrita a distribuição dos títulos de anticorpos anti-D.

Tabela 2 - Distribuição da especificidade dos tipos de anticorpos antieritrocitários encontrados em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010

Tipo de anticorpo	n (%)
Anti-D	40 (97,6%)
Isolado	20 (48,8%)
+ anti-C	13 (31,7%)
+ anti-C + outros	5 (12,3%)
+ anti-E	1 (2,4%)
+ Jk ^a	1 (2,4%)
Anti-Kell	1 (2,4%)

n = número de casos

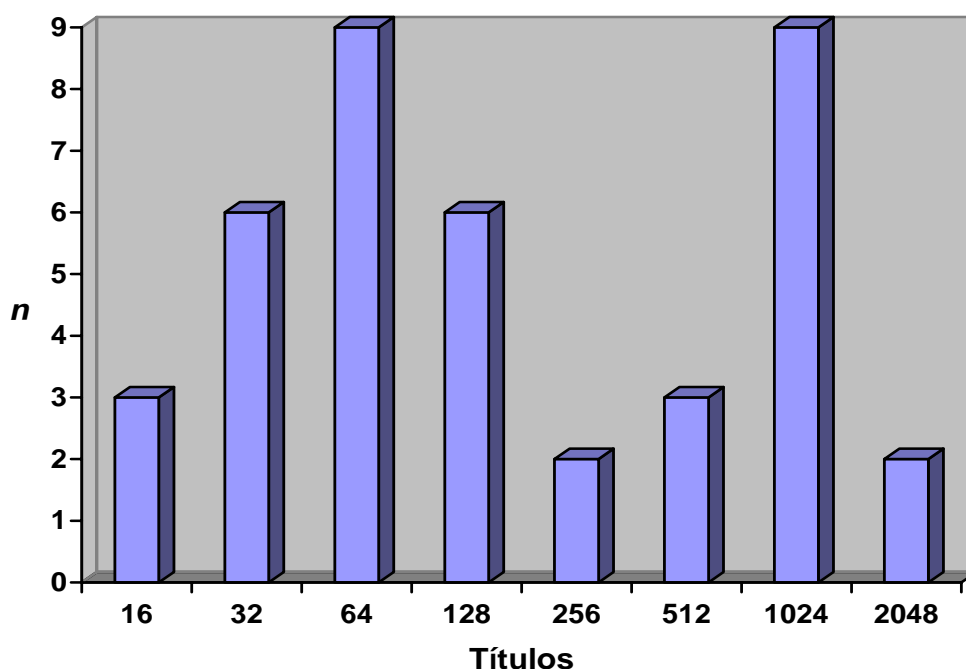


Gráfico 1 - Distribuição dos títulos de anticorpos antieritrocitários anti-D em 40 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010

Em relação à primeira transfusão intrauterina, em 26 (63%) gestantes a punção uterina foi realizada por via transplacentária. A tabela 3 resume os dados clínicos e laboratoriais referentes à primeira TIU.

Tabela 3 - Características da primeira transfusão intrauterina em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010

	Média
Idade gestacional (semanas)	26,1 (4,6)
Hb pré 1 (g/dl)	6,6 (2,5)
Hb DP pré 1(DP)	-6,0 (2,6)
V _{máx} ACM pré 1 (cm/s)	56,9 (14,3)
ACM MoM pré 1(MoM)	1,7 (0,4)
Hb bolsa (g/dl)	28,8 (2,8)
Volume infundido (ml)	44,4 (23,5)
Expansão volêmica (%)	51,3 (14,5)
Hb pós 1 (g/dl)	13,8 (2,5)
Hb DP pós 1(DP)	+1,7 (2,9)

Hb = concentração de hemoglobina; DP = múltiplos do desvio padrão ; V_{máx}= velocidade sistólica máxima; ACM = artéria cerebral média; MoM = múltiplos da mediana.
() - desvio padrão

Na tabela 4, estão descritos os dados clínicos e laboratoriais da segunda transfusão intrauterina.

Tabela 4 - Características da segunda transfusão intrauterina em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010

	Média
Idade gestacional (semanas)	28,3 (4,5)
V _{máx} ACM (cm/s)	63,1 (18,7)
ACM MoM pré 2 (MoM)	1,6 (0,4)
Hb pré 2 (g/dl)	8,1 (2,3)
Hb DP pré 2 (DP)	-4,7 (2,3)
Intervalo entre 1 ^a e 2 ^a TIU (dias)	15,7 (6,5)
Hemólise (g/dl/d)	-0,40 (0,25)

Hb = concentração de hemoglobina; DP = desvio padrão; V_{máx} = velocidade sistólica máxima; ACM = artéria cerebral média; MoM = múltiplos da mediana; TIU = transfusão intrauterina

() – desvio padrão

Houve correlação significativa negativa entre a hemoglobina fetal, expressa como múltiplo do desvio padrão e velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média, expressa em MoM, na primeira e na segunda transfusões intrauterinas.

Primeira transfusão intrauterina:

$$\text{ACM MoM} = -3,314 \times \text{DP Hb} - 0,4665 \quad (r = -0,45; p = 0,003)$$

e segunda transfusão intrauterina:

$$\text{ACM MoM} = -3,3867 \times \text{DP Hb} + 0,8314 \quad (r = -0,52; p = 0,0005) \quad (\text{gráfico 2}).$$

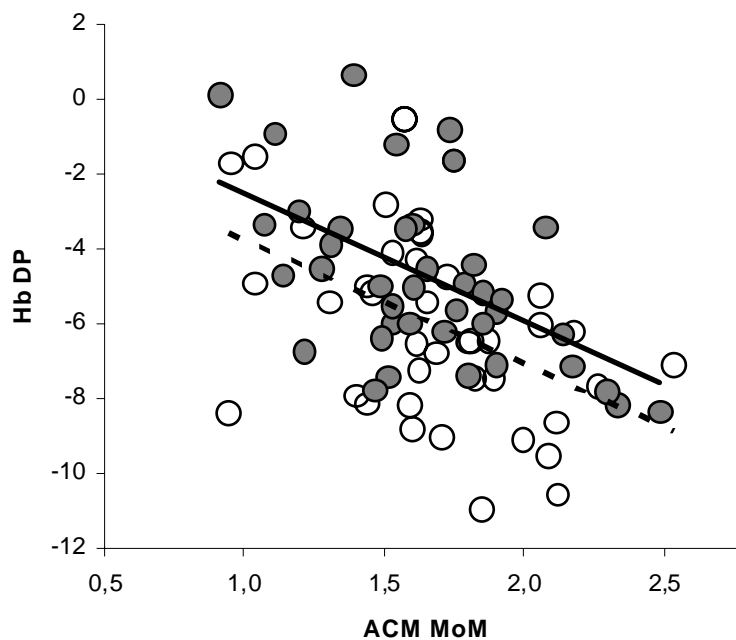


Gráfico 2 - Correlação entre concentração da hemoglobina fetal, expressa em múltiplos do desvio padrão, e velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média, expressa em múltiplos da mediana em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010

1ª TIU: círculos vazios e linha tracejada ($r = -0,45$); 2ª TIU: círculos cheios e linha contínua ($r = -0,52$)

A tabela 5 mostra a média de hemólise nos diferentes grupos, conforme o antecedente obstétrico em relação à aloimunização (grave, moderado, leve, nenhum ou não grave). A comparação desses diferentes grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,21$).

Tabela 5 - Médias da hemólise em distintos grupos conforme o antecedente obstétrico em relação à doença hemolítica perinatal em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010

Tipo de antecedente	n	Médias de hemólise (DP) (g/dl/d)
Grave	27	- 0,39 (0,22)
Moderado	4	- 0,38 (0,20)
Leve	3	- 0,77 (0,39)
Nenhum	7	- 0,29 (0,18)
Não grave	14	- 0,42 (0,29)

n= número de casos; DP = desvio padrão

A tabela 6 mostra a média de hemólise e o tipo de punção intrauterina (transplacentária ou não transplacentária). Não houve diferença estatisticamente significativa da média da hemólise nos dois grupos (Teste Mann-Whitney U, intervalo de confiança de 95% = - 0,055 a 0,199, K = 123, $p= 0,387$).

Tabela 6 - Médias da hemólise em distintos grupos conforme o tipo de punção uterina em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010

Tipo de punção uterina	n	Médias de hemólise (DP) (g/dl/d)
Transplacentária	26	- 0,417 (0,235)
Não transplacentária	15	- 0,379 (0,271)

n = número de casos; DP = desvio padrão

Análise por regressão linear demonstrou correlação significativa entre taxa de hemólise e:

- a concentração de hemoglobina pré 1^a TIU (hemólise = $0,031 \times \text{DP Hb pré1} - 0,216$, IC 95% = 0,022 a 0,576, $r = 0,327$, $p = 0,037$) (gráfico 3).
- intervalo em dias entre a primeira e a segunda transfusões intrauterinas (hemólise = $0,015 \times \text{Intervalo} - 0,649$, IC 95% = 0,120 a 0,639, $r = 0,413$, $p = 0,007$) (gráfico 4).
- a medida da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média pré 2^a TIU (hemólise = $-0,367 \times \text{Vmáx ACM pré 2} + 0,202$, IC 95% = -0,721 a -0,268, $r = -0,531$, $p < 0,001$) (gráfico 5)

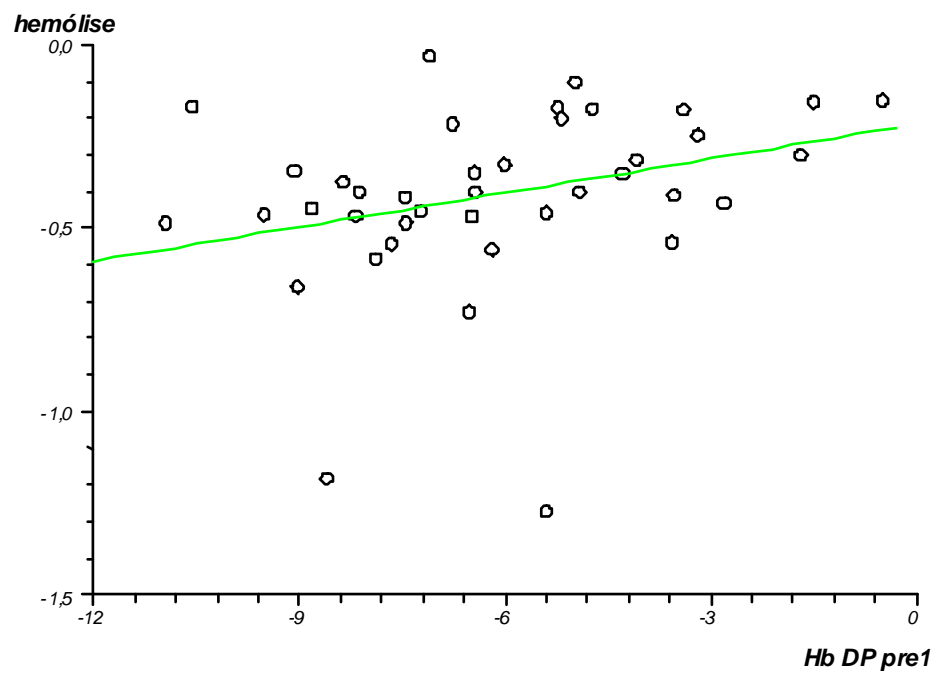


Gráfico 3 - Correlação entre taxa de hemólise, expressa em g/dl/d, e concentração de hemoglobina pré 1ª TIU, expressa em múltiplos do desvio padrão (Hb DP) em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010 ($r = 0,327$, $p = 0,037$)

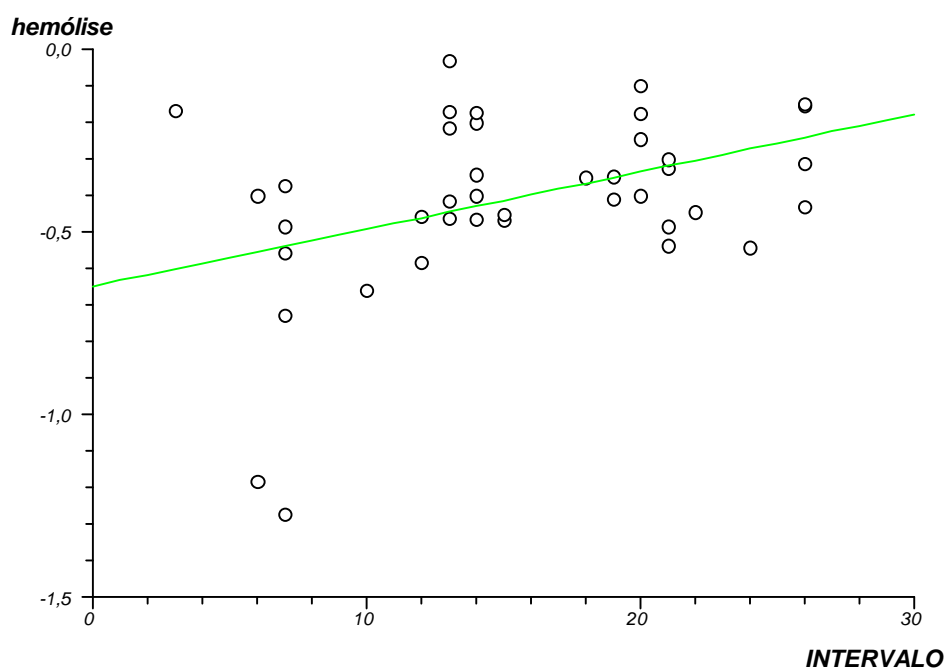


Gráfico 4 - Correlação entre taxa de hemólise, expressa em g/dl/d, e intervalo de tempo entre 1ª e a 2ª TIU, expresso em dias em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010 ($r = 0,413$, $p = 0,007$)

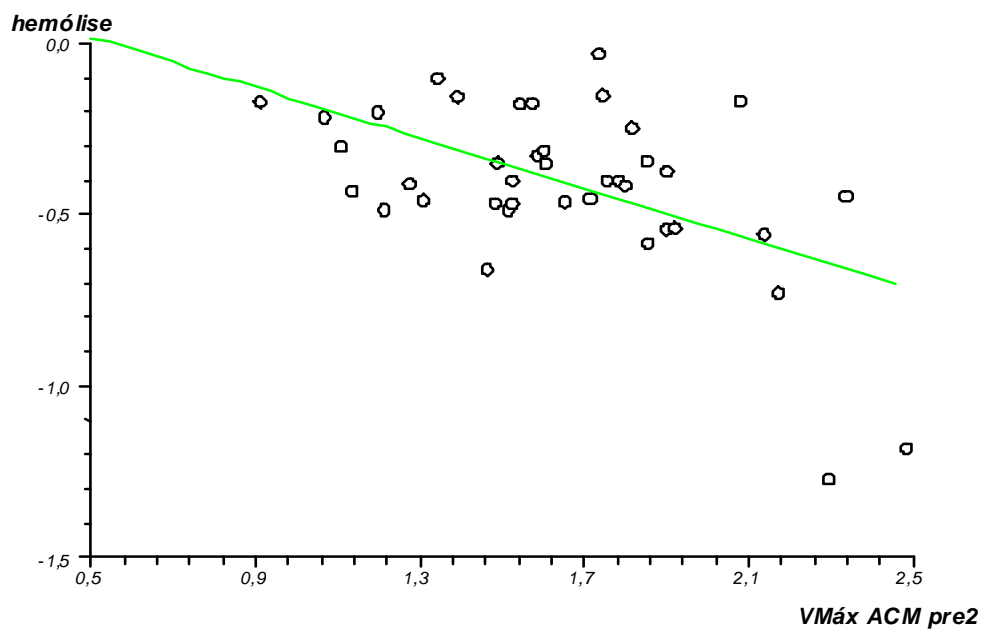


Gráfico 5 - Correlação entre taxa de hemólise, expressa em g/dl/d, e velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média pré 2ª TIU, expressa em múltiplos da mediana ($r = -0,531$, $p < 0,001$) em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro 2010

Não houve correlação significativa entre taxa de hemólise e as seguintes variáveis: idade materna, idade gestacional da 1ª TIU, concentração de hemoglobina pós 1ª TIU, volume de expansão, razão entre Hb endógena em relação à quantidade de hemoglobina pós, medida da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média pré 1ª TIU, idade gestacional da 2ª TIU e títulos dos anticorpos (tabela 7).

Tabela 7 – Análise de regressão linear simples na correlação entre hemólise e as variáveis abaixo em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010

Variável	A	B	r	IC 95%	p
Idade materna (anos)	- 0,214	- 0,006	- 0,122	- 0,414 a 0,193	0,45
IG 1ª TIU (semanas)	- 0,437	0,001	0,025	- 0,285 a 0,329	0,88
Hb DP pós 1 (DP)	- 0,409	0,004	0,043	- 0,268 a 0,346	0,79
Volume de expansão (%)	- 0,353	- 0,001	- 0,057	- 0,359 a 0,255	0,72
Hb endógena/ Hb total pós	- 0,590	0,006	0,291	- 0,018 a 0,550	0,06
ACM MoM 1(MoM)	- 0,359	- 0,026	- 0,038	- 0,341 a 0,273	0,81
IG 2ª TIU (semanas)	- 0,574	- 0,574	0,110	- 0,204 a 0,404	0,49
Títulos dos anticorpos (log AC)	- 0,240	- 0,079	- 0,196	- 0,493 a 0,141	0,25

A e B = constantes da regressão linear simples (equação: Hemólise = variável x B + A), r = Índice de correlação, IC = intervalo de confiança, p = probabilidade

IG = idade gestacional ; ACM MoM = múltiplos da mediana da V_{máx} ACM; DP = desvio padrão; Hb = concentração de hemoglobina; TIU = transfusão intrauterina; Hb endógena/ Hb total pós = razão entre concentração de hemoglobina endógena em relação à quantidade total de hemoglobina pós total; AC = anticorpo

A análise multivariada anterógrada demonstrou a correlação significativa entre taxa de hemólise e concentração de hemoglobina pós 1ª TIU, intervalo entre as duas TIU e Vmáx ACM pré 2ª TIU. A equação que melhor representa a taxa de hemólise foi: $\text{hemólise} = -0,31517 + 0,03463 \times \text{Intervalo} - 0,314038 \times \text{ACM MoM pré 2} - 0,068719 \times \text{Hb DP pós1}$ ($r^2 = 0,58$) (tabela 8).

Tabela 8 - Análise multivariada anterógrada na correlação entre hemólise e variáveis abaixo em 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010

Variável	r	p
Hb DP pós 1 (DP)	- 0,60	< 0,001
Intervalo (dias)	0,64	<0,001
ACM MoM pré 2 (MoM)	- 0,56	<0,001

r = Índice de correlação, p= probabilidade

Hb= concentração de hemoglobina, DP = desvio padrão; ACM MoM = múltiplos da mediana da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média

6 DISCUSSÃO

A doença aloimune é ainda causa relevante de morbidade e mortalidade fetais nos dias atuais, apesar da redução de sua incidência com a implementação de programas de profilaxia da doença com a imunoglobulina anti-D¹. Além disso, alguns fetos são acometidos pela doença hemolítica devido à sensibilização materna por outros antígenos não D. Em países ocidentais, a incidência da aloimunização varia de 10 a 35 por 10.000 nascidos vivos^{3,4}. Assim, o seguimento, o diagnóstico e o tratamento dos fetos anêmicos se tornam importantes.

O tratamento desses fetos anêmicos se faz pela transfusão intrauterina e, no seguimento desses casos, a indicação da próxima transfusão varia conforme o centro médico. Alguns utilizam como parâmetro a velocidade de hemólise de 0,3 a 0,4 g/dl por dia, enquanto outros se baseiam na predição de anemia pela medida da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média, descritas em estudos anteriores de Mari et al., Scheier et al. e Detti et al.^{15,21,23}. Contudo, a casuística desses estudos é pequena, inclusive não é possível definir o melhor nível de corte da medida da V_{máx} ACM que seja preditivo de anemia para fetos previamente transfundidos. Dessa forma, na atualidade, o seguimento desses fetos previamente transfundidos se baseia em experiência clínica de especialistas e em estudos que carecem de

casuística maior. Portanto, a melhor compreensão da hemólise para predição da anemia numa próxima transfusão intrauterina se torna importante.

Após a primeira transfusão intrauterina com a infusão de hemácias adultas preparadas pelo banco de sangue, o sangue resultante assim como a hemodinâmica fetal se modificam em relação ao sangue fetal pré transfusional. O sangue resultante é uma mistura de hemácias fetais remanescentes e adultas transfundidas, submetidas a vários fatores que são responsáveis pelo seu desaparecimento, como: a ação lesiva da própria hemoconcentração, a meia-vida da hemácia adulta e a destruição da hemácia fetal remanescente pelos anticorpos antieritrocitários. É ainda importante observar que essa dinâmica da circulação fetal é provavelmente diferente após cada transfusão intrauterina, pois, após a primeira, a quantidade de hemácias fetais é proporcionalmente maior do que a das adultas ¹⁵, diminuindo à medida que se seguem as transfusões. Por outro lado, ocorre a eritropoiese fetal que tenta repor e compensar a destruição das hemácias na circulação fetal. A eritropoiese, por sua vez, após três a quatro transfusões, pode ser inibida ¹⁰⁹. A predição da queda da concentração de hemoglobina após a 2ª TIU é mais fácil, uma vez que é mais dependente do desaparecimento das hemácias adultas doadas na circulação fetal do que das fetais. Macgregor et al.¹⁶ relatam que apenas 6% dos fetos tem mais de 10% de hemácias fetais na circulação. Por outro lado, a avaliação do período entre a primeira e a segunda transfusões intrauterinas é mais problemática, na prática clínica, devido à dificuldade de predição da hemólise das células fetais

remanescentes. Dessa forma, o intervalo entre a 1ª e a 2ª transfusões intrauterinas foi escolhido como alvo de interesse neste estudo.

Os fetos hidróticos não foram incluídos neste estudo. Após a primeira transfusão intrauterina, a quantidade de hemácias fetais remanescentes varia conforme a gravidade do acometimento fetal. Em fetos hidróticos, poucas hemácias fetais parecem sobreviver após a 1ª TIU ¹⁶. Dessa forma, fetos hidróticos e não hidróticos podem ter queda da concentração da hemoglobina determinada por fatores diferentes entre a primeira e segunda transfusões intrauterinas.

Um dos critérios de inclusão considerado foi a transfusão intrauterina pela técnica intravascular direta simples, ou seja, aqueles casos em que foram realizados exsanguíneo transfusão ou pela técnica intraperitoneal não foram incluídos. Na exsanguíneo transfusão devido à troca de volume de sangue, a quantidade de hemácia adulta transfundida e a fetal podem ser variáveis de caso para caso. Na intraperitoneal, por sua vez, ocorre absorção do sangue transfundido na cavidade abdominal que também não ocorre de forma regular, em todos os casos, o que interfere na avaliação da queda da concentração de hemoglobina na circulação fetal entre as transfusões intrauterinas.

Os resultados deste estudo demonstraram correlação entre a concentração de hemoglobina e $V_{m\acute{a}x}$ ACM antes da primeira e da segunda transfusões intrauterinas. No gráfico 2, é possível observar tendência de desvio das curvas para direita, o que demonstra que a transfusão de concentrado de hemácias adultas na TIU traz mudanças na circulação fetal.

Em fetos previamente transfundidos, se fosse utilizar um valor de corte para predição de anemia, este provavelmente deveria ser maior do que naqueles sem transfusão anterior.

Depois da transfusão intrauterina, as características físicas do sangue da circulação se modificam devido à presença de hemácias adultas, as quais, comparadas às fetais, têm tamanho e rigidez menores e maior capacidade de agregação^{24,25}. Além disso, as adultas ainda apresentam capacidade total diminuída de transporte de oxigênio²⁵. Dessa forma, o menor tamanho da hemácia doada faz aumentar a velocidade circulante, provocando o deslocamento da curva da V_{máx} ACM para a direita, tendo que se considerar valores maiores da V_{máx} ACM para se suspeitar de anemia fetal.

Na transfusão intrauterina, a punção transplacentária aumenta o risco de laceração de vasos fetoplacentários, de exsanguinação do feto e de hemorragia fetomaterna descrita em até 40% das transfusões intrauterinas, sendo mais comum com placenta anterior do que posterior^{106,107}. O aumento dos títulos dos anticorpos também pode ocorrer se a hemorragia fetomaterna ultrapassa 1,0 ml¹⁰⁷. A punção transplacentária pode interferir na piora da hemólise na medida em que piora a sensibilização materna com aumento dos títulos dos anticorpos. Contudo, não se verificou, neste estudo, diferença estatisticamente significativa da média da hemólise quanto ao tipo de punção uterina transplacentária ou não, concordando com a avaliação dos títulos dos anticorpos que também não se correlacionaram com a taxa

de hemólise. Se existe aumento dos títulos dos anticorpos, possivelmente, isso ainda não se reflete até o momento da 2ª TIU.

A hemólise que ocorre na circulação fetal, após uma transfusão intrauterina, como se observa, é um processo complexo que depende de vários outros fatores como agressividade dos anticorpos antieritrocitários, da qualidade das células adultas doadas, assim como da meia-vida das hemácias adultas na circulação fetal. Quanto à qualidade das hemácias adultas transfundidas dependerá da bolsa de sangue ser fresca, com menos de cinco dias e do seu preparo pelo banco de sangue, ou seja, procedimentos realizados como a irradiação e a filtração que podem promover a lesão da membrana da hemácia e assim favorecer a hemólise. A meia-vida da hemácia adulta na circulação fetal na literatura é controversa, variando de 30 a 60 dias^{18,133}. Dessa forma, a meia-vida dessas hemácias doadas é um parâmetro que participa do desaparecimento dessas hemácias adultas na circulação fetal, o que não está totalmente elucidado.

O presente estudo mostrou que a taxa de hemólise está significativamente correlacionada com a concentração de hemoglobina pós 1ª TIU, o intervalo de tempos entre as duas transfusões e a $V_{m\acute{a}x}$ ACM antes da 2ª TIU.

A correlação inversa entre a taxa de hemólise e a concentração de hemoglobina pós 1ª TIU pode refletir a gravidade da doença. Em casos de anemia grave, a quantidade de sangue que pode ser transfundida está limitada à tolerância à sobrecarga de volume pelo feto e, dessa forma, a concentração de hemoglobina após a TIU pode ainda estar abaixo do nível

esperado. Dessa forma, níveis de concentração de hemoglobina mais baixos no final da transfusão podem refletir casos mais graves com maiores taxas de hemólise.

A correlação positiva entre hemólise e o intervalo de tempo entre as transfusões sugere que, após a primeira TIU, a taxa de hemólise não ocorre de forma fixa na circulação fetal. De fato, o desaparecimento das hemácias adultas na circulação fetal não ocorre de forma linear, provavelmente devido aos efeitos lesivos à membrana celular da irradiação utilizada no preparo da bolsa de sangue, dos efeitos mecânicos da hemoconcentração e ainda das alterações bioquímicas do novo ambiente (circulação fetal) à hemácia adulta^{17,27,88-93}. Além disso, a hemorragia fetomaterna que pode ocorrer durante o procedimento pode aumentar os títulos dos anticorpos maternos, que pode, ao longo do período entre as transfusões, por sua vez, aumentar ainda mais a hemólise¹⁰⁷.

A correlação inversa da hemólise com a $V_{m\acute{a}x}$ ACM antes da 2ª TIU demonstra que maior taxa de hemólise reflete casos mais graves nos quais a infusão de volume seja limitada pela sobrecarga volêmica máxima do feto. Isso determina subcorreção da anemia e portanto, podem ser observados valores mais baixos de concentração de hemoglobina pós 1ª TIU e pré 2ª TIU. Assim, casos mais graves com hemólise maior e concentrações de hemoglobina menores do que o esperado, após a TIU, apresentam consequentemente, $V_{m\acute{a}x}$ ACM menor.

A expansão de volume durante a transfusão intrauterina não se correlacionou significativamente com a taxa de hemólise, apesar do volume

de sangue adulto transfundido poder interferir na dinâmica da circulação fetal. Quanto maior a quantidade de hemácias adultas transfundidas, menor será a proporção entre as células fetais e as adultas, sugerindo que a hemólise dependeria mais do desaparecimento das primeiras, o que não foi observado neste estudo. Isso pode ser explicado pelo fato da expansão de volume da TIU, em nosso centro, ser fixado ao redor de 50%, interferindo na análise do volume transfundido.

A razão entre quantidade de hemoglobina endógena e a quantidade total de hemoglobina pós TIU também não se correlacionou com a taxa de hemólise, constatação atribuída ao controle de expansão de volume que interfere na quantidade de hemoglobina exógena infundida.

Os títulos dos anticorpos também não se correlacionaram com a taxa de hemólise. O efeito dos anticorpos na hemólise não depende somente do seu título, mas também da sua agressividade e ligação com o antígeno da superfície da hemácia fetal. A gravidade da anemia hemolítica fetal é variável mesmo em fetos com títulos dos anticorpos semelhantes¹⁶. O número reduzido desta casuística pode também ter interferido na análise da hemólise em relação aos anticorpos antieritrocitários.

A medida da $V_{m\acute{a}x}$ ACM antes da primeira TIU não se correlacionou com a taxa de hemólise, pois essa medida reflete o estado hiperdinâmico da circulação fetal antes da transfusão, período na qual estão presentes apenas as hemácias fetais. Portanto, provavelmente outros fatores, além do estado hiperdinâmico antes da 1ª TIU, devem ser mais importantes na

determinação da hemólise fetal. Além disso, deve ocorrer correção rápida do estado hiperdinâmico após a 1ª TIU.

O antecedente obstétrico relacionado à aloimunização é um dos parâmetros utilizados no manuseio clínico das gestantes aloimunizadas, devido à tendência de piora progressiva da história em gestações subsequentes. Contudo, neste estudo, não se observou diferença estatisticamente significativa entre a taxa de hemólise dos diferentes grupos de antecedente obstétrico relacionado à aloimunização (grave, moderado, leve, nenhum e não grave). Isso pode ser devido à gravidade dos casos estudados com necessidade de transfusão intrauterina. Tal ocorrência faz supor que o antecedente obstétrico seja importante para distinguir aquele que necessitará de TIU e não para o seguimento dos casos.

No seguimento das gestantes aloimunizadas com fetos tratados com transfusão intrauterina para reduzir o número de procedimentos e também as complicações associadas, a individualização dos casos é importante. Portanto, recomenda-se não usar somente valores fixos de hemólise ou medida isolada da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média como parâmetro preditor de hemólise entre as transfusões intrauterinas. A predição da queda da hemoglobina, após transfusões intrauterinas, é alvo de erros sistemáticos, assim como de variações entre os diferentes fetos. Este estudo demonstrou a importância de se avaliar outros parâmetros que possam interferir na queda da concentração de hemoglobina entre as transfusões intrauterinas, tentando detalhar mais variáveis no processo

hemolítico. Dessa forma, novos trabalhos para avaliar melhor a predição de hemólise são necessários para o futuro.

Os processos que ocorrem após a transfusão intrauterina na circulação e sangue fetais merecem mais estudos para postergar as transfusões intrauterinas e assim reduzir o número de procedimentos e suas complicações. Como a aloimunização é um evento com incidência baixa em países ocidentais, de aproximadamente 1:1000 nascidos vivos ¹, principalmente após a introdução da profilaxia com a imunoglobulina anti-D, a realização de estudos prospectivos com grande número de casos necessita ser multicêntrico.

A equação obtida neste estudo explica 58% da hemólise. Dessa forma, a hemólise é um processo que deve depender de outros fatores. A subclasse do anticorpo anti-D IgG interfere na gravidade da doença hemolítica perinatal. Pollock e Bowman ¹³⁴ relatam que a presença de IgG1 associado a IgG3 está mais associado aos casos graves do que somente IgG1. Além disso, como altos níveis de anticorpos estão presentes em casos leves e níveis baixos em graves, Hadley et al. ¹³⁵ sugerem que não somente os títulos dos anticorpos determinam a gravidade da doença hemolítica perinatal. Esses fatores incluem a subclasse e a glicosilação dos anticorpos maternos, a estrutura, a densidade, a distribuição tecidual dos antígenos eritrocitários, a eficiência do transporte de IgG para o feto, a maturidade funcional do baço fetal, polimorfismos que afetam a função do receptor Fc e a presença de anticorpos inibidores relacionados ao HLA. Portanto, estudos

que avaliem melhor os vários aspectos em relação aos anticorpos antieritrocitários poderiam ser realizados.

A avaliação da quantidade de hemácias fetais por meio do teste de Kleihauer na circulação fetal, após a transfusão intrauterina poderia ajudar na predição da hemólise. Quando há diminuição da quantidade de hemácias fetais, o ritmo de hemólise se torna dependente da taxa de desaparecimento das hemácias doadas. Desse modo, conforme a taxa de hemólise é ditada pela destruição das células fetais ou adultas, a queda da concentração da hemoglobina é diferente. Neste estudo, não foi possível fazer essa avaliação, uma vez que não era rotina a solicitação do teste de Kleihauer após as transfusões.

Neste estudo foi avaliada somente a taxa de hemólise entre a primeira e a segunda transfusões intrauterinas. A análise dos períodos subsequentes, entre a 2ª e a 3ª e entre a 3ª e 4ª transfusões intrauterinas, poderia fornecer dados que sugerissem tendências evolutivas de determinadas variáveis que na avaliação de um único intervalo, não é possível. Talvez dessa avaliação, seria possível encontrar fatores que possam predizer a hemólise após as transfusões uterinas.

A predição da hemólise em fetos previamente transfundidos, após aproximadamente 48 anos, desde a primeira transfusão intrauterina por Liley, ainda não está devidamente esclarecida, mostrando que a queda da hemoglobina no feto é dependente de vários fatores e complexo, necessitando da devida atenção dos centros de referência das gestantes aloimunizadas.

Portanto, este estudo demonstrou que a taxa de hemólise fetal entre a primeira e a segunda transfusões intrauterinas, em gestantes aloimunizadas pode ser predita pela combinação dos fatores concentração da hemoglobina após a primeira TIU, intervalo de tempo entre as transfusões e medida da $V_{\text{máx}}$ ACM antes da segunda TIU. Ao auxiliar na predição de hemólise e refinar o seguimento fetal pós-transfusional, a avaliação desses parâmetros pode reduzir o número de procedimentos invasivos e complicações ao evitar transfusões desnecessárias e ,consequentemente, melhorar a sobrevivência dos fetos de gestantes aloimunizadas graves.

7 CONCLUSÕES

A avaliação dos fatores clínicos, laboratoriais, dopplervelocimétricos e hematimétricos preditivos de hemólise fetal, entre a primeira e a segunda transfusões intrauterinas em gestantes aloimunizadas, permitiu concluir que a taxa de hemólise fetal observada apresenta correlação significativa positiva com o intervalo de tempo entre as transfusões e negativa, com a concentração de hemoglobina pós 1ª TIU e a $V_{máx}$ ACM pré 2ª TIU.

8 ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da FMUSP



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 30/01/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1166/07**, intitulado: "**ESTUDO DOS PARÂMETROS ANTENATAIS, DE PARTO E PÓS-NATAIS DE GESTANTES ALOIMUNIZADAS**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **MARIA DE LOURDES BRIZOT**

Pesquisador (a) Executante: **ESTELA NAOMI NISHIE**

CAPPesq, 08 de Fevereiro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão de
Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo B – Aprovação do Comitê de Ética – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da FMUSP



Ref.: Carta datada de 07/10/10

Ao
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10.11.10 tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **1166/07** intitulado: "**ESTUDO DOS PARÂMETROS ANTENATAIS, DE PARTO E PÓS-NATAIS DE GESTANTES ALOIMUNIZADAS**", será **tese de doutorado** da aluna **ESTEÇA NAOMI NISHIE**, tendo como orientador **PROFº DR. ADOLFO WENJAW LIAO**, bem como tomou ciência do relatório parcial do estudo.

Pesquisador(a) Responsável: **Dra. Maria de Lourdes Brizot**

CAPPesq, 10 de novembro de 2010.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo C - Idade materna, antecedente obstétrico, antecedente de aloimunização, tipo e título dos anticorpos, idade gestacional da 1ª TIU, Vmáx ACM pré1, concentração de hemoglobina antes e depois da 1ª TIU, volume transfundido, idade gestacional da 2ª TIU, Vmáx ACM pré2, concentração de hemoglobina antes e depois da 2ª TIU e dados do parto e recém nascido das 41 gestantes aloimunizadas – HCFMUSP – janeiro de 1999 a setembro de 2010

Paciente N°	Idade Materna (anos)	Antecedente Obstétrico	Antecedente de Aloimunização	Tipo e título Dos anticorpos	IG 1ªTIU (sem.)	Vmáx ACM pré1 (cm/s)	Concentração de hemoglobina (g/dl)		VT (ml)	IG 2ªTIU (sem.)	Vmáx ACM pré2 (cm/s)	Concentração de hemoglobina (g/dl)		Dados do parto e do recém-nascido		
							1ª TIU					2ª TIU		IG	resultado	Peso
							antes	depois				Antes	depois			
1	40	7G6P0A	Grave	D=256, C<1	32,1	42	5,3	10,6	80	33,1	89	8,0	12,4	34,7	natimorto	2754
2	23	4G3P0A	Leve	D=1024	20,7	55,7	3,3	10,8	18	21,6	68	3,7	11,1	23,7	natimorto	650
3	28	3G1P1A	Nenhum	D=64	22,3	60	5,7	9	24	22,7	60	8,5	14,3	35,1	vivo	2630
4	34	4G3P0A	Grave	D=64	29,1	70	6,6	14,4	40	31,3	65,5	7,4	12,9	34,7	vivo	2000
5	28	3G2P0A	Grave	D=1024, Jk ³ <1	17,7	47	6,0	13,5	12	19,6	22,7	11,3	13,8	34,6	vivo	2310
6	29	2G1P0A	Nenhum	D=64, C=1	31	61	8,3	12,2	90	33,9	65	10,2	15,2	36,4	vivo	2810
7	35	5G4P0A	Grave	D=64	26,7	36	7,7	13,6	54	28,7	68	8,0	14,7	36	vivo	2710
8	23	2G1P0A	Nenhum	D=512, C=1, E=1, S=2	29	98	6,0	12,6	54	30,9	73	12,2	19,2	30,8	vivo	1390
9	27	5G4P0A	Grave	D=64	30,9	71	6,6	12,9	50	32,7	49	10,1	17	32,7	vivo	2190
10	36	4G2P1A	Grave	D=32, C<1	26,9	73	3,4	14,4	60	28,7	63	8,4	14,5	36,4	vivo	2660
11	31	5G3P1A	Grave	D=128	18,6	49	5,4	12,7	13	21,6	43,4	5,9	13,6	34,7	vivo	2340
12	41	7G3P3A	Grave	D=1024	27,3	58	9,4	13,6	45	30,1	74	8,7	15,8	33,8	natimorto	2290
13	29	2G1P0A	Nenhum	D=64	29,7	64	4,5	1105,4	81	32,9	108	5,6	10,9	32,8	Neomorto precoce	2490
14	33	3G2P0A	Grave	D=512, C=16, V=8	28,6	53	5,2	15	80	30,3	76	8,0	14,9	35,1	Vivo	2259
15	44	8G7P0A	Grave	D=2048, C<1,	23,6	60	3,3	11,3	40	25,6	61	6,5	13,1	27,6	Vivo	1090
16	30	3G 2P0A	Grave	D=512	31	70	7,9	15,1	80	32,7	60	9,6	17,2	35,3	Vivo	2250
17	24	3G2P0A	Grave	D=32	24	29	10,3	17,8	36	27	39	11,5	13,5	32,8	Vivo	2170
18	35	6G3P2A	Grave	D=128	24	37	8,7	14,7	22	26,9	54	11,2	17,3	36,6	Vivo	3070
19	34	4G1P2A	Nenhum	K=1024	30,7	79	5,9	11,7	80	32,6	82	6,3	15	37,6	Vivo	3150
20	31	4G3P0A	Grave	D=128, C=8, autocrioaglutinina positivo	22,9	30	10,3	16,9	30	26,6	48	12,9	16,9	37,3	Vivo	2720
21	36	3G1P1A	Moderado	D=1024	25	49	8,2	17,6	54	28,7	61	9,5	17,6	36,8	Neomorto precoce	3150
22	33	4G3P0A	Grave	D=1024	23,1	48	8,4	18,5	38	26,1	65	7,2	18,5	37,3	Vivo	2999
23	31	6G5P0A	Grave	D=1024	29,4	68	8,3	12,2	15	31,4	68	9,8	17,4	36	Vivo	2580
24	29	5G4P0A	Grave	D=128	20,9	60	4,2	18,3	30	24,3	59	5,3	16,4	36,4	Vivo	3090
25	38	5G4P0A	Grave	D=32	20,4	39	8,7	18,7	20	24,1	35	7,5	17,9	37,1	Vivo	2640
26	36	7G6P0A	Grave	D=32, C<1	29	60,6	12,2	15,6	65	32,7	80,1	11,7	15,2	36,7	Vivo	3010
27	42	5G4P0A	Grave	D=64	29,7	52	7,7	14,5	54	30,7	96	5,6	14,8	36	Vivo	2200
28	31	4G3P0A	Grave	D=64, C<1	18,9	44	4,1	14,8	15	21,9	42	4,6	13,7	36,1	Vivo	2650
29	39	6G5P0A	Grave	D=256, E<1	25,7	60	6,1	13,2	38	28,4	56	6,6	10,8	28,4	Vivo	1430
30	33	6G5P0A	Grave	D=128, C<1	31,7	71	6,3	14,4	72	33,9	83	7,6	14,3	35,6	Vivo	3010
31	38	5G3P1A	Moderado	D=32	30	65,3	8,8	14,8	54	32,6	73,2	8,5	15,8	35,1	Vivo	3060
32	34	2G1P0A	Nenhum	D=16, C<1	24,6	50	4,3	14,1	36	26,6	51,2	7,6	16,2	37	Vivo	2900
33	31	2G1P0A	Grave	D=2048, C=16, Dia<1	17,1	48,6	5,0	9	4	18,1	49,9	5,1	10,4	33,6	Vivo	2065
34	30	3G1P1A	Leve	D=128, C<1	27,6	67,7	6,4	15,7	48	30,4	63	7,7	15,4	36	Vivo	2850
35	29	4G2P1A	Nenhum	D=16	30,7	60	5,3	10,2	64	31,6	76,4	7,8	12,2	33,4	Neomorto precoce	3690
36	37	3G1P1A	Leve	D=64, C<1	32	71,7	7,0	11,7	60	33	101	6,6	10,5	34	Neomorto precoce	2200
37	36	8G6P1A	Grave	D=32, C=1	29	60,6	12,2	15,6	25	32,7	80,1	11,7	15,2	36,7	Vivo	3010
38	23	3G2P0A	Moderado	D=16	26,4	50	7,4	12,6	35	28,4	45	9,8	13,8	33,4	Neomorto precoce	2090
39	36	8G6P1A	Grave	D=1024, C<1	15,9	33,7	7,3	14,6	9	18,6	30,4	6,8	15,2	29,6	Vivo	2400
40	26	3G1P1A	Moderado	D=1024, C=32	31	72,2	4,5	12,5	70	32,4	65	5,9	13,9	35,1	Vivo	2140
41	35	6G3P2A	Grave	D=1024, C<1, E<1	24,6	57,6	5,7	9,2	27	25,6	39,6	5,8	16,2	32,4	Vivo	1720

N° = número, IG = idade gestacional, Vmáx ACM pré1 = velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média antes da 1ª transfusão intrauterina, TIU = transfusão intrauterina, Vmáx ACM pré 2 = velocidade sistólica máxima antes da 2ª transfusão intrauterina, VT = volume transfundido, sem. = semanas

9 REFERÊNCIAS

1. Chavez GF, Mulinare J, Edmonds LD. Epidemiology of Rh hemolytic disease of the newborn in the United States. *JAMA*. 1991; 265(24):3270-4.
2. Moise KJ. Non-anti-D antibodies in red cell alloimmunization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000; 92:75-81.
3. Public Health Service. Centers for disease control and prevention congenital malformation surveillance. *Teratology*. 1993;48:545-709.
4. Oepkes D. Invasive versus non-invasive testing in red-cell alloimmunized pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000; 92:83-9.
5. Fretts RC, Boyd ME, Usher RH, Usher HA. The changing pattern of fetal death, 1961 - 1988. *Obstet Gynecol*. 1992;79:35-9.
6. Duarte G, Cunha SP, Mauad Filho F, Berezowsky AT, Baruffi I. Aspectos conceituais e etiopatogênicos (análise de 437 casos). *Rev Bras Ginecol Obstet*. 1985;7:115-8.
7. Green GH. Historic perspective on Liley's fetal transfusion. *Vox Sang*. 1985;48:184-7.
8. Green GH. William Liley and fetal transfusion: a perspective in fetal medicine. *Fetal Ther*. 1986;1:18-22.

9. Liley AW. Intrauterine transfusion of foetus in haemolytic disease. *BMJ*. 1963;2:1107-9.
10. Liley AW. The development of the idea of fetal transfusion. *Am J Obstet Gynecol*. 1971;111:303-4.
11. Rodeck CH, Kemp JR, Holman CA, Whitmore DN, Karnicki J, Auston MA. Direct intravascular fetal blood transfusion by fetoscopy in severe rhesus isoimmunisation. *Lancet*. 1981;i:625-7.
12. Bang J, Bock JE, Trolle D. Ultrasound-guided fetal intravenous transfusion for severe rhesus haemolytic disease. *BMJ*. 1982;284:373-4.
13. Van Kamp IL, Klumper FJ, Oepkes D, Meerman RH, Scherjon SA, Vandebussche FP, Kanhai HH. Complications of intrauterine intravascular transfusion for fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192:171-7.
14. Nicolaides KH, Soothil PW, Rodeck CH, Clewell W. Rh disease: Intravascular fetal blood transfusion by cordocentesis. *Fetal Ther* 1986;1:185-192.
15. Mari G, Zimmermann R, Moise KJ, Deter RL. Correlation between middle cerebral artery peak systolic velocity and fetal hemoglobin after 2 previous intrauterine transfusions. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193:117-20.
16. Macgregor SN, Socol ML, Pielet BW, Sholl JS, Silver RK. Prediction of hematocrit decline after intravascular fetal transfusion. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161:1491-3.

17. Jones HM, Linch DC, Nicolaides KH, Rodeck CH. Survival of transfused adult cells in the fetus. *Fetal Ther.* 1986;1:193-5.
18. Pattison N, Roberts A. The management of severe erythroblastosis fetalis by fetal transfusion: survival of transfused adult erythrocytes in the fetus. *Obstet Gynecol.* 1989;74:901-4.
19. Mari G, Adrignolo A, Abuhamad AZ, Pirhonen J, Jones DC, Ludomirsky A, Copel JA. Diagnosis of fetal anemia with Doppler ultrasound in the pregnancy complicated by maternal blood group immunization. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1995;5(6):400-5.
20. Mari G. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *N Engl J Med.* 2000;342:9-14.
21. Scheier M, Hernandez-Andrade E, Fonseca EB, Nicolaides KH. Prediction of severe fetal anemia in red blood cell alloimmunization after previous intrauterine transfusions. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195:1550-6.
22. Deren O, Onderoglu L. The value of middle cerebral artery systolic velocity for initial and subsequent management in fetal anemia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002;101(1):26-30.
23. Detti L, Oz U, Guney I, Ferguson JE, Bahado-Singh RO, Mari G. Doppler ultrasound velocimetry for timing the second intrauterine transfusion in fetuses with anemia from red cell alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185:1048 -51.
24. Welch R, Rampling MW, Anwar A, Talbert DG, Rodeck CH. Changes in hemorrheology with fetal intravascular transfusion. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170:726-32.

25. El Bouhmadi A, Boulot P, Laffargue F, Brun JF. Rheological properties of fetal red cells with special reference to aggregability and disaggregability analyzed by light transmission and laser backscattering techniques. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2000;22:79-90.
26. Deren O, Onderoglu L. The value of middle cerebral artery systolic velocity for initial and subsequent management in fetal anemia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002;101:26-30.
27. Egberts J, Van Kamp IL, Kanhai HHH, Meerman RH, Giordano PC, Gravenhorst JB. The disappearance of fetal and donor red blood cells in alloimmunised pregnancies: a reappraisal. *BJOG.* 1997;104:818-24.
28. Halitsky V, Krumholz BA, Schwalb E, Gromisch DS. The current role of intrauterine fetal transfusion in the management of erythroblastosis fetalis: a review of indications and methods. *Obstet Gynecol Surv.* 1968;23(4):301-30.
29. Queenan JT. Fetal transfusion. *Fetal Ther.* 1986;1(1):59-64.
30. Frigoletto FD Jr., Umansky I, Birnholz J, Acker D, Easterday CL, Harris GB, Griscom NT. Intrauterine fetal transfusion in 365 fetuses during fifteen years. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;139(7):781-90.
31. Cooperberg PL, Carpenter CW. Ultrasound as an aid in intrauterine transfusion. *Am J Obstet Gynecol.* 1977;128(3):239-41.
32. Frigoletto FD, Birnholz JC, Rothchild SB, Finberg HJ, Umansky I. Intrauterine transfusion with the use of phased array ultrasonography: a new technique. *Am J Obstet Gynecol.* 1978;131(3):273-5.

33. Platt LD, Keegan KA, Druzin ML, Gauthier RJ, Evertson LR, Manning FA. Intrauterine transfusion utilizing linear-array, real-time B scan: a preliminary report. *Am J Obstet Gynecol.* 1979;135(8):1115-6.
34. Berkowitz RL, Chitkara U, Goldberg JD, Wilkins I, Chervenak FA, Lynch L. Intrauterine intravascular transfusions for severe red blood cell isoimmunization: ultrasound-guided percutaneous approach. *Am J Obstet Gynecol.* 1986;155(3):574-81.
35. Berkowitz RL, Chitkara U, Wilkins I, Chervenak FA, Lynch L, Mehalek KE. Technical aspects of intravascular transfusions: Lessons learned from thirty-three procedures. *Am J Obstet Gynecol.* 1987;157:4-9.
36. Christmas JT, Little BB, Johnston WL, Santos-Ramos R, Theriot SK, Brown CEL. Nomograms for rapid estimation of intravascular intrauterine exchange transfusion. *Obstet Gynecol.* 1990;75:887-91.
37. Grannum PA, Copel JA, Plaxe SC, Scioscia AL, Hobbins JC. In utero exchange transfusion by direct intravascular injection in severe erythroblastosis fetalis. *N Engl J Med.* 1986;314:1431-4.
38. Lewis M, Bowman JM, Pollock J, Lowen B. Absorption of red cells from the peritoneal cavity of an hydropic twin. *Transfusion.* 1973;13(1):37 -40.
39. Creasman WT, Duggan ER, Lund CJ. Absorption of transfused chromium-labeled erythrocytes from the fetal peritoneal cavity in hydrops fetalis. *Am J Obstet Gynecol.* 1966;94(4):586-8.
40. Taylor WW, Scott DE, Pritchard JA. Fate of compatible adult erythrocytes in the fetal peritoneal cavity. *Obstet Gynecol.* 1966;28(2):175-81.

41. Harman CR, Bowman JM, Manning FA, Menticoglou SM. Intrauterine transfusion - Intraperitoneal versus intravascular approach: A case-control comparison. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;162:1053-9.
42. Moise KJ, Carpenter RJ, Kirshon B, Deter RL, Sala JD, Cano LE. Comparison of four types of intrauterine transfusion: Effect on fetal hematocrit. *Fetal Ther.* 1989;4:126-37.
43. Nicolini U, Kochenour NK, Greco P, Letsky E, Rodeck CH. When to perform the next intra-uterine transfusion in patients with Rh alloimmunization: combined intravascular and intraperitoneal transfusion allows longer intervals. *Fetal Ther.* 1989;4(1):14-20.
44. Santolaya J, Warsof SL. Combined intravascular-intraperitoneal transfusions in hydropic twins due to Rh (D) alloimmunization. *Fetal Diagn Ther.* 1990;5(2):70 -5.
45. de Crespigny LC, Robinson HP, Quinn M, Doyle L, Ross A, Cauchi M. Ultrasound-guided fetal blood transfusion for severe rhesus isoimmunization. *Obstet Gynecol.* 1985;66(4):529-32.
46. Nicolini U, Nicolaidis P, Fisk NM, Tannirandorn Y, Rodeck CH. Fetal blood sampling from the intrahepatic vein: analysis of safety and clinical experience with 214 procedures. *Obstet Gynecol.* 1990;76(1): 47-53.
47. Nicolini U, Santolaya J, Ojo OE, Fisk NM, Hubinont C, Tonge M, Rodeck CH. The fetal intrahepatic umbilical vein as an alternative to cord needling for prenatal diagnosis and therapy. *Prenat Diagn.* 1988; 8(9):665-71.

48. Harman CR. (ed.) Invasive techniques in the management of alloimmune anemia. Invasive fetal testing and treatment. Boston: Blackwell Scientific Publications; 1995. p.107-91.
49. Benacerraf BR, Bars VA, Saltzman DH, Greene MF, Penso CA, Frigoletto FD. Acute fetal distress associated with percutaneous umbilical blood sampling. *Am J Obstet Gynecol.* 1987;156(5):1218-20.
50. Westgren M, Selbing A, Stangenberg M. Fetal intracardiac transfusions in patients with severe rhesus isoimmunisation. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1988;296(6626):885-6.
51. Galligan BR, Cairns R, Schifano JV, Selbing A, Bernvil SS. Preparation of packed red cells suitable for intravascular transfusion in utero. *Transfusion.* 1989;29(2):179-81.
52. Thorp JA, Plapp FV, Cohen GR, Yeast JD, O'Kell RT, Stephenson S. Hyperkalemia after irradiation of packed red blood cells: possible effects with intravascular fetal transfusion. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;163(2):607-9.
53. Guidelines on gamma irradiation of blood components for the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. BCSH Blood Transfusion Task Force. *Transfus Med.* 1996; 6(3):261-71.
54. Vengelen-Tyler V. Technical Manual of The American Association of Blood Banks. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks; 1999.
55. Viëtor HE, Kanhai HH, Brand A. Induction of additional red cell alloantibodies after intrauterine transfusions. *Transfusion.* 1994;34(11):970-4.

56. Schonewille H, Klumper FJ, van de Watering LM, Kanhai HH, Brand A. High additional maternal red cell alloimmunization after Rhesus and K-matched intrauterine intravascular transfusions for hemolytic disease of the fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(2):143.e1-6.
57. Watson WJ, Wax JR, Miller RC, Brost BC. Prevalence of new maternal alloantibodies after intrauterine transfusion for severe Rhesus disease. *Am J Perinatol.* 2006;23:189-92.
58. Nicolaides KH, Thilaganathan B, Mibashan RS. Cordocentesis in the investigation of fetal erythropoiesis. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161(5):1197-200.
59. Leduc L, Moise KJ, Carpenter RJ, Cano LE. Fetoplacental blood volume estimation in pregnancies with Rh alloimmunization. *Fetal Diagn Ther.* 1990;5(3-4):138-46.
60. Weiner CP, Pelzer GD, Heilskov J, Wenstrom KD, Williamson RA. The effect of intravascular transfusion on umbilical venous pressure in anemic fetuses with and without hydrops. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161(6 Pt 1):1498-501.
61. Hallak M, Moise KJ, Hesketh DE, Cano LE, Carpenter RJ. Intravascular transfusion of fetuses with rhesus incompatibility: prediction of fetal outcome by changes in umbilical venous pressure. *Obstet Gynecol.* 1992;80(2):286 -90.
62. Radunovic N, Lockwood CJ, Alvarez M, Plecas D, Chitkara U, Berkowitz RL. The severely anemic and hydropic isoimmune fetus: changes in fetal hematocrit associated with intrauterine death. *Obstet Gynecol.* 1992;79(3):390-3.

63. Selbing A, Stangenberg M, Westgren M, Rahman F. Intrauterine intravascular transfusions in fetal erythroblastosis: the influence of net transfusion volume on fetal survival. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1993;72(1):20-3.
64. Liggins GC. Fetal transfusion by the impaling technic. *Obstet Gynecol.* 1966;27(5):617-21.
65. Moise KJ Jr., Carpenter RJ Jr, Deter R L, Kirshon B, Diaz S F. The use of fetal neuromuscular blockade during intrauterine procedures. *Am J Obstet Gynecol.* 1987;157(4 Pt 1):874-9.
66. Copel JA, Grannum PA, Harrison D, Hobbins JC. The use of intravenous pancuronium bromide to produce fetal paralysis during intravascular transfusion. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;158(1):170-1.
67. Moise KJ Jr, Deter R L, Kirshon B, Adam K, Patton D E, Carpenter R J Jr. Intravenous pancuronium bromide for fetal neuromuscular blockade during intrauterine transfusion for red-cell alloimmunization. *Obstet Gynecol.* 1989;74(6):905-8.
68. Menticoglou SM, Harman CR, Manning FA, Bowman JM. Intraperitoneal fetal transfusion: paralysis inhibits red cell absorption. *Fetal Ther.* 1987;2(3):154-9.
69. Bernstein HH, Chitkara U, Plosker H, Gettes M, Berkowitz RL. Use of atracurium besylate to arrest fetal activity during intrauterine intravascular transfusions. *Obstet Gynecol.* 1988;72(5):813-6.
70. Daffos F, Forestier F, Mac Aleese J, Aufrant C, Mandelbrot L, Cabanis EA, Iba-Zizen MT, Alfonso JM, Tamraz J. Fetal curarization for prenatal magnetic resonance imaging. *Prenat Diagn.* 1988;8(4):312-4.

71. Leveque C, Murat I, Toubas F, Poissonnier MH, Brossard Y, Saint-Maurice C. Fetal neuromuscular blockade with vecuronium bromide: studies during intravascular intrauterine transfusion in isoimmunized pregnancies. *Anesthesiology*. 1992;76(4):642-4.
72. Reitan JA, Warpinski MA. Cardiovascular effects of pancuronium bromide in mongrel dogs. *Am J Vet Res*. 1975;36(9):1309-11.
73. Jones RS. Muscle relaxants in canine anaesthesia 2: clinical application. *J Small Anim Pract*. 1992;33:423-9.
74. Nicolini U, Talbert DG, Fisk NM, Rodeck CH. Pathophysiology of pressure changes during intrauterine transfusion. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;160(5 Pt 1):1139-45.
75. Moise KJ Jr., Mari G, Fisher DJ, Huhta JC, Cano LE, Carpenter RJ Jr. Acute fetal hemodynamic alterations after intrauterine transfusion for treatment of severe red blood cell alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;163(3):776-84.
76. Copel JA, Grannum PA, Green JJ, Belanger K, Hanna N, Jaffe CC, Hobbins JC, Kleinman CS. Fetal cardiac output in the isoimmunized pregnancy: a pulsed Doppler-echocardiographic study of patients undergoing intravascular intrauterine transfusion. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161(2):361-5.
77. Mari G, Moise KJ Jr., Deter RL, Carpenter RJ Jr. Flow velocity waveforms of the umbilical and cerebral arteries before and after intravascular transfusion. *Obstet Gynecol*. 1990;75(4):584-9.

78. Mari G, Moise KJ Jr., Deter RL, Kirshon B, Stefos T, Carpenter RJ Jr. Flow velocity waveforms of the vascular system in the anemic fetus before and after intravascular transfusion for severe red blood cell alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;162(4):1060-4.
79. Weiner CP, Robillard JE. Effect of acute intravascular volume expansion on human fetal prostaglandin concentrations. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161(6 Pt 1):1494-7.
80. Kingdom JC, Ryan G, Whittle MJ, McNay MB, Bowman AW, Doyle J, Connell JM. Atrial natriuretic peptide: a vasodilator of the fetoplacental circulation? *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165(4 Pt 1):791-800.
81. Panos MZ, Nicolaidis KH, Anderson JV, Economides DL, Rees L, Williams R. Plasma atrial natriuretic peptide in human fetus: response to intravascular blood transfusion. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161(2):357-61.
82. Weiner CP. Nonhematologic effects of intravascular transfusion on the human fetus. *Semin Perinatol.* 1989;13(4):338-41.
83. Nicolini U, Santolaya J, Fisk NM, Hubinont C, Kochenour NK, Greco P, Rodeck CH. Changes in fetal acid base status during intravascular transfusion. *Arch Dis Child.* 1988;63(7 Spec No):710-4.
84. Soothill PW, Lestas AN, Nicolaidis KH, Rodeck CH, Bellingham AJ. 2,3-Diphosphoglycerate in normal, anaemic and transfused human fetuses. *Clin Sci (Lond).* 1988;74(5):527-30.
85. Hashimoto B, Filly RA, Callen PW, Parer JT. Absorption of fetal intraperitoneal blood after intrauterine transfusion. *J Ultrasound Med.* 1987;6(8):421-3.

86. Montague AC, Holzman GB. The absorption rate of blood from the peritoneal cavity by the fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 1966;94(2):282-3.
87. Fumia FD, Edelstone DI, Holzman IR. Blood flow and oxygen delivery to fetal organs as functions of fetal hematocrit. *Am J Obstet Gynecol.* 1984;150(3):274-82.
88. Egberts J, Hardeman MR, Luykx LM. Decreased deformability of donor red blood cells after intrauterine transfusion in the human fetus: possible reason for their reduced life span? *Transfusion.* 2004; 44(8):1231-7.
89. Anand AJ, Dzik WH, Imam A, Sadrzadeh SM. Radiation-induced red cell damage: role of reactive oxygen species. *Transfusion.* 1997; 37(2):160-5.
90. Katz D, Mazor D, Dvilansky A, Meyerstein N. Effect of radiation on red cell membrane and intracellular oxidative defense systems. *Free Radic Res.* 1996;24(3):199-204.
91. Jin YS, Anderson G, Mintz PD. Effects of gamma irradiation on red cells from donors with sickle cell trait. *Transfusion.* 1997;37(8):804-8.
92. Barjas-Castro ML, Brandao MM, Fontes A, Costa FF, Cesar CL, Saad ST. Elastic properties of irradiated RBCs measured by optical tweezers. *Transfusion.* 2002;42(9):1196-9.
93. Cicha I, Suzuki Y, Tateishi N, Shiba M, Muraoka M, Tadokoro K, Maeda N. Gamma-ray-irradiated red blood cells stored in mannitol-adenine-phosphate medium: rheological evaluation and susceptibility to oxidative stress. *Vox Sang.* 2000;79(2):75-82.

94. Luykx LM, Berger HM, Geerdink J, Kanhai HH, Egberts J. Non-protein-bound iron and free radical damage in fetuses with rhesus haemolytic disease: influence of intrauterine transfusions. *Bjog*. 2004; 111(4):303-10.
95. Kuypers FA, Scott MD, Schott MA, Lubin B, Chiu DT. Use of ektacytometry to determine red cell susceptibility to oxidative stress. *J Lab Clin Med*. 1990;116(4):535-45.
96. Baskurt OK, Temiz A, Meiselman HJ. Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24(1):102-10.
97. Moise KJ Jr. Intrauterine transfusion with red cells and platelets. *West J Med*. 1993;159(3):318-24.
98. Weiner CP, Wenstrom KD, Sipes SL, Williamson RA. Risk factors for cordocentesis and fetal intravascular transfusion. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165(4 Pt 1):1020-5.
99. Maxwell DJ, Johnson P, Hurley P, Neales K, Allan L, Knott P. Fetal blood sampling and pregnancy loss in relation to indication. *Br J Obstet Gynaecol*. 1991;98(9):892-7.
100. Seeds JW, Chescheir NC, Bowes WA Jr., Owl-Smith FA. Fetal death as a complication of intrauterine intravascular transfusion. *Obstet Gynecol*. 1989;74(3 Pt 2):461-3.
101. Seeds JW, Bowes WA Jr., Chescheir NC. Echogenic venous turbulence is a critical feature of successful intravascular intrauterine transfusion. *Obstet Gynecol*. 1989;73(3 Pt 2):488-90.

102. Evans DG, Lyon AJ. Fatal congenital cytomegalovirus infection acquired by an intra-uterine transfusion. *Eur J Pediatr.* 1991;150(11):780-1.
103. Dildy GA 3rd, Smith LG Jr., Moise KJ Jr., Cano LE, Hesketh DE. Porencephalic cyst: a complication of fetal intravascular transfusion. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165(1):76-8.
104. Ghi T, Brondelli L, Simonazzi G, Valeri B, Santini D, Sandri F, Ancora G, Pilu G. Sonographic demonstration of brain injury in fetuses with severe red blood cell alloimmunization undergoing intrauterine transfusions. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004;23(5):428-31.
105. Chaim W, Mares AJ, Leiberman J, Cohen A. Omental herniation: an unusual fetal complication of intrauterine transfusion. *Obstet Gynecol.* 1976;47:621-2.
106. Cassady G, Barnett R, Ceballos R. Dangers of fetal transfusion: importance of placental location. *Am J Obstet Gynecol.* 1971;110(5):672-3.
107. Nicolini U, Kochenour NK, Greco P, Letsky EA, Johnson RD, Contreras M, Rodeck CH. Consequences of fetomaternal haemorrhage after intrauterine transfusion. *BMJ.* 1988;297(6660):1379-81.
108. Moise KJ Jr., Carpenter RJ Jr. Increased severity of fetal hemolytic disease with known rhesus alloimmunization after first-trimester transcervical chorionic villus biopsy. *Fetal Diagn Ther.* 1990;5(2):76-8.
109. Lozinska D. The impact of intrauterine transfusions on morphological picture of red cells in Rh incompatibility. *Arch Immunol Ther.* 1987;35:775-9.

110. Halitsky V, Krumholz BA. Estimation of red cell volume requirements for intrauterine transfusion. Comparison of calculated and actual results in fetuses given 19 transfusions. *Obstet Gynecol.* 1968; 31(4):543-50.
111. Van Ameringen MR, Fouron JC, Bard H, Le Guennec JC, Prosmann J. Oxygenation in anemic newborn lambs with high or low oxygen affinity red cells. *Pediatr Res.* 1981;15(12):1500-3.
112. Fan FC, Chen RYZ, Schuessler GB, Chien S. Effects of hematocrit variations on regional hemodynamics and oxygen transport in the dog. *Am J Physiol.* 1984;238:H545-52.
113. Kirkinen P, Jouppila P, Eik-Nes S. Umbilical venous flow as indicator of fetal anaemia. *Lancet.* 1981;1(8227):1004-5.
114. Gill RW, Kossof G, Warren PS, Garrett WJ. Umbilical venous flow in normal and complicated pregnancy. *Ultrasound Med Biol.* 1984;10: 349-63.
115. Bilardo CM, Nicolaides KH, Campbell S. Doppler studies in red cell isoimmunization. *Clin. Obstet. Gynecol.* 1989;32:19-27.
116. Hecher K, Snijers R, Campebell S, Nicolaides KH. Fetal venous, arterial and intracardiac blood flows in red cell isoimmunization. *Obstet Gynecol.* 1995;85:122-8.
117. Oepkes D, Brand R, Vandenbussche FP, Meerman RH, Kanhai HH. The use of ultrasonography and Doppler in the prediction of fetal haemolytic anaemia: a multivariate analysis. *Br J Obstet Gynaecol.* 1994;101(8):680-4.

118. Steiner H, Schaffer H, Spitzer D, Batka M, Graf AH, Staudach A. The relationship between peak velocity in the fetal descending aorta and hematocrit in Rhesus isoimmunization. *Obstet Gynecol.* 1995; 85:659-62.
119. Oepkes D, Vandenbussche FP, Van Bel F, Kanhai HH. Fetal ductus venosus blood flow velocities before and after transfusion in red-cell alloimmunized pregnancies. *Obstet Gynecol.* 1993;82(2):237-41.
120. Teixeira JM, Duncan K, Letsky E, Fisk NM. Middle cerebral artery peak systolic velocity in the prediction of fetal anemia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2000;15(3):205-8.
121. Scheier M, Hernandez-Andrade E, Carmo A, Dezerega V, Nicolaides KH. Prediction of fetal anemia in rhesus disease by measurement of fetal middle cerebral artery peak systolic velocity. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004;23(5):432-6.
122. Mari G, Rahman F, Olofsson P, Ozcan T, Copel JA. Increase of fetal hematocrit decreases the middle cerebral artery peak systolic velocity in pregnancies complicated by rhesus alloimmunization. *J Matern Fetal Med* 1997;6:206-8.
123. Moise KJ Jr. The usefulness of middle cerebral artery Doppler assessment in the treatment of the fetus at risk for anemia. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(2):161.e1-4.
124. Bowman JM, Pollock JM. Amniotic fluid spectrophotometry and early delivery in the management of erythroblastosis fetalis. *Pediatrics.* 1965;35:815-35.

125. Nicolaides KH, Soothill PW, Clewell WH, Rodeck CH, Mibashan RS, Campbell S. Fetal haemoglobin measurement in the assessment of red cell isoimmunisation. *Lancet*. 1988;1(8594):1073-5.
126. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. *Lancet*. 1945;2(15):255-66.
127. Nishie EN, Brizot ML, Liao AW, Carvalho MH, Toma O, Zugaib M. A comparison between middle cerebral artery peak systolic velocity and amniotic fluid optical density at 450 nm in the prediction of fetal anemia. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188(1):214-9.
128. Bowman JM. Maternal blood group immunization. Hemolytic disease (erythroblastosis foetalis). In: Creasy RK, Resnick R. (eds.) *Maternal fetal medicine: principles and practice*. Philadelphia: Saunders; 1994. p.395-449.
129. Iskaros J, Kingdom J, Morrison J, Rodeck CH. Prospective non-invasive monitoring of pregnancies complicated by red cell alloimmunization. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1998;11:432-7.
130. Nicolaides KH. Management of red blood cell isoimmunized pregnancies. In: Chervenak FA, Issacson GC, Campbell S. (eds.) *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. Boston: Little, Brown and Company; 1993. p.1543-55.
131. Nicolaides KH, Rodeck CH. Fetal blood sampling. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1987;1(3):623-48.
132. Lobato G, Soncini CS. Fetal hydrops and other variables associated with the fetal hematocrit decrease after the first intrauterine transfusion for red cell alloimmunization. *Fetal Diagn Ther*. 2008;24(4):349-352.

133. Jones HM, Linch DC, Nicolaidis KH, Rodeck CH. Survival of transfused adult cells in the fetus. *Fetal Ther.* 1986;1:193-5.
134. Pollock J, Bowman, JM. Anti-Rh (D) IgG subclasses and severity of Rh hemolytic disease of the newborn. *Vox Sang.* 1990;59(3):176-9.
135. Hadley A. A comparison of in vitro tests for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang.* 1998; 74(2):375-83.