



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

**AVALIAÇÃO DA FÓRMULA DE CÁLCULO DA
HEMOGLOBINA FETAL NA SEGUNDA METADE DA GRAVIDEZ**

LARA RODRIGUES FÉLIX

Belo Horizonte

2016

LARA RODRIGUES FÉLIX

**AVALIAÇÃO DA FÓRMULA DE CÁLCULO DA
HEMOGLOBINA FETAL NA SEGUNDA METADE DA GRAVIDEZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Vítor Leite.

Área de concentração: Medicina Fetal.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina – UFMG
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitora de Pós-Graduação: Prof^a. Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-Reitora de Pesquisa: Prof. Ado Jorio

Faculdade de Medicina

Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor: Prof. Humberto José Alves

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Luiz Armando Cunha de Marco

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Selmo Geber

Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia: Prof^a. Márcia Mendonça Carneiro

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher: Prof. Selmo Geber

Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher: Prof. Fernando Marcos dos Reis

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher:

Selmo Geber (Coordenador)

Fernando Marcos dos Reis (Subcoordenador)

Alamanda Kfoury

Agnaldo Lopes da Silva Filho

Rubens Lene Carvalho Tavares

Zilma Nogueira Reis

Aos meus pais e irmãos, minha razão de viver e meu conforto,
pelo amor infinito, apoio incondicional e presença essencial
a cada passo do caminho. Vocês fazem tudo parecer possível!

Ao meu marido, Miguel, grande amor e incentivador,
por ser um verdadeiro parceiro, por me apoiar, me admirar
e torcer pelo meu sucesso, que na verdade,
como tudo em minha vida, é nosso!

AGRADECIMENTOS

A Deus, presença constante, por claramente guiar meu caminho e por permitir essa grande realização na minha vida!

Ao meu orientador, Professor Doutor Henrique Vítor Leite, pelos ensinamentos, por lapidar minha formação e meu caráter, pela paciência, compreensão, apoio e por ter, sempre, a firmeza e a doçura de um pai. Sem dúvida, o meu maior exemplo como profissional.

Ao Professor Doutor Antônio Carlos Vieira Cabral, a quem eu tanto admiro, por ser um grande mestre, pelos ensinamentos imensuráveis em Obstetrícia, por ter me recebido tão bem no Centro de Medicina Fetal e, acima de tudo, por ser meu maior incentivador para a realização deste projeto.

À Professora Doutora Alamanda Kfourri Pereira, exemplo maior de que o tempo não é capaz de modificar a ternura e a humanidade de um médico. Um grande coração supera todas as adversidades. Obrigada pelo carinho e ensinamentos!

A todos os profissionais do Centro de Medicina Fetal, sempre tão receptivos e acolhedores, por terem me ensinado tanto, dividindo comigo seus conhecimentos ímpares e proporcionado um ambiente de trabalho agradável e produtivo.

Ao Professor Doutor Mário Dias Corrêa Júnior, pelo acolhimento, pelo grande incentivo relacionado à carreira acadêmica, pela compreensão das limitações e estímulo das virtudes, e por não hesitar em contribuir para a execução deste trabalho.

Ao Professor Doutor Enrico Antônio Colosimo, pela excelência no ensino da disciplina de Estatística e, especialmente, por ter se disponibilizado tão prontamente a me auxiliar na análise e interpretação dos resultados obtidos neste trabalho. Sem seu olhar criterioso, sua generosidade e valiosos conhecimentos

não seria possível concluir meu projeto! Ao senhor, toda a minha admiração e reconhecimento!

Ao amigo Doutor Augusto Henriques Fulgêncio Brandão, pela dedicação a este trabalho, pela paciência, generosidade e apoio, essenciais para que o sonho do mestrado se tornasse realidade.

À minha eterna tutora Dr^a. Raquel Waleska dos Santos, por literalmente pegar nas minhas mãos e por me transformar em uma ultrassonografista. Seu exemplo, comprometimento, dedicação e incentivo são inestimáveis! Minha eterna e sincera gratidão!

À minha grande amiga Evilane, pelas incontáveis experiências compartilhadas, por ser o estímulo quando houve desânimo, por ser apoio quando surgiram novas ideias e desafios, por sempre acreditar em mim e por ser literalmente minha sócia em todos os empreendimentos! Amo você!

Aos residentes da Medicina Fetal, pela generosidade em compartilhar comigo todos os dados e procedimentos, colaborando para a conclusão deste trabalho e tornando-se também parceiros deste projeto!

A todos os meus preceptores do Hospital das Clínicas da UFMG. Foi com vocês que aprendi o que é ser profissional, o que é o amor à Obstetrícia e à Ginecologia. E é a vocês que devo a profissão que hoje exerço! Muito obrigada por terem sido, além de mestres, amigos e incentivadores! Cada um, a seu modo, marcou a minha vida.

Aos meus colegas da pós-graduação, por terem dividido comigo esse caminho cheio de angústias e surpresas, e pelo auxílio precioso na elaboração desta dissertação, ao me permitirem aprender com seus trabalhos. Destaco com carinho os queridos Aluana Parola, Fernando Bastos, Leonardo Ferraz e Ludmila Porto. Vocês fizeram toda a diferença!

À professora Magda Roquette, por ter se empenhado na leitura e correção deste

texto, com tanto carinho e eficiência.

À Dr^a. Angelica Lemos Debs Diniz, por ter avaliado meu trabalho com tanta seriedade e compromisso, pela generosidade, consideração e pelos primorosos conselhos dados.

Aos meus alunos de graduação, por serem a recordação diária dos motivos que me fizeram escolher a Medicina como profissão, por alimentarem minha alegria e minha vontade de fazer a diferença na vida das pessoas e por me realizarem como professora.

A todos os familiares, que sempre me apoiaram incondicionalmente, torceram pelo meu sucesso, acompanharam cada momento e participaram, direta ou indiretamente, desta conquista! Vocês são essenciais!

Aos amigos que, mesmo distantes, foram presença constante. Entenderam as falhas, as ausências e, na mais linda prova de amizade, continuaram torcendo e vibrando comigo, sempre! Amo vocês!!!

A todas as pacientes, sem as quais este estudo não seria possível. Cada olhar, sorriso, abraço e aperto de mão foram os verdadeiros propulsores desta pesquisa.

”A utopia está no horizonte. Aproximo-me dois passos, ela se afasta dois passos.

Caminho dez passos e o horizonte se distancia dez passos mais além.

Para que serve a utopia? Serve para isso: para caminhar”.

Galeano.

RESUMO

Introdução: a anemia fetal, especificamente a causada pela aloimunização materna pelo fator *Rhesus* (Rh), é doença prevalente no Brasil. Atualmente, o único tratamento disponível para essa condição é a transfusão sanguínea intraútero ou a antecipação do parto. O êxito das gestações acometidas está relacionado, portanto, à estimativa acurada da gravidade da anemia e do volume de sangue a ser transfundido, além do número de procedimentos invasivos realizados. No Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG), a classificação da anemia fetal baseia-se no cálculo do déficit de hemoglobina, tendo como parâmetro a curva padrão publicada por Nicolaidis *et al.* em 1988. Porém, interroga-se se a expressão matemática publicada poderia ser extrapolada para diversas populações, já que atualmente se reconhece a influência do ambiente e da carga genética nos parâmetros biológicos individuais. **Objetivo:** averiguar se a curva padrão de normalidade de hemoglobina fetal mostra-se apropriada para uma amostra da população brasileira. **Pacientes e métodos:** entre janeiro de 2012 e dezembro de 2015, foram avaliadas as hematimetrias do sangue de cordão de 161 fetos não anêmicos acompanhados no Centro de Medicina Fetal (CEMEFE)/HC. Foram selecionadas 48 amostras de sangue fetal, cujos valores de hemoglobina foram comparados aos valores esperados pela de Nicolaidis *et al.*, ajustados pela idade gestacional. **Resultados:** os valores de hemoglobina encontrados nos fetos estudados foram significativamente mais dispersos do que o esperado pela curva padrão. A inclinação da reta que representa a hemoglobina dos fetos avaliados é zero, com intervalo de confiança entre -0,17 e 0,17. A constante de crescimento de 0,19 (encontrada no estudo original de Nicolaidis *et al.*) não pertence ao intervalo obtido neste trabalho. **Discussão e conclusão:** na presente amostra, a curva de Nicolaidis *et al.* para a hemoglobina fetal não se encaixa como modelo adequado de classificação do feto anêmico. Acredita-se ser imperiosa a criação de uma curva de variação da hemoglobina específica para fetos brasileiros, cujos dados serão valiosos para a melhoria da assistência obstétrica no Brasil, devendo estender-se à criação de curvas biométricas e de padrões de evolução, que resultam de complexa amálgama ambiental e genética ainda não completamente compreendida.

Palavras-chave: Anemia fetal. Gestação de alto risco. Genética fetal. População brasileira.

ABSTRACT

Introduction: Fetal anemia caused by Rh isoimmunization is a prevalent disease in Brazil, determining high impact in public health. Despite the development of methodologies for monitoring affected fetuses, currently, the only available treatment is still intrauterine blood transfusion, an invasive procedure associated with maternal and fetal risks. The success of the affected pregnancy depends grossly of the effectiveness of the transfusion, with an accurate evaluation of the severity of the anemia and the expertise of the professionals involved. At the present time, the classification of fetal anemia at the Fetal Medicine Center of HC / UFMG is based on the concept of hemoglobin deficit according to gestational age, from comparing the hemoglobin found in the cord blood of the sick fetus and a standard curve, published by Nicolaidis *et al.* in 1988. Once it has been designed previously to several technical and scientific advances, such curve arouses interest and compels us to delineate this study. We aim to investigate whether it would be the best classification parameter for Brazilian fetuses, and we are also moved by the desire to improve our clinical protocol, analyzing if the adopted references effectively reflect our population demands. This work follows the trend of contemporary literature, exploring the effects of environmental and genetic characteristics of diverse populations not only in their phenotype, but also in the manifestation of diseases. Although obstetrics is an old science, little is known about the interference of these factors in intrauterine fetal development, and this reflection is also a purpose of this study. **Objective:** To investigate if the standard fetal hemoglobin curve developed by Nicolaidis *et al.* is suitable for a sample of the Brazilian population. **Patients and Methods:** This is a cross-sectional observational study of a case series. From January 1st 2012 to the end of December of 2015, we evaluated the hematological parameters from the blood cord of 161 non-anemic fetuses followed at CEMEFE / HC and submitted to cordocentesis. After selection, 48 fetal blood samples were included in this analysis. The hemoglobin level of each fetus was compared to the expected values according to the standard curve of Nicolaidis. **Results:** The hemoglobin levels of our study were significantly more dispersed than expected by the standard curve. The original equation predicts an increase in hemoglobin during pregnancy, while in fetuses studied, the values remained almost constant at around 13.5 g/dl between 23 to 36 weeks of gestation. Regression adjustment showed that the slope of the line representing the hemoglobin of the evaluated fetuses is zero, with a confidence interval between -0.17 and 0.17. The growth constant of 0.19 (found in the original study) is not within the confidence interval obtained at this research. **Discussion and Conclusion:** The standard curve of Nicolaidis *et al.* does not fit as a suitable model for classification and treatment for anemic fetuses in our population. Therefore, we believe it is imperative to create a specific hemoglobin curve to Brazilian fetuses. It would be a valuable tool for improving obstetric assistance in Brazil, and should be extended beyond fetal hematology, with the inclusion of biometric curves and evolutionary patterns, which certainly result from a complex environmental, genetic and social blend, not yet fully understood.

Keywords: Fetal anemia. High-risk pregnancy. Fetal genetics. Brazilian population.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACM	Artéria cerebral média
ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
bpm	Batimentos por minuto
CEMEFE	Centro de Medicina Fetal
CA	Circunferência abdominal
CC	Circunferência cefálica
CF	Comprimento do fêmur
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DBVE	Diâmetro biventricular externo
DHPN	Doença hemolítica perinatal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DUM	Data da última menstruação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HC	Hospital das Clínicas
HFM	Hemorragia feto-materna
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
ICF	Índice cardiofemoral
ICGON	Instituto Clínico de Ginecologia, Obstetrícia e Neonatologia
INTERGROWTH	<i>International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century</i>
IP	Índice de pulsatilidade
IgG	Imunoglobulina G
LOTUS	<i>Long-term follow-up after intra-uterine transfusions</i>
MoM	Múltiplos da mediana
OMS	Organização Mundial de Saúde
PFE	Peso fetal estimado
pH	Potencial hidrogeniônico
PVS	Pico de velocidade sistólica
Rh	<i>Rhesus</i>

ROC	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
stk	<i>Stalk</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TIU	Transfusão intrauterina
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNICAMP	Universidade de Campinas
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Padrão sinusoidal à cardiotocografia.....	28
FIGURA 2- Relação entre hemoglobina fetal e idade gestacional.....	31
FIGURA 3 - Dopplervelocimetria da artéria cerebral média baseada na idade gestacional em pacientes com aloimunização pelo fator Rh.....	32
FIGURA 4 - A) Correlação entre o pico de velocidade sistólica (PVS) da artéria esplênica e o déficit de hemoglobina; B) Correlação entre o índice de pulsatilidade (IP) da artéria esplênica e o déficit de hemoglobina.....	34
FIGURA 5 - Reta de regressão da correlação entre o ICF e a hemoglobina fetal (g/dL).....	36
FIGURA 6 - Concentração de hemoglobina de 48 fetos hidróticos e 106 fetos não hidróticos de gestantes aloimunizadas no momento da primeira coleta de sangue fetal.....	39
FIGURA 7 - Fluxograma que mostra a derivação da população do nosso estudo, a partir dos critérios de inclusão e exclusão.....	47
FIGURA 8 - Pesos fetais médios estimados (gramas) de acordo com a idade gestacional (semanas) obtidos no estudo de Araújo Jr. <i>et al.</i> (2014) <i>versus</i> os do estudo de Hadlock <i>et al.</i> (1991).....	67

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Hemoglobina encontrada no sangue dos fetos estudados (Hb_ encontrada) <i>versus</i> hemoglobina esperada (Hb_ esperada) para a idade gestacional desses fetos, de acordo com a fórmula de Nicolaides <i>et al.</i> , em g/dL.....	56
GRÁFICO 2 - Relação entre os valores de hemoglobina fetal encontrados na amostra e a idade gestacional em semanas completas.....	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Distribuição numérica dos fetos incluídos no estudo conforme a faixa de idade gestacional em que se encontravam no momento da cordocentese.....	48
TABELA 2 - Distribuição numérica dos fetos incluídos no estudo conforme o sítio da principal malformação estrutural identificada à ultrassonografia....	48
TABELA 3 - Distribuição numérica dos tipos de cariótipos fetais encontrados na amostra do estudo.....	49

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Etiologia e fisiopatologia das alterações hematimétricas fetais.....	21
2.2 Métodos para propedêutica, classificação e seguimento clínico de fetos anêmicos.....	25
2.3 Delineamento da curva padrão de hemoglobina fetal de acordo com a idade gestacional.....	37
2.4 Importância da análise da curva de normalidade para a hemoglobina em uma amostra de fetos brasileiros.....	40
3 OBJETIVO.....	43
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	44
4.1 Seleção de pacientes.....	44
4.1.1 Critérios de inclusão.....	45
4.1.2 Critérios de exclusão.....	45
4.1.3 Amostra da pesquisa.....	46
4.1.4 Aspectos éticos.....	49
4.2 Métodos.....	50
4.2.1 Cordocentese.....	50
4.2.2 Hematimetria fetal.....	53
4.2.3 Avaliação do cariótipo fetal.....	53
4.2.4 Análise estatística.....	54
5 RESULTADOS.....	56

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011.

6 DISCUSSÃO E SUGESTÕES.....	59
7 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXOS E APÊNDICES.....	81

1 INTRODUÇÃO

O desejo de tornar-me médica existe desde as minhas mais tenras recordações da infância. A caminhada até a realização desse sonho é linda e gratificante, porém acompanhada de renúncias e profundas transformações em nossa forma de viver, de pensar e de nos relacionarmos com o mundo. Demanda que nos tornemos pessoas verdadeiramente imbuídas da intenção de modificar o que podemos e de pelo menos fazer alguma diferença para o bem nos casos em que o curso natural da vida não pode ser contido. Acredito sinceramente que o que move as pesquisas médicas é a inconformidade natural do ser humano de se render àquilo de que dispomos. Sempre buscamos ir além. Esse percurso não tem fim: quanto mais se descobre, mais é preciso aprender. Mas é graças a esse “instinto” que a humanidade avança, que nossa sociedade evolui e que a raça humana ainda sobrevive.

A “inquietação” com a vocação e com o papel que eu almejava exercer dentro da Medicina sempre existiu, mas descobrir como aplicá-la de maneira produtiva demandou-me um trabalhoso movimento. Todas as experiências que tive desde o primeiro dia em que entrei na faculdade moldaram-me em direção à trajetória acadêmica, que ao longo do tempo descobri ser uma das atividades que mais me realizam pessoalmente. A ideia do projeto de mestrado surgiu na época da conclusão da minha residência médica no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), em Ginecologia e Obstetrícia, sendo consolidada quando ingressei na segunda residência, em Ultrassonografia Ginecológica e Obstétrica, na mesma instituição. Ao longo desse período tive a oportunidade de participar ativamente das atividades do Centro de Medicina Fetal (CEMEFE), sob a tutoria de exímios profissionais da área, pessoas que me inspiraram nessa busca da evolução constante.

Ao acompanhar os procedimentos realizados durante a minha formação, surgiu o propósito de avaliar melhor as condutas relacionadas à anemia fetal, doença que constitui uma linha de pesquisa tradicional e relevante na história do CEMEFÉ.

Sua potencial morbimortalidade, a prevalência em nosso meio e o desafio que representa a abordagem dos conceitos acometidos pela doença justificam, a nosso ver, o seu estudo contínuo.

A despeito da ampla utilização da ultrassonografia para o seguimento pré-natal, a utilização de metodologia invasiva ainda é realidade no seguimento de fetos anêmicos. Atualmente, o único tratamento disponível para essa condição é a transfusão intraútero (TIU), que envolve riscos maternos e fetais não desprezíveis. Portanto, quanto menor o número de vezes que o procedimento for realizado, maiores as chances de sucesso da gestação (CRAPARO, 2005; KISERUD, 2005; VAN KAMP *et al.*, 2005), o que demanda estimativa acurada da gravidade da anemia e do volume de sangue a ser transfundido, além de expertise dos profissionais envolvidos.

Para classificar e determinar a forma de seguimento dos fetos anêmicos em nossa instituição, classicamente utilizamos a comparação dos nossos dados com a curva padrão de hemoglobina fetal conforme a idade gestacional, pioneiramente construída por Nicolaidis *et al.*, em 1988. Tal publicação científica teve grande repercussão para a comunidade obstétrica, sendo amplamente adotada por diversas instituições mundiais. Até os dias atuais, é a referência literária mais tradicional em termos de padronização dos valores hematimétricos esperados com a evolução gestacional. Por conseguinte, mantém-se como fundamento dos protocolos de centros dedicados ao tratamento de doenças fetais.

Por ser um parâmetro criado previamente a diversos avanços técnicos e científicos em Medicina e por ser utilizado de forma tão “unânime”, a curva padrão de Nicolaidis desperta interesse e impele a realização deste estudo. Somos também motivados pelo anseio de aprimorar nossos protocolos assistenciais, especialmente os que envolvem procedimentos maternos e fetais invasivos. A revisão de resultados e atualização de condutas é primordial a qualquer serviço, e ponderar se as referências adotadas refletem efetivamente nossas demandas populacionais configura prática fundamental dessa premissa. Seria uma curva de normalidade estabelecida há quase 30 anos e baseada em fetos de uma população europeia homogênea adequada à nossa população?

A pretensão deste projeto vai ao encontro da literatura médica contemporânea, que se empenha na avaliação da influência do ambiente e da carga genética das diversas populações, não apenas em seu fenótipo, mas também na manifestação de diversas doenças. Destaca-se a chamada “medicina personalizada”, em que o objetivo maior é individualizar, em detrimento da utilização de valores e conceitos universais. Ainda que a Obstetrícia seja uma ciência antiga, ainda há muito a ser explorado: pouco se sabe sobre a real interferência da modulação genética e dos fatores ligados ao ambiente e ao *status* socioeconômico sobre o desenvolvimento fetal intraútero.

Em um país como o Brasil, essa temática reveste-se de especial importância: somos o maior país da América Latina, com população superior a 200 milhões de pessoas. De acordo com o último censo, 43,1% da população se intitula miscigenada, configurando a maior população inter-racial no mundo (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2010). Portanto, estudar a hematimetria dos nossos fetos pode fornecer informações relevantes que traduzem elementos de diferentes etnias dentro de uma única sociedade e podem modificar nossas condutas pré-natais.

Ao elaborar o presente estudo, esperamos contribuir para o conhecimento sobre as particularidades das gestações e dos fetos da população brasileira, além de estimular a realização de novas pesquisas voltadas para esse intento.

De acordo com o nosso conhecimento, não existem, até o momento, estudos publicados que explorem as particularidades da concentração da hemoglobina de fetos brasileiros ao longo da gestação, bem como trabalhos que constatem a acurácia da curva original de Nicolaidis para distintas populações.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Etiologia e fisiopatologia das alterações hematómicas fetais

Entre as possíveis alterações hematómicas fetais que demandam propedêutica e tratamento, a anemia é, indubitavelmente, a mais prevalente. Classicamente, a doença é dividida em duas entidades, com base na etiologia: imune (relacionada à anemia fetal secundária à aloimunização materna a antígenos de hemácias); e não imune (outras causas) (CALLEN, 2009).

Ainda que existam diversas circunstâncias descritas como causadoras dessa condição, a anemia hemolítica secundária à aloimunização Rh materna ainda é a etiologia predominante, especialmente em países subdesenvolvidos (BERRY *et al.*, 2013) . Sua incidência estimada é de seis casos para cada 1.000 nascidos vivos, com significativas implicações em termos de saúde pública (PAPANTONIOU; SIFAKIS; ANTSAKLIS, 2013).

De forma sumária, a fisiopatologia da doença inicia-se a partir do contato entre hemácias maternas e antígenos eritrocitários fetais de origem paterna, o que pode resultar na formação de anticorpos contra tais antígenos, caracterizando a aloimunização materna (MARI *et al.*, 2000). A passagem transplacentária desses anticorpos maternos para a circulação fetal, essencialmente os da classe IgG, que se ligam à superfície das hemácias, pode ocasionar hemólise, com subsequente anemia fetal. Como consequência, ocorre a estimulação compensatória da hematopoiese medular e extramedular fetal (MOISE JR., 2002) e, por esse motivo, detectam-se hemácias jovens (denominadas eritroblastos) na circulação periférica. Todo esse processo caracteriza a doença hemolítica perinatal (DHPN), no passado denominada eritroblastose fetal.

Com a progressão da anemia, o feto apresenta graus crescentes de acometimento e manifestações clínicas, que vão desde a hepatoesplenomegalia pelo efeito da eritropoiese extramedular, a insuficiência cardíaca secundária ao

hiperdinamismo circulatório condicionado pela anemia até, num estágio final, a perda progressiva de fluidos para o terceiro espaço devido à redução da osmolaridade intravascular, culminando em grave hidropisia. Se não houver intervenções que impeçam tal progressão, a morte fetal é inevitável (SANTIAGO *et al.*, 2010).

A sensibilização materna por antígenos fetais pode ocorrer em diversas situações clínicas, predominando as de origem obstétrica, como abortamento, gravidez ectópica, doença trofoblástica gestacional, corangioma placentário, hemorragias da segunda metade da gestação, parto e procedimentos obstétricos invasivos. Bowman, Pollack e Penston (1986) relataram que o principal mecanismo de sensibilização é a hemorragia feto-materna (HFM) espontânea, que pode ocorrer em até 75% das gestações, mesmo que em pequena monta. Comprovou-se que o extravasamento de volumes inferiores a 0,1 mL de sangue fetal para a circulação materna é suficiente para desencadear a doença e que a frequência e o volume desses extravasamentos aumentam ao longo da gestação (MOISE JR., 2002). A HFM está presente em aproximadamente 3% das pacientes do primeiro trimestre, alcança 15% no segundo trimestre e aumenta para 45% ao final do terceiro trimestre. No momento do parto, registra-se HFM em até 64% dos casos (SHMIDT; CORREA JR.; LOURES, 2010). Estima-se, ainda, que 55-80% das pacientes desenvolvam a chamada “sensibilização silenciosa”, que ocorre na ausência de qualquer evento de risco identificável que pudesse demandar o uso imediato da imunoglobulina antiD (CHILCOTT *et al.*, 2003).

No contexto epidemiológico, sabe-se que cerca de 10% das mulheres aloimunizadas terão fetos acometidos por anemia hemolítica grave, demandando tratamento intraútero ou até mesmo interrupção pré-termo da gestação (URBANIÁK, 2008). Apesar de a forma grave da doença incidir sobre uma parcela relativamente pequena de fetos, em números absolutos ela ainda representa um desafio à saúde pública de países como o Brasil, marcado por sérias fragilidades relacionadas ao acesso à saúde, à qualidade e oferta de cuidados pré-natais adequados. O fornecimento aquém do ideal da imunoglobulina antiD passa por questões de estrutura e financiamento do sistema de saúde até a não

administração ou administração inadequada da mesma, por falha da assistência médica (BERRY *et al.*, 2013; SHMIDT; CORREA JR.; LOURES, 2010).

Mesmo em países desenvolvidos, a anemia fetal continua sendo um problema significativo. A introdução da imunoglobulina anti-*Rhesus* (Rh) em 1968 reduziu de forma considerável a incidência de aloimunização mas, em vista disso, outros aloanticorpos ganharam importância. Consistem em anticorpos contra antígenos eritrocitários “não D” (c, C, e, E) e anticorpos atípicos ou irregulares (ex.: antiKell, antiKidd e antiDuffy), também capazes de causar aloimunização materna e para os quais não existe imunoprevenção efetiva (BERRY *et al.*, 2013; MARI *et al.*, 2015).

A etiologia não obstétrica predominante de aloimunização é a transfusão de sangue incompatível – por hemoterapia ou compartilhamento de seringas entre usuárias de drogas endovenosas (CABRAL, 2002). Juntam-se às causas imunológicas outras diversas origens não imunes de anemia fetal, notadamente as alterações cromossômicas, cardiopatias, desordens metabólicas, condições genéticas - como as talassemias - e a transfusão feto-fetal em gestações gemelares. Tumores vasculares e malformações arteriovenosas placentárias também podem desencadear essa condição (MARI *et al.*, 2015).

Outra circunstância relevante que pode desencadear a anemia fetal é a infecção materna durante a gestação. Doenças infecciosas virais, bacterianas e parasitárias já foram associadas a essa afecção. Entre elas, a infecção pelo parvovírus B19 é a que apresenta maior incidência, sendo responsável por 10-27% das hidropisias fetais não imunes, com mortalidade que pode variar de 0 a 9% (von KAISENBERG; JONAT, 2001; XU *et al.*, 2003). O vírus tem tropismo pelas células progenitoras eritroblásticas e afeta o estágio final de maturação eritrocitária, causando tanto hemólise quanto aplasia medular de células vermelhas. A maioria dos episódios de anemia é transitória, mas há descrição de casos graves em que a transfusão intraútero se faz necessária para que o feto suporte o período de crise medular aplásica (MARI *et al.*, 2015).

A despeito de todos os avanços da Medicina, atualmente o único tratamento disponível para a anemia fetal é a transfusão sanguínea intrauterina, que pode ser realizada através da punção direta do cordão umbilical ou por injeção intraperitoneal de sangue O Rh negativo, compatível com o sangue materno após prova cruzada. Ambos são procedimentos invasivos, com risco de complicações como hemorragia e/ou trombose de cordão, amniorrexe prematura, trabalho de parto pré-termo, corioamnionite e até a morte fetal, que ocorre em 1-5% dos casos, dependendo do centro de referência e da gravidade da anemia (MOISE JR., 2002; PAPANTONIOU; SIFAKIS; ANTSAKLIS, 2013). Além disso, HFM ou aloimunização para novos anticorpos podem ocorrer após repetidos procedimentos (PAPANTONIOU; SIFAKIS; ANTSAKLIS, 2013).

Assim sendo, o tratamento deve ser realizado mediante planejamento adequado, consentimento assinado dos responsáveis e após estimativa acurada da gravidade da anemia e do volume de sangue a ser transfundido. O volume de hemácias para transfusão é calculado com base em uma fórmula que incorpora o hematócrito inicial, o volume fetoplacentário e o hematócrito do sangue contido na bolsa, de forma que o hematócrito fetal pós-transfusional atinja 40-50%, o que propicia maior intervalo de tempo até que haja demanda por um novo procedimento. Em fetos gravemente anêmicos, recomenda-se que o hematócrito final não ultrapasse quatro vezes o valor inicial, já que, nesses casos, pode haver sobrecarga cardiovascular a ponto de o feto não conseguir compensar as modificações agudas de volume e viscosidade sanguínea, evoluindo para óbito por insuficiência cardíaca (PAPANTONIOU; SIFAKIS; ANTSAKLIS, 2013). É importante ressaltar que, devido aos riscos mencionados, quanto menor número de vezes o procedimento for realizado e com a maior precisão possível, maiores as chances de sucesso da gestação (CRAPARO, 2005; KISERUD, 2005; VAN KAMP *et al.*, 2005).

Em relação às consequências da anemia fetal em longo prazo, paralisia cerebral e retardo de desenvolvimento são mais comuns em fetos acometidos pela DHPN, se comparados a fetos não acometidos. Porém, em mais de 90% dos casos o desenvolvimento neuropsicomotor é considerado normal (JANSSENS *et al.*, 1997). No estudo *Long-term follow-up after intra-uterine transfusions* (LOTUS),

publicado em 2012, foi avaliada a incidência global de comprometimento do desenvolvimento neurológico em crianças com histórico de anemia fetal imune submetidas à TIU. Esse termo genérico incluiu como desfechos a paralisia cerebral, o atraso cognitivo grave, a surdez bilateral e/ou a cegueira bilateral, sendo observada incidência de 4,8%. Entre os diversos possíveis fatores de risco ligados à doença, destacam-se a gravidade da anemia, o número de transfusões realizadas e a idade gestacional do parto, porém o histórico de hidropisia fetal foi o mais forte preditor para desfechos neurológicos negativos. O exato mecanismo de lesão cerebral ainda não foi elucidado, mas acredita-se que decorra da injúria hipóxica relacionada à anemia grave (LINDENBURG *et al.*, 2012).

Tendo em vista as razões explicitadas, a criação de métodos mais acurados para o diagnóstico, seguimento e tratamento da anemia fetal ainda se mostra imprescindível (CABRAL *et al.* 2008; MARI, 2005).

2.2 Métodos para propedêutica, classificação e seguimento clínico dos fetos anêmicos

A primeira metodologia invasiva para avaliação do grau de comprometimento do feto anêmico foi descrita por Bevis, em 1956, ao propor a realização de amniocentese para subsequente análise do teor de bilirrubina no líquido amniótico (BEVIS, 1956). O preceito básico de sua proposição é a relação direta entre a taxa de hemólise e a liberação, na circulação fetal, de produtos do metabolismo da hemoglobina. Como forma de depuração desses produtos, ocorre aumento da excreção renal de bilirrubina conjugada pelo feto. Esse metabólito promove a modificação da cor límpida do líquido amniótico para uma coloração amarelada, de intensidade proporcional ao comprometimento hematológico.

A técnica utilizada para determinar a concentração de bilirrubina no líquido amniótico é a espectrofotometria. A partir de um dispositivo denominado espectrofotômetro, estuda-se a intensidade do desvio óptico de um feixe de luz ao atravessar um meio líquido. Quanto maior a concentração de bilirrubina no meio, maior o desvio do feixe em relação ao seu ângulo de incidência, o que o torna,

portanto, indicador indireto da dimensão da hemólise e, conseqüentemente, da anemia fetal (MOISE JR., 2002).

A curva de referência para análise dos resultados obtidos por essa técnica foi introduzida por Liley (1961), para fetos com idade gestacional superior a 27 semanas, apresentando três zonas que se distinguem pela intensidade da variação da densidade óptica do líquido amniótico à análise espectrofotométrica.

Tal curva foi posteriormente modificada por Robertson (1966), que propôs a classificação dos resultados em cinco zonas distintas de gravidade, mas manteve o princípio determinado pelos autores que o precederam. Por fim, Queenan *et al.* (1993) propuseram um refinamento da curva original, incluindo valores de referência para uma faixa de idade gestacional mais ampla, entre 14 e 40 semanas.

Atualmente, esses trabalhos têm apenas significância histórica, já que métodos mais acurados e seguros foram desenvolvidos ao longo do tempo. A realização de amniocentese exclusivamente para propedêutica da anemia fetal é desaconselhada, exceto nos raros casos em que a ultrassonografia com doppler ou a cordocentese não estejam disponíveis (MARI *et al.*, 2015).

No que diz respeito à classificação da gravidade da anemia fetal, o primeiro critério foi proposto por Nicolaidis *et al.* (1988), a partir da introdução do conceito de déficit de hemoglobina, que se baseia no cálculo da diferença entre a hemoglobina esperada para a idade gestacional e a hemoglobina encontrada na análise do sangue obtido por cordocentese. Correlacionando seus achados laboratoriais com evidências clínicas e ultrassonográficas, os autores consideraram fetos com déficit de hemoglobina superior a 7 g/dL como anêmicos graves, com elevado risco de hidropisia.

Um segundo método de classificação foi publicado por Bahado-Singh *et al.* (1998). O objetivo primário dos autores era averiguar se a medida da circunferência esplênica fetal à ultrassonografia apresentava-se como um preditor sensível de anemia, levando em conta o fato de esse ser um dos principais

órgãos envolvidos na eritropoiese extramedular intraútero. Neste estudo, os valores normais esperados para a circunferência esplênica foram obtidos de um grupo de fetos não anêmicos, sendo, então, utilizados como referência para a classificação de 121 fetos aloimunizados. Esses autores também utilizaram metodologia invasiva (cordocentese) para avaliação hematimétrica fetal e cálculo do déficit de hemoglobina, porém o conceito de anemia adotado foi de um déficit de 2 g/dL ou mais, sendo rotulada como anemia grave a detecção de um déficit superior a 5 g/dL. Paralelamente ao uso dessa nova classificação, os autores propuseram a utilização da medida da circunferência esplênica como preditor de anemia grave em fetos não transfundidos, descrevendo sensibilidade de 100% e especificidade de 94,7% para o diagnóstico.

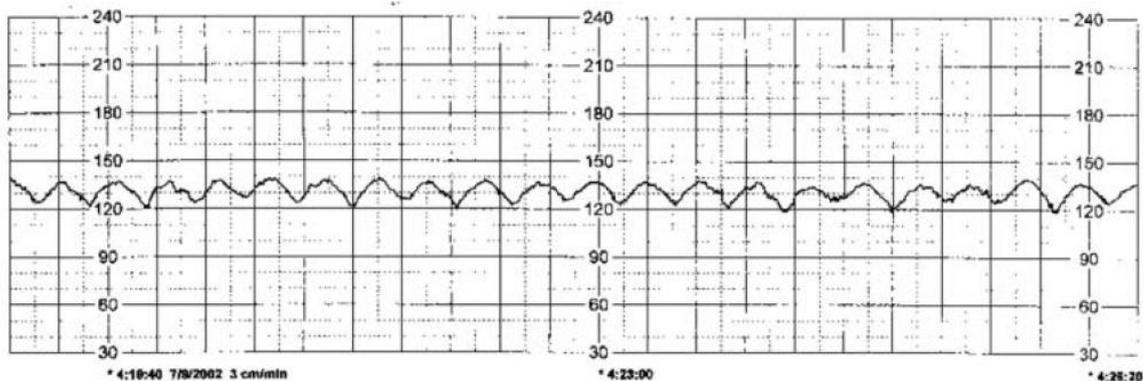
Apesar da relevância desses estudos àquela época, sua metodologia baseia-se no emprego de técnicas invasivas, o que vai de encontro aos anseios primordiais tanto de médicos assistentes quanto de pacientes. O que se aspirava, desde então, era a utilização de recursos que expusessem o binômio gestante-feto a baixos riscos, mantendo eficácia comparável ou superior às já existentes para o diagnóstico de anemia. Em decorrência dessa demanda, nas últimas décadas ganharam espaço as pesquisas voltadas para a exploração e aprimoramento de métodos propedêuticos não invasivos (PAPANTONIOU; SIFAKIS; ANTSAKLIS, 2013).

O primeiro método não invasivo utilizado para avaliação do bem-estar do feto anêmico, ainda hoje largamente empregado, não obstante sua simplicidade técnica, é a cardiotocografia. Os aspectos observados nesse exame consistem na normalidade da linha de base da frequência cardíaca fetal, sua variabilidade e acelerações transitórias durante o período de observação, particularmente após estímulos como a movimentação fetal ou intervenções externas (ex.: vibração, som). A congruência desses achados é considerada boa evidência de bem-estar fetal (*AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS - ACOG*, 2009).

Apesar da automaticidade intrínseca do miocárdio, sabe-se que a frequência cardíaca sofre influência direta do sistema nervoso autônomo (simpático e

parassimpático), mediada por barorreceptores, quimiorreceptores e estímulos hormonais diversos e, portanto, seria passível de interferência das modificações hemodinâmicas e metabólicas proporcionadas pela anemia fetal (MODANLOU; MURATA, 2004). Manseau *et al.* (1972) foram os primeiros pesquisadores a associar alterações em exames cardiotocográficos anteparto a essa doença, descrevendo um padrão sinusoidal (ou ondulatório) em nove fetos com anemia secundária à aloimunização Rh, entre os quais seis evoluíram para morte intraútero. Esse padrão é classicamente caracterizado por: a) linha de base estável entre 120 e 160 batimentos por minuto (bpm), com oscilações regulares; b) amplitude de 5-15 bpm; c) frequência de dois a cinco ciclos por minuto; d) variabilidade fixa ou comprimida; e) oscilação da onda sinusoidal acima e abaixo da linha de base; f) ausência de períodos com variabilidade ou reatividade normais (MODANLOU; FREEMAN, 1982) (FIG. 1).

FIGURA 1 - Padrão sinusoidal à cardiotocografia



Fonte: adaptado de Modanlou e Murata (2004, p. 169).

Esses primeiros achados identificaram o padrão sinusoidal como um preditor de gravidade, denotando fetos em risco iminente de morte. Em 1974, Baskett e Koh (1974) corroboraram essa hipótese, ao apresentarem um relato de caso que associou novamente a cardiotocografia sinusoidal à hipóxia fetal grave e morte neonatal. Após análise, atribuíram o padrão oscilatório ao dano causado pela hipóxia tecidual no sistema nervoso central, com consequente disfunção autonômica. Concluíram que esse padrão poderia representar o estágio final de comprometimento fetal e demandava intervenção imediata. Achados semelhantes

foram descritos nos ensaios de Modanlou *et al.* (1977), em que o ritmo cardíaco sinusoidal associou-se à mortalidade perinatal em 50 a 75% dos casos.

Desde então, vários estudos foram conduzidos com o intuito de estabelecer a correlação entre o agravamento da anemia fetal e a perda da reatividade em exames de cardiotocografia. Em 1989, Nicolaides, Sadovsky e Cetin (1989) referiram sensibilidade de 68% e especificidade de 18% desse exame na predição da anemia fetal. Em 1990, o grupo de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) publicou seu primeiro trabalho sobre o assunto. Foram avaliadas 38 gestantes sensibilizadas pelo fator Rh, realizando-se cardiotocografias previamente ao parto programado. Os resultados obtidos no traçado (classificados como reativos, hiporreativos ou não reativos) foram comparados aos níveis de hemoglobina encontrados no sangue do cordão umbilical imediatamente após o nascimento. Foram considerados anêmicos fetos com concentração de hemoglobina inferior a 11 g/dL. Nesse estudo, o valor preditivo negativo da cardiotocografia para a detecção de anemia fetal foi de 78%, com sensibilidade de 64,28%.

À época, os achados foram similares aos descritos por outros centros de pesquisa bem-conceituados (LIMA; CABRAL; CORREA, 1990). Em 2000, o mesmo grupo acompanhou 45 pacientes aloimunizadas e comparou seus traçados cardiotocográficos com a hemoglobina fetal obtida por cordocentese ou por punção do cordão umbilical imediatamente após o nascimento. Considerando-se como critério para definição de anemia a concentração de hemoglobina inferior a 10 g/dL, a cardiotocografia revelou sensibilidade e especificidade de 100 e 92,4%, respectivamente, para predição da doença (MELO, 2000).

Apesar de sua importância na avaliação de fetos com anemia por aloimunização Rh, o padrão cardiotocográfico oscilatório não é exclusivo dessa condição, podendo ser também encontrado em outras causas de anemia e sofrimento fetal agudo, como na hemorragia feto-materna maciça, síndrome de transfusão feto-fetal, sangramento por vasa prévia e sangramento fetal traumático. Além disso, deve-se ressaltar que, por ser padrão que indica comprometimento fetal grave, não se deve aguardar a oscilação típica à cardiotocografia para definir a conduta

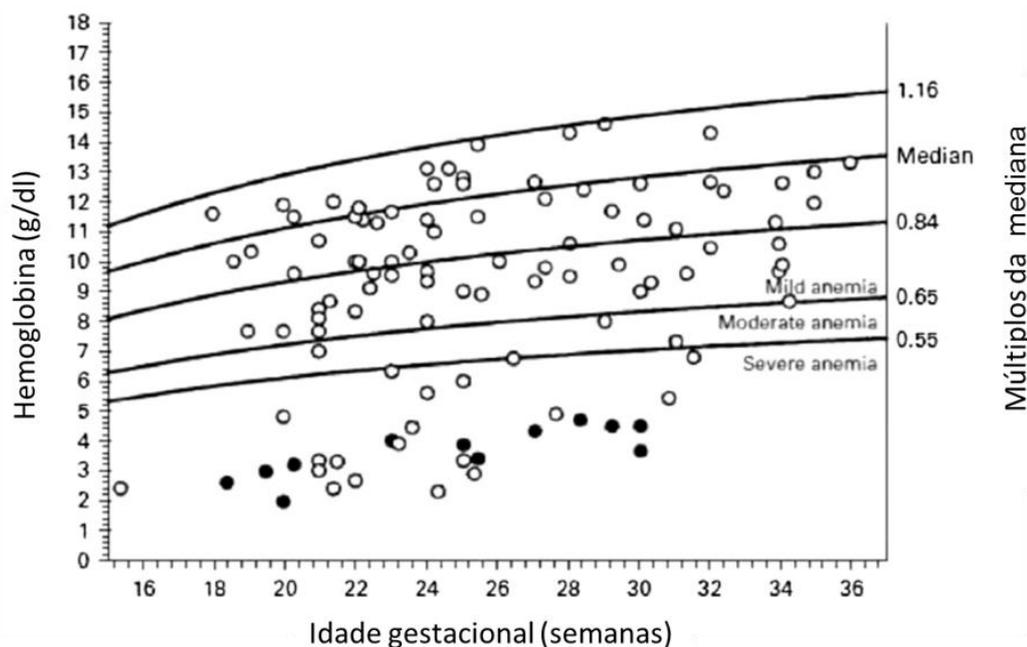
em relação à continuidade da gestação. A cardiocotografia é, acima de tudo, ferramenta auxiliar de monitorização cotidiana de fetos anêmicos. Qualquer alteração de seu padrão habitual deve se apresentar como alerta à equipe médica assistente, motivando propedêutica adicional. A conduta deve ser individualizada, avaliando não só a condição de base, mas também a viabilidade fetal determinada pela idade gestacional (MODANLOU; MURATA, 2004).

Também orientados pelo paradigma de “não invasão” e em busca de ferramentas mais precisas para a avaliação e classificação do feto anêmico, um grupo de pesquisadores utilizou os princípios físicos da dopplervelocimetria para avaliar a compleição do sangue fetal, concebendo um dos mais notórios achados no âmbito da assistência obstétrica (MARI *et al.*, 1995; MARI *et al.*, 2000). Sabe-se que, nos fetos anêmicos, ocorre redução da viscosidade do sangue em virtude da menor concentração eritrocitária, acarretando aumento da velocidade do fluxo sanguíneo intravascular. Essas alterações podem ser detectadas pela observação do valor máximo registrado na curva de fluxo sistólico ao doppler, denominado pico da velocidade sistólica (PVS).

Respaldados pelo preceito de que a integridade do tecido cerebral mostra-se altamente dependente de concentrações regulares de oxigênio e que, portanto, as artérias cerebrais respondem de maneira imediata à hipoxemia, os pesquisadores selecionaram a artéria cerebral média para a condução de seu estudo-piloto. Adicionalmente, esse vaso apresenta a vantagem de ser facilmente identificado à ultrassonografia, desde que observada a técnica correta para insonação (ângulo de zero grau entre o transdutor e a direção do fluxo sanguíneo), o que proporcionaria pequena variabilidade de registros intra e interobservador. O estudo foi desenhado com a finalidade de determinar os valores de pico da velocidade sistólica na artéria cerebral média (PVS-ACM) que poderiam caracterizar a anemia fetal secundária à isoimunização. Os resultados foram inicialmente retratados por uma curva que correlaciona a idade gestacional à concentração de hemoglobina plasmática, incluindo 265 fetos hematologicamente normais e 111 fetos sob risco de anemia. A faixa de normalidade foi determinada pelos valores entre 0,84 e 1,16 múltiplos da mediana (correspondentes aos percentis 5 e 95 da curva, respectivamente), sendo considerados fetos anêmicos

graves aqueles com concentração de hemoglobina inferior a 0,55 múltiplos da mediana (representados como pontos negros) (FIG. 2) .

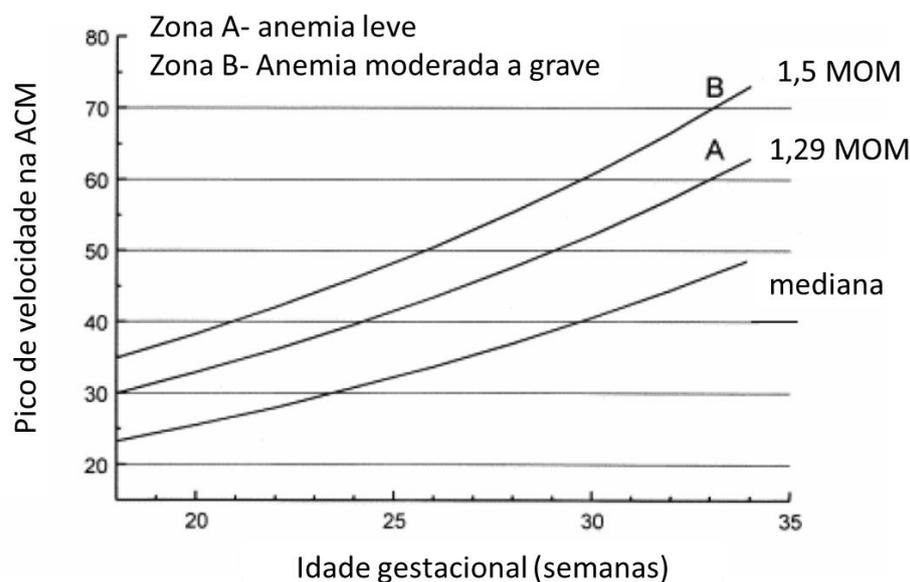
FIGURA 2 - Relação entre hemoglobina fetal e idade gestacional



Fonte: adaptado de Mari *et al.* (2000).

Posteriormente, ao correlacionar os valores de hemoglobina dos fetos anêmicos graves aos valores encontrados à dopplervelocimetria dos mesmos fetos, o estudo determina que valores superiores a 1,55 múltiplo da mediana para o PVS-ACM indicam os fetos mais gravemente comprometidos (FIG. 3).

FIGURA 3 - Dopplervelocimetria da artéria cerebral média baseada na idade gestacional em pacientes com aloimunização pelo fator Rh



MoM= múltiplos da mediana.
 Fonte: adaptado de Mari *et al.* (2000).

Além de possibilitar a predição da gravidade da anemia fetal, o método auxilia na detecção dos mecanismos hemodinâmicos de adaptação do conceito frente à doença. Dessa forma, permite individualização da assistência, selecionando melhor os casos que se beneficiariam da propedêutica invasiva. A sensibilidade desse parâmetro para detecção de anemia moderada (concentração de hemoglobina inferior a 0,65 múltiplo da mediana) e anemia grave (concentração de hemoglobina inferior a 0,55 múltiplos da mediana) foi de 100% (intervalo de confiança - IC 95%: 86-100), com taxa de falso-positivos igual a 12%. Os valores preditivos positivo e negativo foram estimados em 65 e 100%, respectivamente (MARI *et al.*, 2000). Existem, ainda, evidências de que a correlação entre a concentração de hemoglobina fetal e o PVS-ACM se torne mais acurada quanto maior a gravidade da anemia (MARI *et al.*, 2002).

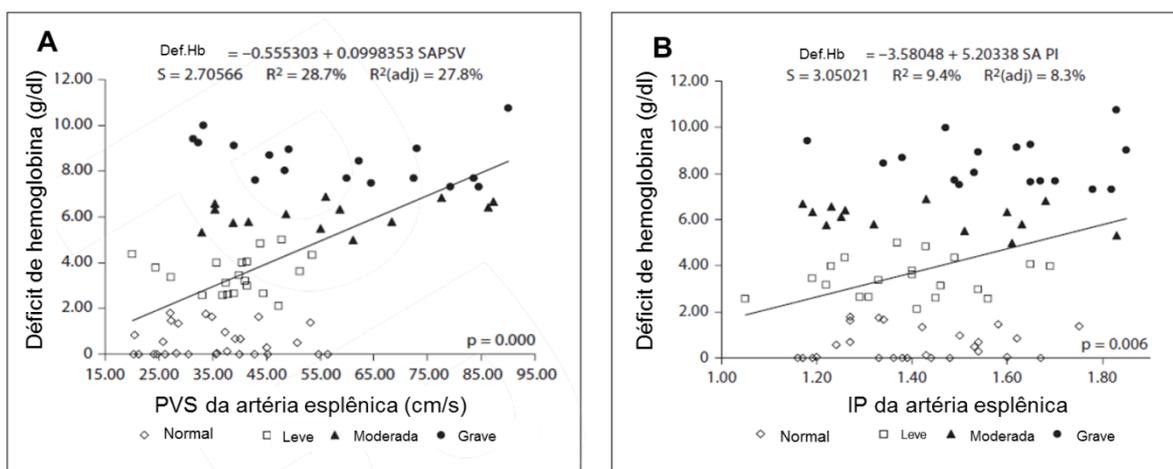
No mesmo trabalho, os autores teceram considerações sobre a classificação de anemia proposta por Nicolaidis, refutando o valor de corte arbitrário de 7 g/dL de concentração de hemoglobina no sangue fetal. Propuseram a classificação a partir da curva de normalidade utilizada em seu trabalho (FIG. 2), considerando a

concentração de hemoglobina inferior a 0,55 múltiplo da mediana como melhor parâmetro para detecção do feto anêmico grave.

Em estudo posterior realizado em fetos acompanhados no CEMEFÉ-HC/UFMG, o PVS-ACM apresentou sensibilidade de 75,8% e especificidade de 78% na detecção de hemoglobina fetal inferior ou igual a 10 g/dL, com valor preditivo positivo de 69,5% e valor preditivo negativo de 82,9% (TAVEIRA *et al.*, 2004).

Utilizando também os fundamentos do efeito doppler associado ao conhecimento sobre a expansão da eritropoiese extramedular em fetos anêmicos, que causa, em segunda análise, aumento volumétrico do baço e fígado fetais à ultrassonografia, um grupo do HC-UFMG conduziu estudo com o objetivo de avaliar o comportamento do fluxo sanguíneo da artéria esplênica em fetos de gestantes aloimunizadas (CORREA JR. *et al.*, 2009). Os resultados evidenciaram correlação positiva entre o índice de pulsatilidade (IP) e o pico de velocidade sistólica (PVS) da artéria esplênica com o déficit de hemoglobina observado no sangue fetal obtido por cordocentese (FIG. 4).

FIGURA 4 - A) Correlação entre o pico de velocidade sistólica (PVS) da artéria esplênica e o déficit de hemoglobina; B) Correlação entre o índice de pulsatilidade (IP) da artéria esplênica e o déficit de hemoglobina



Fonte: adaptado de Correa Jr. *et al.* (2009).

Os autores explicam que, provavelmente, a intensa infiltração esplênica por tecido hematopoiético que ocorre em fetos gravemente anêmicos oblitera os capilares desse órgão, causando o aumento de resistência ao fluxo, que se traduz à dopplervelocimetria pelo aumento do IP. A conclusão é de que, uma vez que o IP da artéria esplênica expõe a intensidade da eritropoiese extramedular, este parâmetro poderia ser utilizado para determinar a programação de transfusões intrauterinas, especialmente em fetos anêmicos graves (CORREA JR. *et al.*, 2009).

Apesar de sua comprovada acurácia diagnóstica, a utilização exclusiva da dopplervelocimetria para o acompanhamento de fetos anêmicos não é recomendada, já que, por basear-se em propriedades físicas do sangue, pode haver redução da confiabilidade após a realização de transfusões fetais. Estudos evidenciam que o método não é capaz de prever o momento ideal da próxima transfusão em um feto já submetido à cordocentese terapêutica, uma vez que a curva do doppler passa a refletir características mistas do sangue fetal e do sangue transfundido, que geralmente apresenta hematócrito e concentração eritrocitária elevados (MOISE JR., 2008).

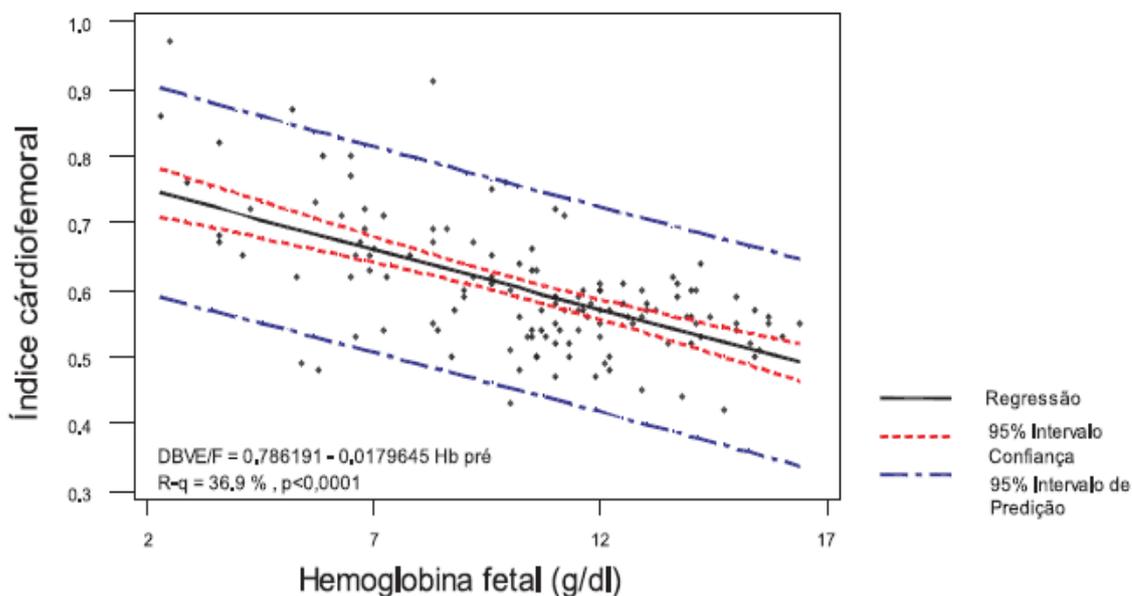
Outra possível explicação para essa redução da sensibilidade do exame pós-transfusão seria o fato de que células de doadores adultos apresentam diferentes propriedades reológicas, que contribuem para o aumento geral da viscosidade, porém com decréscimo da capacidade total de carrear oxigênio (WELCH *et al.*, 1994). Além disso, as transfusões intraútero produzem efeitos vasculares agudos secundários a alterações no volume plasmático, viscosidade sanguínea, potencial hidrogeniônico (pH) e disponibilidade de oxigênio ligada ao 2,3-difosfoglicerato, fatores que também podem interferir nos resultados desse exame (CABRAL *et al.*, 2010).

Cita-se ainda como importante método propedêutico não invasivo o índice cardiofemoral (ICF) (CABRAL *et al.*, 2008), fundamentado na relação entre o diâmetro cardíaco biventricular externo (DBVE) e a medida da diáfise femoral fetal. O fêmur, nessa relação, é utilizado como um parâmetro constante, cujo comprimento é proporcional à idade fetal, sendo uma forma de ajustar a análise para a idade gestacional em que a fórmula é aplicada.

Quanto maior o grau de anemia de um feto, maior é a sobrecarga cardíaca compensatória a que é submetido, o que desencadeará hipertrofia excêntrica da parede ventricular e, em última análise, cardiomegalia. Além de mostrar acurácia satisfatória na detecção de cardiomegalia fetal (RIZZO; ARDUINI; ROMANINI, 1992), a medida do DBVE apresenta correlação inversa com a concentração da hemoglobina, de forma independente da idade gestacional, o que consolidou sua utilização como preditor valoroso dos índices hematimétricos fetais (BARCELOS, 2003).

Utilizando o ICF como forma de controlar a variação fisiológica do DBVE com o aumento da idade gestacional, observou-se que o desvio da curva de normalidade é diretamente proporcional ao grau de anemia (FIG. 5).

FIGURA 5 - Reta de regressão da correlação entre o ICF e a hemoglobina fetal (g/dL)



Fonte: adaptado de Cabral *et al.* (2005).

Acredita-se que a remodelação ventricular com dilatação das câmaras cardíacas seja o principal responsável pelo aumento do débito cardíaco observado nos fetos anêmicos e, por isso, o estudo do índice cardiofemoral tem gerado bons resultados na predição dessa condição.

Cabral *et al.* (2005) procuraram estabelecer o ponto de corte do ICF com melhor acuidade para identificação de valores de hemoglobina menores ou iguais a 10 g/dL, geralmente determinantes de terapêutica fetal invasiva. A partir da construção de *Receiver Operating Characteristic Curves* (curvas ROC), encontrou-se o valor de $ICF > 0,59$ como aquele que combina elevadas sensibilidade e especificidade para diagnóstico de anemia fetal moderada a grave, com valor preditivo positivo de 73,1% e valor preditivo negativo de 88,5%.

Os autores ressaltam que a medida do DBVE é de fácil obtenção, já que a visão cardíaca de quatro câmaras faz parte da rotina da ultrassonografia obstétrica, além de ser metodologia simples e de custo acessível, podendo ser realizada até mesmo por ultrassonografistas em centros de atenção primária. Seu grande diferencial em relação ao método previamente descrito (doppler da ACM) está no

fato de não sofrer interferência da viscosidade sanguínea, mantendo sensibilidade significativa mesmo após procedimentos de transfusão intraútero. O ponto de corte de ICF $>0,59$ foi capaz de detectar 88% dos fetos gravemente anêmicos após duas ou mais transfusões sanguíneas, com valor preditivo negativo de 92,1% para aqueles que haviam sido submetidos a pelo menos uma transfusão (CABRAL *et al.*, 2008).

Mesmo com os relatados benefícios do ICF, em estudo publicado em 2010, Cabral *et al.* não foram capazes de defini-lo como teste suficientemente confiável para ser utilizado de forma isolada no manejo de gestações complicadas por aloimunização. Pelo contrário, ressaltam a vantagem da utilização combinada do ICF e do doppler de ACM, proporcionando aumento significativo da capacidade diagnóstica. Os autores mostram que todos os fetos gravemente anêmicos apresentaram resultados alterados em pelo menos um dos testes não invasivos, com sensibilidade combinada de 100%, confirmando a eficácia da utilização de parâmetros conjugados no seguimento desses pacientes (CABRAL *et al.*, 2010).

Na prática clínica, ainda não podem ser definidas indicações precisas de quando substituir a propedêutica não invasiva pela metodologia invasiva, até que os marcadores clínicos, ultrassonográficos e cardiotocográficos de anemia fetal tenham sido estudados exaustivamente. A experiência inicial indica que a conduta mais segura é o uso paralelo de dois ou mais testes, até que haja completo domínio e comprovada superioridade de técnicas não invasivas (MOISE JR., 2006). Nesse ínterim, a cordocentese continuará sendo recurso essencial para diagnóstico e terapêutica da anemia fetal grave (MELO, 2003).

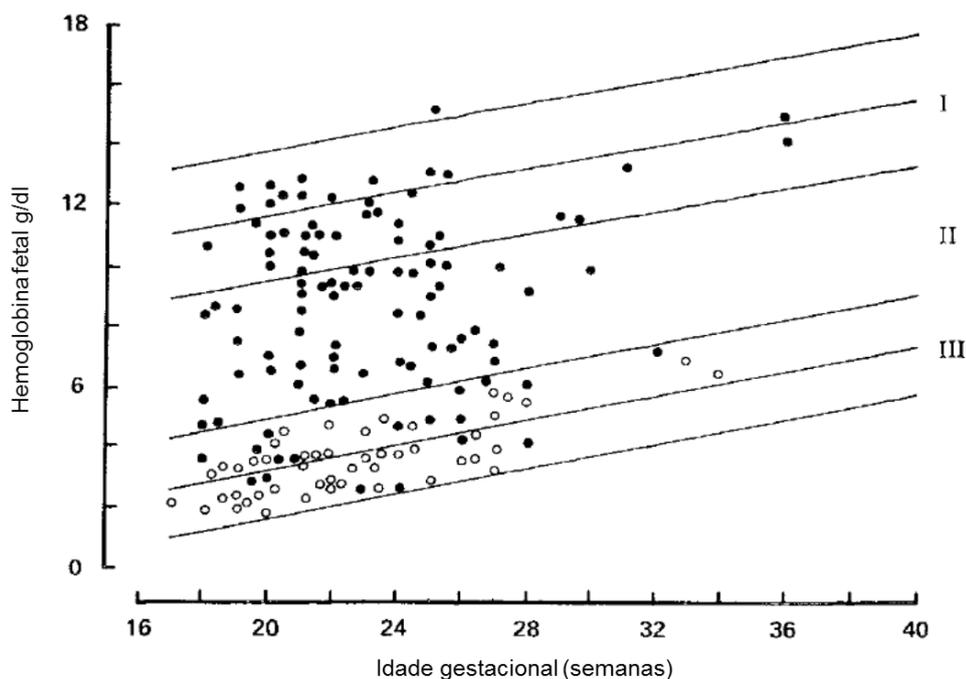
2.3 Delineamento da curva padrão de hemoglobina fetal de acordo com a idade gestacional

O valor padrão de hemoglobina fetal esperada conforme a idade gestacional foi pioneiramente determinado por Nicolaidis em estudo transversal publicado no *The Lancet*, em 1988 (NICOLAIDES *et al.*, 1988). Estabeleceu-se uma faixa de referência para hemoglobina fetal normal entre 17 e 40 semanas de gestação, a

partir de 200 amostras de sangue fetal obtidas por cordocentese e 10 amostras obtidas pela punção do cordão umbilical imediatamente após o parto a termo. Os fetos incluídos no estudo foram referenciados de diversas regiões do Reino Unido para o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do *King's College Hospital*, em virtude da suspeita de doença fetal secundária à aloimunização materna. O encaminhamento foi determinado por alterações em parâmetros indiretos, como níveis elevados de anticorpos maternos, gestações prévias afetadas por aloimunização, espectrofotometria de líquido amniótico ou evidências ultrassonográficas de anemia fetal. Todos os fetos cuja amostra sanguínea foi utilizada para a construção da curva de normalidade foram submetidos à propedêutica antenatal padrão da instituição e não se mostraram afetados pela condição.

Por meio de regressão logística, calculou-se o intervalo de confiança de 95% para os valores de hemoglobina esperados de acordo com a idade gestacional. Em fetos normais, observou-se que a concentração de hemoglobina aumentou linearmente com o avançar da idade gestacional, apresentando coeficiente de correlação positiva de 0,74. Os percentis 2,5 e 97,5 mostraram-se graficamente paralelos e o valor de um desvio-padrão foi de aproximadamente 1 g/dL. Os resultados da cordocentese de fetos normais e de fetos anêmicos à propedêutica foram retratados de forma conjunta e representados graficamente no formato *scatter plot*. As retas paralelas definem os intervalos de confiança para as chamadas “zona de normalidade” (zona I) e “zonas de anemia” (zona II - anemia moderada e zona III- hidropisia fetal), como demonstrado na FIG. 6.

FIGURA 6 - Concentração de hemoglobina de 48 fetos hidrópicos e 106 fetos não hidrópicos de gestantes aloimunizadas no momento da primeira coleta de sangue fetal



Pontos sem preenchimento-○:fetos hidrópicos; pontos preenchidos-●:fetos não hidrópicos.
Fonte: adaptado de Nicolaides *et al.* (1988).

A partir dessa publicação, incorporou-se à prática clínica o uso de equações matemáticas para predizer o valor normal de hemoglobina fetal de acordo com a idade gestacional. A fórmula padrão proposta pelo grupo de pesquisa nada mais é do que a equação da reta que corresponde à mediana da zona de normalidade (zona I). Traduz-se pelo produto entre a idade gestacional e o grau de inclinação da reta original (0,19), somado à constante 7,9.

Fórmula para o cálculo da hemoglobina fetal esperada de acordo com a idade gestacional (NICOLAIDES *et al.*, 1988):

$$\text{Hb esperada (g/dL)} = \{0,19 \times \text{idade gestacional (em semanas)} + 7,9\}$$

Nos dias de hoje, esse ainda é o pilar da terapêutica realizada no CEMEFE do HC-UFMG, sendo determinante do protocolo de classificação e acompanhamento

de fetos anêmicos, bem como ocorre em outras instituições mundiais (CORREA *et al.*, 2009; LINDENBURG *et al.*, 2012).

2.4 Importância da análise da curva de normalidade para a hemoglobina em uma amostra de fetos brasileiros

No momento presente, a literatura médica está voltada para a identificação de fatores individuais que determinam os distintos padrões de manifestação das doenças. Essa tendência é reproduzida especialmente pelos estudos referentes às particularidades do desenvolvimento fetal em diversas regiões do mundo, já que aspectos presentes na vida intrauterina são importantes reguladores da fisiologia humana. O intuito é desvendar o real papel da influência étnica no fenótipo dos conceptos e, conseqüentemente, da população como um todo (KING; MURPHY; HOYO, 2015).

Alguns achados relevantes já foram publicados, sobretudo no que diz respeito às variações regionais dos parâmetros biométricos fetais. Jacquemyn, Sys e Verdonck (2000) estudaram uma coorte transversal de fetos cujas mães tinham origem belga, turca e marroquina, com parceiro de etnia conhecida e igual à materna, considerando que a etnia paterna poderia ter influência de 50% no fenótipo fetal. Concluíram que existem diferenças significativas entre os indicadores biométricos dos fetos de origem étnica distinta, especialmente em relação à circunferência cefálica (CC), circunferência abdominal (CA), comprimento do fêmur (CF) e peso fetal estimado (PFE) (JACQUEMYN; SYS; VERDONK, 2000). Os autores mencionam outros diversos trabalhos que descreveram diferenças significativas de peso ao nascimento em distintas etnias, após ajuste para a idade gestacional. Concluem que tais diferenças refletem majoritariamente características genéticas, não sendo explicadas apenas pelas diversidades nutricionais ou socioeconômicas entre as populações avaliadas.

Similarmente, Shiono *et al.* (1997) constataram que existe disparidade de peso ao nascimento para diferentes grupos étnicos, mesmo realizando o ajuste para outros 46 possíveis fatores de confusão.

No Brasil, um dos primeiros achados expressivos foi publicado por Cecatti *et al.* (2000), ao construir curvas de peso fetal estimado *versus* idade gestacional a partir de uma amostra de 2.874 fetos brasileiros. Os autores observaram que, para idades gestacionais superiores a 30 semanas, os valores do percentil 90 da curva que elaboraram aproximavam-se dos valores correspondentes ao percentil 50 da curva padrão de biometria fetal criada por Hadlock, Harrist e Martinez-Poyer (1991). Dessa maneira, os pesos fetais considerados normais na amostra foram significativamente inferiores aos valores previamente utilizados como referência.

Outro notável projeto brasileiro apurou dados de 31.476 gestações de risco habitual entre 18 e 38 semanas e, a partir deles, formulou curvas de referência personalizadas para os parâmetros biométricos fetais (ARAÚJO JR. *et al.*, 2014a). A principal conclusão foi de que, para todas as variáveis, os valores médios encontrados na amostra foram discretamente inferiores àqueles apresentados na curva de Hadlock, Harrist e Martinez-Poyer (1991).

Para além da avaliação da diversidade fenotípica, estudos contemporâneos concentram-se na exploração de elementos pré-natais capazes de modificar o padrão de metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e, conseqüentemente, o *imprinting* genético de cada indivíduo. Alguns autores demonstraram que a raça/etnia é um desses elementos, com influência discriminável mesmo após ajuste para a interferência de fatores socioeconômicos (SUBRAMANYAM *et al.*, 2013). Há evidências crescentes de que peculiaridades sociais e étnicas modulam a expressão do genoma humano (BORGHOL *et al.*, 2012; LAM *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2011). Portanto, ainda que as diferentes populações possuíssem carga genética idêntica, ela poderia ser expressa de distintas formas de acordo com os estímulos aos quais seus integrantes são expostos, caracterizando o que se intitula de regulação epigenética.

Toda a informação corrente reforça a necessidade de se estabelecer um novo olhar científico, focado nas particularidades em detrimento das generalidades, o que poderia aumentar sobremaneira a acurácia diagnóstica em relação a distúrbios do desenvolvimento fetal e da fisiologia humana. Portanto, é mister que nos empenhemos na reformulação de conceitos e na evolução da nossa forma de

fazer pesquisa. Destaca-se que o ato de classificar um indivíduo a partir de tabelas e curvas construídas para populações não específicas pode resultar em julgamento clínico inadequado ou até mesmo em um diagnóstico incorreto, o que, especialmente na prática obstétrica, pode ter consequências irremissíveis.

Pelos motivos expostos, este estudo foi formulado para investigar se a curva de normalidade da hemoglobina fetal criada por Nicolaides a partir de amostras sanguíneas de uma população homogênea de fetos europeus tem acurácia adequada para a população brasileira, que apresenta eminente grau de miscigenação. Acredita-se que seja pertinente determinar se os parâmetros que adotamos são apropriados à nossa população, uma vez que tanto a classificação da anemia fetal quanto o volume de sangue transfundido intraútero são determinantes para o bom prognóstico gestacional.

3 OBJETIVO

Identificar se a curva de normalidade da hemoglobina fetal para o segundo e terceiro trimestres de gestação, elaborada por Nicolaidis *et al.* (1988), mostra-se apropriada para uma amostra da população brasileira.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Seleção de pacientes

Trata-se de estudo observacional transversal de uma série de casos em que foram incluídas as gestantes referenciadas ao Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEMEFE/HC-UFMG) no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2015, por motivos assistenciais, a partir de unidades básicas do Sistema Único de Saúde. Foram selecionadas pacientes com idade gestacional entre 18^{+6/7} e 36^{+6/7} semanas que apresentavam, à ultrassonografia, fetos com malformações estruturais bem estabelecidas e que demandavam pesquisa genética pré-natal.

Durante o atendimento pré-natal, discutiu-se com as gestantes e seus acompanhantes a necessidade da realização da coleta de sangue fetal por cordocentese para a análise de cariótipo, de forma a esclarecer se a malformação identificada à ultrassonografia apresentava origem genética ou não, o que poderia modificar a conduta em relação à sua assistência perinatal. A seguir, a equipe forneceu explicações quanto ao procedimento e suas implicações e apresentou às pacientes e familiares o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), sendo solicitado que lessem e, em caso de concordância, assinassem.

Cada cordocentese propedêutica realizada foi considerada um caso. Para cada caso, foram registrados em banco de dados: identificação materna, idade gestacional no momento da punção (em semanas completas), data da punção, principal sistema em que se localizava a malformação fetal diagnosticada à ultrassonografia realizada no CEMEFE, resultado do cariótipo fetal, volume corpuscular médio da hemácia (VCM) e hemoglobina fetal encontrados na hematimetria. Foi também calculada, para cada feto, a hemoglobina esperada para a idade gestacional segundo a fórmula de Nicolaidis *et al.*, sendo estimadas a diferença absoluta e a variância entre os dois últimos parâmetros.

A indicação de pesquisa de cariótipo fetal deu-se de acordo com o protocolo do CEMEFE do HC/UFMG e não houve interferência do presente estudo na conduta adotada em relação ao seguimento gestacional das participantes.

4.1.1 Critérios de inclusão

- a) Gestantes maiores de 18 anos que concordaram com o procedimento e assinaram o termo de consentimento;
- b) gestantes menores de 18 anos cujos pais ou responsáveis concordaram com o procedimento e assinaram termo de consentimento;
- c) gestações únicas;
- d) idade gestacional entre 18^{+6/7} e 36^{+6/7} semanas, definida com base na data da última menstruação (DUM), quando conhecida. Em caso de DUM desconhecida ou discordância entre a mesma e a idade gestacional estimada à primeira ultrassonografia, esta última foi considerada para datação da gravidez;
- e) malformações fetais estruturais que motivassem a propedêutica invasiva (cordocentese);
- f) ausência de doenças/condições maternas associadas a possíveis alterações adicionais no desenvolvimento fetal (ex.: pré-eclâmpsia, diabetes *mellitus*, uso de drogas ilícitas ou outros teratógenos conhecidos).

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo fetos que poderiam apresentar desvios dos valores normais de hemoglobina devido à sua doença de base. A razão de tal seleção é que o objetivo do estudo é avaliar a acuidade da curva de Nicolaidis *et al.* para fetos não anêmicos e, a partir daí, concluir se a mesma poderia ser aplicada como referência em nossa população para o protocolo de tratamento de fetos anêmicos.

Devido à possibilidade de alterações hematológicas, foram excluídos:

- a) Fetos com cariótipo alterado;
- b) fetos de gestantes aloimunizadas (coombs indireto positivo em qualquer titulação);
- c) fetos com hidropisia não imune;
- d) fetos com crescimento intrauterino restrito grave (percentil de peso inferior a 3 para a idade gestacional, com pior prognóstico em relação aos fetos classificados apenas como baixo peso para a idade gestacional independentemente de parâmetros relacionados ao doppler), segundo critérios de Hadlock, Harrist e Martinez-Poyer (1991) e de Figueiras e Gratacós (2014).

Além disso, foram excluídos fetos de gestantes que se recusaram a assinar o termo de consentimento para inclusão no estudo, revogaram o termo ou optaram pela não realização de propedêutica fetal invasiva.

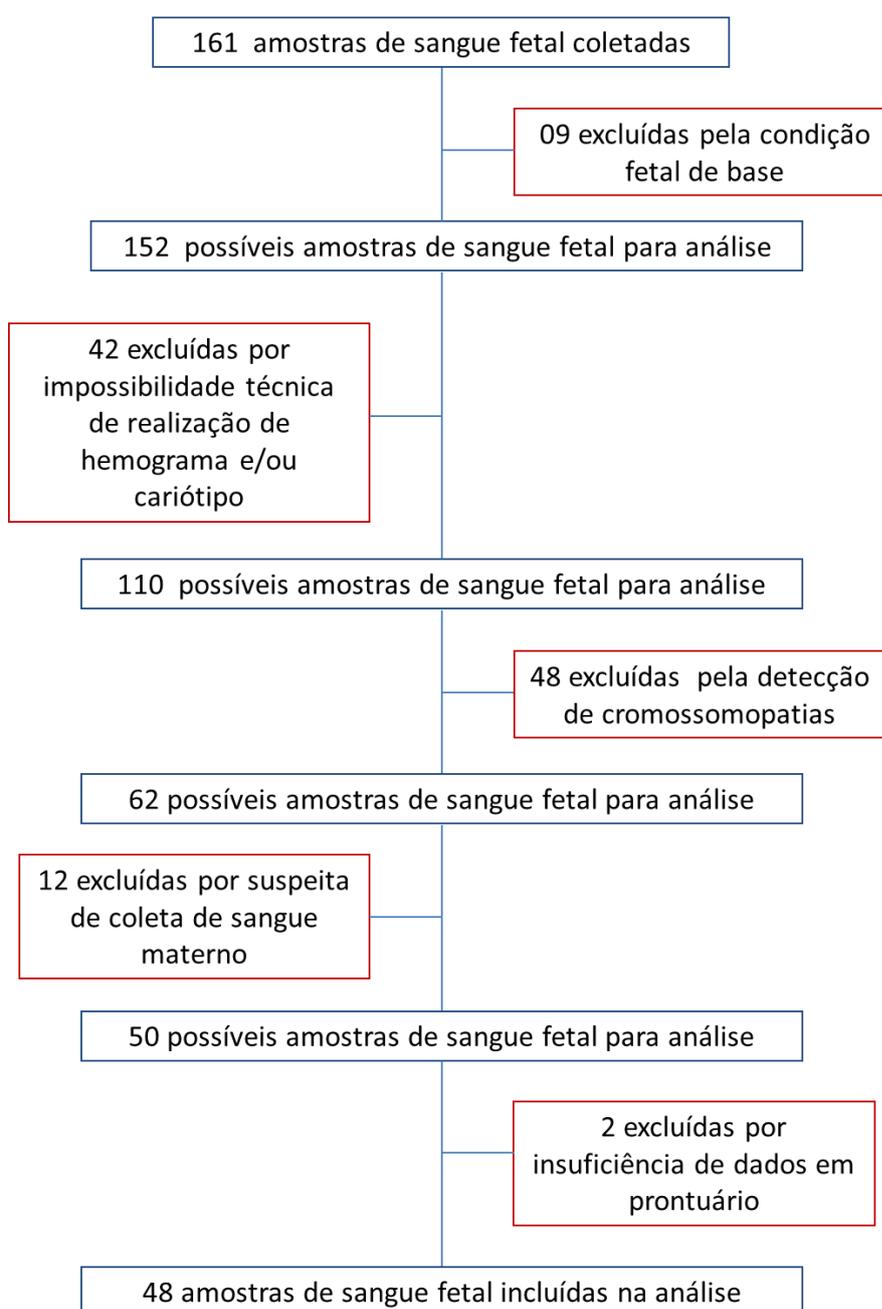
4.1.3 Amostra da pesquisa

Durante o período de 1º de janeiro de 2012 a 31 de dezembro de 2015, foram realizadas cordocenteses de 161 fetos acompanhados no CEMEFE/HC. Em todos os procedimentos, sempre que possível, foram coletadas amostras de sangue fetal em volume suficiente para três tipos de análise: hematológica, gasométrica e genética. Entre as amostras analisadas, 113 foram excluídas do estudo:

- a) 08 foram excluídas pela doença fetal de base (hidropisia não imune);
- b) 01 foi excluída pela detecção de pancitopenia no hemograma fetal, o que pode indicar doença hematológica de base e configura-se, portanto, como possível viés para a análise proposta;
- c) 42 foram excluídas pela impossibilidade técnica de realização de hemograma e/ou cariótipo na data da coleta sanguínea (incluindo situações como amostra em volume insuficiente, coagulação do sangue após a coleta, contaminação da amostra ou obtenção de número insuficiente de metáfases celulares, impossibilitando a análise do cariótipo);

- d) 48 foram excluídas por apresentarem cariótipo alterado;
- e) 12 foram excluídas por não ser possível descartar coleta de sangue materno;
- f) 02 foram excluídas por não haver registro adequado de dados em prontuário.

FIGURA 7 - Fluxograma que mostra a derivação da população do nosso estudo, a partir dos critérios de inclusão e exclusão



Fonte: dados da pesquisa.

Entre os fetos incluídos no estudo, a maioria encontrava-se com idade gestacional entre 26^{+0/7} e 35^{+6/7} semanas, conforme ilustrado na TAB. 1. A baixa frequência de gestantes no primeiro e início do segundo trimestres de gestação reflete principalmente o fato de a amostra ter sido coletada em um centro de assistência terciária, que recebe pacientes exclusivamente a partir de encaminhamento do sistema público de saúde. Esse fluxo desde a unidade básica de saúde até a avaliação especializada obedece às vias burocráticas do Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro, em que é evidente a disparidade entre demanda por atendimento e oferta de vagas. Isso frequentemente retarda o diagnóstico e o acesso da paciente ao tratamento. Além disso, nossa equipe preconiza, sempre que possível, a realização de cordocentese no segundo trimestre gestacional, devido aos menores riscos maternos e fetais condicionados por procedimentos invasivos durante essa fase da gravidez (BERRY *et al.*, 2013).

TABELA 1 - Distribuição numérica dos fetos incluídos no estudo conforme a faixa de idade gestacional em que se encontravam no momento da cordocentese

Faixa de idade gestacional (semanas)	Número de fetos
18 ^{+0/7} a 25 ^{+6/7}	6
26 ^{+0/7} a 35 ^{+6/7}	41
≥ 36 ^{+0/7}	1
Total	48

Pode-se também caracterizar a amostra pelo tipo de malformação estrutural fetal identificada à ultrassonografia, que motivou a realização de propedêutica invasiva pela equipe do CEMEFE- HC/UFMG (TAB. 2).

TABELA 2 - Distribuição numérica dos fetos incluídos no estudo conforme o sítio da principal malformação estrutural identificada à ultrassonografia

Tipo de malformação	Número de fetos
Cardíaca	10
Defeito de fechamento da parede abdominal	05
Óssea	01
Sistema geniturinário	03
Sistema nervoso central	12
Malformações em múltiplos sistemas	16
Outras	01
Total	48

É relevante explicitar a distribuição dos cariótipos encontrados na amostra (TAB.

3), devido ao fato de terem sido encontrados, nos fetos avaliados, arranjos cromossômicos com alterações de heterocromatina (qh+ e qh-) e “variante *stalk*” (stk), considerados nuances da normalidade e que, portanto, podem ser encontrados na população normal. Os resultados originais dos cariótipos dos fetos que apresentaram tais particularidades genéticas estão anexados a este trabalho (ANEXO C).

TABELA 3 - Distribuição numérica dos tipos de cariótipos fetais encontrados na amostra do estudo

Cariótipo	Número de fetos
46, XX	18
46, XY	24
46, X, Yqh+	02
46, X, Yqh-	01
46, XY, 16qh+	02
46, XX, 15pstk+	01
Total	48

4.1.4 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG), recebendo o número de protocolo CAAE-50497715.0.0000.5149 (ANEXO A). Foi também aprovado pelo colegiado de pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia e pela Câmara do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da UFMG (ANEXO B), tendo sido respeitados os princípios de Helsinque para pesquisa em seres humanos.

Todas as pacientes incluídas na pesquisa assinaram o Termo de Consentimento livre e Esclarecido previamente ao procedimento de cordocentese (APÊNDICE A).

A seleção das pacientes e a obtenção do material para pesquisa não afetaram a evolução da gestação ou a indicação do momento e via de parto. Logo, a pesquisa não implicou, em momento algum, risco adicional para a gestante e seu concepto.

A recusa de assinatura no termo de consentimento - a não permissão de inclusão de dados no estudo - não interferiu no acompanhamento pré-natal da gestante em

nossa instituição.

4.2 Métodos

Neste item são detalhados os métodos nos quais se embasou esta investigação.

4.2.1 Cordocentese

A cordocentese consiste na punção direta do cordão umbilical guiada por ultrassonografia, sendo realizada preferencialmente próximo de sua inserção na placenta (DAFFOS, CAPELLA-PAVLOVSKY;FORESTIER, 1983). O procedimento possibilita a coleta de amostra de sangue fetal para tipagem sanguínea, análise hematimétrica, determinação de cariótipo, titulação de anticorpos, assim como permite o tratamento do feto anêmico por meio da transfusão intrauterina (MOISE JR., 2002; NICOLAIDES; WARENSKI; RODECK, 1985).

Por ser um método propedêutico e terapêutico invasivo e que compreende certa complexidade técnica, associa-se à perda fetal de 1 a 2%, com maior incidência quanto mais precoce a idade gestacional no momento da punção. Pode ainda resultar em hemorragia feto-materna que, por sua vez, pode causar o desenvolvimento ou agravamento da aloimunização (OEPKES *et al.*, 2006).

A complicação mais comum é o sangramento do sítio de punção no cordão umbilical ou na placenta, com incidência relatada de 20-30%, sendo geralmente autolimitado (menos de três minutos). Alterações da frequência cardíaca fetal também ocorrem frequentemente, sendo a bradicardia mais comum do que a taquicardia (5-10% dos casos). A maior parte das bradicardias se resolve em até cinco minutos, usualmente não requerendo intervenções (BERRY *et al.*, 2013). Caso seja persistente, o procedimento deve ser suspenso. Quando realizado em gestações viáveis (≥ 24 -26 semanas, a depender do protocolo institucional), a equipe deve estar preparada para extração fetal de emergência, em centro com

infraestrutura cirúrgica adequada, disponibilidade de Unidade de Terapia Intensiva Neonatal e assistência de equipe de obstetras e neonatologistas capacitados (Serviço de Protocolos de Medicina Perinatal - Instituto Clínico de Ginecologia, Obstetrícia e Neonatologia - ICGON - Hospital das Clínicas de Barcelona. Disponível em: https://www.medicinafetal.barcelona.org/clinica/images/protocolos/patologia__fetal/cordocentesi.pdf. Acesso em: 04/08/2015).

Para as gestantes com sangue Rh negativo, é realizada a pesquisa quantitativa de coombs indireto antes do procedimento. Caso o resultado seja negativo, administram-se 300 microgramas de imunoglobulina anti-Rh intramuscular profilática logo após o término da punção.

O processo para a realização do procedimento pela equipe do CEMEFE-HC/UFMG consiste nos seguintes passos:

- a) Orientação da gestante e familiares sobre a malformação fetal, indicação de avaliação de cariótipo e exames adicionais a serem realizados no sangue coletado (hemograma e gasometria);
- b) assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pela paciente (se maior de 18 anos) ou pelos responsáveis (Apêndice A);
- c) ultrassonografia obstétrica com detalhada avaliação da morfologia fetal, além de localização precisa da inserção placentária do cordão umbilical (local preferível de punção);
- d) definição do local de punção no abdome materno guiada por ultrassonografia. Antissepsia do local com degermante de iodopovidona a 10%;
- e) punção percutânea com agulha de 20 Gauge (G) sob orientação ultrassonográfica contínua, de acordo com a técnica "à mão livre" (permite reconsiderar a direção da agulha em todos os momentos do procedimento);
- f) extração de 3 a 5 mL de sangue fetal. A primeira amostra de sangue (cerca de 1 mL) é acondicionada em tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para realização de hemograma fetal.

Cerca de 1 mL é coletado em seringa específica para a realização de gasometria e o restante é enviado em tubo com heparina sódica para avaliação de cariótipo pela técnica de banda G (vide item 4.2.3);

- g) confirmação da origem fetal do sangue coletado a partir de análise hematimétrica, realizada em laboratório. A confirmação da origem fetal do sangue, em nosso serviço, é estipulada a partir de dois possíveis parâmetros: i) pela avaliação do volume corpuscular médio das hemácias (VCM), que nos fetos é maior devido à presença eritroblastos circulantes; ii) pelo resultado de cariótipo distinto do materno;
- h) retirada da agulha, compressão leve no ponto de punção por 1 minuto e curativo local.

Todos os procedimentos incluídos neste estudo foram realizados por dois profissionais com ampla experiência no acompanhamento e tratamento de doenças fetais e na realização de ultrassonografia obstétrica. As ultrassonografias obstétricas transabdominais foram feitas em um único tipo de aparelho (Philips Healthcare® modelo HD7 XE), utilizando transdutor abdominal convexo (3,5 MHz). Um dos profissionais orientava a punção por meio da ultrassonografia e o outro, paramentado, realizava a punção do cordão umbilical e coleta de sangue para análise, sendo a frequência cardíaca fetal monitorizada durante todo o procedimento.

Após a punção, confirmadas a vitalidade fetal e a regularidade de seu ritmo cardíaco, a paciente era liberada para o domicílio, com orientações sobre possíveis intercorrências, serviço obstétrico de referência e agendamento de retorno ambulatorial. O seguimento ambulatorial em todos os casos foi feito pela mesma equipe responsável pela cordocentese.

Não faz parte do protocolo do nosso serviço a utilização de bloqueadores neuromusculares, agentes tocolíticos ou antibioticoterapia profilática durante a cordocentese. Não foram registrados, durante o período da pesquisa, casos de corioamnionite, trauma de órgãos maternos ou fetais nem de trabalho de parto pré-termo associados ao procedimento. Todos os casos de sangramento no sítio

de punção e bradicardia fetal (complicações mais comuns encontradas) resolveram-se espontaneamente em tempo inferior a dois minutos.

Cabe lembrar que, independentemente do momento em que foram feitas, todas as cordocenteses foram realizadas após anuência da paciente, com a assinatura do termo de consentimento pós-informado.

4.2.2 Hematimetria fetal

A análise hematimétrica de todas as amostras de sangue fetal foi realizada no laboratório central do HC-UFMG, por metodologia automatizada (aparelho Coulter STKS), capaz de fornecer o resultado completo em cerca de um minuto.

A avaliação hematimétrica com base em contadores automáticos pode ser feita com pequeno volume de sangue total colhido em tubo com anticoagulante, preferencialmente o EDTA (LEHNERA; GREVEB; CASSENSA, 2007). A amostra deve estar perfeitamente homogeneizada e sem coágulos, devendo ser processada em no máximo duas a quatro horas após a coleta. As amostras com tempo de armazenamento superior ao preconizado podem apresentar alterações das contagens celulares e de seus índices (BRAGA, 2014).

Quando houve resultados duvidosos ou alertas do aparelho que o justificassem, foi empregado o método de avaliação tradicional, com visualização microscópica do esfregaço de sangue e contagem celular manual.

4.2.3 Avaliação do cariótipo fetal

A técnica de cariotipagem em sangue periférico consiste na análise microscópica dos cromossomos de linfócitos bloqueados na metáfase celular (Técnica de Moorhead modificada), após cultura de 72 horas com fito hemaglutinina. Essa substância é uma proteína vegetal que possui excelente atividade mitogênica,

bastando 0,1-0,2 mL para estimular a diferenciação básica e consequente mitose de linfócitos T presentes em 1 mL de sangue.

Em seguida, os cromossomos da amostra são corados pelo método de coloração para banda G, que envolve processos como desidratação, desnaturação ou digestão enzimática, seguida da incorporação de corante DNA-específico (ex.: Giemsa). As bandas formadas refletem a organização funcional do genoma e a técnica fundamenta-se na composição de bases do DNA e suas proteínas associadas (Técnicas de análise cromossômica (disponível em: <http://www.fciencias.com/2014/07/13/tecnicas-de-analise-cromossomica/>. Acesso em 29/06/2016). A resolução utilizada em nosso laboratório de citogenética (HC/UFMG) é de 400-550 bandas.

Esse exame destina-se à identificação e pareamento dos cromossomos, com distinção de suas diferentes regiões, tendo por base sua morfologia, a posição do centrômero e o tamanho e número de bandas, que são específicas para cada par. Dessa forma, permite o diagnóstico de desarranjos numéricos e/ou estruturais, balanceados ou não.

Imediatamente após a coleta em tubo com heparina sódica, o material coletado no CEMEFE é enviado para o laboratório central do HC-UFMG, sendo processado e analisado no centro de citogenética. Em nossa instituição, a avaliação de cariótipo fetal somente é realizada em amostra de sangue obtido por cordocentese. Ainda não dispomos de técnicas de cariotipagem para análise de células obtidas por outros métodos, como biópsia de vilo corial, amniocentese ou identificação de DNA fetal livre em sangue periférico materno.

4.2.4 Análise estatística

Foram revisados em prontuário os dados de 161 pacientes submetidas a cordocentese no CEMEFE do HC-UFMG, bem como informações relacionadas às malformações de seus fetos. Porém, apenas 48 indivíduos atenderam aos critérios de inclusão no estudo e tiveram seus dados incluídos na análise.

Os resultados das dosagens de hemoglobina fetal, VCM e análise de cariótipo foram obtidos por meio do sistema *on-line* do Laboratório Central do HC-UFMG e incluídos, juntamente às informações supracitadas, em banco de dados construído no *software Microsoft Excel*®.

Para caracterização da amostra, foram calculadas inicialmente as médias, desvios-padrão e valores máximos e mínimos da hemoglobina encontrada para a idade gestacional.

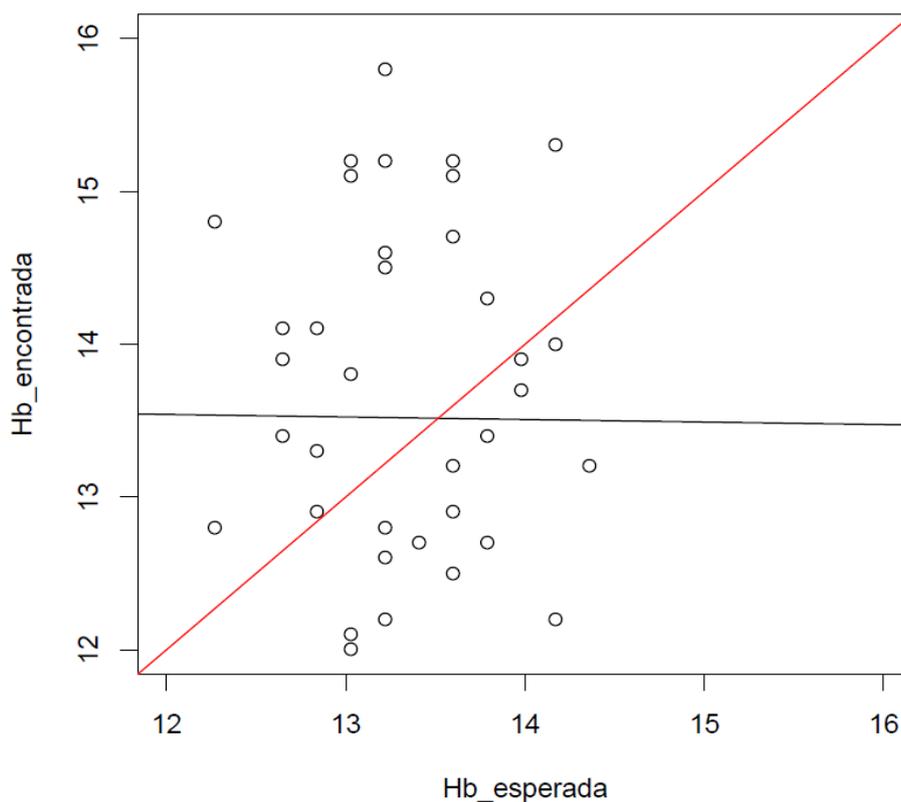
O modelo de regressão linear e o suavizador *Lowess* foram utilizados para descrever a relação entre a hemoglobina e a idade gestacional.

A análise dos dados foi feita utilizando-se o *software* estatístico “R”.

5 RESULTADOS

O gráfico 1 compara a hemoglobina mensurada no sangue dos fetos incluídos no estudo com a hemoglobina esperada, de acordo com a fórmula original de Nicolaidis *et al.* Nesse gráfico, a reta da equação de Nicolaidis para os valores de hemoglobina esperada encontra-se destacada em vermelho, enquanto os pontos não preenchidos representam os valores encontrados na amostra.

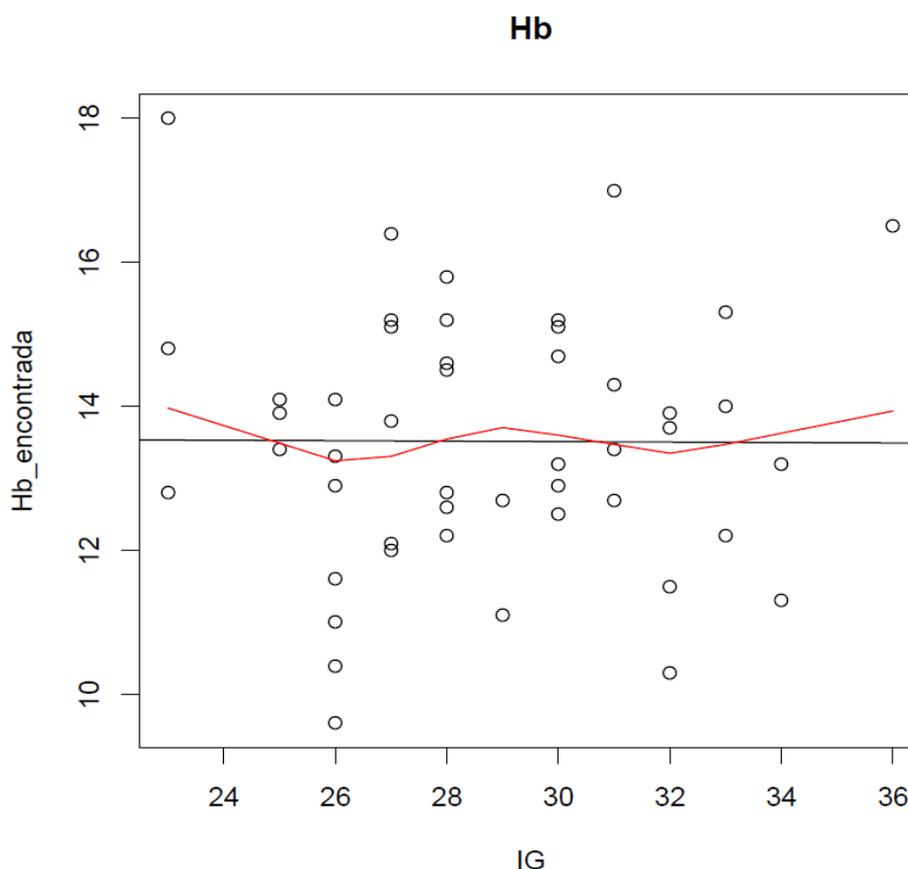
GRÁFICO 1 - Hemoglobina encontrada no sangue dos fetos estudados (Hb_ encontrada) *versus* hemoglobina esperada (Hb_ esperada) para a idade gestacional desses fetos, de acordo com a fórmula de Nicolaidis *et al.*, em g/dL



O que se pode observar nessa primeira avaliação é que a hemoglobina encontrada nos fetos avaliados apresenta-se significativamente mais dispersa do que o esperado. Os valores deveriam estar próximos da reta vermelha ($X=Y$) caso a fórmula de Nicolaidis *et al.* fosse adequada para descrever os dados. No

entanto, os valores estão distantes dessa reta e aproximam-se, matematicamente, da linha preta central. A equação original prediz um ténue crescimento da concentração de hemoglobina ao longo da gestação, enquanto nos fetos estudados os valores mostraram-se praticamente constantes, em torno de 14 g/dL. Dessa forma, concluiu-se que o modelo esperado nesta análise está predizendo mal os valores observados. O segundo passo do estudo foi, então, a determinação de qual equação melhor descreveria os valores de hemoglobina encontrados em nossa amostra, em função da idade gestacional (GRÁF. 2).

GRÁFICO 2 - Relação entre os valores de hemoglobina fetal encontrados na amostra, em g/dL (Hb_encontrada), e a idade gestacional (IG), em semanas completas



A linha vermelha representa o suavizador não paramétrico, enquanto a linha preta demonstra o ajuste de regressão linear. De acordo com a avaliação estatística, é a linha vermelha que melhor descreve a relação entre a hemoglobina fetal e a

idade gestacional, para a amostra estudada. Observa-se que a mesma é praticamente constante, ou seja, indica que, entre 23 e 36 semanas de gravidez, a hemoglobina manteve-se em torno do valor de 13,5 g/dL.

6 DISCUSSÃO E SUGESTÕES

Um dos principais motivos para a realização deste estudo foi a inexistência de valores de referência longitudinais para a concentração plasmática de hemoglobina personalizados para fetos brasileiros, o que afeta diretamente a assistência prestada no Centro de Medicina Fetal. Ao longo de sua condução, tornou-se progressivamente evidente a necessidade da criação de curvas de crescimento e desenvolvimento fetais adequadas às nossas características populacionais. Porém, esse escopo demanda uma programação metodológica complexa e completamente diversa do que a inicialmente estruturada.

Uma pesquisa que apresente como principal propósito a criação de gráficos de referência para a hematologia fetal implicaria o envolvimento de múltiplos centros, com a documentação longitudinal da evolução de fetos provenientes das diversas regiões do Brasil. Demandaria ainda a participação de instituições de níveis primário, secundário e terciário de assistência, reduzindo a possibilidade de vieses relacionados à seleção amostral. Todas as equipes envolvidas na coleta de dados deveriam ser habilitadas a partir da mesma metodologia e utilizar ferramentas semelhantes de análise, o que geraria a necessidade de adaptação estrutural dos centros envolvidos e, sobretudo, a disponibilidade de recursos humanos determinados a participar e conduzir o projeto da forma mais adequada possível.

Um país de dimensões continentais e com tamanha complexidade étnica, cultural e climática como o Brasil requer estudos com elevado número amostral, capaz de representar características particulares de cada território. Sabe-se que, em nosso caso, a tentativa de implementação das curvas padrão etnia-específicas já existentes na literatura é inoportuna, devido ao alto grau de miscigenação populacional.

Outra implicação metodológica de estudos que envolvam a avaliação de parâmetros fetais é a necessidade de obtenção de uma condição intrauterina

“ótima” para o desenvolvimento do conceito, de forma a reduzir a interferência de fatores ambientais modificáveis nos resultados obtidos. Na medida do possível, o grupo de pesquisa deve buscar o controle de aspectos como idade, nutrição e saúde materna, exposição a medicamentos e a drogas lícitas/ilícitas, exposição a agentes infecciosos e poluentes, condições básicas de saneamento e infraestrutura social, acesso adequado a cuidados pré-natais e, em última análise, o bom funcionamento da unidade feto-placentária. Indiscutivelmente, todas essas condições podem estar fora do domínio dos investigadores, mas devem ser registradas e consideradas na análise de possíveis diferenças encontradas nos diversos sítios de estudo. A descrição detalhada das condições em que foram obtidas as informações é essencial para a adequada validação externa dessas curvas (UAUY *et al.*, 2013).

Por fim, uma vez construídas e publicadas as curvas, os desfechos resultantes de sua implementação devem ser cuidadosamente monitorizados, de forma a equacionar o real impacto dos novos parâmetros no cuidado gestacional em longo prazo, essencialmente no que diz respeito à morbimortalidade materno-fetal. Para tal, são primordiais a adesão, o treinamento e a uniformidade dos médicos assistentes em relação à interpretação de dados e à tomada de decisões, possivelmente um dos maiores desafios operacionais.

No âmbito do presente trabalho, o maior desafio metodológico foi a obtenção de amostras de sangue fetal elegíveis para inclusão no estudo. Em primeiro lugar, sobrepôs-se a questão ética. Frente aos riscos maternos e fetais intrínsecos aos procedimentos invasivos, não se justifica a realização de cordocentese em fetos normais para fins exclusivos de pesquisa, o que reduziu nosso universo amostral àqueles fetos que, por motivos assistenciais, seriam necessariamente submetidos a tal procedimento. Não houve possibilidade de proceder a seleções elaboradas ou realizar um cálculo amostral específico, uma vez que, frente ao exposto, era compulsória a limitação à amostra de conveniência originária da nossa instituição.

A análise hematimétrica das amostras de sangue obtidas também constituiu etapa laboriosa. Em muitos momentos, apesar de todos os cuidados adotados durante a coleta, da perícia dos profissionais envolvidos e da equipe de apoio disponível,

não foi possível obter um volume de sangue fetal suficiente para inclusão na pesquisa. Por ser um vaso relativamente pouco calibroso e com considerável fragilidade parietal, é comum que ocorra perda do ponto de punção na artéria umbilical, em decorrência da movimentação fetal ou até transfixação da mesma, o que limita o volume de sangue obtido. Visto que frequentemente os riscos de uma nova tentativa de punção superam os possíveis benefícios da obtenção de maior volume amostral, optou-se por priorizar a realização do cariótipo para determinação da conduta em relação à gestação, em detrimento de outras informações passíveis de serem obtidas a partir desse procedimento, como bem elucidado em nossa proposta ética inicial.

Em determinados casos, a amostra apresentou pequenos coágulos, formados dentro da seringa ainda durante o processo de coleta, impedindo sua utilização para fins de contagem celular. Por motivos evidentes ligados à proteção da circulação fetal, não é habitual a coleta de sangue por cordocentese em seringas que contenham anticoagulantes. Uma vez coletada, a alíquota da amostra que se destinará à análise hematológica deve ser rapidamente transferida a outro recipiente revestido por anticoagulante, porém nem sempre a agilidade da equipe supera o tempo necessário para que microcoágulos se formem no tubo de coleta e prejudiquem a progressão da análise. Embora seja uma atividade habitual para a equipe de Medicina Fetal do nosso serviço, atribuem-se à cordocentese muitas precauções e cuidados, uma vez que fatores como a movimentação fetal, o local da inserção placentária do cordão e até mesmo a tolerância e sensibilidade maternas ao procedimento podem inviabilizá-lo.

O terceiro maior obstáculo à execução deste trabalho foram as particularidades relacionadas à técnica de estudo cromossômico, já que propusemos apenas a inclusão de fetos normais do ponto de vista genético. Como explicitado anteriormente, o método de cariotipagem pela técnica de bandeamento G exige a obtenção de um número mínimo de linfócitos em metáfase celular, que muitas vezes não pôde ser alcançado dentro da amostra sanguínea obtida de nossos fetos. Todos os processos que envolvem a cultura e manipulação de células configuram desafios técnicos importantes na execução de pesquisas, já que estão condicionados à influência de diversos fatores ambientais e intrínsecos à

linhagem celular, que frequentemente fogem ao controle dos técnicos laboratoriais.

Questões relacionadas à interpretação do resultado genético, nos casos em que este foi disponibilizado, também assumiram importância no processo de seleção amostral. Uma vez munidos dos cariótipos, era imperioso confirmar sua origem fetal, já que a técnica de cordocentese é passível de coleta inadvertida ou contaminação com sangue materno. Para tal, foram definidos dois grupos caracterizados inicialmente pela presença ou não do cromossomo Y. O resultado de cariótipo 46, XY (distinto do cariótipo 46, XX materno), assegura que a amostra de sangue examinada é, de fato, fetal. Porém, nos casos em que o cariótipo encontrado foi 46, XX, tornou-se necessário excluir a possibilidade de coleta de sangue materno. A metodologia mais simples para estabelecer tal distinção consiste na avaliação do volume corpuscular médio das hemácias, que, no feto saudável, habitualmente é superior a 100 fl, devido à presença de hemácias imaturas (caracteristicamente mais volumosas do que as hemácia do indivíduo adulto) em sua circulação periférica. Este é o ponto de corte que foi utilizado para legitimar a amostra como representativa do sangue fetal. Nos casos em que o cariótipo 46, XX, associou-se a VCM inferior a 100 fl, não foi possível definir com precisão a origem do sangue coletado, o que determinou a exclusão de 8% dos pacientes (12 amostras).

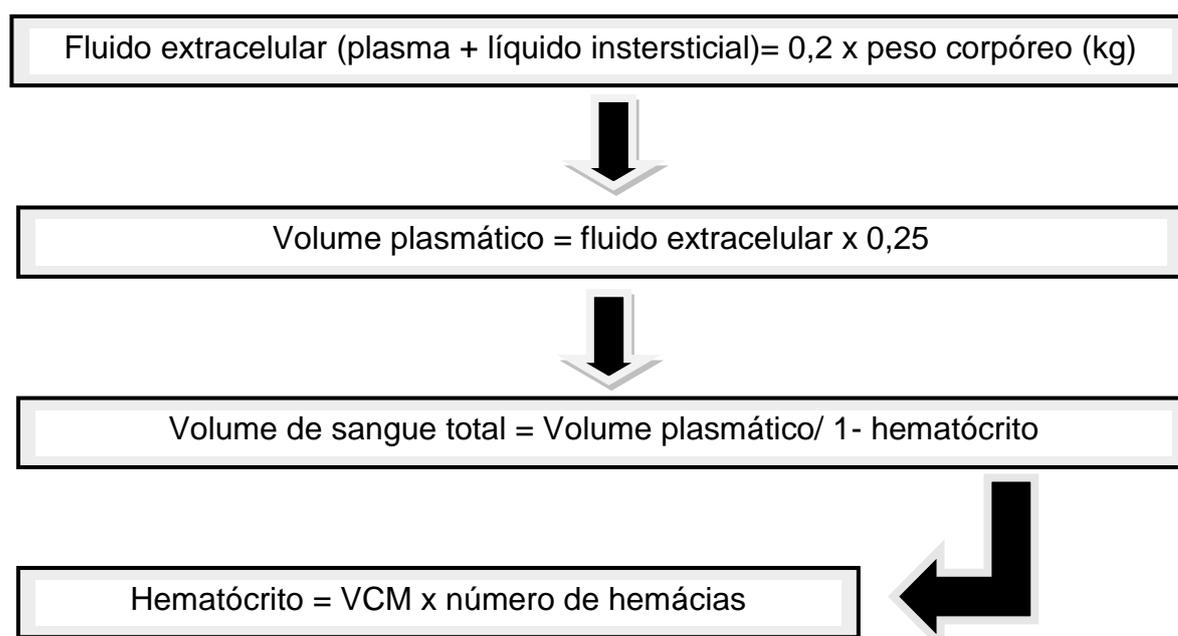
Por fim, houve também subtração amostral relacionada a um viés intrínseco aos trabalhos com componentes retrospectivos: em uma minoria de casos, os registros de prontuário foram insuficientes ou inadequados para a inclusão dos pacientes no estudo.

Ainda que a amostra final disponível seja de apenas 48 fetos, os resultados apresentados na seção anterior são suficientemente robustos, ao serem interpretados à luz dos conceitos estatísticos. O ajuste de regressão evidencia que, nos fetos incluídos no estudo, não houve aumento significativo da concentração de hemoglobina em função do aumento da idade gestacional. Este achado contradiz a fórmula de Nicolaidis, que reporta haver, em média, aumento

mensal de 0,19 g/dL na concentração da hemoglobina fetal ao longo do segundo e terceiro trimestres gestacionais.

Considerando a representação gráfica, a inclinação da reta que retrata a concentração de hemoglobina dos nossos fetos (GRÁF. 2) é zero, com intervalo de confiança entre -0,17 e 0,17. Observa-se que a constante de crescimento de 0,19 (encontrada no estudo original) não pertence ao intervalo de confiança obtido no presente trabalho. Dessa forma, os dados encontrados nos permitem afirmar que a fórmula original não é adequada para classificação dos fetos que constituem a amostra desta investigação. Este achado é, por si só, suficiente para impelir a construção de uma nova curva de referência para a concentração de hemoglobina fetal e a adoção de maiores cuidados em relação à terapêutica intraútero nas instituições brasileiras.

Por outro lado, são conhecidos os pilares fisiológicos da hemodinâmica humana, em que comprovadamente há relação direta entre o volume sanguíneo total, o hematócrito e o peso corporal de um indivíduo, conforme explicitado pelas equações a seguir (SCHULTZ, 2000; STANTON; KOEPPEN, 2004).



Portanto, alicerçados nesses conceitos, admite-se que deva existir algum grau de elevação na concentração da hemoglobina ao longo da gestação, acompanhando de forma direta o crescimento fetal. Acreditamos, no entanto, que esse incremento na população avaliada seja provavelmente inferior ao previsto por Nicolaides *et al.* em sua fórmula original. Considerando uma constante de elevação presumivelmente modesta, o tamanho da amostra pode não ter sido suficiente para representar sua existência e amplitude, e por isso nossos dados apresentaram-se constantes ao longo da evolução gestacional.

Os resultados obtidos não causaram surpresa, já que vão ao encontro da hipótese que motivou a realização deste trabalho, mas nos advertem, na medida em que são compreendidas suas potenciais consequências. Ao tratar de forma inadequada um feto, pode-se selar o destino de determinada gestação, bem como afetar toda a evolução desse indivíduo no que diz respeito às condições de saúde em longo prazo. Estudos consistentes revelam que a manipulação de qualquer elemento do ambiente no período que se estende da concepção até a infância pode associar-se a mudanças permanentes na fisiologia conceptual. Grande parte dessas alterações é atribuída a modificações perenes na expressão genética, regulada por fatores como a metilação do DNA e metilação/acetilação de histonas, sem alterações diretas do genoma em si, mas apenas em sua transcrição, o que caracteriza a essência do conceito de epigenética (GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007). Essa plasticidade do desenvolvimento fetal ocorre em várias espécies e, provavelmente, implica a indução de atributos de adaptação do indivíduo ao tipo de ambiente em que ele viverá fora do útero, promovendo, dessa forma, melhores condições de sobrevivência e de perpetuação de sua carga genética (GLUCKMAN *et al.*, 2005).

Guiados por essas informações, diversos grupos de pesquisa iniciaram um movimento em busca de referências que sejam efetivamente adequadas às características ambientais e genéticas de diversas populações mundiais e às condições de vida atuais. São expoentes dessa nova tendência o estudo *International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century* (INTERGROWTH-21st) (UAUY *et al.*, 2013) e o estudo multicêntrico de referência de crescimento conduzido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (*The WHO*

Multicentre Growth Reference Study) (DE ONIS *et al.*, 2004). A justificativa para a realização de ambos é que as atuais referências de crescimento fetal e neonatal são baseadas em amostras restritas, com importantes limitações metodológicas. Um bom exemplo é a antiga curva padrão da OMS para o crescimento neonatal por idade gestacional, que tinha como referência apenas uma população de recém-nascidos do estado da Califórnia (Estados Unidos) na década de 70 (WILLIAMS *et al.*, 1982), provavelmente não representando adequadamente o atual universo de neonatos. Os autores ressaltam que as populações têm sido expostas a uma série de condições sociodemográficas, culturais e nutricionais que têm profundo impacto em seus padrões de desenvolvimento e que, até o início deste século, não estavam disponíveis parâmetros de desenvolvimento que realmente contemplassem as chamadas “populações saudáveis contemporâneas”.

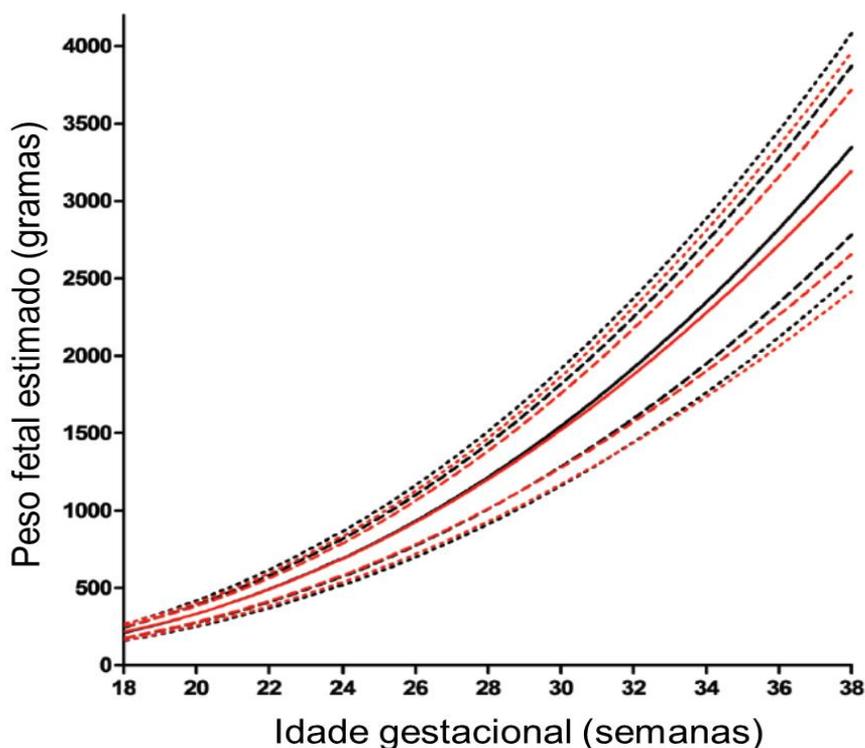
Outro ponto que ainda instiga os pesquisadores é o fato de, assim como ocorreu para a curva de hemoglobina de Nicolaidis *et al.*, as antigas curvas de referência terem sido geradas a partir de dados transversais, ou seja: foram realizadas medidas únicas de parâmetros biométricos de diversos fetos em diferentes idades gestacionais, em vez de se acompanhar a evolução desses parâmetros para um mesmo feto ao longo de seu desenvolvimento intrauterino. Como consequência, essas curvas mostram-se úteis para comparações entre indivíduos dentro de determinada idade gestacional, mas apresentam consideráveis limitações quando o objetivo é julgar a adequabilidade da trajetória de crescimento de um feto ou neonato em particular e suas potenciais consequências futuras. Do ponto de vista biológico, é mais valioso avaliar se houve desvio do padrão normal de progressão do que julgar o valor absoluto de um parâmetro em um determinado momento (UAUY *et al.*, 2013).

Em 2014, um grupo de pesquisa estabeleceu referências para os parâmetros biométricos de fetos brasileiros a partir da avaliação de mais de 31.000 gestações entre 18 e 38 semanas de evolução (ARAÚJO JR. *et al.*, 2014a). Os autores ponderam que diversos gráficos de biometria fetal já haviam sido publicados na Europa e Ásia, mas que todos foram criados a partir de populações homogêneas, sendo provavelmente inapropriados para populações em que não há grupos

étnicos evidentes, como é o caso do Brasil. Estudos genéticos mostraram, por exemplo, que 61% dos brasileiros que se consideram “brancos”, ao serem questionados sobre sua raça, possuem elementos de ancestrais negros e indígenas em seu DNA, em proporções de 28 e 33%, respectivamente (CARNEIRO, 2009).

Em nosso país, a maioria dos serviços pré-natais de referência ainda utiliza, para fins de classificação e definição de risco, a tabela de peso fetal proposta por Hadlock, Harrist e Martinez-Poyer (1991), estruturada a partir de uma população composta de 392 gestantes norte-americanas brancas de classe média, um grupo que pouco representa a população brasileira como um todo. Quando compararam os pesos fetais médios de seu estudo com aqueles estimados pela tabela clássica de Hadlock *et al.* (1991), os pesquisadores observaram que os valores de sua amostra eram discretamente menores ao longo de todo o intervalo gestacional estudado. Na conclusão, inferem que o achado díspar decorre de heterogeneidades raciais e genéticas, mas também sofre influência do reduzido número de casos avaliados no estudo norte-americano (FIG. 8).

FIGURA 8 - Pesos fetais médios estimados (em gramas) de acordo com a idade gestacional (em semanas) obtidos no estudo de Araújo Jr. *et al.* (2014) versus os do estudo de Hadlock, Harrist e Martinez-Poyer (1991)



Observação: neste gráfico, as linhas sólidas indicam os percentis 50, enquanto as linhas pontilhadas indicam o 3º e o 97º percentis. As linhas vermelhas representam o estudo brasileiro, enquanto as linhas pretas indicam o estudo de Hadlock, Harrist e Martinez-Poyer (1991).

Fonte: adaptado de Araújo Jr. *et al.* (2014a).

Ao analisar uma amostra vultosa de fetos de ascendência altamente miscigenada, este estudo mostrou caráter inédito e abriu as portas para que se explorassem todas as possíveis diferenças dos nossos conceitos em relação aos demais da população mundial. Já existem hoje trabalhos publicados que contemplam curvas de fetos brasileiros para parâmetros como translucência nucal (ARAÚJO JR. *et al.*, 2014d), translucência intracraniana (PEIXOTO *et al.*, 2016a), comprimento do osso nasal (ARAÚJO JR. *et al.*, 2014c), diâmetro cerebelar transverso (ARAÚJO JR *et al.*, 2015), diâmetro do átrio do ventrículo lateral (PEIXOTO *et al.*, 2016b), diâmetro da cisterna magna (ARAÚJO JR. *et al.*, 2014b), entre outros.

Em relação à hematologia fetal, não foram encontrados, na revisão bibliográfica

efetuada, estudos que tenham avaliado linhagens celulares específicas, circunstância provavelmente atribuída às importantes limitações éticas e metodológicas sobre as quais discorreremos previamente. Não obstante, pudemos identificar diversos trabalhos voltados para a construção de curvas populacionais específicas da dopplervelocimetria de vasos fetais e até mesmo maternos. Em alguns deles, evidenciam-se padrões de comportamento peculiares das ondas de velocidade sanguínea, o que de forma indireta pode refletir características reológicas próprias desses indivíduos e de sua homeostase.

No Brasil, destaca-se uma pesquisa do Centro de Atenção à Saúde Integral da Mulher da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (TAVARES *et al.*, 2013), que estabeleceu referências de parâmetros dopplervelocimétricos materno-fetais para uma população de gestantes brasileiras. Os autores justificam a relevância do trabalho alegando que, uma vez que as características hemodinâmicas materno-fetais em situações de alto risco apresentam caráter evolutivo, a dopplervelocimetria durante a gestação seria mais bem interpretada a partir de intervalos de referência longitudinais. E acrescentam o argumento de que “pouco se sabe se as diferenças populacionais ou étnicas podem interferir nos parâmetros dopplervelocimétricos gestacionais”.

Ao efetuarem a comparação de seus resultados com os intervalos de normalidade propostos nas publicações mais relevantes até aquele momento, Tavares *et al.* (2013) detectaram semelhança entre os valores das medianas tanto para os índices de pulsatilidade da artéria umbilical quanto do ducto venoso, porém com intervalos significativamente mais estreitos entre os percentis 5 e 95 na curva brasileira. Na conclusão, ponderam que as discrepâncias poderiam ser parcialmente justificadas pelo número de aferições realizadas em cada estudo (aproximadamente 500 medidas nos trabalhos internacionais contra 1.242 exames no trabalho brasileiro), o que contribui para o estreitamento entre os percentis, mas ressaltam que não é possível saber até que ponto as diferenças populacionais teriam contribuído para esses achados.

Da mesma forma, nossas observações não permitem afirmar que a curva de Nicolaidis não possa ser empregada em fetos brasileiros, mas alertam sobre o

fato de que, na amostra aqui registrada, ela não se encaixa como um modelo ideal de classificação e tratamento para o feto anêmico.

Como principal ponto positivo deste estudo, ressalta-se o fato de todos os exames ultrassonográficos e cordocenteses terem sido realizados pelos mesmos profissionais, com ampla experiência e capacidade técnica. Dessa forma, controlam-se possíveis vieses relacionados à coleta amostral, registro e interpretação de informações. Adicionalmente, o processamento e análise de todas as amostras foram realizados por técnicas uniformes dentro de um único laboratório de referência, vinculado ao serviço hospitalar. Isso garante a confiabilidade e reprodutibilidade interna dos resultados, além de agilidade na disponibilização dos mesmos.

Considerando os entraves no que concerne à obtenção de material biológico fetal, julga-se que nossa população foi a mais fidedigna possível aos parâmetros de fetos normais, com inclusão de toda uma série de casos ao longo de quatro anos de atividades de um centro terciário especializado em assistência fetal. Destaca-se ainda o cuidado de excluir da análise todas as condições que, até o momento, são reconhecidamente capazes de interferir na hematimetria fetal (vide seção 4.1.2).

As limitações identificadas relacionam-se principalmente à seleção amostral, que contemplou a população proveniente de apenas um centro médico terciário, o que pode restringir a validação externa dos resultados. Em segundo lugar, cita-se o fato de todas as amostras de sangue terem sido coletadas de fetos com malformações estruturais diagnosticadas à ultrassonografia, não tendo sido possível incluir, em nossa análise, fetos absolutamente normais do ponto de vista morfológico. Por envolverem riscos proibitivos para a gestante e, especialmente, para o feto, procedimentos invasivos como a cordocentese estão proscritos para fins exclusivos de pesquisa. Assim, a única forma de obter amostras de sangue fetal sem interferir na evolução da gestação seria a partir das cordocenteses formalmente indicadas para fins assistenciais propedêuticos e/ou terapêuticos.

Por fim, tecem-se considerações relacionadas ao arranjo amostral, que não apresenta uniformidade de distribuição de observações para cada idade gestacional, o que resulta numa lacuna de precisão para a construção de uma nova curva de referência. Conforme estudo que trata da metodologia propícia à construção de faixas de normalidade para variáveis fetais, seria necessária amostra de pelo menos 20 observações por idade gestacional para a construção de uma curva adequada, o que se denomina “Princípio de Royston” (ROYSTON; WRIGHT, 1998).

Observando esse princípio, a construção de um intervalo de normalidade para a hemoglobina fetal entre 18 e 36 semanas de gestação demandaria pelo menos 380 amostras de sangue fetal, que poderiam ser obtidas de duas formas: pela metodologia transversa, através da seleção de 380 fetos em diferentes idades gestacionais, ou pela metodologia longitudinal, através da monitorização de pelo menos 20 fetos durante toda a gestação, com a realização de cordocenteses mensais, técnica no momento inviável do ponto de vista ético e assistencial.

Cabe aqui uma observação sobre a metodologia adotada por Nicolaidis para a construção de sua curva, em que não são reconhecidos princípios estatísticos que validem o cálculo amostral. Enfatiza-se que em seu trabalho foram avaliadas amostras de sangue de 210 fetos com idades gestacionais entre 17 e 40 semanas (incluindo 10 coletas diretas do sangue do cordão umbilical imediatamente após o parto) e, entre esses, apenas 38 foram alocados na zona I do gráfico, considerada a faixa de normalidade da concentração de hemoglobina durante a gestação. É concebível aceitar que, à época, tais preceitos matemáticos ainda não estavam consolidados e que o autor trabalhou, como de praxe, com a amostra disponível em seu centro de pesquisa. Ainda assim, compete-nos mencionar que a existência atual de normas bem-estabelecidas para a validação desse tipo de curva, postuladas por pesquisadores que se dedicam ao estudo da estatística médica, fragiliza o uso inquestionável da curva original.

Isso posto, depreende-se que, possivelmente, uma nova curva construída dentro dos modelos preconizados forneceria informações mais exatas e efetivas para o manejo de doenças fetais. Houve significativa modificação nos paradigmas

estruturais das pesquisas, especialmente no que diz respeito àquelas que envolvem a saúde humana e condutas intervencionistas, o que deve ser ponderado no âmbito desta discussão.

Salienta-se, entretanto, que o objetivo deste trabalho consiste primariamente na comparação dos valores de concentração de hemoglobina fetal encontrados na amostra com aqueles esperados segundo a curva clássica de Nicolaides, sendo possível, em um segundo momento, refletir sobre a aplicabilidade desta última à nossa população.

Após análise crítica dos resultados e de todos os fatores envolvidos no desenvolvimento fetal no ambiente intrauterino, pode-se concluir sobre a importância da busca permanente por análises personalizadas, que se ajustem às características da população da qual um indivíduo é proveniente. Diferentemente do que se acreditava no passado, não é possível, em Medicina, que se formulem parâmetros únicos aplicáveis a qualquer situação. Isso facilitaria enormemente a prática médica, mas nos levaria a cometer erros muitas vezes inadmissíveis. Nosso estudo ilustra bem esse princípio ao evidenciar que, aparentemente, a fórmula adotada em diversos centros mundiais para classificação e tratamento de fetos anêmicos não representa adequadamente as características da população que assistimos em nossa instituição.

Ao admitir que a ciência médica é dinâmica e que conceitos uniformes podem apresentar equívocos, almeja-se atentar os pesquisadores para o fato de que nem sempre estudos brilhantemente conduzidos, com respaldo estatístico e argumentação bem fundamentada, podem ser imediatamente adotados dentro de nossa realidade de trabalho. Propõe-se um julgamento crítico de toda e qualquer metodologia e uma reflexão contínua sobre como e se tais achados podem ser utilizados em benefício dos nossos pacientes.

Frente à nobreza do cuidado de uma vida intraútero e de toda a expectativa que ela encerra, são impreteríveis o empenho em reduzir incorreções e a busca pela conduta mais precisa possível para um binômio singular. Em vista disso, consideramos imperiosa a criação de uma curva de variação da hemoglobina ao

longo da gestação específica para fetos brasileiros, a despeito de suas importantes implicações metodológicas.

Recomendamos ainda que a tendência à “personalização” de curvas se estenda a outros parâmetros fetais, já que trabalhos publicados em outros países e estudos preliminares em nossa população demonstraram importante heterogeneidade na evolução conceptual intraútero, relacionada diretamente às características genéticas dos progenitores. Uma vez munidos da informação de que fatores sociodemográficos, culturais e étnicos são capazes de interferir permanentemente na fisiologia humana e que, de forma subsequente, a apresentação e suscetibilidade às doenças são afetadas por peculiaridades inerentes à população da qual um indivíduo é proveniente, somos convidados a refletir. A excelência da assistência médica exige, entre outros requisitos, a contemplação cuidadosa das particularidades, respeitando a complexa amálgama ambiental, social e genética que guia os rumos da humanidade e que ainda não é completamente compreendida.

7 CONCLUSÕES

Após a avaliação dos resultados, pôde-se concluir que a curva padrão de concentração plasmática de hemoglobina fetal publicada por Nicolaidis *et al.* (1988) não se encaixa como um bom preditor de normalidade para os fetos de uma população brasileira.

REFERÊNCIAS

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. ACOG Practice bulletin n°. 106: Intrapartum fetal heart rate monitoring: nomenclature, interpretation, and general management principles. **Obstet Gynecol**, v. 114, n. 1, p. 192-202, 2009.

ARAÚJO JR., E. *et al.* Reference charts of fetal biometric parameters in 31,476 Brazilian singleton pregnancies. **J Ultrasound Med**, v. 33, n. 7, p. 1185-91, 2014a.

ARAÚJO JR. E. *et al.* Normative data for fetal cisterna magna length measurement between 18 and 24 weeks of pregnancy. **Childs Nerv Syst**, v. 30, n. 1, p. 9-12, 2014b.

ARAÚJO JR. E. *et al.* Reference range of fetal nasal bone length between 18 and 24 weeks of pregnancy in an unselected Brazilian population: experience from a single service. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 27, n. 12, p. 1276-9, 2014c.

ARAÚJO JR. E. *et al.* Reference values of nuchal translucency thickness in a Brazilian population sample: experience from a single center. **J Perinat Med**, v. 42, n. 2, p. 255-9, 2014d.

ARAÚJO JR. E. *et al.* Reference range of fetal transverse cerebellar diameter between 18 and 24 weeks of pregnancy in a Brazilian population. **J Child Neurol**, v. 30, n. 2, p. 250-3, 2015.

BAHADO-SINGH, R. *et al.* Fetal splenic size in anemia due to Rh-alloimmunization. **Obstet Gynecol**, v. 92, n. 5, p. 828-32, nov. 1998.

BARCELOS, T.B. **Acuidade do índice ecográfico diâmetro biventricular externo/comprimento do fêmur na predição da anemia fetal em gestantes isoimunizadas.** Tese de Doutorado em Saúde da Mulher. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.

BASKETT, T.F.; KOH, K.S. Sinusoidal heart rate pattern. A sign of fetal hypoxia. **Obstet Gynecol**, v. 44, p. 379, 1974.

BERRY, S.M. *et al.* Society for maternal-fetal medicine (SMFM). Fetal blood sampling. **Am J Obst Gynecol**, v. 209, n. 3, p. 170-80, 2013.

BEVIS, D.C.A. Blood pigments in haemolytic disease of the newborn. **J Obstet Gynaecol Br Emp**, v. 63, n. 1, p. 68-75, 1956.

BORGHOL, N. *et al.* Associations with early life socio-economic position in adult DNA methylation. **Int J Epidemiol**, v. 41, p. 62-74, 2012.

BOWMAN, J.M.; POLLOCK, J.M.; PENSTON, L.E. Fetomaternal transplacental hemorrhage during pregnancy and after delivery. **Vox Sang**, V. 51, n. 2, p. 117-21, 1986.

BRAGA, D.S.G.P.A. **Contagem globular automática: parâmetros avaliados, significado clínico e causas de erro**. Monografia em Farmácia - Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, 2014.

CABRAL, A.C.V. Isoimunização materna. *In*: CABRAL, A.C.V. (Ed.). **Obstetrícia**. 2. ed., Rio de Janeiro: Revinter; p. 203-9, 2002.

CABRAL, A.C.V. *et al.* Cardiofemoral index as na ultrasound marker of foetal anaemia in isoimmunised pregnancy. **Int J Gynecol Obstet**, v. 100, p. 60-4, 2008.

CABRAL, A.C.V. *et al.* Combined use of the cardiofemoral index and middle cerebral artery Doppler velocimetry for the prediction of fetal anemia. **Int J Gynecol Obstet**, v. 111, n. 3, p. 205-8, 2010.

CABRAL, A.C.V. *et al.* Índice cardiofemoral para avaliação da anemia de fetos de gestantes isoimunizadas. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 2005, v. 27, n. 8), p. 450-5, 2005.

CALLEN, P. W. Avaliação ultrassonográfica de hidropisia fetal. *In*: KENNETH J., MOISE JR., K.J. **Ultrassonografia em Ginecologia e Obstetrícia**. Tradução Maurício Saito *et al.* Rio de Janeiro: Elsevier, 5. ed., ISBN 978-85-352-3137-3, 2009, p. 676-697.

CARNEIRO S. **A miscigenação racial no Brasil**. 2009. Arquivo Geledés Website. Disponível em: <http://www.geledes.org.br/miscigenacao-racial-brasil/>. Acesso em: 12 de julho de 2016.

CECATTI, J.G. *et al.* Curve of normal fetal weight values estimated by ultrasound according to gestation age. **Cad Saude Publica**, v. 16, n. 4, p. 1083-90, 2000.

CHILCOTT J. *et al.* A review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of routine anti-D prophylaxis for pregnant women who are rhesus-negative. **Health Technol Assess**, v. 7, n. 4, p. iii-62, 2003.

CORREA JR., M.D. *et al.* Influence of fetal anemia on fetal splenic artery Doppler in Rh-alloimmunized pregnancies. **Fetal Diagn Ther**, v. 25, n. 1, p. 3-7, 2009.

CRAPARO, F.J. The effects of serial intravascular transfusion in ascetic/ hydropic RhD-alloimmunized foetuses. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 25, p. 144-8, 2005.

DAFFOS, F.; CAPELLA-PAVLOVSKY, M.; FORESTIER, F. A new procedure for fetal blood sampling in utero: preliminary results of fifty-three cases. **Am J Obstet Gynecol**, v. 146, n. 8, p. 985-7, 1993.

DE ONIS, M. *et al.* The WHO Multicentre Growth Reference Study: planning, study design, and methodology. **Food Nutr Bull**, v. 25 (1 Suppl), p. S15-26, 2004.

FIGUERAS, F.; GRATACÓS, E. Update on the Diagnosis and classification of fetal growth restriction and proposal of a stage-based management protocol. **Fetal Diagn Ther**, v. 36, p. 86-98, 2014.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A.; BEEDLE, A.S. Early Life Events and Their Consequences for Later Disease: A Life History and Evolutionary Perspective. **Am J Hum Biol**, v. 19, n. 1, p. 1-19, 2007.

GLUCKMAN, P.D. *et al.* Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. **Proc Biol Sci**, v. 272, n. 1564, p. 671-7, 2005.

HADLOCK, F.P.; HARRIST, R.B.; MARTINEZ-POYER, J. In útero analysis of fetal growth: a sonographic weight standard. **Radiology**, v. 181, p. 129-133, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **As características gerais da população, religião e pessoas com deficiência do Censo Demográfico 2010**. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/94/cd_2010_religiao_deficiencia.pdf. Acesso em: 04/08/2015.

JACQUEMYN, Y.; SYS, S.U.; VERDONK, P. Fetal biometry in different ethnic groups. **Early Hum Dev**, v. 57, n. 1, p. 1-13, Jan. 2000.

JANSSENS, H.M. *et al.* Outcome for children treated with fetal intravascular transfusions because of severe blood group antagonism. **J Pediatr**, v. 131, n. 3, p. 373-80, 1997.

KING, K.; MURPHY, S.; HOYO, C. Epigenetic regulation of newborns' imprinted genes related to gestational growth: patterning by parental race/ethnicity and maternal socioeconomic status. **J Epidemiol Community Health**, v. 69, p. 639-47, 2015.

KISERUD T. Physiology of the foetal circulation. **Semin Foetal Neonatal Med**, v. 10, p. 493-503, 2005.

LAM, L.L. *et al.* Factors underlying variable DNA methylation in a human community cohort. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 109, n. Suppl 2, p. 17253-60, 2012.

LEHNERA, J.; GREVEB, B.; CASSENSA, U. Automation in hematology. **Transf Med Hemoth**, v. 34, p. 328-39, 2007.

LIMA, M.I.M.; CABRAL, A.C.V.; CORREA, M.D. Padrão cardiotocográfico em relação à hemoglobina do cordão de pacientes isoimunizadas pelo fator Rh. **J Bras Ginecol**, v. 100, n. 1/2, p. 21-3, 1990.

LINDENBURG, I.T. *et al.* LOTUS study group. Long-term neurodevelopmental outcome after intrauterine transfusion for hemolytic disease of fetus/newborn: the LOTUS study. **Am J Obstet Gynecol**, v. 206, p. 141.e1-8, 2012.

LILEY, A.W. Liquor amni analysis in the management of the pregnancy complicated by resus sensitization. **Am J Obstet Gynecol**, v. 82, p. 1359-70.

MANSEAU, P. *et al.* Le rythme cardiaque foetal sinusoïsal. Aspect évocateur de souffrance foetale au cours de la grossesse. **J Gynecol Obstet Biol Reprod**, v. 1, p. 343, 1972.

MARI, G. *et al.* Accurate prediction of fetal hemoglobin by Doppler ultrasonography. **Obstet Gynecol**, v. 99, p. 589-93, 2002.

MARI, G. *et al.* Diagnosis of fetal anemia with Doppler ultrasound in the pregnancy complicated by maternal blood group immunization. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 5, p. 400-5, 1995.

MARI, G. *et al.* Noninvasive diagnosis by doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. **N Engl J Med**, v. 342, n. 1, p. 9-14.

MARI, G. *et al.* Society for maternal-fetal Medicine (SMFM) clinical guideline #8: the fetus at risk for anemia: diagnosis and management. **Am J Obstet Gynecol**, v. 212, n. 6, p. 697-710, Jun. 2015.

MARI, G. Middle cerebral artery peak systolic velocity: is it the standard of care for diagnosis of foetal anaemia? **J Ultrasound Med**, v. 24, p. 697-02, 2005.

MELO, I.G. **Cardiotocografia anteparto em fetos de gestantes isoimunizadas**. 2000. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ginecologia e Obstetrícia). Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

MELO, I.G. **Desenvolvimento de um escore de exames não invasivos para a predição da anemia fetal**. 2003. Tese (Doutorado em Ginecologia e Obstetrícia). Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

MODANLOU, H.D. *et al.* Sinusoidal fetal heart rate pattern following intrauterine fetal transfusion. **Obstet Gynecol**, v. 49, p. 537, 1977.

MODANLOU, H.D.; FREEMAN, R.K. Sinusoidal fetal heart rate pattern. Its definition and clinical significance. **Am J Obstet Gynecol**, v. 142, p. 1033, 1982.

MODANLOU, H.D.; MURATA, Y. Sinusoidal heart rate pattern: Reappraisal of its definition and clinical significance. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 30, n. 3, p. 169-80, 2004.

MOISE JR., K.J. Diagnosing hemolytic disease of the fetus: time to put the needles away? **N Engl J Med**, v. 355, n. 2, p. 192-4, 2006.

MOISE JR., K.J. Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. **Obstet Gynecol**, v. 100, n. 3, p. 600-11, 2002.

MOISE JR., K.J. The usefulness of middle cerebral artery Doppler assessment in the treatment of the fetus at risk for anemia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 198, n. 2, p. 161 e1-161.e4, 2008.

NICOLAIDES, K.H. *et al.* Fetal haemoglobin measurement in the assessment of red cell isoimmunisation. **Lancet**, v. 1, n. 8594, p. 1073-5, May 1988.

NICOLAIDES, K.H.; SADOVSKY, G.; CETIN, E. Fetal heart rate patterns in red blood cell isoimmunized pregnancies. **Am J Obstet Gynecol**, v. 161, n. 2, p. 351-6, 1989.

NICOLAIDES, K.H.; WARENSKI, J.C.; RODECK, C.H. The relationship of fetal plasma protein concentration and hemoglobin level to the development of hydrops in rhesus isoimmunization. **Am J Obstet Gynecol**, v. 152, n. 3, p. 341-4, Jun. 1985.

OEPKES, D. *et al.* Diamond Study Group. Doppler ultrasonography versus amniocentesis to predict fetal anemia. **N Engl J Med**, v. 355, p. 156-64, 2006.

PAPANTONIOU, N.; SIFAKIS, S.; ANTSAKLIS, A. Therapeutic management of fetal anemia: review of standard practice and alternative treatment options. **J Perinat Med**, v. 41, n. 1, p. 71-82.

PEIXOTO, A.B. *et al.* Reference range for the fetal intracranial translucency measurement between 11 and 14+2 weeks of gestation in a Brazilian population. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 29, n. 16, p. 2588-91, 2016a.

PEIXOTO, A.B. *et al.* Reference values for the fetal lateral ventricle atrium measurement in the second and third trimestres of pregnancy in a Brazilian population. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 29, n. 14, p. 2337-40, 2016b.

QUEENAN, J.T. *et al.* Deviation in amniotic fluid optical density at a wavelength of 450 nm in Rh-immunized pregnancies from 14 to 40 weeks' gestation: a proposal for clinical management. **Am J Obstet Gynecol**, v. 168, p. 1370-6, 1993.

RIZZO, G.; ARDUINI, D.; ROMANINI, C. Doppler echocardiographic assessment of fetal cardiac function. **Ultrasound Obst Gynecol**, v. 2, n. 6, p. 434-45, 1992.

ROBERTSON, J.G. Evaluation of the reported methods of interpreting spectrophotometric tracing of amniotic fluid in Rhesus isoimmunisation. **Am J Obst Gynecol**, v. 95, n. 1, p. 120-126, 1966.

ROYSTON, P.; WRIGHT, E.M. How to construct "normal ranges" for fetal variables. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 11, n. 1, p. 30-8, 1998.

SANTIAGO, M.D. *et al.* Determining the volume of blood required for the correction of foetal anaemia by intrauterine transfusion during pregnancies of Rh isoimmunised women. **Blood Transfus**, v. 8, p. 271-7, 2010.

SCHULTZ, S.G. Fisiologia geral: o meio interno. *In*: JOHNSON, L.R. (Ed.). **Fundamentos de fisiologia médica** (2. ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 3-8.

SHIONO, P.H. *et al.* Ethnic differences in birthweight: the role of lifestyle and other factors. **Am J Publ Health**, v. 87, p. 787-93, 1997.

SHMIDT, L.C.; CORREA JR. M.D.; LOURES, L.F. Atualizações na profilaxia da isoimunização Rh. **Femina**, v. 38, n. 7, p. 345-52, 2010.

STANTON, B.A.; KOEPPEN, B.M. O rim: controle da osmolaridade e do volume dos fluidos corporais. *In*: BERNE, R.M. (Ed.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, p. 701-728.

SUBRAMANYAM, M.A. *et al.* Social factors and leukocyte DNA methylation of repetitive sequences: the multi-ethnic study of atherosclerosis. **PLoS ONE**, v. 8, p. e54018, 2013.

TAVARES, N.M.C. *et al.* Intervalos de referência longitudinais de parâmetros doplervelocimétricos materno-fetais. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 35, n. 1, p. 33-8, 2013.

TAVEIRA, M.R. *et al.* Diagnóstico não invasivo da anemia fetal pela medida do pico de velocidade sistólica na doplervelocimetria da artéria cerebral média. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 26, n. 8, p. 649-653, 2004.

UAUY, R. *et al.* Conceptual basis for prescriptive growth standards from conception to early childhood: present and future. International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century (INTERGROWTH- 21st). **BJOG**, v. 120, n. 2, p. 3-8, 2013.

URBANIAK, S.J. Noninvasive approaches to the management of RDH haemolytic disease of the foetus and the newborn. **Transfusion**, v. 48, p. 2-5, 2008.

VON KAISENBERG, C.S.; JONAT, W. Fetal parvovirus B19 infection. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 18, p. 280-8.

VAN KAMP, I.L. *et al.* Complication of intrauterine intravascular transfusion for fetal anaemia due to maternal red cell alloimmunization. **Am J Obstet Gynecol**, v. 192, p. 171-7, 2005.

WELCH, R. *et al.* Changes in hemorheology with fetal intravascular transfusion. **Am J Obstet Gynecol**, v. 170, p. 726-32, 1994.

WILLIAMS, R.L. *et al.* Fetal growth and perinatal viability in California. **Obstet Gynecol**, v. 59, p. 624-32, 1982.

XU, J. *et al.* Hydrops fetalis secondary to parvovirus B19 infections. **J Am Board Fam Pract**, v. 16, n. 1, p. 63-8, 2003.

ZHANG, F.F. *et al.* Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. **Epigenetics**, v. 6, p. 623-9, 2011.

ANEXOS E APÊNDICES

Anexo A – Parecer ético



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 50497715.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Henrique Vitor Leite
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 12 de novembro de 2015, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação da fórmula de cálculo da hemoglobina fetal na segunda metade da gravidez" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo B – Parecer da Câmara do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

PARECER

PROJETO DE PESQUISA: **AValiação DA FÓRMULA DE CÁLCULO DA HEMOGLOBINA FETAL NA SEGUNDA METADE DA GRAVIDEZ**

PESQUISADORES: Prof. Henrique Vitor Leite
Lara Rodrigues Félix
Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral
Profa. Alamanda Kfoury Pereira

1- OBJETIVO

Verificar a acuidade da fórmula estabelecida por Nicolaides et al (1986) para cálculo da hemoglobina fetal de acordo com a idade gestacional e sua aplicabilidade na população brasileira.

A hipótese principal é de que a fórmula testada corresponda à hemoglobina fetal efetivamente encontrada na punção de sangue de cordão dos fetos da nossa população.

2- ANÁLISE DO PROJETO

2.1- Relevância do tema

Como o diagnóstico preciso da anemia fetal e o tratamento envolvem procedimento invasivo e com riscos potenciais à gestação, um diagnóstico não invasivo preciso pode propiciar uma redução do número de procedimentos e dos riscos envolvidos.

2.2- Avaliação crítica dos objetivos

Pretende-se correlacionar os valores de hemoglobina fetal esperada para a idade gestacional obtida através da fórmula de Nicolaides com os valores efetivamente encontrados em fetos assumidamente normais do ponto de vista hematológico.

2.3- Metodologia

O estudo será realizado através de revisão de prontuários de 43 fetos submetidos a cordocentese no HC-UFMG entre 2013 e 2014. Serão calculados os valores de hemoglobina fetal esperada para cada idade gestacional e, a seguir, constatada a hemoglobina fetal encontrada.

O protocolo propõe a comparação das variáveis, aplicando teste de normalidade e comparações paramétricas ou não paramétricas.

3- QUALIFICAÇÃO DO SOLICITANTE E EQUIPE DE TRABALHO

A equipe conta com 3 professores do departamento, qualificados e com experiência reconhecida em medicina fetal.

4- ORÇAMENTO E CRONOGRAMA

Os pesquisadores não serão remunerados e não haverá custo adicional gerado pelo projeto. Os dados serão extraídos de prontuários de gestantes submetidas a cordocentese no serviço em 2013 e 2014

5- APROVEITAMENTO

Os resultados esperados podem ter impacto na assistência às gestantes com indicação de cordocentese para transfusão intra-útero como tratamento para anemia fetal. A avaliação da acurácia do diagnóstico pode permitir indicação mais criteriosa dos procedimentos invasivos e minimizar as complicações inerentes aos mesmos.

6- ASPECTOS POSITIVOS (pontos fortes)

Esta avaliação permitirá avaliação do atual protocolo terapêutico da anemia fetal e maior precisão dos tratamentos.

O projeto não gera despesas nem para pacientes nem para a instituição, assim como não prevê visitas e procedimentos adicionais além dos já realizados, de modo que não gera transtorno para as pacientes.

7- ASPECTOS NEGATIVOS (pontos fracos)

Como se trata de um estudo retrospectivo que buscará dados de cordocentese indicadas por suspeita de malformação fetal, esta população pode não refletir exatamente a população de fetos considerados "normais" em relação ao critério avaliado (hemoglobina fetal).

8- COMENTÁRIOS E RECOMENDAÇÕES

Sugerimos rever os instrumentos estatísticos a serem utilizados no estudo. Sugerimos cálculo de coeficiente de correlação.

9- PARECER CONCLUSIVO

Projeto aprovado.

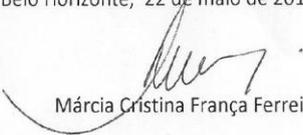
AVALIAÇÃO FINAL DA PROPOSTA

APROVADO COM SUGESTÃO

DILIGÊNCIA

NÃO APROVADO

Belo Horizonte, 22 de maio de 2015.


Márcia Cristina França Ferreira

Parecer aprovado pela Câmara do GOB

em 22/05/2015

Chefe do GOB 

Prof. Juliana Silva Barra
Subchefe do Departamento
de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina/UFMG

Anexo C – Cariótipos com variantes da normalidade encontrados na amostra



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
UNIDADE FUNCIONAL PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL

Emissão: 07/01/2016 às 20:41

Fl.: 3

Cliente: FETO DE	NPF: ---
Dt. Nasc:	RG: ---
Médico.: CAMILA DE MOURA DIAS	
Clínica: 4 ANDAR - NORTE - MATERNIDADE	
Origem.: COLETA HOSPITALAR HC	Pedido: 11377313

Coleta:20/08/2015 15:18

Liberção:01/09/2015 06:56

CARIÓTIPO COM BANDA G

Material: SANGUE DE CORDÃO

Método: MOORHEAD et. al. (1960) MOD., COM ESTIMULAÇÃO

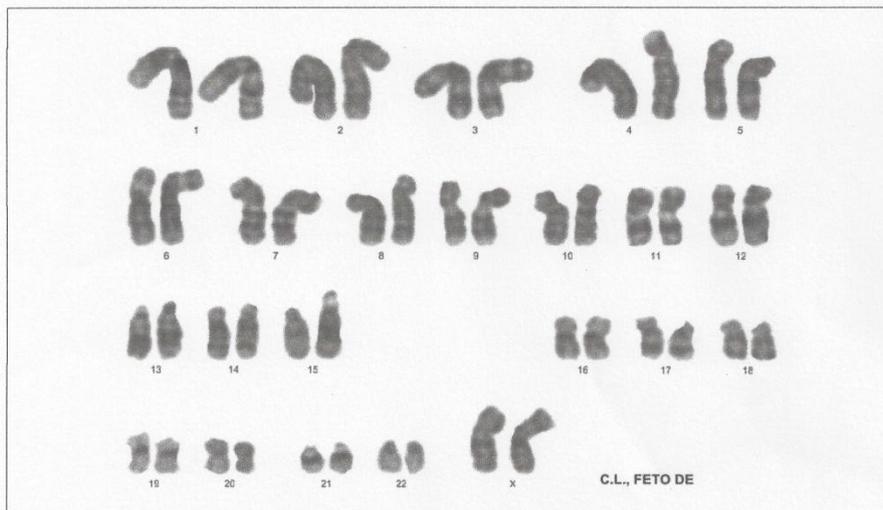
Número de células analisadas: 30

Resolução: 350 bandas

RESULTADO:

46,XX,15pstk+

Observação: O aumento do "stalk" do cromossomo 15 é uma variante encontrada na população normal.



Reagentes preparados pelo próprio laboratório.

Edirlaine Soares

Liberado por: EDIRLAINE SOARES DA SILVA - CRF-MG-9386

RESPONSÁVEIS TÉCNICOS

Dra. Myriam de Siqueira Feitosa CRM-MG 15.416 | Dra. Rosângela Fátima Di Lorenzo Pires CRM-MG 12.822

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG - CRM-MG 2.946. Av. Prof. Alfredo Balena, 110 - Santa Efigênia, Belo Horizonte - MG

CEP: 30.130-100 - Fones: (31) 3409-9600 | 9601 - CNPJ: 17217985003472 - CNES: 0027049



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
UNIDADE FUNCIONAL PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL

Emissão: 07/01/2016 às 20:10

Fl.: 2

Cliente: FETO DE	NPF: ---
Dt. Nasc:	RG: ---
Médico.: DANIELA GUIMARAES SILVA	
Clínica: GINECOLOGIA OBSTETRICIA - IJF	
Origem.: COLETA HOSPITALAR HC	Pedido: 6243878

Coleta: 16/05/2013 15:16

Liberção: 13/06/2013 13:29

CARIÓTIPO COM BANDA G

Material: Sangue de cordão

Método: MOORHEAD et. al. (1960) MOD., COM ESTIMULAÇÃO

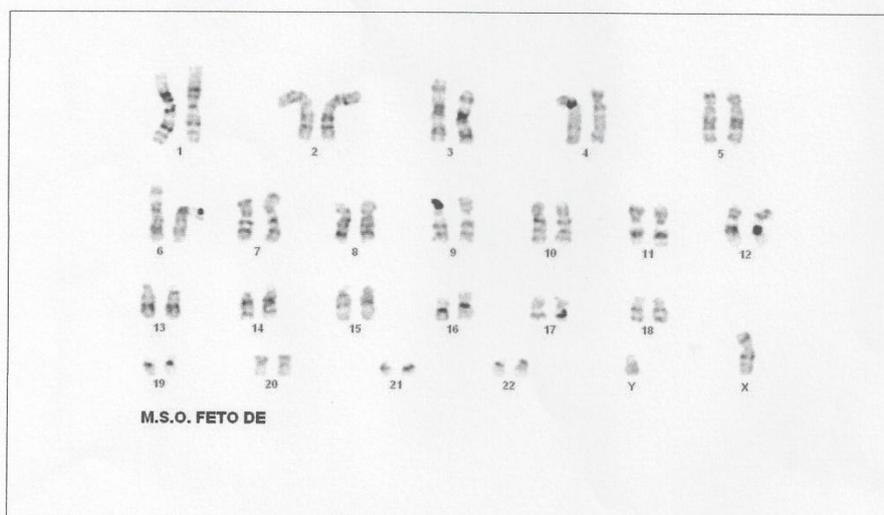
Número de células analisadas: 30

Resolução: 350-400 bandas

RESULTADO:

46,XY,16qh+

O aumento da heterocromatina do cromossomo 16 é uma variante encontrada na população normal.



Reagentes preparados pelo próprio laboratório.

Liberado por: *Amanda*
 AMANDA DE LOURDES NUNES - CRB-MG 80366/04-D

RESPONSÁVEIS TÉCNICOS

Dra. Myriam de Siqueira Feitosa CRM-MG 15.416 | Dra. Rosângela Fátima Di Lorenzo Pires CRM-MG 12.822

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG - CRM-MG 2.946. Av. Prof. Alfredo Balena, 110 - Santa Efigênia, Belo Horizonte - MG

CEP: 30.130-100 - Fones: (31) 3409-9600 | 9601 - CNPJ: 17217985003472 - CNES: 0027049



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
UNIDADE FUNCIONAL PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL

Emissão: 07/01/2016 às 20:08

Fl.: 2

Cliente: FETO DE	NPF: ---
Dt. Nasc:	RG: ---
Médico.: DANIELA GUIMARAES SILVA	
Clínica: 4 ANDAR - NORTE - MATERNIDADE	
Origem.: COLETA HOSPITALAR HC	Pedido: 6199100

Coleta:09/05/2013 15:00

Liberção:10/06/2013 20:21

CARIÓTIPO COM BANDA G

Material: SANGUE DE CORDÃO

Método: MOORHEAD et. al. (1960) MOD., COM ESTIMULAÇÃO

Número de células analisadas: 30

Resolução: 350-400 bandas

RESULTADO:

46,XY,16qh+

O aumento da heterocromatina do cromossomo 16 é uma variante encontrada na população normal.



Reagentes preparados pelo próprio laboratório.

Liberado por: FRANCISCO DANILO FERREIRA PAULA - CRF-MG 9.768

RESPONSÁVEIS TÉCNICOS

Dra. Myriam de Siqueira Feitosa CRM-MG 15.416 | Dra. Rosângela Fátima Di Lorenzo Pires CRM-MG 12.822

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG - CRM-MG 2.946. Av. Prof. Alfredo Balena, 110 - Santa Efigênia, Belo Horizonte - MG

CEP: 30.130-100 - Fones: (31) 3409-9600 | 9601 - CNPJ: 17217985003472 - CNES: 0027049



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
UNIDADE FUNCIONAL PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL

Emissão: 07/01/2016 às 20:32

Fl.: 2

Cliente: FETO DE	NPF: ---
Dt. Nasc:	RG: ---
Médico.: LARA RODRIGUES FÉLIX	
Clínica: CEMEFE (CENTRO MEDICINA FETAL)	
Origem.: COLETA HOSPITALAR HC	Pedido: 10100938

Coleta: 29/01/2015 14:48

Liberção: 11/02/2015 07:02

CARIÓTIPO COM BANDA G

Material: SANGUE DE CORDÃO

Método: MOORHEAD et. al. (1960) MOD., COM ESTIMULAÇÃO

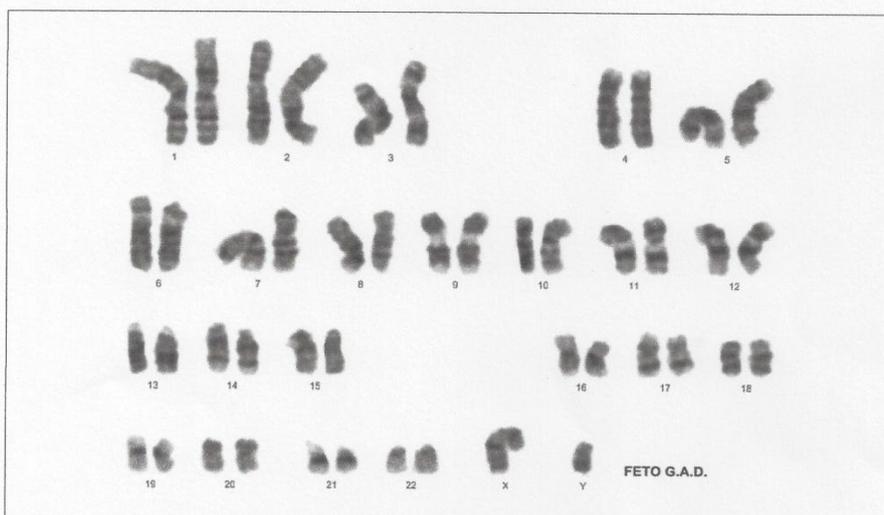
Número de células analisadas: 30

Resolução: 350 bandas

RESULTADO:

46,X,Yqh+

Observação: O aumento da heterocromatina do cromossomo Y é uma variante encontrada na população normal.



Reagentes preparados pelo próprio laboratório.

Edynara Rocha Araujo

Liberado por: EDYNARA ROCHA ARAUJO - CRBIO-76.884

RESPONSÁVEIS TÉCNICOS

Dra. Myriam de Siqueira Feitosa CRM-MG 15.416 | Dra. Rosângela Fátima Di Lorenzo Pires CRM-MG 12.822

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG - CRM-MG 2.946. Av. Prof. Alfredo Balena, 110 - Santa Efigênia, Belo Horizonte - MG

CEP: 30.130-100 - Fones: (31) 3409-9600 | 9601 - CNPJ: 17217985003472 - CNES: 0027049



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
UNIDADE FUNCIONAL PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL

Emissão: 07/01/2016 às 20:15

Fl.: 2

Cliente: FETO DE	NPF: ---
Dt. Nasc:	RG: ---
Médico.: JULIANA EUGÊNIO DE SOUZA	
Clínica: 4 ANDAR - NORTE - MATERNIDADE	
Origem.: COLETA HOSPITALAR HC	Pedido: 6289746

Coleta: 23/05/2013 15:01

Liberção: 20/06/2013 06:50

CARIÓTIPO COM BANDA G

Material: Sangue fetal

Método: MOORHEAD et. al. (1960) MOD., COM ESTIMULAÇÃO

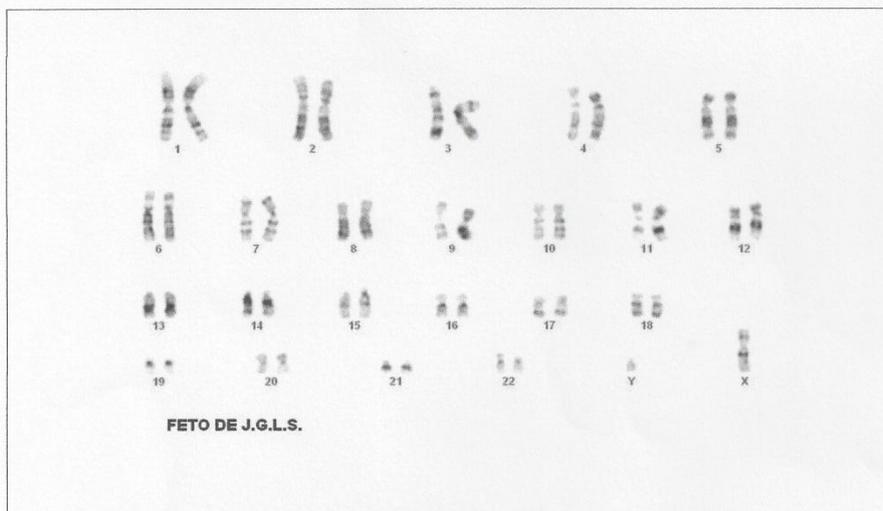
Número de células analisadas: 30

Resolução: 350-400 bandas

RESULTADO:

46, X, Yqh-

A redução da heterocromatina do cromossomo Y é uma variante encontrada na população normal.



Reagentes preparados pelo próprio laboratório.

Liberado por: AMANDA DE LOURDES NUNES - CRB-MG 80366/04-D

RESPONSÁVEIS TÉCNICOS

Dra. Myriam de Siqueira Feitosa CRM-MG 15.416 | Dra. Rosângela Fátima Di Lorenzo Pires CRM-MG 12.822

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG - CRM-MG 2.946. Av. Prof. Alfredo Balena, 110 - Santa Efigênia, Belo Horizonte - MG

CEP: 30.130-100 - Fones: (31) 3409-9600 | 9601 - CNPJ: 17217985003472 - CNES: 0027049



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
UNIDADE FUNCIONAL PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL

Emissão: 07/01/2016 às 20:14

Fl.: 2

Cliente: FETO DE

NPF: ---

Dt. Nasc:

RG: ---

Médico.: DANIELA GUIMARAES SILVA

Clínica: GINECOLOGIA OBSTETRICIA - IJF

Origem.: COLETA HOSPITALAR HC

Pedido: 6243819

Coleta:16/05/2013 15:08

Liberação:18/06/2013 12:02

CARIÓTIPO COM BANDA G

Material: Sangue de cordão

Método: MOORHEAD et. al. (1960) MOD., COM ESTIMULAÇÃO

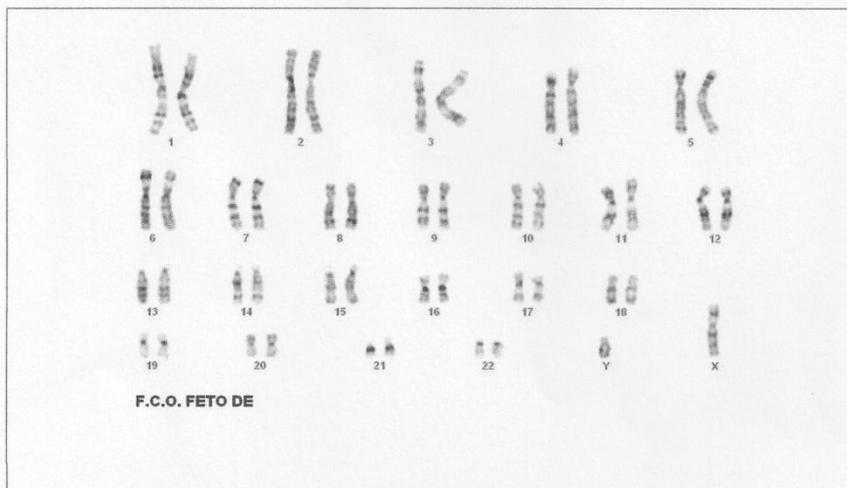
Número de células analisadas: 30

Resolução: 350-400 bandas

RESULTADO:

46, X, Yqh+

O aumento da heterocromatina do cromossomo Y é uma variante encontrada na população normal.



Reagentes preparados pelo próprio laboratório.

Amendes

Liberado por: AMANDA DE LOURDES NUNES - CRB-MG 80366/04-D

RESPONSÁVEIS TÉCNICOS

Dra. Myriam de Siqueira Feitosa CRM-MG 15.416 | Dra. Rosângela Fátima Di Lorenzo Pires CRM-MG 12.822

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG - CRM-MG 2.946. Av. Prof. Alfredo Balena, 110 - Santa Efigênia, Belo Horizonte - MG

CEP: 30.130-100 - Fones: (31) 3409-9600 | 9601 - CNPJ: 17217985003472 - CNES: 0027049

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e esclarecido

Procedimento informado

Cordocentese

DECLARANTE	
Nome:	_____
Idade:	_____
Endereço:	_____
Telefone: ()	_____
Identidade:	_____ Órgão expedidor: _____
Data de emissão:	_____
Paciente ()	Representante legal () Representante familiar () Responsável ()
Obs.: No caso de o declarante não ser o paciente, preencher os dados do paciente.	

PACIENTE	
Nome:	_____
Idade:	_____
Endereço:	_____
Telefone: ()	_____
Identidade:	_____ Órgão expedidor: _____
Data de emissão:	_____

DECLARO

Que o(a) doutor(a) _____,

CRM número _____,

instituição _____

informou-me que, tendo em vista o diagnóstico de _____, é conveniente e indicado proceder à CORDOCENTESE mediante punção transabdominal do cordão umbilical para obter informação do cariótipo do feto, assim como realizar eventuais estudos hematimétricos, bioquímicos, enzimáticos, hormonais, biológicos e microbiológicos.

Esclareceu-me que:

1. Pode haver riscos potenciais para esse procedimento

- Genéricos: punção placentária, punção fetal, trauma de cordão, rotura da bolsa d'água, desencadeamento de parto e/ou aborto, infecções, enjoos, hemorragia materna, hemorragia fetal, fracasso do procedimento.

- Personalizados (segundo circunstâncias clínicas): _____
_____.

2. Igualmente me foram explicados tanto as características da técnica do procedimento como os cuidados que devo seguir após o mesmo e que me comprometo a observar.

Dessa forma, manifesto que estou satisfeito e entendi as explicações que me foram prestadas em linguagem clara e simples, esclarecendo-me todas as dúvidas que me acorreram.

Também entendi que, a qualquer momento e sem necessidade de dar alguma explicação, poderei revogar o consentimento que agora presto.

Assim, declaro que agora estou satisfeito(a) com a informação recebida e que compreendo o alcance e riscos do tratamento.

Por tal razão e nessas condições, CONSINTO que se realize a CORDOCENTESE proposta.

Reservo-me expressamente o direito de revogar a qualquer momento meu consentimento antes que o procedimento objeto deste documento se realize.

Local e data: _____

Médico

Paciente ou Representante ou Responsável

Testemunhas: _____

REVOGAÇÃO

Revogo o consentimento prestado na data de ____/____/____ e não desejo prosseguir o tratamento, que dou com esta por finalizado.

Local e data: _____

Médico: _____ Paciente: _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER



FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA FÓRMULA DE CÁLCULO DA HEMOGLOBINA FETAL NA SEGUNDA METADE DA GRAVIDEZ

LARA RODRIGUES FÉLIX

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Mestre em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PERINATOLOGIA.

Aprovada em 16 de dezembro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Henrique Vitor Leite - Orientador

UFMG

Prof(a). Gabriel Costa Osanan

UFMG

Prof(a). Camila Romano Berindoague

UFMG

Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2016.