THAÍSA ANDRADE RIBEIRO MARCONDES NARCISO

**Pesquisa de hemorragia fetomaterna,
pela citometria de fluxo, em pacientes com
hematomas subcoriônicos de primeiro trimestre**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Narciso, Thaísa Andrade Ribeiro Marcondes
Pesquisa de hemorragia fetomaterna, pela
citometria de fluxo, em pacientes com hematomas
subcoriônicos de primeiro trimestre / Thaísa Andrade
Ribeiro Marcondes Narciso. -- São Paulo, 2020.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientadora: Maria de Lourdes Brizot.

Descritores: 1.Hemorragia feto-materna
2.Transfusão feto-materna 3.Hemoglobina fetal
4.Hematoma intrauterino 5.Citometria de fluxo
6.Ameaça de aborto

USP/FM/DBD-155/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*A meus pais e irmão, **Márcia, José Pedro e Pedro Luís**,
minha base, meus pilares. Por serem minha fonte de
inspiração e apoiarem-me em todas minhas decisões.*

*A meu marido **André**, meu amigo e companheiro há quase 20
anos. Por todo amor, cumplicidade e pela paciência. Pelos
nossos sonhos e por sempre acreditar em mim. Por
conquistar o mundo comigo todos os dias.*

*A minha filha **Alice**, por me ensinar o amor incondicional.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Meu agradecimento especial à **Professora Doutora Maria de Lourdes Brizot**, minha orientadora, por todo apoio, paciência e por me abraçar nesta minha empreitada acadêmica com tanto carinho. Estes anos de convivência fizeram-me admirá-la cada vez mais, não só como a pesquisadora competente e dedicada que é, mas também como pessoa. Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Marcelo Zugaib**, Professor Titular da disciplina de Obstetrícia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), por permitir a realização deste estudo em seu departamento.

À **Prof. Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco**, chefe do departamento de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por toda sua dedicação ao ensino e à pesquisa.

Aos **residentes, estagiários e preceptoras da medicina fetal**, não apenas pela ajuda na coleta de dados, mas pela troca de conhecimento nos ambulatórios, pela convivência, amizade e pelo carinho que cultivei por muitos de vocês. Muito obrigada por terem me recebido tão abertamente.

Às **equipes dos laboratórios de Fisiologia Obstétrica (LIM 57) e de Imunologia Clínica e Alergia (LIM 60)**, por participarem ativamente da análise e interpretação das amostras de sangue das pacientes, viabilizando a realização deste estudo.

À **equipe de enfermagem do Ambulatório de Clínica Obstétrica**, por todo apoio e auxílio de sempre. Um agradecimento especial à **Enf. Ana Maria da Silva Sousa Oliveira**, meu anjo da guarda nestes anos de pesquisa, obrigada pela sua disposição em todas as vezes que precisei, sem você teria sido tudo mais difícil.

A meus colegas e assistentes do Ambulatório de Aloimunização **Dra. Sckarlet Biancolin, Dr. Laurence Hsu Lin, Profª. Dra. Maria de Lourdes Brizot e Dr. Antonio Gomes de Amorim Filho**, pelo período curto, mas, de muito aprendizado.

Aos membros de minha banca de qualificação - **Dra. Márcia Cristina Zago Novaretti, Dra. Lisandra Stein Bernardes Ciampi de Andrade, Dr. Mario Henrique Burlacchini de Carvalho e Dr. Laurence Hsu Lin**, pelas contribuições e disponibilidade.

A **Lucinda Cristina Pereira**, secretária do programa de pós-graduação da FMUSP, por estar sempre disponível e nos auxiliar, sempre com imensa simpatia, nas questões burocráticas.

A **Agatha Rodrigues** e a **Stela Vertinhasse Peres**, por viabilizarem minhas análises estatísticas e por todas nossas discussões muito enriquecedoras.

A **equipe de plantonistas e residentes do Hospital Universitário(HU-USP)**, com a qual tive o imenso prazer de conviver por algumas semanas e que compartilharam comigo a alegria de cada amostra coletada.

A **todos os docentes e assistentes da Medicina Fetal**, por todo o conhecimento compartilhado nas reuniões da medicina fetal e reuniões da Clínica Obstétrica.

Às amigas queridas com quem compartilho a paixão pela Medicina Fetal **Livia Maria Del Monaco** e **Rafaela Cardoso Nagafchi**, aprendo diariamente com vocês.

E, por fim, às **gestantes**. A elas e seus bebês ainda não nascidos, eu agradeço e dedico esta pesquisa.

*“Porque eu sou do tamanho do que vejo,
e não do tamanho da minha altura.
E o que vejo são os meus sonhos”*

Alberto Caeiro (Fernando Pessoa)

*Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas
usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer
os nossos caminhos, que nos levam sempre aos
mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não
ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre,
à margem de nós mesmos*

Fernando Teixeira de Andrade

NORMALIZAÇÃO

Esta dissertação 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 Anneliese 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: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo principal.....	7
2.2 Objetivo secundário	7
3 REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1 Hemorragia fetomaterna.....	9
3.1.1 Hemorragia fetomaterna e sangramento vaginal.	11
3.1.2 Diagnóstico de hemorragia fetomaterna	13
3.1.2.1 Teste qualitativo	13
3.1.2.2 Testes quantitativos:	15
3.2 Hematoma intrauterino.....	19
3.2.1 Classificação dos hematomas intrauterinos	20
3.2.2 Repercussões maternas e fetais dos hematomas intrauterinos	22
3.3 Aloimunização RhD.....	24
3.3.1 Profilaxia da aloimunização RhD nas gestantes com sangramento vaginal:	25
4 MÉTODOS	28
4.1 Delineamento da pesquisa.....	28
4.2 Ética em pesquisa.....	28
4.3 Casuística	28
4.3.1 Cálculo do tamanho amostral.....	28
4.3.2 Critérios de inclusão.....	29
4.3.3 Critérios de exclusão	30
4.3.4 Seleção das pacientes	30
4.4 Procedimento do estudo	30

4.4.1 Coleta de dados	31
4.4.2 Datação da gestação	31
4.4.3 Avaliação ultrassonográfica de primeiro trimestre	31
4.4.4 Diagnóstico ultrassonográfico de hematoma	32
4.4.5 Coleta de sangue materno e quantificação da hemorragia fetomaterna por citometria de fluxo	32
4.4.6 Análise estatística.....	38
5 RESULTADOS	40
5.1 Caracterização da população.....	40
5.2 Caracterização das variáveis ultrassonográficas.	42
5.3 Porcentagem de hemoglobina fetal e HFM.....	43
5.4 Porcentagem de hemoglobina fetal e idade gestacional.....	45
5.5 Índice de massa corpórea das gestantes e HbF%	46
5.6 Porcentagem de hemoglobina fetal e características ultrassonográficas dos hematomas intrauterinos.....	47
6 DISCUSSÃO:	50
6.1 Aplicabilidade do estudo.....	54
6.2 Limitações do estudo.....	54
7 CONCLUSÃO	56
8 ANEXOS	58
8.1 Anexo A - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Pesquisa (CAPPpesq) da Diretoria do HCFMUSP.....	59
8.2 Anexo B - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Pesquisa (CAPPpesq) da Diretoria do HCFMUSP.....	60
8.3 Anexo C - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Pesquisa (CAPPpesq) do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP).....	61
8.4 Anexo D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	62
9 REFERÊNCIAS.....	64

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ASS	Assintomáticas
CA	Anidrase carbônica
CCN	Comprimento cabeça-nádega
CF	Citometria de fluxo
COG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
DP	Desvio padrão
DHPN	Doença hemolítica perinatal
DM	Diabetes Mellitus
DMSG	Diâmetro do saco gestacional
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA	Hemoglobina adulta
HbF	Hemoglobina fetal
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HFM	Hemorragia fetomaterna
HIU	Hematoma intrauterino
IC	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMC	Índice de massa corpórea
K-B	Teste de eluição ácida de Kleihauer- Betke
OR	<i>Odds Ratio</i>
PE	Ficoeritrina
RP	Retroplacentário

SABP	Subcoriônico atingindo borda placentária
SOP	Subcoriônico oposto à placenta
SV	Sangramento vaginal
SVA	Sangramento vaginal ativo
V _s	versus
VSG	Volume estimado do saco gestacional
β-hCG	Fração beta da gonadotrofina coriônica

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
±	Mais ou menos
=	Igual

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características demográficas da população estudada de gestantes com hematoma, com sangramento vaginal e pacientes assintomáticas no período de fevereiro de 2019 e fevereiro de 2020.	41
Tabela 2-	Parâmetros ultrassonográficos das gestantes com hematoma intrauterino, com sangramento vaginal ativo e pacientes assintomáticas no período de fevereiro de 2019 e fevereiro de 2020.	42
Tabela 3 -	Distribuição dos casos positivos para hemoglobina fetal e porcentagem de hemoglobina fetal circulante (HbF%) entre os três grupos estudados: pacientes com hematoma intrauterino (HIU), pacientes com sangramento vaginal (SVA) e pacientes assintomáticas (ASS) no período de fevereiro de 2019 e fevereiro de 2020.	43
Tabela 4 -	Hemorragia fetomaterna (HFM), em mililitros de sangue fetal, nos três grupos estudados: pacientes com hematoma intrauterino, pacientes com sangramento vaginal e pacientes assintomáticas no período de fevereiro de 2019 e fevereiro de 2020	44
Tabela 5 -	Distribuição da hemoglobina fetal entre pacientes com hematoma intrauterino (HIU), com posição de hematoma em região fúndica e istmocervical.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Teste de rastreamento da roseta para detecção de hemorragia fetomaterna. Esquema com resultado negativo (imagem superior) e positivo (imagem inferior).	15
Figura 2 -	Teste de Kleihauer Betke para detecção de hemorragia fetomaterna. Esquema com resultado positivo.....	16
Figura 3 -	Citogramas obtidos da análise por citometria de fluxo de sangue de controles (doador do sexo masculino e sangue de cordão) e de uma das pacientes analisadas.	19
Figura 4 -	Hematoma subcoriônico em gestação de sete semanas	21
Figura 5 -	Hematoma retrocoriônico em gestação de nove semanas.....	21
Figura 6 -	Fetal Cell Count TM Kit, IQ Products	33
Figura 7 -	Amostras prontas para receber anticorpos marcados com imunofluorescência.	35
Figura 8 -	Citômetro de Fluxo BD FACS CANTO II do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....	36
Figura 9 -	Obtenção dos citogramas com a distribuição das células marcadas por imunofluorescência.....	36
Figura 10 -	Porcentagem de hemoglobina fetal em relação à idade gestacional entre as pacientes com hematoma intrauterino (n=22), pacientes com sangramento vaginal (n=17) e pacientes assintomáticas (n=27). HbF%= porcentagem de hemoglobina fetal circulante, IG= idade gestacional (semanas).....	45

Figura 11 - Porcentagem de hemoglobina fetal em relação ao índice de massa corpórea das pacientes com hematoma intrauterino (n=22), pacientes com sangramento vaginal (n=17) e pacientes assintomáticas (n=27). HbF%=porcentagem de hemoglobina fetal circulante, IMC= índice de massa corpórea.....46

Figura 12 - Porcentagem de hemoglobina fetal circulante em sangue materno (HbF%) em relação ao volume do hematoma , nas paciente dos grupo com hematoma intrauterino (n=22).47

RESUMO

Narciso TARM. *Pesquisa de hemorragia fetomaterna, pela citometria de fluxo, em pacientes com hematomas subcoriônicos de primeiro trimestre* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

OBJETIVOS: Comparar a frequência da presença e porcentagem de hemoglobina fetal (HbF%) pela técnica de citometria de fluxo (CF) entre pacientes assintomáticas com diagnóstico ultrassonográfico de hematoma intrauterino (HIU), pacientes com sangramento vaginal ativo (SVA) e gestantes assintomáticas (ASS) sem HIU e sem SVA. Objetivo secundário: correlacionar a HbF% em sangue materno com o volume e posição do HIU. **MÉTODO:** Estudo prospectivo envolvendo gestantes de primeiro trimestre. Pacientes com o diagnóstico de HIU assintomático foram selecionadas e pareadas com pacientes com SVA e com pacientes ASS de mesma idade gestacional. As amostras de sangue coletadas foram analisadas pela técnica de CF. Os grupos foram comparados para a presença de HbF circulante e o HbF%, além das características demográficas e ultrassonográficas. As pacientes do grupo HIU foram avaliadas para as características do hematoma e sua associação e correlação com o HbF%. **RESULTADOS:** Foram selecionadas 66 pacientes, sendo 22 com HIU, 17 com SVA e 27 ASS. A HFM foi identificada em 15 pacientes do grupo HIU (68,2%), 13 SVA (76,5%) e 20 ASS (74,1%), sem diferença significativa entre os grupos tanto para a identificação de HFM, por meio do HbF% positivo ($p=0,830$), como para o volume de células transferido. A média do HbF% para cada grupo estudado foi 0,054 (HIU), 0,012 (SVA) e 0,042 (ASS) ($p=0,141$). As características demográficas e ultrassonográficas das pacientes foram semelhantes, assim como a idade gestacional (IG) média ($p=0,630$). No grupo com HIU houve correlação moderada negativa com significância estatística entre o volume estimado do HIU e o HbF% ($r_{\text{Spearman}} = -0,527$; $p=0,012$). A posição do HIU em relação à placenta e ao útero não foi significativa para a HbF%. **CONCLUSÕES:** Os três grupos estudados não diferiram na porcentagem de hemoglobina fetal circulante e, conseqüentemente, no volume de hemorragia materno-fetal.

Descritores: Hemorragia feto-materna; Transfusão feto-materna; Hemoglobina fetal; Hematoma intrauterino; Citometria de fluxo; Ameaça de aborto.

ABSTRACT

Narciso TARM. *Investigation of fetal-maternal hemorrhage, by flow cytometry, in patients with subchorionic first-trimester hematomas* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

OBJECTIVE: To compare the frequency of presence and percentage of fetal hemoglobin (HbF%) by flow cytometry (FC), between first trimester asymptomatic patients with intrauterine hematoma (IUH) patients with threatened abortion (TA) and asymptomatic pregnant women (APW) without IUH on ultrasonography examination. Secondary objective: to correlate HbF% in maternal blood with the volume and position of the IUH. **METHODS:** Prospective study involving pregnant women in the first trimester of pregnancy. Patients who had ultrasound finding of asymptomatic IUH and with TA were selected and paired with APW at the same gestational age. Maternal blood sample was collected and the HbF% evaluated by FC. The groups were compared in relation to the presence of circulating fetal hemoglobin and HbF%, demographic characteristics and ultrasonographic variables. The patients in HIU group were evaluated for the ultrasonographic characteristics of the IUH and their correlation and association with the HbF%. **RESULTS:** 66 patients were selected, 22 with IUH, 17 with TA and 27 APW. HFM was identified in 15 IUH patients (68.2%), 13 TA (76.5%) and 20 APW (74.1%), with no significant difference between groups for the identification of positive HbF% ($p = 0.830$) and for the volume of cells transferred. The mean HbF% for each group was 0.054 (IUH), 0.012 (TA) and 0.042 (APW) ($p = 0.141$). The demographic and ultrasound characteristics of the patients were similar, as well as the average GA ($p = 0.630$). In the IUH group, there was a moderate negative correlation with statistical significance between the estimated volume of IUH and HbF% (Spearman, $r = -0.527$; $p = 0.012$). The position of IUH in relation to the placenta and uterus was not significant for HbF%. **CONCLUSIONS:** FMH expressed by Hbf%, in the first trimester of pregnancy, does not seems to differ between patients with and without ultrasound finding of IUH.

Descriptors: Fetomaternal transfusion; Fetomaternal hemorrhage; Fetal hemoglobin; Intrauterine hematoma; Flow cytometry; Abortion, threatened.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Hemorragia fetomaterna (HFM) é o processo de transferência de células fetais para a circulação materna que ocorre durante a gestação e/ou parto ¹. Esta transferência se estabelece desde o primeiro trimestre gestacional, e o volume de eritrócitos fetais circulantes na mãe aumenta com a progressão da gestação, com o ápice ocorrendo no momento do parto ¹⁻³. Acredita-se que esse processo ocorra em todas as gestações normais, em diferente intensidade e, na maioria dos casos, sem significado clínico ou patológico ^{1,2}.

Em teoria, a transfusão fetomaterna é possível desde o final da 4ª semana de vida embrionária, quando a vascularização do vilo corial e a atividade cardíaca fetal iniciam-se ⁴. A média do volume transfundido estimado na 8ª semana gestacional é de, aproximadamente, 0,33 ml ⁵. Em 99% das gestações, o volume de hemorragia fetomaterna, considerando-se todos os trimestres até o parto, é inferior a 2 ml, podendo chegar a 15 ml de hemácias fetais (30 ml de sangue total) em raros casos ^{2,6,7}.

Entre 3 e 11% das mulheres com episódios de sangramento nos primeiros três meses da gestação e, aproximadamente, 45% daquelas com parto no 3º trimestre vão evoluir com HFM significativa ^{4,8}. Nos dois primeiros trimestres da gestação, a transfusão de sangue fetal para a circulação materna é descrita em quadros de sangramento, abortamentos espontâneos e instrumentados (dilatação e curetagem, evacuação uterina a vácuo), em gestações ectópicas, tumores placentários, traumas abdominais e procedimentos diagnósticos tais como biópsias de vilo corial e amniocentese ^{1,8}.

Em qualquer idade gestacional, a HFM pode resultar em consequências catastróficas à gestação e ao futuro reprodutivo de gestantes RhD negativo ^{1,2}. Durante os dois primeiros trimestres da gestação, o volume fetoplacentário é menor e, conseqüentemente, há menor transfusão de eritrócitos fetais à circulação materna. Todavia, mesmo em pequeno volume, esta hemorragia transplacentária ainda na primeira metade da gestação pode ser capaz de sensibilizar gestantes RhD negativo, quando o feto é RhD positivo.

Apesar do antígeno RhD ser reconhecido como um forte desencadeador de resposta imune, esta resposta é bastante variável entre os indivíduos ⁹. Estudos realizados com homens RhD negativo demonstraram que injeções intravenosas de quantidades tão pequenas quanto 0,1ml de hemácias RhD positivo foram suficientes para sensibilizar alguns indivíduos, que passavam então a exibir anticorpo do tipo anti-D ^{5, 9, 10}.

Mesmo a resposta imune sendo variável entende-se que a exposição da gestante ao antígeno RhD dependa do volume de eritrócitos fetais que atingem a circulação materna ⁵. Von Stein et al.⁴ avaliaram a presença de HFM em pacientes com ameaça de abortamento e demonstraram que pacientes nesta condição apresentavam maior taxa de hemorragia (11,24%) quando comparadas a gestantes sem sangramento que internavam para abortamento eletivo (4,26%). Dessa forma, concluíram que, embora não houvesse dados suficientes para avaliar a sensibilização destas pacientes ao antígeno RhD, o aumento na incidência de hemorragia fetomaterna nos casos de ameaça de abortamento justificaria a implementação da Imunoglobulina anti-D nestes casos ⁴.

Na fisiopatologia da HFM, advoga-se que há uma ruptura no trofoblasto que permite a entrada de eritrócitos fetais provenientes da circulação fetal de alta pressão para dentro do espaço intervilo e, a partir deste, para a circulação materna ¹. O que não está claro é o que determina se esta quebra da barreira placentária será mínima e cicatrizará completamente ou resultará em HFM massiva ¹.

Na ruptura da placa coriodecidual a principal manifestação clínica é o sangramento vaginal. Complicação frequente do primeiro trimestre, o sangramento ocorre entre 15 e 25% de todas as gestações ¹¹⁻¹³ e pode estar associado a complicações, tais como abortamento espontâneo, gestação molar, gestação ectópica ou presença de um hematoma intrauterino ¹⁴. O diagnóstico da causa do sangramento vaginal exige correlação de dados clínicos (história clínica, exame físico), laboratoriais (gonadotrofina coriônica sérica) e a avaliação ultrassonográfica da gestação ¹⁴.

A ultrassonografia transvaginal para avaliação dos sangramentos vaginais foi introduzida por Mantoni e Pedersen há quase 30 anos ¹⁵ e possibilitou o melhor entendimento da anatomia e fisiologia do feto e seus anexos, além do estudo *in vivo*

pós-implantação do embrião. O conhecimento da aparência evolutiva habitual das gestações iniciais e suas peculiaridades é essencial para o diagnóstico e manejo das intercorrências gestacionais de primeiro trimestre supracitadas ¹².

O uso combinado da ultrassonografia e experimentos *in vivo* vêm demonstrando que a circulação materna no interior das vilosidades placentárias inicia-se na periferia do trofoblasto e este processo está associado a um estresse oxidativo fisiológico que, provavelmente desencadeie a formação das membranas coriodecíduais ^{11, 16}. É exatamente o desenvolvimento deficiente das membranas que pode levar à ruptura na placa coriodecidual, geralmente, em sua porção periférica e desencadear os quadros de sangramento, exteriorizados ou não ¹². Em ambos os casos, não é incomum a formação de uma coleção intrauterina, o hematoma intrauterino. No exame ultrassonográfico, a área de hematoma é descrita como uma formação hipoeoica, em formato de foice, localizada entre as membranas ovulares e/ ou a placenta (subcoriônico e /ou retroplacentário) e o miométrio ¹⁷⁻²⁰.

A incidência de hematomas intrauterinos diagnosticados no primeiro trimestre varia entre 4,0% e 39,5% dependendo da população estudada, definição e idade gestacional do diagnóstico ²¹⁻²³. Estima-se que entre 18% e 39% das pacientes avaliadas por queixa de sangramento vaginal apresentem pelo menos um hematoma intrauterino e que até 70% das pacientes com hematomas apresentam algum grau de sangramento durante a gestação ²⁴.

Diversos estudos avaliam o significado dessas coleções hemáticas para o desenvolvimento e desfecho da gestação. O que alguns autores advogam é que o hematoma é um sinal ultrassonográfico precoce de invasão trofoblástica inadequada ^{12, 22} e está associado a estresse oxidativo agudo que altera tanto o desenvolvimento vilositário como das membranas ovulares ¹². A quebra de equilíbrio entre a produção de radicais livres de oxigênio e a ação antioxidante protetora do início da gestação é resultante da ruptura da barreira placentária e do influxo de sangue materno oxigenado nas vilosidades. O desequilíbrio seria capaz de desencadear diversas complicações que se estendem, desde abortamentos precoces e tardios até o desenvolvimento de pré-eclâmpsia, descolamento prematuro de placenta, parto prematuro e rotura prematura de membranas ovulares ^{12, 13, 16, 18, 19, 22, 24}.

Nestes estudos, todavia, pouco ou nada se discute em relação ao efeito da transferência entre células fetais e maternas que ocorre no espaço interviloso nessas pequenas rupturas da placa basal. Pode-se então questionar que, da mesma maneira em que a ruptura da barreira placentária implica maior volume de sangue materno altamente oxigenado em contato com a placenta e membranas ovulares em formação (levando a repercussões agudas e tardias), poderia ocorrer também uma maior taxa de HFM, isto é, uma maior porcentagem de eritrócitos fetais em contato com o sangue materno.

Na literatura é bem determinada a relação entre a ameaça de abortamento e o risco de HFM, sendo a profilaxia com imunoglobulina anti-D amplamente defendida nestes casos²⁵⁻²⁷, entretanto não há na literatura estudos relacionando a presença do hematoma intrauterino, isolado, em pacientes assintomáticas e a hemorragia fetomaterna. Desta forma este estudo foi desenvolvido para avaliar a taxa de hemorragia fetomaterna em gestações no 1º trimestre com achado ultrassonográfico de HIU.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

O presente estudo envolvendo gestações de 1º trimestre teve como objetivos:

2.1 Objetivo principal

Comparar a presença e porcentagem de hemoglobina fetal, pela citometria de fluxo, entre pacientes (1) assintomáticas com hematoma intrauterino, (2) pacientes com sangramento vaginal ativo e (3) pacientes assintomáticas sem hematoma e sem sangramento vaginal.

2.2 Objetivo secundário

No grupo com hematoma:

1. Correlacionar a porcentagem de hemoglobina fetal com o volume e posição do hematoma em relação ao córion.

3 Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Hemorragia fetomaterna

A hemorragia fetomaterna (HFM) é o processo de transferência de células fetais para a circulação materna, ocorre como resultado da perda de integridade da barreira fisiológica existente entre as duas circulações ^{1, 2} em qualquer fase do desenvolvimento gestacional. Não há comunicações diretas entre os vasos, maternos e fetais, no leito placentário, todavia a transferência até mesmo fisiológica de células entre as circulações ocorre de modo intermitente. A natureza e o mecanismo deste extravasamento celular vêm sendo estudados há décadas, mas até os dias atuais não estão bem estabelecidos ²⁸.

Em 1941, Levine et al. propuseram uma etiologia para a eritroblastose fetal que implicava a entrada de eritrócitos fetais na corrente sanguínea materna ²⁹, o que levou ao questionamento se a transferência de células ocorreria apenas em casos patológicos, ou também, em gestações não complicadas. Os estudos realizados, após esta primeira hipótese, demonstraram que o intercâmbio de células entre mãe e feto é sim um processo fisiológico que se mantém, na grande maioria dos casos, indetectado e clinicamente insignificante durante toda a gestação ^{1, 30}.

Em teoria, a transfusão fetomaterna é possível após o final da 4ª semana de gestação, quando a vascularização do vilo corial e a atividade cardíaca fetal iniciam-se ^{2, 4, 5} e vêm sendo demonstradas desde a 5ª semana de gestação ⁵. Bowman et al.³ (1986) publicaram estudo prospectivo avaliando a presença de HFM durante a gestação e após o parto. Foram estudadas 33 pacientes Rh positivas e ABO compatíveis com seus conceitos, submetidas a testes seriados de Kleihauer-Betke (K-B) a cada duas semanas durante os três trimestres da gestação e duas semanas após o parto. Os autores demonstraram taxas de HFM de 3%, 12,1%, 45,4% e 63,6% para primeiro, segundo, terceiro-trimestre e pós-parto respectivamente. Para este resultado, consideraram como positiva a presença de, pelo menos, 0,01 ml de eritrócitos fetais em sangue materno. Tais achados foram consistentes com os de outros autores, utilizando a mesma técnica, evidenciando que cerca de 50% das

gestantes no período pós-parto apresentam eritrócitos fetais circulantes em sua corrente sanguínea^{2, 31, 32} e que o volume de hemorragia fetomaterna aumentava com a idade gestacional^{2, 3}.

Wit et al.³³ (2011) obtiveram resultados diferentes dos citados acima. Em estudo multicêntrico que teve como objetivo estabelecer valores de referência para a presença de hemácias fetais na circulação materna, utilizando a técnica de citometria de fluxo, os autores avaliaram 236 pacientes com idade gestacional entre 21 e 41 semanas de gestação (IG média de 32 semanas e mediana de 31 semanas) de gestações únicas ou gemelares não complicadas. Para a população estudada eles observaram uma porcentagem de eritrócitos fetais circulantes em sangue materno (HbF%) que variava entre 0,00% e 0,50% (média de 0,047% e mediana de 0,025%) e distribuição da HbF% não correlacionada com a idade gestacional.

A média do volume de sangue fetal transfundido na 8ª semana de gestação é estimada em cerca de 0,33 ml⁵, com alguns autores citando volumes menores que 0,1 ml durante todo o período gestacional³⁴. Em revisão sistemática realizada por Sebring et al.², com resultados de testes de eluição ácida (K-B) realizados no período pós-natal, observou-se que 74% das puérperas apresentavam menos de 0,05 ml de sangue fetal circulante (0,025 de eritrócitos fetais), 96% apresentavam volume menor a 1ml de sangue fetal em sua circulação (0,5 ml de eritrócitos fetais) e 99,67% das mulheres apresentavam volume inferior a 30 ml (15 ml de eritrócitos fetais) circulante.

Boa parte dos estudos estabelecem como valor de corte para HFM significativa o volume de 30 ml de sangue fetal total ou 0,6% de HbF%³⁵. Este valor foi estabelecido por corresponder à quantidade de eritrócitos fetais coberta pela dose de imunoglobulina administrada tradicionalmente para prevenção da aloimunização RhD^{1, 8, 25, 26}. Todavia, Wylie et al.¹ (2010), ressaltam em revisão sistemática sobre o tema que embora este valor de corte seja importante para prevenção da aloimunização RhD, sobretudo no que diz respeito às HFM de 3º trimestre, ele não necessariamente se correlaciona com o risco de morbidade e mortalidade fetais, e que volumes menores de HFM podem ser catastróficos para a gestação dependendo da idade gestacional e tempo de sangramento. É importante observar que o volume total de sangue fetoplacentário varia com a idade gestacional e peso fetal sendo

apenas 3 ml na 12ª semana de gestação e ao redor de 35 ml na 20ª semana de gestação ³⁶.

No 1º e 2º trimestres da gestação são descritos alguns fatores de risco para ocorrência de transfusão fetomaterna. Episódios de sangramento vaginal no 1º trimestre, abortamentos espontâneos e instrumentados ^{4, 8} (dilatação e curetagem, evacuação uterina a vácuo), gestações ectópicas ⁸ tumores placentários ³⁷, os traumas abdominais ^{38, 39} e procedimentos diagnósticos tais como biópsias de vilos coriais e amniocentese ^{1, 8, 30} são fatores associados à ocorrência de HFM na primeira metade da gestação. No 3º trimestre, descreve-se a associação da HFM com manobras como versão cefálica externa ⁴⁰, extração manual da placenta ⁴¹, o parto cesáreo ² e complicações gestacionais, como a pré-eclâmpsia ^{1, 42}. Embora a literatura seja extensa, muitos trabalhos baseiam-se em relatos de casos, com poucos estudos prospectivos, controlados e revisões sistemáticas, além dos resultados serem controversos. O que é bem estabelecido é que, apesar de fatores de risco, em 80% dos casos de HFM não é possível se estabelecer fator causal ^{1, 2, 28, 42}.

O que parece ser claro é a ocorrência da quebra na barreira placentária, que permite a entrada de eritrócitos fetais provenientes da circulação fetal de alta pressão para o espaço intervilo e, então, para a circulação materna. Devi et al.²⁸ (1968), estudando a placenta de 120 pacientes cuja gestação e parto ocorreram sem complicações e as placentas de 264 mulheres com gestação e parto complicados observaram que a presença de lagos placentários, trombos intervilosos, infartos e áreas de hemorragia retroplacentárias estavam associados à presença de eritrócitos fetais na circulação materna e quanto maior o número ou extensão das lesões placentárias, maior a taxa de HFM.

3.1.1 Hemorragia fetomaterna e sangramento vaginal

A principal manifestação clínica das roturas na placa coriodecidual é o sangramento vaginal, complicação frequente do primeiro trimestre e que acomete aproximadamente, entre 15 e 25% de todas as gestações ¹¹⁻¹³. Entre as gestantes que apresentam sangramento de primeiro trimestre, entre 3 e 11% vão evoluir com HFM considerada significativa ^{4, 8}.

Von Stein et al.⁴ (1992), em estudo transversal, compararam a taxa de HFM em 89 gestantes com idade gestacional inferior a 20 semanas e que apresentavam sangramento vaginal sem dilatação ou perda de restos ovulares (grupo de estudo) com 94 gestantes de idades gestacionais semelhantes, sem história de sangramento prévio e que se apresentavam para abortamento eletivo (grupo controle). Utilizando-se do teste de Kleihauer-Betke (K-B) para avaliação da presença de hemorragia fetomaterna, os autores puderam observar uma taxa de 11,24% de HFM no grupo de estudo e apenas 4,26% no grupo controle, demonstrando que há uma maior taxa de HFM nas pacientes que se apresentam com sangramento vaginal no primeiro trimestre.

Os achados de Von Stein et al. corroboram os observados por Litwalk et al.⁴³ (1970). Em estudo preliminar Litwalk et al.⁴⁴, analisando uma amostra de 36 pacientes com abortamento espontâneo e 20 controles sadios, observaram uma taxa de HFM de 36% no primeiro grupo e apenas 10% no segundo. No estudo de 1970, os mesmos autores avaliaram 98 pacientes hospitalizadas com gestações entre 8 e 20 semanas. Destas, 23 apresentavam sangramento vaginal, 25 internaram com abortamento completo e 50 com abortamento incompleto. Para controle foram utilizadas amostras de sangue de 38 gestantes sadias com idade gestacional entre 8 e 20 semanas, 10 mulheres não gestantes e 10 homens. Após análise das amostras e quantificação da HFM com o uso da técnica de Kleihauer-Betke, os autores demonstraram a presença de HFM em 32% das pacientes do grupo caso e em apenas 8% dos controles. A diferença entre os dois grupos foi significativa, já entre os três grupos que compunham o grupo de casos (sangramento vaginal, abortamento completo e abortamento incompleto), os autores não observaram diferença estatisticamente significativa. A conclusão do estudo foi que, embora não fosse possível avaliar sem pacientes RhD negativo sensibilizam-se após estes eventos, a maior taxa de hemorragia fetomaterna justificaria o emprego da imunoglobulina anti-D nestas pacientes.

Mas, os estudos envolvendo HFM e ameaça de abortamento ou quadros de abortamento espontâneo/eletivo não são unânimes quanto ao aumento da frequência da transferência transplacentária de hemácias fetais. Murray et al.⁴⁵ (1970), em estudo multicêntrico, avaliaram 483 pacientes que internaram para abortamento

eletivo (392 casos) ou após abortamento espontâneo (91 casos) para a presença de HFM. A avaliação foi feita usando o teste de Kleihauer-Betke e as amostras de sangue foram coletadas antes, imediatamente após e algum tempo após a evacuação uterina. Os autores não demonstraram diferença significativa na frequência de HFM entre os grupos e técnicas de esvaziamento uterino.

Kuller et al.⁴⁶ (1994), compararam 96 pacientes com quadro de ameaça de abortamento com 113 controles assintomáticas, todas com idade gestacional inferior a 20 semanas. As pacientes foram também submetidas ao teste de K-B para quantificação da hemorragia fetomaterna e os autores observaram que a incidência total, entre casos e controles de HFM foi 4,3%, sendo 4,1% entre os casos e 4,4% entre os controles, não havendo assim diferença significativa entre os grupos. Os autores compararam seus resultados com os obtidos por Von Stein (1992)⁴ e, associando as amostras e resultados puderam observar uma tendência a maior volume de HFM em pacientes com sangramento vaginal (méd±DP: $0,14 \pm 0,06\%$) do que em controles ($0,099 \pm 0,04\%$), porém ainda sem diferenças significativas entre os grupos.

3.1.2 Diagnóstico de hemorragia fetomaterna

A detecção e quantificação de eritrócitos fetais na circulação materna é necessária para a prevenção da aloimunização Rh D entre as pacientes D-negativo³⁵, além de determinar a presença de sangramentos ocultos associados a vários eventos e condições obstétricas já relatadas previamente¹. Os principais testes diagnósticos dividem-se em dois grupos, os testes qualitativos, sendo o mais utilizado o teste de rastreamento da roseta e os testes quantitativos, sendo os mais importantes o teste de eluição ácida, ou Kleihauer- Betke (K-B), e a citometria de fluxo.

3.1.2.1 Teste qualitativo

Teste de rastreamento da Roseta (Rosette screen test)

Exame qualitativo que possui alta sensibilidade para detecção de volumes maiores ou iguais a 10ml de sangue total fetal na circulação materna, ou 0,2% de células fetais³⁵. Nesta técnica, a amostra de sangue materno é incubada com anti-D e

depois lavada. Um indicador de hemácias D -positivo é então adicionado e a amostra é avaliada sob microscopia óptica. Na presença de células D positivas, o indicador destas células foi a formação de agregado (rosetas) ao redor dos eritrócitos fetais (Figura 1). O teste só é válido caso o sangue materno seja RhD negativo e o fetal RhD positivo. O fenótipo D fraco, tanto materno quanto fetal pode levar a resultados falsos- positivos ou falsos-negativos respectivamente^{35, 47, 48}.

Trata-se de um teste de rastreamento e tem seu uso limitado aos casos em que se pretende a prevenção da aloimunização Rh. Em resultado negativo (não se observa a formação de rosetas), uma dose de Imunoglobulina anti-D (300 µg) é suficiente para prevenir a aloimunização em 99% das pacientes⁴⁷. Caso o teste seja positivo, isto implica HFM superior a 10 ml de sangue fetal, e deve-se prosseguir a quantificação da hemorragia fetomaterna pela realização de um dos testes quantitativos para que seja aplicada a dose adequada de Imunoglobulina anti-D.

FONTE: Canada's Transfusion Safety Offices em agradecimento de Mount Sinai Hospital Blood Transfusion Laboratory, Toronto, Ontario

Figura 1 - Teste de rastreamento da roseta para detecção de hemorragia fetomaterna. Esquema com resultado negativo (imagem superior) e positivo (imagem inferior)

3.1.2.2 Testes quantitativos

Eluição ácida- Teste de Kleihauer Betke (K-B)

Teste descrito por Kleihauer et al.⁴⁹ (1957) diferencia hemácias contendo hemoglobina fetal (HbF) daquelas com hemoglobina adulta (HbA) pela avaliação da resistência das células à eluição ácida⁵⁰. Eritrócitos fetais, que possuem majoritariamente HbF, são resistentes à eluição ácida, enquanto as células adultas/maternas são sensíveis.

Para a técnica, prepara-se um esfregaço de sangue periférico materno que é então exposto ao tamponamento ácido, no qual a hemoglobina das células adultas acaba sendo eluída enquanto a das células contendo HbF (majoritariamente células fetais) fica retida ³⁵. A amostra passa então por coloração e, nesse processo, as células fetais que possuem HbF ficam coloridas em rosa escuro (Figura 2 - células marcadas com setas), enquanto as células adultas adquirem uma coloração bem fraca, apenas com seus contornos demarcados (células fantasmas) ³⁵.

A quantificação de células fetais (HbF%) é feita pela leitura da lâmina em microscopia ótica, sendo recomendada para aumentar a sensibilidade do método a contagem de pelo menos, 2.000 eventos ⁴⁷. Embora de ampla utilização e baixo custo, o teste de K-B possui várias críticas, uma vez que é um teste completamente manual, com acurácia e precisão subótimas devido sobretudo, à falta de padronização em sua realização (espessura do esfregaço, variações no pH do ácido utilizado para tamponamento) e sujeito a variações em sua interpretação tanto interobservador, como entre laboratórios/hospitais ^{35,51}.

FONTE: Espinosa e al. ⁵²

Figura 2- Teste de Kleihauer Betke para detecção de hemorragia fetomaterna. Esquema com resultado positivo

Citometria de Fluxo (CF)

Conhecendo-se as limitações do teste de eluição ácida, técnicas mais acuradas para identificação e quantificação de eritrócitos fetais na circulação materna foram desenvolvidas. As técnicas de citometria de fluxo para detecção de HFM disponíveis atualmente baseiam-se, sobretudo, no uso de dois anticorpos monoclonais marcados com fluorescência e utilizados de acordo com o antígeno que se quer identificar: RhD ou HbF³⁵. Independente do tipo de anticorpo, a técnica é mais acurada em relação ao K-B, uma vez que, por ser automatizada, tem maior reprodutividade e menor coeficiente de variabilidade interobservador³³.

O uso de anticorpos monoclonais para hemoglobina fetal (HbF) permite que eritrócitos contendo esse tipo de cadeia de hemoglobina sejam detectados e contados independente da tipagem sanguínea materna e fetal⁵³. Embora alguns estudos afirmem que a marcação com anticorpo anti-HbF possa superestimar a hemorragia fetomaterna, pela possibilidade de contar também eritrócitos maternos com hemoglobina fetal, as chamadas células-F, a identificação dos eritrócitos fetais pela técnica de citometria de fluxo é muito mais acurada do que no teste de Kleihauer Betke^{33, 35}.

As células-F são hemácias adultas que possuem uma quantidade aumentada de hemoglobina fetal e que apresentam população elevada durante a gestação, sobretudo no segundo trimestre⁵⁴. Também estão aumentadas em casos de persistência hereditária de hemoglobina fetal e em algumas, como a anemia falciforme e β -talassemia^{33, 35, 54-56}.

Mesmo com o uso isolado do anticorpo anti-HbF, a extensão do aumento na HFM é muito pequena, e não aparenta contribuir de maneira relevante para resultados falsos-positivos⁵⁶. Todavia, a fim de eliminar este viés e separar as populações celulares, foram desenvolvidas técnicas que combinam anticorpos, aumentando a especificidade do teste e sua aplicabilidade clínica.

Novas técnicas de imunofluorescência para citometria de fluxo utilizam um anticorpo monoclonal murino direcionado para a hemoglobina fetal (HbF) em conjunto com um anticorpo policlonal direcionado para a anidrase carbônica (CA). As isoenzimas de CA, representadas nas hemácias por CAI e CAII, só são expressas completamente após o nascimento⁵⁵. A dupla marcação, com anti-Hb e anti-CA,

permite a identificação de três grupos celulares distintos no citômetro pela fluorescência: eritrócitos fetais (expressam HbF+, CA-), eritrócitos adultos maternos (expressam HbF-, CA+) e células F maternas (expressam HbF+, CA+) ⁵⁵ (Figura 3)

Anticorpos voltados para o antígeno de superfície eritrocitária D (anti-D) também podem ser utilizados para quantificação de hemorragia fetomaterna e são inclusive o método de escolha por alguns protocolos ⁵⁷. Sua aplicabilidade é limitada aos casos onde há incompatibilidade RhD entre mãe e feto, porém ele tem suas vantagens como a alta sensibilidade ⁷. Esta técnica pode identificar quadros de HFM menores que 0,2% ⁵⁸ e não precisa passar pela etapa de permeabilização celular, uma vez que a marcação é feita em um antígeno de superfície ³⁵.

Células distribuídas em citograma marcadas com PE-anti-HbF e FITC-anti-CA. Células fetais (HbF+, CA-) estão no quadrante superior esquerdo (Q1). Células adultas maternas (HbF,CA+) estão no quadrante inferior direito (Q4). O quadrante superior direito (Q2) possui células F maternas (HbF+, CA+). O HbF% está representando em Q1. Nesse exemplo (paciente 36) o HbF% foi 0,025%.

CTRL +: sangue de cordão umbilical + sangue de doador do sexo masculino, CTRL -: sangue de doador do sexo masculino, H36: amostra de paciente número 36.

Figura 3 - Citogramas obtidos da análise por citometria de fluxo de sangue de controles (doador do sexo masculino e sangue de cordão) e de uma das pacientes analisadas

3.2 Hematoma intrauterino

O hematoma intrauterino (HIU) é um achado comum na ultrassonografia obstétrica de rotina, especialmente no primeiro trimestre da gestação. Foi descrito pela primeira vez em 1981 por Mantoni e Pedersen que, com o advento da ultrassonografia transvaginal, estudavam casos de sangramento em gestações com idade gestacional inferior a 20 semanas¹⁵. Os autores descreveram em algumas

pacientes a presença de áreas anecóicas que se estendiam entre as membranas e a parede uterina ^{12, 15}.

De 1981 para os dias atuais, a descrição modificou muito pouco e a mais aceita é a de uma imagem em crescente ou foice, anecoica ou hipoeoica, localizada entre as membranas ovulares e/ou placenta e o miométrio ¹⁷⁻²⁰. A incidência dos HIU durante a gestação varia entre 4% e 39% de acordo com a população estudada, definição e idade gestacional de diagnóstico ^{18, 21-23}.

3.2.1 Classificação dos hematomas intrauterinos

Os hematomas intrauterinos são classificados em três tipos, de acordo com sua localização:

- Hematoma subcoriônico: Localizado predominantemente entre as membranas ovulares e/ou margem placentária e o miométrio. Corresponde a 81% dos HIU ⁵⁹ (Figura 4).
- Hematoma retrocoriônico: Localizado entre a placenta e o miométrio. Corresponde a 16% dos hematomas subcoriônicos (Figura 5).
- Hematoma subamniótico: Localizado entre a placenta e a cavidade amniótica/membranas placentárias. Representa 4% dos hematomas intrauterinos.

Muitos autores classificam hematomas subcoriônicos e retrocoriônicos como uma mesma entidade ultrassonográfica, uma vez que possuem origem semelhante, e são resultado de roturas na placa basal e consequente separação entre as membranas coriônicas e miométrio. Nos dois casos, o sangue extravasado para o espaço intervilo é predominantemente materno ²³. O que predispõe à formação destes hematomas não é algo completamente estabelecido.

Acredita-se que o hematoma seja um sinal ultrassonográfico precoce de invasão trofoblástica inadequada ^{12, 22}, com consequente alteração da angiogênese e fragilidade vascular ¹⁸ e associado a estresse oxidativo agudo que altera tanto o desenvolvimento vilositário, como das membranas ovulares ¹².

Os hematomas subamnióticos são resultado da ruptura de vasos alantocoriônicos, geralmente próximos à inserção do cordão, são descritos como uma imagem cística com componente sólido aderido à superfície fetal placentária, que pode corresponder à área de trombo ou depósito de fibrina^{20, 60, 61}. São raros e no geral, descritos após o segundo trimestre. Diferentemente dos hematomas subcoriônicos e retroplacentários, o hematoma subamniótico forma-se pela rotura de vasos fetais, predominando, assim, o extravasamento de sangue fetal que, muitas vezes, não atinge o espaço intervilositário. Entretanto, Deans et al.²⁰ puderam demonstrar em 80% dos casos que estudaram de hematomas subamnióticos, um aumento de α -fetoproteína sérica materna, o que pode estar associado à presença de eritrócitos fetais na circulação metrena e, conseqüentemente, à hemorragia fetomaterna.

SG: saco gestacional, HSC: hematoma subcoriônico.

FONTE: Ambulatório de primeira consulta pré-natal do departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Figura 4 - Hematoma subcoriônico em gestação de 7 semanas

SG: saco gestacional, HRC: hematoma retrocoriônico, Trof: trofoblasto.

FONTE: Ambulatório de primeira consulta pré-natal do departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Figura 5 - Hematoma retrocoriônico em gestação de 9 semanas

3.2.2 Repercussões maternas e fetais dos hematomas intrauterinos

O significado clínico da presença dos hematomas intrauterinos, especialmente, no que diz respeito aos mais prevalentes, subcoriônico e retroplacentário, é bastante controverso na literatura⁶². Conforme Jauniaux et al.^{11, 12} existem evidências crescentes de que muitas das falhas na placentação podem estar associadas a quebras na barreira placentária. Em idade gestacional precoce, estas quebras afetariam o desenvolvimento e função placentária gerando repercussões tanto precoces, como tardias na gestação.

A entrada excessiva de sangue materno rico em oxigênio para o interior dos espaços intervilosos dá origem ao hematoma intrauterino. O influxo de sangue gera tanto um efeito mecânico direto no tecido vilositário, como indireto pelo estresse oxidativo. A quebra do equilíbrio entre a produção de radicais livres de oxigênio e enzimas antioxidantes, escassas no 1º trimestre da gestação, contribui para disfunção e/ou dano celular. Consequentemente há alteração na angiogênese e no desenvolvimento das membranas ovulares, além de reação inflamatória crônica e estímulo à atividade miometrial²⁴.

Em revisão sistemática e metanálise, Tuuli et al.¹⁸ (2011), identificaram sete estudos de relevância sobre o tema que incluíam em sua totalidade 1.735 mulheres portadoras de hematoma e 70.703 controles. Na metanálise, os hematomas intrauterinos de primeiro trimestre foram associados a abortamento espontâneo de primeiro e segundo trimestres e óbito intrauterino. Também mostraram associação com risco aumentado para descolamento de placenta, trabalho de parto prematuro e rotura prematura de membranas ovulares. A associação com o desenvolvimento de pré-eclâmpsia e restrição de crescimento intraútero, descrita na literatura por outros autores^{13, 22, 24, 63}, não foi estatisticamente significativa na metanálise de Tuuli et al.

Todavia, estudo recente publicado por Naert et al. (2019) não demonstrou associação entre a presença de HIU no primeiro trimestre e complicações gestacionais. Os autores analisaram retrospectivamente 2.172 gestações abaixo de 14 semanas, entre elas 389 (17,9%) com hematoma subcoriônico. A presença isolada do HIU não aumentou o risco de desfechos adversos ou complicações gestacionais após a 20^a semana de gestação, tais como parto pré-termo, hipertensão gestacional. Pré-eclâmpsia, descolamento prematuro de placenta, óbito intrauterino além de não alterar no momento e via de parto⁶⁴.

No mesmo estudo descrito acima, os autores observaram que 31% das pacientes com hematoma referiam sangramento no momento do exame ultrassonográfico⁶⁴. O sangramento vaginal é a manifestação clínica mais prevalente da presença de um hematoma subcoriônico. Estima-se que, entre 18 e 39% das pacientes avaliadas por queixa de sangramento vaginal apresentem pelo menos um hematoma intrauterino^{15, 17} e cerca de 70% das pacientes com hematomas apresentem algum grau de sangramento durante a gestação^{22, 24}. Dessa forma, cerca de 30% das pacientes com hematomas intrauterinos serão assintomáticas.

Mesmo na ausência de exteriorização do sangramento vaginal a quebra da barreira placentária existe e complicações gestacionais, tais como, a hemorragia fetomaterna, é possível. Essa complicação, descrita na literatura para os quadros de sangramento vaginal, ainda não foi explorada nos casos de pacientes assintomáticas portadoras de hematoma intrauterino.

3.3 Aloimunização RhD

Mulheres RhD negativo expostas a sangue fetal RhD positivo durante a gestação estão sob risco de aloimunização RhD. Trata-se da resposta imune à antígenos de superfície eritrocitária fetal do tipo D, estranhos ao organismo materno^{65, 66}, que leva à produção de anticorpos maternos do tipo anti-D.

Embora as circulações materna e fetal sejam separadas, mesmo em pacientes assintomáticas e de maneira silenciosa, existe a passagem de eritrócitos fetais para a circulação materna^{1, 2, 8}. Eventos como abortamentos, gestações ectópicas, sangramentos durante a gestação e parto e procedimentos como biópsia de vilo corial, amniocentese, curetagem uterina pós-abortamento e tratamento cirúrgico de prenhez ectópica podem levar a uma maior exposição da mãe ao sangue fetal e, consequentemente, à aloimunização RhD⁸.

As hemácias fetais são capazes de expressar o antígeno RhD em idade gestacional tão precoce como 38 dias após a concepção ou 52 dias após a data da última menstruação⁶⁷. Apesar do antígeno RhD ser conhecidamente forte desencadeador da resposta imune, esta resposta é bastante variável entre os indivíduos. Estudos realizados na década de 1960 com homens RhD negativo demonstraram que injeções intravenosas de quantidades tão pequenas como 0,1 ml de hemácias RhD positivo seriam suficientes para aloimunizar alguns indivíduos^{5, 8, 9}.

Seguindo esse mesmo raciocínio, de pequenos volumes de sangue positivo resultando em aloimunização, Em coorte realizada com mulheres usuárias de drogas endovenosas, Lappen et al. (2016) observaram que o compartilhamento de seringas entre gestantes com sangue RhD positivo e RhD negativo seria fator de risco para ocorrência de aloimunização⁶⁸. O estudo incluiu 16.327 gestantes sendo identificadas 305 pacientes usuárias de drogas injetáveis. A aloimunização foi mais frequente no grupo de usuárias de drogas endovenosas (11 de 305 pacientes; 3,8%) que no grupo de não usuárias (288 de 16022 mulheres; 1,8%, risco relativo de 2,0, IC 95%, 1,11-3,62). As pacientes inclusas na avaliação não possuíam outros fatores de risco associados, tais como história obstétrica ou antecedente de transfusão sanguínea.

A primeira exposição ao antígeno de superfície RhD resulta na produção de anticorpos anti-D da classe IgM, que possuem meia-vida curta, mas que rapidamente mudam para uma resposta do tipo IgG²⁵. Em uma nova exposição antigênica, em geral, em gestação subsequente, linfócitos B de memória, estimulados pela presença do antígeno produzem IgG em grande quantidade. Estes anticorpos são capazes de atravessar a barreira placentária e opsonizar hemácias fetais RhD positivo. A aloimunização pode levar à anemia fetal, hidropsia, óbito intraútero, doença hemolítica do recém-nascido e óbito neonatal^{8, 25, 65}.

A profilaxia da aloimunização e consequentemente da doença hemolítica perinatal (DHPN) pela incompatibilidade RhD é realizada, desde a década de 1970 com a administração de imunoglobulina anti-D⁸. Esta deve ser administrada a todas as gestantes RhD-negativo até 72 horas após o parto de recém-nascido RhD positivo. A realização de uma dose adicional na 28^a semana para gestantes não sensibilizadas, seguida pela dose pós-parto, reduziu para menos de 0,2% as taxas de sensibilização materna e é o protocolo utilizado atualmente na maior parte dos países^{8, 9, 65}.

O *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG)⁸ (2017), em revisão sistemática, também orienta a administração de imunoglobulina anti-D após procedimentos invasivos nas versões cefálicas, gestações molares, abortamentos de primeiro trimestre espontâneos e instrumentados, interrupções da gestação, hemorragias após a 20^a semana da gestação, trauma abdominal e óbito fetal intraútero nos segundo e terceiro trimestres.

3.3.1 Profilaxia da aloimunização RhD nas gestantes com sangramento vaginal

Na literatura é descrito que entre 3 e 11% das mulheres com sangramento vaginal nos primeiro e segundo trimestres, e aproximadamente 45% das pacientes com parto no terceiro trimestre apresentem algum grau de HFM⁸ e que esta possa ser significativa mesmo com um baixo volume fetoplacentário (ao redor de 3 ml na 12^a semana de gestação) e representar risco para a mãe de desenvolvimento de anticorpos anti-D³⁶.

Não existe um consenso sobre a realização da profilaxia anti-D para quadros de sangramento no 1º trimestre, e estudos disponíveis e diretrizes são

controversos ^{5, 69-71}. O ACOG ⁸ (2017) não faz recomendações quanto ao uso da profilaxia para sangramentos antes da 12^a semana por falta de evidências que sustentem tal medida. Moise ²⁵ (2008) descreve que, embora controversa, a imunoglobulina deva ser administrada em quadros de ameaça de abortamento, porém com dose inferior à habitual, uma vez que há menor volume fetoplacentário e, consequentemente, de eritrócitos fetais na circulação materna. Autores que defendem a profilaxia enfatizam a gravidade da doença hemolítica perinatal (DHPN) e o baixo risco da imunoglobulina ^{4, 5, 9, 71}.

Em diretriz britânica sobre o uso de imunoglobulina anti-D para a prevenção da DHPN, Qureshi et al. ²⁷ (2014) recomendam que a profilaxia nos quadros de sangramento vaginal no 1º trimestre só deve ser realizada se o sangramento for de grande quantidade, repetitivo ou associado à dor abdominal. A administração da imunoglobulina deve ser mantida para todos os casos de abortamento, gestação ectópica ou gestação molar.

Em revisão da Sociedade de Obstetrícia e Ginecologia do Canadá, Fung et al. ⁷¹ (2018) defendem que as evidências para se indicar a profilaxia nos quadros de sangramento de primeiro trimestre são fracas, porém a recomendação da profilaxia é mantida em vista da presença de estudos como os de Von Stein et al. ⁴ que demonstram maior taxa de HFM nos quadros de sangramento de primeiro trimestre.

4 Métodos

4 MÉTODOS

4.1 Delineamento da pesquisa

Estudo prospectivo envolvendo gestantes de 1º trimestre avaliadas no ambulatório de primeira consulta de Pré-natal da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Pronto-Socorro de Obstetrícia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo no período entre fevereiro de 2019 e fevereiro de 2020.

4.2 Ética em pesquisa

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAAE:63241616.9.0000.0068) e pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (CAAE:63241616.9.3001.0076).

As pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram convidadas a participar do estudo, após serem esclarecidas de seus objetivos e seus aspectos práticos. Após os devidos esclarecimentos, as pacientes definiram seu aceite pela leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo D).

4.3 Casuística

4.3.1 Cálculo do tamanho amostral

Uma vez que não há estudos na literatura que quantifiquem a HFM em hematomas subcoriônicos de 1º trimestre, para o estudo desta condição considerou-se mais adequado utilizar publicações que avaliassem a presença de hemorragia fetomaterna em quadros de sangramento vaginal. Sendo assim, para a determinação do tamanho amostral utilizou-se o trabalho de Von Stein et al. (1992)⁴, cujo objetivo

era comparar o volume de HFM entre pacientes com ameaça de abortamento (casos) com pacientes assintomáticas internadas para abortamento eletivo (controles), utilizando para esta análise o teste de Kleihauer-Betke.

Foi utilizado como parâmetro um valor mínimo de HbF% de 0,07% pelo K-B, os autores observaram que 11,24% dos casos e 4,26% das pacientes do grupo controle apresentavam HFM. A opção por um estudo que fez uso de técnica diferente para quantificação da HFM deu-se pelo fato de não existirem publicações semelhantes que quantifiquem a HbF% circulante pela técnica de citometria de fluxo, considerada atualmente uma técnica melhor e mais acurada para quantificação da HFM³⁵.

Para este estudo considerou-se que a frequência de HFM no grupo com hematoma intrauterino sem sangramento vaginal (casos) possa ser semelhante ao observado por Von Stein et al. para o grupo com ameaça de abortamento (11,24%) e no grupo sem hematoma e assintomático (controles) comparável à dos controles dos autores, isto é 4,26%. Para demonstrar diferença significativa entre os grupos com hematoma e sem hematoma, calculou-se que seriam necessários para a amostra 54 pacientes (sendo 18 casos em cada grupo), considerando o poder do teste de 80.

4.3.2 Critérios de inclusão

- Gestação única e tópica;
- Embrião/feto vivo;
- Idade gestacional até 13 semanas e 6 dias;
- Para o grupo hematoma: presença de hematoma intrauterino ao exame ultrassonográfico, ausência de sangramento vaginal ativo ou prévio;
- Para o grupo sangramento: presença de sangramento vaginal ativo ou referido nas últimas 24 horas;
- Para o grupo controle: ausência de sangramento vaginal ativo ou prévio e ausência de hematoma ao exame ultrassonográfico;
- Ausência de tentativa de interrupção da gestação;
- Ausência de realização de procedimentos invasivos (biópsia de vilo corial);

- Ausência de gestação molar e
- Ausência de hemoglobinopatia materna.

4.3.3 Critérios de exclusão

- Paciente com resultados muito discrepantes de hemorragia feto materna, sem causa definida.

4.3.4 Seleção das pacientes

No período entre 20 de fevereiro de 2019 e 11 de fevereiro de 2020, foram selecionadas do Ambulatório de primeira consulta da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e no Pronto Socorro de Obstetrícia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, 67 pacientes a partir do exame ultrassonográfico de primeiro trimestre.

As gestantes que cumpriram os critérios de inclusão foram convidadas a participar do estudo. Após a seleção de cada paciente dos grupos HIU e SVA, as pacientes assintomáticas eram selecionadas considerando pareamento pela idade gestacional, com intervalo de até uma semana em relação aos outros grupos.

Após a etapa de análise das amostras, uma paciente do grupo com SVA foi excluída do estudo por apresentar HFM não compatível com a idade gestacional estudada. A estimativa de volume de sangue fetal transferido para essa paciente foi 56 ml. Não foram identificadas irregularidades de coleta e análise, porém como não foi possível repetir estas etapas, optou-se pela exclusão da mesma. A amostra final foi de 66 pacientes.

4.4 Procedimento do estudo

As pacientes que cumpriram os critérios de inclusão foram convidadas pela pesquisadora executante (TARMN) a participar do estudo. Após esclarecimentos sobre a pesquisa, as pacientes que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo D).

4.4.1 Coleta de dados

Os dados clínicos coletados foram:

- Idade materna (em anos);
- Cor (branca, preta, parda, amarela);
- Índice de massa corpórea (em Kg/m^2);
- Idade gestacional (em semanas);
- Paridade (nulípara / multípara);
- Patologias prévias a gestação;
- Tabagismo (sim / não);
- Drogadição (sim / não);
- Etilismo (sim / não).

4.4.2 Datação da gestação

A idade gestacional foi calculada a partir da data da última menstruação referida, foi comparada com a biometria fetal, conforme a medida do comprimento cabeça-nádega (CCN) obtida em imagem sagital estrita do polo cefálico e tronco fetais em posição neutra⁷². Nos casos em que a discrepância foi igual ou superior a 5 dias, foi utilizada a idade gestacional calculada de acordo com o CCN.

4.4.3 Avaliação ultrassonográfica de primeiro trimestre

Os exames ultrassonográficos de 1º trimestre foram realizados por via transvaginal e, quando necessário, complementados pela via transabdominal, utilizando os seguintes aparelhos: TOSHIBA (modelo Aplio XG) e GE (modelos 730 e E8). Os parâmetros ecográficos avaliados foram:

- Diâmetro médio do saco gestacional (mm);
- Volume estimado do saco gestacional (VSG)(cm^3), obtido pela multiplicação dos diâmetros longitudinal, anteroposterior e transversal pela constante 0,52⁷³;
- Comprimento cabeça-nádega (mm);

- Localização da placenta (anterior, posterior, fúndica, istmocervical);
- Localização do hematoma
 - Subcoriônico (abaixo do cório liso) ou retrocoriônico (abaixo do corio frondoso)
 - Anterior, posterior, fúndico ou istmocervical;
- Volume total estimado do hematoma (mm^3), obtido pela multiplicação dos diâmetros longitudinal, anteroposterior e transversal do HIU pela constante 0,52⁷³ e
- Tamanho do HIU: Classificação do tamanho do HIU em pequeno, médio e grande pela relação do volume do hematoma e do VSG. Pequeno: volume do hematoma <20% do VSG; médio: volume do hematoma entre 20 e 50% do VSG; grande: volume do hematoma > 50% do VSG.

4.4.4 Diagnóstico ultrassonográfico de hematoma

O hematoma foi definido como coleção anecoica ou hipoeecogênica localizada entre o cório e a parede uterina, podendo envolver apenas o cório liso ou também o cório frondoso^{15, 17-20}.

4.4.5 Coleta de sangue materno e quantificação da hemorragia fetomaternal por citometria de fluxo

Para a quantificação da hemorragia fetomaternal pela técnica de citometria de fluxo, inicialmente foram coletados 5 ml de sangue por punção periférica venosa em tubos contendo etilenodiamino tetracético (EDTA) das pacientes selecionadas para o estudo.

As amostras foram coletadas pelas equipes de enfermagem do ambulatório da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e do Pronto Socorro de Obstetrícia do Hospital Universitário da USP ou por um dos investigadores da pesquisa. Após a coleta foram refrigeradas a 4 °C e encaminhadas para processamento pela equipe do Laboratório de Investigação Médica da Obstetrícia (LIM-57) em intervalo máximo de 48 horas.

Para preparo das amostras para a técnica de citometria de fluxo foi utilizado o Fetal Cell Count™ Kit (IQ Products, Groningen, The Netherlands) ⁵⁵ (Figura 6). Para a adequada identificação e separação dos grupos celulares nos citogramas, foram utilizadas, para cada processamento, uma amostra de sangue de cordão e uma amostra de sangue de homem adulto, coletadas com intervalo inferior a 24 horas à análise dos casos.

FONTE: iqproducts.nl/products/perinatal/fetal-cell-count-kit-diagnosis-of-fetomaternal-hemorrhage/

Figura 6 - Fetal Cell Count™ Kit, IQ Products

Para a detecção das hemácias fetais em sangue materno pela técnica de citometria de fluxo foram utilizados dois anticorpos conjugados a marcadores de fluorescência presentes no Fetal Cell Count™ Kit. No processamento do sangue, as células inicialmente são permeabilizadas e, em seguida marcadas por um marcador anti-HbF conjugado à ficoeritrina (PE) e um marcador antianidrase carbônica (anti-CA) conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC). O processo de permeabilização celular e marcação da fluorescência é realizado, conforme orientação do fabricante e está descrito abaixo:

- Procedimento para detecção de HFM com Fetal Cell Count™ kit:

Para cada experimento realizado foram utilizadas as amostras de pacientes coletadas, uma amostra de homem adulto como controle negativo e uma amostra

controle positivo obtida da mistura de sangue do homem adulto e sangue de cordão umbilical. Para cada amostra, foram realizados os seguintes passos:

A. Processo 1: Fixação e permeabilização:

1. Adicionar 100 μ L do reagente A (solução de permeabilização- contendo $<0,1\%$ de azida de sódio) em tubo de fundo cônico.
2. Adicionar 10 μ L de sangue total (5 μ L de concentrado de hemácias) anticoagulado com EDTA e turbilhonar a amostra manualmente;
3. Adicionar ao conteúdo do tubo 100 μ L do reagente B (solução de fixação- Formaldeído Xn R20/21/22, 36/37/38, 40, 43 tamponado) e realizar novo turbilhonamento manual;
4. Incubar a suspensão de células em temperatura ambiente por 30 minutos.
5. Adicionar 2 ml de reagente D inverter os tubos manualmente por algumas vezes.
6. Centrifugar a 300xg por 3 minutos;
7. Descartar o sobrenadante;
8. Adicionar 100 μ L de 1x reagente D;
9. Suspender e turbilhonar o *pellet* de células;
10. Adicionar 100 μ L de reagente C e turbilhonar amostras (tempo exato de incubação de 3 minutos);
11. Após 3 minutos: adicionar 2 ml de 1x reagente D e inverter os tubos algumas vezes para mistura de células;
12. Centrifugar a 300xg por 3 minutos;
13. Descartar o sobrenadante;
14. Adicionar 2 ml de reagente D e ressuspender o *pellet* de células invertendo os tubos algumas vezes;
15. Centrifugar a 300xg por 3 minutos;
16. Descartar o sobrenadante; e
17. Turbilhonar e ressuspender o *pellet* de células em 1 ml de reagente D.

Após o passo 17, as células estão prontas para receber os marcadores de imunofluorescência (Figura 7).

Fonte: Arquivo pessoal, Laboratório de Investigação Médica 57 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Figura 7 - Amostras prontas para receber anticorpos marcados com imunofluorescência

B. Processo 2: Marcação por Imunofluorescência:

18. Adicionar em novo tubo de fundo cônico e misturar:
 - a) 50 μ L reagente E - anti-CA humano FITC
 - b) 50 μ L reagente F- anti-HbF-R humano PE
 - c) 50 μ L suspensão de eritrócitos obtidas no item 17.
 19. Incubar amostras em temperatura ambiente por 15 minutos protegidas da luz.
 20. Centrifugar a 300xg por 3 minutos.
 21. Descartar o sobrenadante.
 22. Ressuspender o *pellet* de células em 50 μ L de reagente D.
- Após a etapa 22, as células estão prontas para leitura pelo citômetro.

O anti-HbF marca hemácias fetais e eritrócitos maternos portadores de hemoglobina fetal, as chamadas células F e o anti-CA marcam apenas eritrócitos maternos. O uso dos dois anticorpos permite separar três populações celulares no

citômetro pela fluorescência: eritrócitos fetais (HbF+, CA-), eritrócitos adultos maternos (HbF-, CA+) e células F maternas (HbF+, CA+) ⁵⁵.

Para a quantificação dos eritrócitos fetais, foi utilizado o software FlowJo do citômetro BD FACS CANTO II™ (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, EUA) (Figuras 8 e 9). Em vista da idade gestacional precoce e do baixo volume de células fetais, foram adquiridos 2.000 eventos para cada amostra com o objetivo de construir um histograma de dispersão dos sinais de fluorescência (FL1 e FL2) que possibilitasse a identificação da região contendo eritrócitos e a distinção entre as populações celulares ⁷⁴.

FONTE: Arquivo pessoal, Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Figura 8 - Citômetro de Fluxo BD FACS CANTO II do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FONTE: Arquivo pessoal, Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Figura 9 - Obtenção dos citogramas com a distribuição das células marcadas por imunofluorescência

Os eritrócitos fetais marcados são expressos nos resultados da citometria de fluxo por HbF%. Para análise neste estudo, evitou-se a conversão do HbF% para volume de hemorragia feto materna por não existir um consenso sobre a melhor fórmula para tal cálculo ^{1, 35, 75}, todavia a maior parte dos estudos utiliza a equação descrita por Mollison (1972) ⁷⁵⁻⁷⁷ que considera o volume estimado de eritrócitos maternos de 1.800ml e a média de eritrócitos fetais 22% maior quando comparada à de eritrócitos maternos percentualmente.

% de eventos positivos (células fetais) X (1.800/100) X (122/100) = ml de eritrócitos fetais

Inicialmente resultado obtido refere-se ao concentrado de hemácias fetais e deve então ser multiplicado por 2 para se chegar ao volume total de hemorragia fetomaterna, considerando-se que o hematócrito fetal é de aproximadamente, 51% ⁷⁷.

Apesar das análises serem realizadas em até 72 horas da coleta do sangue materno, os resultados foram liberados e as interpretações realizadas ao término da análise de todos os casos. Portanto, não houve repetição da análise das amostras.

4.4.6 Análise estatística

Para a análise estatística foram utilizados os softwares Microsoft Excel versão 2010 na construção do banco de dados e IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY) para os cálculos estatísticos.

As variáveis quantitativas foram resumidas por meio de média e desvio-padrão ou de mediana e valores mínimo e máximo. As variáveis qualitativas foram apresentadas por frequências absolutas (n) e porcentagens (%).

Para as variáveis quantitativas na comparação entre os três grupos (HIU, sangramento vaginal e assintomáticas) aplicou-se, para avaliar a distribuição dos dados, o teste de Komolgorov-Smirnov. Para os dados com distribuição normal, utilizou-se o teste ANOVA, para as análises e aos dados que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para a análise de variáveis quantitativas com a comparação de dois grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney

A análise da associação entre variáveis qualitativas foi realizada pelo teste Exato de Fisher e a correlação entre as variáveis foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Spearman. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população

Inicialmente foram selecionadas para este estudo 67 pacientes, 22 no grupo com HIU, 18 no grupo com SVA e 27 pacientes no grupo ASS (grupo referência), que cumpriram os critérios de inclusão. Uma paciente do grupo SVA teve a amostra de sangue analisada, porém não foi incluída nos resultados, pois foi mensurado um volume de HFM equivalente a 56ml de sangue fetal, o que não é compatível com a idade gestacional estudada. Não foi identificada uma causa para o volume obtido, todavia, por se tratar de uma taxa de HFM muito superior a encontrada em situações pós-parto, optou-se por considerar esta paciente, como um outlier. A exclusão dessa paciente não alterou o resultado das análises, mas melhorou a visualização gráfica das variáveis analisadas. Ao final foram incluídas 66 pacientes, sendo 22 do grupo com HIU, 17 do grupo com SVA e 27 do grupo ASS.

Nos dados da Tabela 1, são apresentadas as características da população estudada. Os grupos foram similares em relação à idade materna, cor, presença de abortos prévios, IMC, tabagismo e a presença de comorbidades em geral (HAS, DM e trombofilia). O tempo de análise das amostras nos três grupos também foi semelhante, com a maioria sendo analisada em intervalo de tempo inferior a 24 horas e nenhuma análise realizada após 72 horas da coleta do sangue.

Tabela 1 - Características demográficas da população estudada de gestantes com hematoma, com sangramento vaginal e pacientes assintomáticas - HCFMUSP- fev. 2019 a fev. 2020

	Hematoma (n=22)	Sangramento (n=17)	Assintomáticas (n=27)	p
Idade materna - anos; média ± DP	31,18±4,84	30,94±6,36	30,59±5,79	0,935*
Cor - n (%)				
Branca	14 (63,6)	10 (58,8)	18 (66,7)	
Negra	4 (18,2)	3 (17,6)	9 (33,3)	0,139§
Parda	4 (18,2)	4 (23,5)	0 (0,0)	
Paridade – n (%)				
Nulíparas	11 (50,0)	8 (47,1)	12 (44,4)	0,928§
Múltiparas	11 (50,0)	9 (52,9)	15 (55,6)	
Abortos prévios -n (%)	4 (18,2)	3 (17,6)	7 (25,9)	0,800§
IMC¹ ± DP	27,42±4,94	25,24±5,40	27,80±4,78	0,234*
Tabagismo – n (%)	0 (0,0)	2 (11,8)	3 (11,1)	0,251§
Comorbidades –n (%)²	8 (36,4)	8 (47,1)	18 (66,7)	0,102 ^e
HAS	3 (13,6)	1 (5,9)	4 (14,8)	0,797§
DM	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,7)	1,000§
Trombofilia	0 (0,0)	3 (17,6)	1 (3,7)	0,084§
Tempo de análise <24h³ n(%)	16 (72,7)	13 (76,5)	22 (81,5)	0,053§

¹ Índice de massa corporal (Kg/m²)

² Doenças clínicas prévias à gestação: HAC, DM, distúrbios da tireoide, cardiopatia, trombofilia, evento tromboembólico prévio.

³Nenhuma análise foi realizada acima de 72h

Testes estatísticos aplicados *ANOVA, §Teste exato de Fisher, ^e Razão de Verossimilhança.

5.2 Caracterização das variáveis ultrassonográficas

Os dados da Tabela 2 apresentam a descrição dos parâmetros ultrassonográficos dos grupos estudados. Não foram observadas diferenças significativas quanto à idade gestacional dos grupos, o CCN médio do embrião e VSG (cm³). O resultado demonstra um bom pareamento das amostras.

Tabela 2 - Parâmetros ultrassonográficos das gestantes com hematoma intrauterino, com sangramento vaginal ativo e pacientes assintomáticas - HCFMUSP - fev. 2019 a fev. 2020

	Hematoma (n=22)	Sangramento (n=17)	Assintomáticas (n=27)	P
IG- semanas; média ± DP	8,94±1,24	9,18±1,28	8,89±1,35	0,630 ^{&}
CCN; média± DP (mm)	22,59±12,03	25,24±9,48	23,78±11,53	0,767*
VSG; média± DP (cm3)	20,06±14,82	20,47±14,12	27,61±26,79	0,376*

Testes estatísticos aplicados *ANOVA, & Kruskal-Wallis.

5.3 Porcentagem de hemoglobina fetal e HFM

Nos dados da Tabela 3 é apresentada a porcentagem de hemoglobina fetal (HbF%) circulante em sangue materno nos três grupos estudados.

No grupo com HIU, 15 pacientes (68,2 %) apresentaram alguma porcentagem de hemoglobina fetal (HbF%) circulante em sangue materno; no grupo sangramento 13 (77,8%) e no grupo de pacientes assintomáticas 20 tiveram HbF% positivo (74,1%). Não foi observada diferença significativa entre os três grupos para presença de HbF% ($p=0,830$; Teste Exato de Fisher). O grupo com HIU apresentou HbF% médio de 0,054, com mediana de 0,024 (0,00-0,238) e os valores para os grupos SV e ASS foram respectivamente 0,012, com mediana de 0,003 (0,000-0,072) e 0,042, com mediana de 0,031 (0,000-0,164), sem apresentar diferença entre os grupos ($p=0,141$; Kruskal-Wallis) (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição dos casos positivos para hemoglobina fetal (HbF) e porcentagem de hemoglobina fetal circulante (HbF%) entre as pacientes com hematoma intrauterino (HIU), pacientes com sangramento vaginal (SVA) e pacientes assintomáticas (ASS) - fev. 2019 a fev. 2020

Grupo	Casos com HbF positivo (%)	P	HbF%		P
			Média (DP)	Mediana (min, máx)	
HIU (n=22)	15 (68,2)		0,054 (0,067)	0,043 (0,000-0,238)	
SVA (n=17)	13 (76,5)	0,830*	0,012 (0,019)	0,003 (0,000-0,072)	0,141 ^{&}
ASS (n=27)	20 (74,1)		0,042 (0,045)	0,031 (0,000-0,164)	

Testes estatísticos aplicados: [&] Kruskal-Wallis, *Teste Exato de Fisher.

Para estimativa da taxa de hemorragia fetomaterna, a fórmula aplicada para a conversão de HbF% em HFM em mililitros de sangue foi a de Mollison ⁷⁶. Os dados da Tabela 4 mostram a distribuição, em mililitros de sangue fetal da HFM nos três grupos estudados.

Tabela 4 - Hemorragia fetomaterna (HFM), em mililitros de sangue fetal, nas pacientes com hematoma intrauterino (HIU), pacientes com sangramento vaginal (SVA) e pacientes assintomáticas (ASS) - fev. 2019 a fev. 2020

Grupo	Casos com HbF positivo (%)	P	HFM		P
			Média (DP)	Mediana (min-máx)	
HIU (n=22)	15 (68,2)		2,35 (2,92)	1,89 (0,00-10,45)	
SVA (n=17)	13 (76,5)	0,830*	0,51 (0,84)	0,13 (0,00-3,17)	0,141 ^{&}
ASS (n=27)	20 (74,1)		1,86 (1,98)	1,36 (0,00-7,20)	

Testes estatísticos aplicados: [&] Kruskal-Wallis, *Teste Exato de Fisher.

5.4 Porcentagem de hemoglobina fetal e idade gestacional

O HbF% não variou com a idade gestacional ($r_{\text{Spearman}} = 0,128$; $p = 0,304$), conforme demonstrado na Figura 10.

Figura 10 - Porcentagem de hemoglobina fetal em relação à idade gestacional (IG) entre as pacientes com hematoma intrauterino (HIU) (n=22), pacientes com sangramento vaginal (SVA) (n=17) e pacientes assintomáticas (ASS) (n=27). HbF%= porcentagem de hemoglobina fetal circulante

5.5 Índice de massa corpórea das gestantes e HbF%

Não foi observada correlação entre o HbF% com o IMC das gestantes ($r_{\text{Spearman}}=0,010$; $p=0,938$), conforme demonstrado na Figura 11.

Figura 11 - Porcentagem de hemoglobina fetal em relação ao índice de massa corpórea (IMC) das pacientes com hematoma intrauterino (HIU)(n=22), pacientes com sangramento vaginal (SVA)(n=17) e pacientes assintomáticas (ASS)(n=27). HbF%=porcentagem de hemoglobina fetal circulante

5.6 Porcentagem de hemoglobina fetal e características ultrassonográficas dos hematomas intrauterinos

Do total de 66 pacientes avaliadas no estudo, 22 apresentaram HIU assintomático, sem queixa de sangramento vaginal concomitante. Neste grupo, observou-se que houve correlação moderada, com significância estatística entre o volume médio estimado do hematoma e o HbF% ($r_{\text{Spearman}} = -0,527$; $p = 0,012$), conforme demonstrado na Figura 12. A correlação foi negativa com pacientes com hematomas menores, apresentando maiores taxas de HbF%.

Figura 12 - Porcentagem de hemoglobina fetal circulante em sangue materno (HbF%) em relação ao volume do hematoma, nas pacientes dos grupos com hematoma intrauterino (n=22)

Para a posição do hematoma e sua relação com a cavidade uterina, do total de 22 pacientes, uma paciente apresentou hematoma em parede anterior (4,5%), uma em parede posterior (4,5%), cinco em região fúndica (22,7%) e 15 em região istmocervical (68,2%). Em razão da presença de apenas uma paciente em dois dos grupos não foi possível estabelecer uma associação estatística para o HbF% a essa variável. Quando considerados apenas os dois grupos mais prevalentes, de HIU fúndico e istmocervical, a diferença do HbF% entre esses grupos não foi estatisticamente significativa ($p=0,309$), conforme os dados da Tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição da hemoglobina fetal entre pacientes com hematoma intrauterino (HIU), com posição de hematoma em região fúndica e istmocervical

	N (%)	Média (DP)	Mediana (min, máx)	P
HIU fúndico	5 (22,7%)	0,031 (0,037)	0,019 (0,000-0,880)	0,309 ^Ω
HIU istmocervical	15 (68,2%)	0,068 (0,074)	0,056 (0,000-0,238)	

Teste estatístico aplicado: ^ΩMann-Whitney.

O mesmo foi observado para a posição do hematoma em relação à placenta. Vinte das 22 pacientes (90,9%) do grupo de HIU apresentaram hematomas subcoriônicos que atingiam a borda placentária, uma paciente (4,5%) apresentou hematoma localizado totalmente atrás da massa placentária (retroplacentário) e mais uma (4,5%) apresentou hematoma localizado totalmente oposto à placenta. Pela distribuição das pacientes pelos três diferentes grupos, não foi possível estabelecer diferença estatística para o HbF%, mas apenas observar que, na população estudada, a frequência de hematomas subcoriônicos que atingiram a borda placentária foi muito maior do que os demais tipos.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A quebra da barreira placentária que ocorre em casos de HIU e sangramentos vaginais de 1º trimestre levam a um influxo de sangue materno e fetal nos espaços intervilositários e na passagem de eritrócitos fetais para a circulação materna. O diagnóstico dessa transfusão, que chamamos de HFM, é muito importante pelo risco que ela representa às gestantes Rh D negativo que respondem com produção de anticorpos e destruição imunomediada de hemácias fetais com sérias consequências ao futuro reprodutivo dessas pacientes. As perguntas que deram origem a este estudo foram de ordem prática: frente a uma gestante Rh D negativo de primeiro trimestre com HIU assintomático deveríamos nos preocupar em administrar a imunoglobulina anti-D? Faria diferença o volume ou a posição do HIU em relação à placenta nesta decisão? A literatura não oferece resposta no que diz respeito aos HIU de primeiro trimestre. Moise (2017) cita a provável não indicação de imunoglobulina nos HIU, mas toma como base estudos com abortamentos e ameaça de abortamento de primeiro trimestre e refere à falta de estudos neste tópico ⁹.

Avaliar o processo de aloimunização é muito mais complexo do que apenas avaliar a presença de HbF% ou HFM. É necessário que se tenha um grupo significativo de gestantes Rh D negativo e que seja possível avaliar não só a ocorrência de eventos possivelmente sensibilizantes que levem ao aumento de eritrócitos fetais circulantes no sangue materno, mas avaliar a sensibilização propriamente dita. Mesmo não sendo possível responder se ocorre ou não a aloimunização, sabe-se que ela é possível desde o primeiro trimestre de gestação ⁶⁷, e que na literatura, há relatos de que ocorra com volumes muito pequenos de transfusão de sangue RhD positivo para a circulação de indivíduo Rh D negativo ^{5, 8, 9, 68}. Assim, mesmo pequenos volumes transfundidos em qualquer idade gestacional poderiam ser capazes de aloimunizar essas pacientes Rh D positivo, sendo importante a avaliação da HFM em situações de risco.

Para avaliar a HFM nas pacientes com HIU assintomáticas de 1º trimestre, optou-se por comparar a frequência de eritrócitos fetais expressa em HbF%, em pacientes deste grupo com o HbF% de gestantes com sangramento vaginal e

gestantes sem HIU e sem sangramento de mesma idade gestacional. Todas as gestações estão sujeitas à transferência de células fetais para a circulação materna, mesmo que em quantidade mínima ¹ e, como na literatura, não há um consenso sobre o HbF% ou volume de HFM esperado ou considerado normal para o 1º trimestre da gestação, optou-se pela análise comparativa entre os grupos. Os resultados obtidos demonstraram que não há diferença significativa entre o HbF% circulante no sangue das pacientes dos três diferentes grupos e, consequentemente, na taxa de HFM.

Jauniaux et al. (2005), ao explicarem a circulação intervilositária, consideraram que, em uma gestação de desenvolvimento normal, não se espera um fluxo significativo placentário até o final do 1º trimestre ou, aproximadamente, a 10ª semana de gestação ¹². Os autores discutem que, até esta idade gestacional, existiria a formação de tampões celulares que ocluem as terminações das artérias espiraladas, criando uma barreira trofoblástica que dificultaria a entrada de sangue no espaço interviloso e, consequentemente, boa parte das trocas entre sangue materno e fetal. Com isso, é possível inferir que, mesmo que a transferência de células fetais para a circulação materna seja possível desde o início da atividade cardíaca fetal ^{4, 5}, esta transferência seria muito pequena em pacientes sem evidência de HIU e sem história de sangramento vaginal. A quebra da barreira placentária nos quadros de HIU e sangramento vaginal implicaria maior stresse oxidativo e influxo de sangue materno e fetal às vilosidades coriônicas com provável maior taxa de HbF% e de HFM nestes grupos em relação ao de assintomáticas. Todavia, não foi o que se observou. Os grupos não foram diferentes em relação à porcentagem de pacientes que apresentaram alguma porcentagem de eritrócitos fetais circulantes diferente de zero, entre as pacientes no grupo com HIU foram 68,2%, na ameaça de abortamento 76,5% e entre as assintomáticas 74,1% com HbF% positivo na circulação ($p=0,830$). Quando se realizou a conversão de HbF% em volume de HFM, o grupo que apresentou menor mediana de volume transferido foi o de pacientes com sangramento vaginal com mediana de 0,13 ml de sangue fetal circulante. Mesmo a diferença não sendo significativa entre os grupos, pelos estudos realizados previamente ^{4, 46} em pacientes com ameaça de abortamento, esse era o grupo em que se esperava encontrar maior HbF%.

Von Stein et al. (1992)⁴ compararam pacientes com ameaça de abortamento e pacientes sem antecedentes de sangramento que internavam para abortamento eletivo. Utilizaram um grupo de pacientes não gestantes de idade pareada para definir, por meio do teste de K-B, um valor mínimo de 0,07 de HbF% de maneira que pacientes com $\text{HbF\%} \geq 0,07$ seriam consideradas positivas. O resultado foi uma maior taxa de pacientes com HFM no grupo com sangramento (11,24%) em relação às pacientes assintomáticas (4,26%), porém com diferença não significativa entre os grupos ($P=0,13$).

Em estudo metodologicamente semelhante, Kuller et al. (1994)⁴⁶ encontraram resultados diferentes, porém também sem diferença estatística. Consideraram como positivo o $\text{HbF\%} \geq 0,04\%$, com 4,1% das pacientes do grupo com sangramento positivo, mas 4,4% do grupo controle (assintomáticas) positivaram. Neste estudo Kuller et al. discutem que, mesmo agrupando as amostras de seu trabalho com o de Von Stein et al. o que resultaria em maior número de casos, não haveria uma diferença significativa entre os grupos, mas que expandindo a amostra, a projeção é de que haveria uma tendência de maior volume de HFM entre as pacientes do grupo com sangramento vaginal.

Extrapolando nossos resultados para o valor de corte do estudo de Von Stein et al. também não teríamos uma diferença significativa entre os grupos. Nessa análise, 27,2% dos pacientes com HIU (seis de 22) apresentaram HbF% acima de 0,07, 11,1% das pacientes do grupo sangramento (dois em 18) e 25,9% das pacientes assintomáticas (sete de 27 pacientes). Assim, embora a frequência de pacientes positivos fosse maior para cada grupo, ainda sim, não haveria diferença significativa entre os grupos.

A diferença na frequência de positivos entre o presente estudo e os estudos de Von Stein et al. e Kuller et al. ocorreu, provavelmente, pelo uso da CF para quantificar o HbF%. Optou-se pela técnica de CF por ser automatizada, mais precisa e menos operador dependente^{33, 35}, sendo a ideal em vista da idade gestacional muito precoce dos casos (<14semanas), na qual se espera um número muito pequeno de células fetais circulantes. Para a técnica de CF, não há estudos em primeiro trimestre avaliando o valor esperado de HbF%. De Wit et al. (2011) analisando gestantes assintomáticas, descreveram uma média de 0,047%, e mediana de 0,025% de HbF%

para idades gestacionais entre 21 e 41 semanas e não demonstraram correlação entre a idade gestacional e o HbF%³³. O esperado seria que, por ter estudado idades gestacionais mais elevadas, De Wit et al. encontrassem valores mais elevados de HbF%, mas os valores que foram encontrados em nosso estudo, foram muito semelhantes tanto para o grupo de pacientes assintomáticas, como nos grupos com HIU e sangramento vaginal, e no presente estudo o HbF% também não se correlacionou com a idade gestacional ($r=0,166$).

A única correlação significativa encontrada contrariou nossas expectativas iniciais. A hipótese de que haveria uma correlação positiva entre HbF% e o volume do HIU resultou em correlação negativa moderada ($r=-0,527$) e com significância estatística ($p=0,012$). No grupo de pacientes com HIU, as pacientes que apresentaram maiores taxas de HbF% circulante foram aquelas com os menores hematomas. Nossa hipótese para esse resultado seria de que as pacientes com hematomas menores, sobretudo nas idades gestacionais mais avançadas, seriam as com HIU de evolução mais arrastada, subaguda ou crônica e que, pela não exteriorização do sangue coletado, estariam expostas ao sangue fetal por mais tempo até a completa reabsorção do HIU. Kuller et al. (1994) também levantaram essa hipótese da exposição crônica/repetitiva, como resposta aos casos de ameaça de abortamento que apresentaram valores de HbF% não condizentes com o volume sanguíneo fetal total para a IG⁴⁶. A outra hipótese é de que, em idades gestacionais mais avançadas, os hematomas tendam a ser relativamente menores em relação ao VSG e poderia existir mais HFM, mas novamente a correlação entre HbF% e IG não foi significativa.

Neste contexto, outra análise pertinente é a influência da posição do hematoma em relação à placenta nas taxas de HbF%. O esperado seria que hematomas retroplacentários desencadeassem uma maior lesão com efeito mecânico e consequentemente, maior influxo de sangue fetal na interface fetomaterna e maior HFM¹⁶. Em nossa análise, não foi possível chegar a essa conclusão, pois, em apenas um dos casos de HIU, o hematoma estava localizado totalmente atrás da placenta, não sendo possível estabelecer correlação estatística. Todavia, é importante reconhecer que em idades gestacionais muito precoces, especialmente, abaixo de 7 semanas, é difícil determinar se o hematoma está totalmente abaixo do trofoblasto²² e, nestes casos, o hematoma foi considerado subcoriônico, o que pode ter

superestimado a prevalência em nosso estudo desse tipo de HIU. Nagy et al. (2003), estudando a significado clínico do HIU de 1º trimestre, citaram essa limitação e preferiram separar as pacientes com hematomas de difícil localização em um terceiro grupo, mas, concluíram que tamanho e posição do hematoma não apresentavam significância estatística para os resultados adversos gestacionais, sendo significativa apenas a presença ou ausência do HIU. Nagy et al. não investigaram a repercussão dos HIU sobre a HFM, e outros estudos com propósito semelhante também não abordam essa possível complicação^{18, 19, 62, 78}.

6.1 Aplicabilidade do estudo

A literatura é ainda muito controversa em relação ao risco de aloimunização e uso da imunoglobulina RhD para sua profilaxia nos casos de ameaça de abortamento no primeiro trimestre^{5, 36, 46, 69, 70}. Nas diversas publicações sobre o tema, os defensores da administração da imunoglobulina o fazem sob a justificativa do baixo risco da medicação frente ao alto risco de complicação gestacional na aloimunização. Mas, considerando que não houve diferença significativa entre a HFM nos três grupos estudados não há, com os resultados obtidos em nosso estudo, embasamento para se indicar a administração de Imunoglobulina anti-D às pacientes Rh D negativo com HIU.

6.2 Limitações do estudo

No que se refere à avaliação da HFM nos três grupos foi o pequeno tamanho amostral que foi insuficiente para compor análises estatísticas mais aprofundadas. Embora haja eventos comuns na clínica obstétrica, o fato do Hospital das Clínicas da FMUSP, ser um hospital terciário e com pronto-atendimento referenciado, tornou difícil a obtenção de casos que, em alguns departamentos de urgência obstétrica, seriam considerados corriqueiros.

Para a avaliação da possibilidade de indicação do uso da imunoglobulina anti-D nas pacientes Rh D negativo, a principal limitação é a de que mesmo se houvesse uma diferença significativa na HFM entre os grupos, apenas a presença de HbF%

circulante em maiores taxas não indicaria, necessariamente, um maior risco de aloimunização nas gestações de primeiro trimestre.

Essa falta de uma resposta acertiva para o risco de aloimunização faz com que muitos centros e protocolos assistenciais mantenham a indicação da imunoglobulina anti-D nos casos de ameaça de abortamento, tendo em vista o baixíssimo risco associado à medicação e à gravidade da aloimunização. Todavia, com nossos resultados, essa recomendação não deve ser extrapolada às pacientes com HIU. São necessários estudos prospectivos, com maior número de pacientes e preferencialmente, que possuam um grupo de pacientes Rh D negativo para melhor avaliação da HFM e risco de sensibilização

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

O presente estudo, envolvendo gestações de primeiro trimestre, concluiu:

- A porcentagem de hemoglobina fetal circulante e, portanto, o volume de hemorragia fetomaterna não diferiu entre pacientes com hematoma intrauterino, com sangramento vaginal ativo e pacientes assintomáticas.
- Pacientes com hematomas de menor volume apresentaram maior taxa de hemoglobina fetal circulante.
- Não foi possível estabelecer associação entre a posição do hematoma e a porcentagem de hemoglobina fetal em razão da distribuição muito desigual dos tipos de hematoma nas pacientes analisadas, com predomínio do hematoma subcoriônico.

8 Anexos

8 ANEXOS

8.1 Anexo A - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pesquisa de hemorragia feto-materna em hematomas subcoriônicos de primeiro trimestre

Pesquisador: Maria de Lourdes Brizot

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 63241616.9.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.905.976

Apresentação do Projeto:

Os autores apresentam projeto relativo à pesquisa de hemorragia feto-materna na ocorrência de hematomas subcoriônicos do primeiro trimestre da gestação. O hematoma intrauterino é um fenômeno comum na rotina ultrassonográfica obstétrica, especialmente no primeiro trimestre, com incidência que varia de 0,4 a 39,5% dos casos. Além de complicações gestacionais e perinatais, o hematoma intrauterino pode provocar ruptura da placa basal placentária e o sangue materno entrar em contato direto com as velocidades planetárias, sendo que para a gestante RhD negativa, ela pode ser sensibilizada quando o feto for RhD positivo, levando à produção de anticorpos anti-D. A aloimunização RhD é um problema de saúde pública que está relacionado com a realização da profilaxia com imunoglobulina anti-D nos casos de hemorragia feto-materna (HFM). Os autores apontam que não se sabe se a presença de hematomas subcoriônicos, na ausência de exteriorização do sangramento, está associada à HFM e consequentemente ao risco de aloimunização. Assim, está sendo proposto estudo prospectivo transversal que incluirá pacientes no primeiro trimestre da gestação divididas em dois grupos após avaliação ultrassonográfica obstétrica transvaginal: com hematoma sub-coriônico (estudo) e sem hematoma sub-coriônico (controle). Em ambos os grupos, de 13 gestantes em cada um, serão coletadas amostras de sangue por punção

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8.2 Anexo B - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Pesquisa (CAPPpesq) da Diretoria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Continuação do Parecer: 1.905.978

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_790996.pdf	20/12/2016 16:04:51		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_ROSTO_20_12_16.pdf	20/12/2016 16:04:26	Maria de Lourdes Brizot	Aceito
Outros	APROVA_CIAPP.pdf	16/12/2016 10:54:56	Maria de Lourdes Brizot	Aceito
Outros	APROVA_CEP_DOG.pdf	16/12/2016 10:54:07	Maria de Lourdes Brizot	Aceito
Outros	CAPPESQ_16_12_16.pdf	16/12/2016 10:53:42	Maria de Lourdes Brizot	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_10_11_2016.doc	16/12/2016 10:53:04	Maria de Lourdes Brizot	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_hemorragia_feto_materna_e_He matoma_Subcorionico_10_11_2016.doc	16/12/2016 10:52:47	Maria de Lourdes Brizot	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 02 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

8.3 Anexo C - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP)

São Paulo, 08 de novembro de 2019.

Il^{ma}(a), Sr^a(a),

Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot

Pesquisador(a) responsável

Faculdade de Medicina

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “Pesquisa de hemorragia feto-materna em hematomas subcoriônicos de primeiro trimestre”

Equipe de pesquisa: Thaisa Andrade Ribeiro Marcondes Narciso, Mara Sandra Hoshida, Priscilla Ramos Costa, Andrea Tome Niquirilo, Lawrence Hsu Lin, Sckarlet Ernandes Biancolin, Rossana Pulcineli Vieira Francisco

CAAE: 63241616.9.3001.0076

Registro CEP-HU/USP: 1820/19

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 18 de outubro de 2019 analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios parciais semestrais e final, de acordo com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, inciso XI.2, letra “d”.

O primeiro relatório está previsto para 18 de abril de 2020.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

8.4 Anexo D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Termo de Consentimento

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Estamos convidando você a participar desta pesquisa, que visa estudar a ocorrência de troca de sangue entre a mãe e o bebê nos casos com hematomas próximos à placenta ou sangramento vaginal no início da gestação e nas gestações sem hematomas e sem sangramento.

2 – Caso você concorde em participar, será realizada coleta de 10 ml de seu sangue. O exame de sangue é realizado pela punção com agulha fina de uma veia de seu braço. No sangue coletado será analisada a presença ou não de células sanguíneas do bebê em seu sangue.

3 – O exame de sangue pode trazer desconforto, ou dor leve no local da punção. Traz como risco o aparecimento de hematoma e raramente infecção local. Você não terá despesas para participar do estudo, e também não terá que retornar para a pesquisa.

4 – Você não terá benefícios diretos neste estudo, porém poderá haver benefícios para as grávidas com tipo de sangue Rh negativo e que apresentarem hematomas.

5 – Se você optar por não participar do estudo, terá acompanhamento pré-natal normal, igual ao das demais gestantes que acompanham neste serviço.

6- Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas e receberá uma via do termo de consentimento. Os pesquisadores responsáveis por esse projeto são Lawrence Hsu Lin, Sckarlet Ernandes Biancolin e Thaisa Andrade Ribeiro Marcondes Narciso. A principal investigadora é a Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot. Os pesquisadores podem ser contatados em: Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, Prédio dos Ambulatórios, decimo andar, ambulatório de obstetrícia, telefone (s) 2661-6380; 2661-6072; 2661-3185 ou 999005703. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar, tel.: 2661-6442, ramais 16, 17, 18, e-mail: ciapp.ichc@hc.fm.usp.br) ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000- São Paulo - SP- Telefone: (11)3091-9457 - E-mail: cep@hu.usp.br

7-Todas as informações obtidas serão guardadas em segredo, e seu nome não aparecerá em nenhum resultado desta pesquisa.

8- Qualquer resultado que você desejar saber sobre a pesquisa, será informado;

9- Não há despesas pessoais para você caso decida participar. Também não há pagamento relacionado à sua participação.

10- Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Pesquisa de hemorragia fetomaterna em hematomas subcoriônicos de primeiro trimestre”**. Eu discuti com os pesquisadores sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data__ / __ / __

Assinatura da testemunha

Data__ / __ / __

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data__ / __ / __

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : _____

SEXO : M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO _____ Nº _____ APTO: _____

BAIRRO _____

CIDADE _____ CEP: _____

TELEFONE: DDD (____) _____

2.RESPONSÁVEL LEGAL: _____

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : _____

SEXO : M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO _____ Nº _____ APTO: _____

BAIRRO _____

CIDADE _____ CEP: _____

TELEFONE: DDD (____) _____

9 Referências

9 REFERÊNCIAS

1. Wylie BJ and D'Alton ME. Fetomaternal hemorrhage. *Obstet Gynecol.* 2010; 115:1039-51.
2. Sebring ES, Polesky HF. Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects. *Transfusion.* 1990;30:344-57.
3. Bowman JM, Pollock JM, Penston LE. Fetomaternal transplacental hemorrhage during pregnancy and after delivery. *Vox Sang.* 1986;51:117-21.
4. Von Stein GA, Munsick RA, Stiver K, Ryder K. Fetomaternal hemorrhage in threatened abortion. *Obstet Gynecol.* 1992;79:383-6.
5. Jabara S and Barnhart KT. Is Rh immune globulin needed in early first-trimester abortion? A review. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:623-7.
6. Tazzari PL, Ricci F, Manfroi S, Pagliaro P. Experience in the evaluation of foeto-maternal haemorrhage by flow cytometry. *Blood Transfus.* 2013;11:462-3.
7. Gielezynska A, Stachurska A, Fabijanska-Mitek J, Debska M, Muzyka K, Kraszewska. Quantitative fetomaternal hemorrhage assessment with the use of five laboratory tests. *Int J Lab Hematol.* 2016;38:419-25.
8. Committee on Practice B-O. Practice Bulletin No. 181: Prevention of Rh D Alloimmunization. *Obstet Gynecol.* 2017;130:e57-e70.
9. Moise KJ, Jr. Overview of Rhesus D alloimmunization in pregnancy. *UptoDate.* 2017.
10. Zipursky A, Israels LG. The pathogenesis and prevention of Rh immunization. *Can Med Assoc J.* 1967;97:1245-57.

11. Jauniaux E, Van Oppenraaij RH, Burton GJ. Obstetric outcome after early placental complications. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2010;22:452-7.
12. Jauniaux E, Johns J, Burton GJ. The role of ultrasound imaging in diagnosing and investigating early pregnancy failure. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005;25:613-24.
13. Saraswat L, Bhattacharya S, Maheshwari A, Bhattacharya S. Maternal and perinatal outcome in women with threatened miscarriage in the first trimester: a systematic review. *BJOG*. 2010;117:245-57.
14. Dighe M, Cuevas C, Moshiri M, Dubinsky T, Dogra VS. Sonography in first trimester bleeding. *J Clin Ultrasound*. 2008;36:352-66.
15. Mantoni M, Pedersen JF. Intrauterine haematoma. An ultrasonic study of threatened abortion. *Br J Obstet Gynaecol*. 1981;88:47-51.
16. Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol*. 2003;162:115-25.
17. Johns J, Hyett J, Jauniaux E. Obstetric outcome after threatened miscarriage with and without a hematoma on ultrasound. *Obstet Gynecol*. 2003;102:483-7.
18. Tuuli MG, Norman SM, Odibo AO, Macones GA, Cahill AG. Perinatal outcomes in women with subchorionic hematoma: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2011;117:1205-12.
19. Maso G, D'Ottavio G, De Seta F, Sartore A, Piccoli M, Mandruzzato G. First-trimester intrauterine hematoma and outcome of pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2005;105:339-44.

20. Deans A, Jauniaux E. Prenatal diagnosis and outcome of subamniotic hematomas. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1998;11:319-23.
21. Seki H, Kuromaki K, Takeda S, Kinoshita K. Persistent subchorionic hematoma with clinical symptoms until delivery. *Int J Gynaecol Obstet.* 1998; 63: 123-128.
22. Nagy S, Bush M, Stone J, Lapinski R, Gardó S. [Clinical significance of subchorionic and retroplacental hematomas detected in the first trimester of pregnancy]. *Orv Hetil.* 2005; 146: 2157-61.
23. Xiang L, Wei Z, Cao Y. Symptoms of an intrauterine hematoma associated with pregnancy complications: a systematic review. *PLoS One.* 2014; 9: e111676.
24. van Oppenraaij RH, Jauniaux E, Christiansen OB, Horcajadas JA, Farquharson RG, Exalto N, ESHRE Special Interest Group for Early Pregnancy (SIGEP). Predicting adverse obstetric outcome after early pregnancy events and complications: a review. *Hum Reprod Update.* 2009;15:409-21.
25. Moise KJ, Jr. Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2008;112:164-76.
26. Fung Kee Fung K, Eason E, Crane J, Armson A, De La Ronde S, Farine D, Keenan-Lindsay L, Leduc L, Reid GJ, Van Aerde J, Wilson RD, Davies G, Désilets VA, Summers A, Wyatt P, Young DC, Maternal-Fetal Medicine Committee, Genetics Committee. Prevention of Rh alloimmunization. *J Obstet Gynaecol Can.* 2003;25:765-73.
27. Qureshi H, Massey E, Kirwan D, Davies T, Robson S, White J, Jones J, Allard S, British Society for Haematology. BCSH guideline for the use of anti-D immunoglobulin for the prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfus Med.* 2014;24:8-20.

28. Devi B, Jennison RF, Langley FA. Significance of placental pathology in transplacental haemorrhage. *J Clin Pathol.* 1968;21:322-31.
29. Greger WP, Steele MR. Human fetomaternal passage of erythrocytes. *N Engl J Med.* 1957;256:158-61.
30. Maier JT, Schalinski E, Schneider W, Gottschalk U, Hellmeyer L. Fetomaternal hemorrhage (FMH), an update: review of literature and an illustrative case. *Arch Gynecol Obstet.* 2015; 292: 595-602.
31. Woodrow JC, Donohoe WT. Rh-immunization by pregnancy: results of a survey and their relevance to prophylactic therapy. *Br Med J.* 1968;4:139-44.
32. Cohen F, Zuelzer WW, Gustafson DC, Evans MM. Mechanisms of isoimmunization. I. The transplacental passage of fetal erythrocytes in homospecific pregnancies. *Blood.* 1964;23:621-46.
33. de Wit H, Nabbe KC, Kooren JA, Adriaansen HJ, Roelandse-Koop EA, Schuitemaker JHN, Hoffmann JJML. Reference values of fetal erythrocytes in maternal blood during pregnancy established using flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* 2011;136:631-6.
34. Meleti D, De Oliveira LG, Araujo Junior E, Caetano ACR, Boute T, Nardozza LMM, Moron AF. Evaluation of passage of fetal erythrocytes into maternal circulation after invasive obstetric procedures. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013;39:1374-82.
35. Kim YA, Makar RS. Detection of fetomaternal hemorrhage. *Am J Hematol.* 2012;87:417-23.
36. de Crespigny L, Davison G. Anti-D administration in early pregnancy - time for a new protocol. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1995;35:385-7.

37. Santamaria M, Benirschke K, Carpenter PM, Baldwin VJ, Pritchard JA. Transplacental hemorrhage associated with placental neoplasms. *Pediatr Pathol.* 1987;7:601-15.
38. Bickers RG, Wennberg RP. Fetomaternal transfusion following trauma. *Obstet Gynecol.* 1983;61:258-9.
39. O'Brien JA, Coustan DR, Singer DB, Taylor MA. Prepartum diagnosis of traumatic fetal-maternal hemorrhage. *Am J Perinatol.* 1985;2:214-6.
40. Pollock A. Transplacental haemorrhage after external cephalic version. *Lancet.* 1968;1:612.
41. Devi B, Jennison RF, Langley FA. Relationship of transplacental haemorrhage to abnormal pregnancy and delivery. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1968;75:659-66.
42. Rubod C, Deruelle P, Le Goueff F, Tunez V, Fournier M, Subtil D. Long-term prognosis for infants after massive fetomaternal hemorrhage. *Obstet Gynecol.* 2007;110:256-60.
43. Litwak O, Taswell HF, Banner EA, Keith L. Fetal erythrocytes in maternal circulation after spontaneous abortion. *JAMA.* 1970;214(3):531-4.
44. Litwak O, Taswell H, Banner E. Transplacental fetal bleeding in spontaneous abortion. *Lancet.* 1969;294:1161-2.
45. Murray S, Barron SL, McNay RA. Transplacental haemorrhage after abortion. *Lancet.* 1970;1:631-4.
46. Kuller JA, Laifer SA, Portney DL, Rulin MC. The frequency of transplacental hemorrhage in patients with threatened abortions. *Gynecol Obstet Invest.* 1994;37:229-31.

47. Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM. *2014 AABB Technical Manual*. 18th ed. Bethesda: AABB Press; 2014.
48. Sebring ES, Polesky HF. Detection of fetal hemorrhage in Rh immune globulin candidates. A rosetting technique using enzyme-treated Rh2Rh2 indicator erythrocytes. *Transfusion*. 1982;22:468-71.
49. Kleihauer E, Braun H, Betke K. [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. *Klin Wochenschr*. 1957;35:637-8.
50. Baiochi E, Camano L, Bordin JO. [Evaluation of fetomaternal hemorrhage in postpartum patients with indication for administration of anti-D immunoglobulin]. *Cad Saude Publica*. 2005;21:1357-65.
51. Ramsey G, College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource C. Inaccurate doses of R immune globulin after rh-incompatible fetomaternal hemorrhage: survey of laboratory practice. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133:465-9.
52. Espinosa A, Finseras K, Storvold G, Wedo T, Fonn K, Mathew S, Seljeflot EB, Vanky E. A case of severe, Silent Fetomaternal Haemorrhage (FMH) detected by mixed-field in the mother's ABO typing. *J Gynecol Res Obstet*. 2016;2(1):61-2.
53. Chambers E, Davies L, Evans S, Birchall J, Kumpel B. Comparison of haemoglobin F detection by the acid elution test, flow cytometry and high-performance liquid chromatography in maternal blood samples analysed for fetomaternal haemorrhage. *Transfus Med*. 2012;22:199-204.
54. Popat N, Wood WG, Weatherall DJ, Turnbull AC. Pattern of maternal F-cell production during pregnancy. *Lancet*. 1977;2:377-9.
55. Porra V, Bernaud J, Gueret P, Bricca P, Rigal D, Follea G, Blanchard D. Identification and quantification of fetal red blood cells in maternal blood by a dual-

color flow cytometric method: evaluation of the Fetal Cell Count kit. *Transfusion*. 2007;47:1281-9.

56. Davis BH, Olsen S, Bigelow NC, Chen JC. Detection of fetal red cells in fetomaternal hemorrhage using a fetal hemoglobin monoclonal antibody by flow cytometry. *Transfusion*. 1998;38:749-56.

57. Austin E, Bates S, De Silva M, Howarth D, Lubenko A, Rowley M, Scott M, Thomas E, White J, Williams M. *Guidelines for the estimation of fetomaternal haemorrhage*. Working Party of the British Committee for Standards in Haematology. Transfusion Task force. London: British Society of Haematology; 2009. p.1-23.

58. Bromilow IM and Duguid JK. Measurement of fetomaternal haemorrhage: a comparative study of three Kleihauer techniques and tow flow cytometry methods. *Clin Lab Haematol*. 1997;19:137-42.

59. Abu-Yousef MM, Bleicher JJ, Williamson RA, Weiner CP. Subchorionic hemorrhage: sonographic diagnosis and clinical significance. *AJR Am J Roentgenol*. 1987;149:737-40.

60. Volpe G, Volpe N, Fucci L, Campobasso G, De Robertis V, Schonauer LM, Volpe P. [Subamniotic hematoma: 3D and color Doppler imaging in the differential diagnosis of placental masses and fetal outcome]. *Minerva Ginecol*. 2008;60:255-61.

61. Shukunami K, Orisaka M, Orisaka S, Nishijima K, Tajima K, Goto K, Kotsuji F. A subamniotic hematoma resembling a deflated balloon. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2004;16:373-5.

62. Pearlstone M, Baxi L. Subchorionic hematoma: a review. *Obstet Gynecol Surv*. 1993;48:65-8.

-
63. Petriglia G, Palaia I, Musella A, Marchetti C, Antonilli M, Brunelli R, Ostuni R, Benedetti Panici P. Threatened abortion and late-pregnancy complications: a case-control study and review of literature. *Minerva Ginecol.* 2015;67:491-7.
64. Naert MN, Muniz Rodriguez A, Khadraoui H, Naqvi M, Fox NS. Association between first-trimester subchorionic hematomas and adverse pregnancy outcomes after 20 weeks of gestation in singleton pregnancies. *Obstet Gynecol.* 2019;134:863-8.
65. Sperling JD, Dahlke JD, Sutton D, Gonzalez JM, Chauhan SP. Prevention of RhD alloimmunization: A comparison of four National Guidelines. *Am J Perinatol.* 2018;35:110-9.
66. Kumpel BM. On the immunologic basis of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis. *Transfusion.* 2006;46:1271-5.
67. Bergstrom H, Nilsson LA, Nilsson L, Ryttinger L. Demonstration of Rh antigens in a 38-day-old fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 1967;99:130-3.
68. Lappen JR, Stark S, Gibson KS, Prasad M, Bailit JL. Intravenous drug use is associated with alloimmunization in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;215:344 e1-6.
69. Karanth L, Jaafar SH, Kanagasabai S, Nair NS, Barua A. Anti-D administration after spontaneous miscarriage for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;3:CD009617.
70. Hannafin B, Lovecchio F, Blackburn P. Do Rh-negative women with first trimester spontaneous abortions need Rh immune globulin? *Am J Emerg Med.* 2006;24:487-9.
71. Fung KFK, Eason E. No. 133-Prevention of Rh Alloimmunization. *J Obstet Gynaecol Can.* 2018;40:e1-e10.

72. Robinson HP, Fleming JE. A critical evaluation of sonar "crown-rump length" measurements. *Br J Obstet Gynaecol*. 1975;82:702-10.
73. Stabile I, Campbell S, Grudzinskas JG. Ultrasonic assessment of complications during first trimester of pregnancy. *Lancet*. 1987;2:1237-40.
74. Savithrisowmya S, Singh M, Kriplani A, Agarwal N, Mehra NK, Bhatla N. Assessment of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry and Kleihauer-Betke test in Rh-negative pregnancies. *Gynecol Obstet Invest*. 2008;65:84-8.
75. Kumpel BM. Analysis of factors affecting quantification of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. *Transfusion*. 2000;40:1376-83.
76. Mollison PL. Quantitation of transplacental haemorrhage. *Br Med J*. 1972;3:31-4.
77. Dziegiel MH, Nielsen LK, Berkowicz A. Detecting fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. *Curr Opin Hematol*. 2006;13:490-5.
78. Ball RH, Ade CM, Schoenborn JA, Crane JP. The clinical significance of ultrasonographically detected subchorionic hemorrhages. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;174:996-1002.