

BC/22047
IB/81378



UNICAMP

***ESTUDO DA FORÇA ANTIGÊNICA DAS HEMÁCIAS FETAIS, DO
TÍTULO DOS ANTICORPOS IMUNES MATERNO E DOS FENÓTIPOS
DO SISTEMA SECRETOR NA INCOMPATIBILIDADE ABO
MATERNO-FETAL***

MARIA HELENA BAENA DE MORAES LOPES

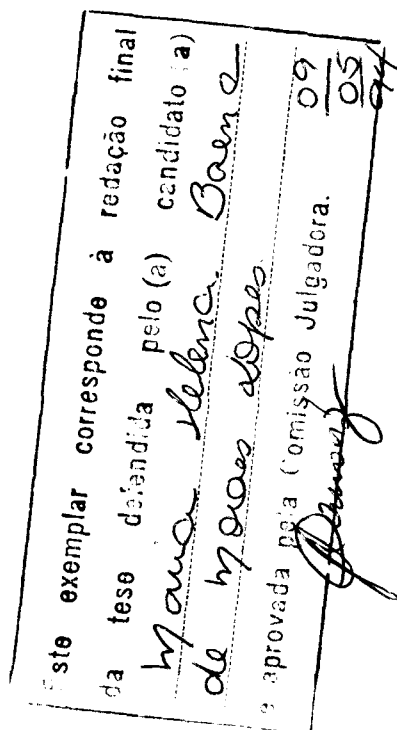
T/UNICAMP

M881_C

MARIA HELENA BAENA DE MORAES LOPES



ESTUDO DA FORÇA ANTIGÊNICA DAS HEMÁCIAS FETAIS, DO TÍTULO DOS ANTICORPOS IMUNES MATERNO E DOS FENÓTIPOS DO SISTEMA SECRETOR NA INCOMPATIBILIDADE ABO MATERNO-FETAL



Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Denise Yvonne Janovitz

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

1994



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	71 UNICAMP
	M 881 e
V.	Ex.
TEMPO BC/	22047
PROC.	286/94
C	☐
D	☒
PREÇO	CR\$ 15.000,00
DATA	01/07/94
N.º CPD	

CM.000 699.38-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Lopes, Maria Helena Baena de Moraes

L881e Estudo da força antigênica das hemácias fetais, do título dos anticorpos imunes maternos e dos fenótipos do sistema secretor na incompatibilidade ABO materno - fetal / Maria Helena Baena de Moraes Lopes. -- Campinas, SP : [s.n.], 1994.

Orientador : Denise Yvonne Janovitz.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Grupos sanguíneos. 2. Incompatibilidade de grupos sanguíneos. 3. Sistema de grupo sanguíneo ABO. 4. Icterícia neonatal.
I. Janovitz, Denise Yvonne. II. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. III. Título.

20. CDD -612.118 25 -616.365

Índices para catálogo sistemático:

1. Grupos sanguíneos 612.118 25
2. Incompatibilidade de grupos sanguíneos 612.118 25
3. Sistema do grupo ABO 612.118 25
4. Icterícia neonatal 616.365

***"Mas os que esperam no Senhor
renovarão as suas forças, subirão com
asas como águia: correrão, e não se
cansarão; caminharão, e não se
fatigarão".***

(ISAÍAS 40,31)

DEDICATÓRIA

***A Deus, pela promessa cumprida de me
conduzir "até a outra margem do rio".***

***Aos meus pais, pelo amor, incentivo e
apoio que sempre me dedicaram.***

***Ao meu esposo João, pelo amor e
compreensão.***

***Aos meus filhos Betuel e Isabel, por suas
doces presenças em nossas vidas.***

AGRADECIMENTOS

- *Prof. Dr. Bernardo Beiguelman, modelo de professor e pesquisador, pela "idéia" que deu origem a esse trabalho.*
- *Profa. Dra. Denise Yvonne Janovitz, pela confiança, orientação e estímulo para que esse trabalho se concretizasse.*
- *Silzeth Schiliching Moromizato, pela dedicação e ajuda em todas as fases dessa pesquisa.*
- *Prof. Dr. Fernando P. Facchini, pelo apoio e orientação.*
- *Prof. Dr. Marcos Palatnik, pela orientação e incentivo.*
- *Profa. DeAnne Karen Hilfinger Messias, pela colaboração e amizade.*
- *Profa. Lilian Maria de Castilho, pela amizade, apoio e orientação durante a execução dos exames laboratoriais no Laboratório de Imuno-hematologia do HEMOCENTRO/UNICAMP.*
- *Maria de Fátima Locatelli, Maria Zelma Machado, Andréa Wagner Ballarim, Roseli Caetano da Silva e Maria Cecília Teori Hashimoto, do HEMOCENTRO/UNICAMP, pela amizade, incentivo, ajuda e colaboração na execução dos exames laboratoriais.*
- *Profa. Dra. Sara Terezinha Olalla Saad, Tereza Sueko Ide Sales, Maria Helena Médula de Carvalho e Diumara Lopes Zambolin, do Laboratório de Hematologia do HEMOCENTRO/UNICAMP pela colaboração na realização dos exames de investigação da deficiência de G6PD.*
- *Isabel Cristina Gardenal de Arruda, pela amizade e revisão deste trabalho.*
- *Sueli Atibaia chaves, pelo apoio e colaboração.*

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Sistema ABO	2
1.2. Incompatibilidade materno-fetal no sistema ABO	10
1.3. Doença hemolítica do recém-nascido (DHRN) do sistema ABO	18
1.4. Antígenos do sistema ABO	25
1.5. Anticorpos do sistema ABO e a DHRN	28
1.6. Relação entre os fenótipos do sistema secretor e a DHRN do sistema ABO	40
2. OBJETIVOS	46
2.1. Geral	47
2.2. Específicos	47
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	49
4. RESULTADOS	60
4.1. Frequências gênicas do sistema ABO e incidência de icterícia neonatal	61
4.2. Resultados do estudo caso-controle	78
5. DISCUSSÃO	94
6. CONCLUSÕES	104
7. RESUMO	106
8. SUMMARY	108
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
ANEXOS	132
ANEXO 1 - Termo de consentimento	133
ANEXO 2 - Formulário	134
ANEXO 3 - Determinação do fenótipo do sistema secretor	135
ANEXO 4 - Dosagem de bilirrubina e microematócrito	140
ANEXO 5 - Investigação da deficiência de G6PD	141
ANEXO 6 - Determinação dos grupos sanguíneos do sistema ABO e Rh	144
ANEXO 7 - Teste de COOMBS direto e eluição dos anticorpos aderidos às hemácias fetais	147
ANEXO 8 - Pesquisa de anticorpos (PAC)	149
ANEXO 9 - Força antigênica das hemácias fetais	151
ANEXO 10 - Pesquisa e titulação de Anti-A e Anti-B imune no soro materno e plasma fetal	152
ANEXO 11 - Congelamento de hemácias em glicerol	154

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Sistema ABO

No início deste século, **LANDSTEINER (1900, 1901)** observou pela primeira vez as reações de aglutinação das hemácias por isoaglutininas do soro que permitiram a classificação dos soros humanos em três grupos sangüíneos (A, B e O). O grupo AB foi descoberto por **DECASTELLO & STURLI (1902)**, colaboradores de Landsteiner.

As isoaglutininas são aglutininas, anticorpos capazes de causar a aglutinação das hemácias, que atuam sobre as hemácias de indivíduos da mesma espécie (**HOERR & OSOL, 1970** e **BEIGUELMAN, 1983**).

O modelo clássico de **LANDSTEINER** admitia a existência de dois antígenos, A e B, nas hemácias e dois anticorpos naturais, anti-A e anti-B, no soro, conforme demonstrado na **TABELA 1**.

TABELA 1 - Grupos sangüíneos do sistema ABO, segundo o modelo de **LANDSTEINER (RACE & SANGER, 1975)**

GRUPO SANGÜÍNEO	ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS	ANTICORPOS SÉRICOS
O	-	Anti-A e Anti-B
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A e B	Ausentes

A teoria atualmente aceita para explicar a determinação genética e a transmissão hereditária dos grupos do sistema ABO é a de **BERNSTEIN (1924, 1925)**. Segundo esta teoria, os grupos A, B, AB e O são explicados pela admissão de

três alelos autossômicos, *A*, *B* e *O*, sendo que o gene *A* é responsável pela produção do antígeno A, o gene *B* pela produção do antígeno B, enquanto que o gene *O* é responsável pela falta de antígenos A e B, quando em homozigose.

Há indivíduos que apresentam um fenótipo raro denominado fenótipo Bombay, por ter sido observado pela primeira vez em Bombaim, na Índia, por **BHENDE *et al.* (1952)**. As hemácias destes indivíduos não são aglutinadas pelos anti-soros anti-A ou anti-B. Contudo, o seu soro aglutina hemácias O além das hemácias A e B.

Segundo **BEIGUELMAN (1983)**, com base nos estudos de **WATKINS & MORGAN**, atualmente considera-se que, além dos genes *A*, *B* e *O*, existe um outro par de genes autossômicos, *H*, *h*, que segregam independente dos primeiros. O gene *h*, que é raro, só se expressa em homozigose. Nos indivíduos que possuem o gene *H* (*HH* ou *Hh*), existe a produção de α -2-L- fucosiltransferase, que é uma enzima necessária à produção do antígeno eritrocitário H a partir de uma substância precursora. Se os indivíduos com genótipo *HH* ou *Hh* tiverem herdado um gene *A*, este determinará a produção da enzima α -N- acetil -D- galactosaminiltransferase, que transformará parte do antígeno H em antígeno A. Quando o gene herdado é o gene *B*, tal gene determinará a produção da enzima α -D- galactosiltransferase, que converterá parte do antígeno H em antígeno B. Nos indivíduos do grupo O, o antígeno H não sofre transformações.

Nos raríssimos indivíduos *hh*, qualquer que seja o genótipo do sistema ABO não haverá produção de antígenos deste sistema, uma vez que não possuem antígeno H formado a partir da substância precursora. As hemácias de tais indivíduos não aglutinam com anti-soro anti-A, anti-B ou anti-H. Por outro lado, o soro aglutina tanto hemácias A, B e AB quanto hemácias O.

Na **TABELA 2** são apresentados os grupos sanguíneos do sistema ABO considerando-se os genótipos *HH* ou *Hh* e *hh*.

TABELA 2 - Grupos sanguíneos do sistema ABO, considerando-se os alelos *H* e *h*

GENÓTIPO	ANTÍGENOS ABH ERITROCITÁRIOS	ANTICORPOS SÉRICOS	GRUPO SANGÜÍNEO
<i>OOH-</i>	H	anti-A e anti-B	O
<i>A-H-</i>	A, H	anti-B	A
<i>B-H-</i>	B, H	anti-A	B
<i>ABH-</i>	A, B, H	ausentes	AB
<i>OOhh, A-hh</i> <i>B-hh, ABhh</i>	--	anti-A, anti-B e anti-H	Oh (fenótipo Bombay)

Em 1911, **DUNGERN & HIRSZFELD** descreveram pela primeira vez os subgrupos do grupo sanguíneo A, mas o conhecimento atual que se tem sobre eles derivam dos trabalhos de outros autores, podendo-se citar o de **FRIEDENREICH & ZACHO (1931)**.

Os grupos A e AB podem ser subdivididos nos subgrupos A_1 e A_2 e A_1B e A_2B . O soro anti-A de doadores do grupo B contém dois anticorpos: o anti-A e o anti- A_1 . As hemácias do grupo A_1 e A_1B reagem fortemente com os dois anticorpos. Já, as hemácias A_2 e A_2B , aglutinam mais fracamente, uma vez que só reagem com o anticorpo anti-A (**RACE & SANGER, 1975** e **BEIGUELMAN, 1983**). Além destas existem outras variantes dos antígenos A e B, sendo algumas bastante raras.

Os antígenos do sistema ABO, presentes nas hemácias fetais desde a sexta semana de gestação (**MOLLISON & CUTBUSH, 1959**), não se restringem às hemácias, sendo também encontrados em todas as células somáticas, com exceção daquelas que compõem o sistema nervoso central, cristalino, cabelos, ossos, cartilagem e células epiteliais (pele) (**WIENER, 1943**).

O antígeno A geralmente não está completamente desenvolvido ao nascimento (**WITEBSKI & ENGASSER, 1949**), alcançando a plena potência apenas por volta dos três anos de idade (**GRUNDBACHER, 1964**). Assim, as hemácias do grupo A ou AB dos recém-nascidos podem reagir como se pertencessem ao subgrupo A_2 ou A_2B , vindo a reagir com o anticorpo anti- A_1 somente alguns meses depois (**WITEBSKY & ENGASSER, 1949**; **CRAWFORD, CUTBUSH, MOLLISON, 1953**; **ZUELZER & KAPLAN, 1954 a,b**; **ZUELZER & COHEN, 1957** e **STERN, LEE, DAVIDSOHN, 1978**). Provavelmente, o mesmo ocorre com o antígeno B, isto é, ele alcança o seu pleno desenvolvimento somente alguns meses após o nascimento (**GRUNDBACHER, 1964**).

Além dos antígenos teciduais e eritrocitários (forma álcool-solúvel ou de glicolipídios), os antígenos A, B e H podem apresentar-se na forma hidrossolúvel (glicoproteínas) nos fluidos corporais como suor; sucos digestivos; bile; leite; líquidos pleural, pericárdico, peritoneal e amniótico; saliva; secreção lacrimal; plasma sangüíneo; esperma; urina; fluidos de hidrocele e de cisto de ovário (**WIENER, 1943**). Os antígenos hidrossolúveis são chamados *substâncias grupo-específicas ABH*.

Os indivíduos denominados *secretores* apresentam nos fluidos corporais a substância grupo-específica H. Dentre eles, aqueles que pertencem aos grupos sangüíneos A, B ou AB apresentam ainda as substâncias grupo-específicas corres-

pondentes ao seu grupo, ou seja, A, B ou A e B. São chamados de *não-secretores* os indivíduos que não apresentam esta característica.

SCHIFF & SASAKI (1932) demonstraram pela primeira vez que o fenótipo secretor é dominante em relação ao não-secretor. Até o momento, a transmissão hereditária destes caracteres é explicada por meio de um par de alelos autossômicos simbolizados por *Se* e *se*. Os indivíduos não-secretores apresentam o genótipo *sese* e os secretores, os genótipos *Sese* e *SeSe*.

Uma característica interessante desse sistema é que as frequências relativas dos secretores são quase as mesmas entre os diferentes grupos étnicos já examinados, exceto em algumas pequenas amostras de índios americanos e aborígenes australianos (**MATSUNAGA *et al.*, 1964**).

Mc NEIL *et al.* (1957 a,b) descreveram dois tipos de indivíduos secretores denominados por eles de secretores parciais e secretores aberrantes, que podem ser agrupados sob o título geral de "secretores anômalos". Segundo estes autores são considerados *secretores* os indivíduos com título de inibição 1:64 ou mais; *secretores parciais* aqueles com título de inibição de 1:8 a 1:32; *não-secretores* quando o título de inibição é de 1:4 ou menos; e *secretores aberrantes* os indivíduos do grupo sanguíneo A ou B que secretam somente um fator (A, B ou H).

Para **PALATNIK, BENEVIDES, SALZANO (1969)**, considerando-se os achados de **Mc NEIL *et al.* (1957a,b)**, o conceito mais adequado de secretor de substâncias ABH é "uma pessoa que apresenta em sua saliva qualquer uma dessas substâncias". Assim, **PALATNIK *et al.* (1969)** recomendaram que os estudos sobre o sistema secretor levem em conta a classificação dos indivíduos secretores em secretores propriamente ditos, secretores parciais e secretores aberrantes.

Inicialmente, pensava-se que os genes *Se* e *se* não tinham expressão nas hemácias, mas **GARDAS & KOSCIELAK (1971)** provaram que nos indivíduos secretores os antígenos eritrocitários são encontrados sob as formas glicolipídica e glicoprotéica, enquanto que, entre os não-secretores, eles ocorrem somente sob a forma glicolipídica.

Segundo **RACE & SANGER (1975)**, até 1957 acreditava-se que os antígenos dos grupos sanguíneos não sofriam influências do ambiente. Contudo, no mesmo ano, **LOGHEM, DORFMEIER, HART (1957)** relataram um antígeno A extremamente fraco em um paciente com leucemia mieloblástica, cujas hemácias apresentavam anteriormente reação normal com o anticorpo anti-A.

Muitos outros autores confirmaram não só a alteração do antígeno A nos indivíduos com leucemia, mas também modificações dos antígenos H, B, e de outros sistemas sanguíneos, podendo-se citar os trabalhos de **SALMON & SALMON (1965)**, na França, e de **AYRES, SALZANO, LUDWIG (1966)**, no Brasil.

Por outro lado, pessoas com doenças como carcinoma do reto ou do cólon podem passar a apresentar o antígeno B em suas hemácias (**CAMERON *et al.*, 1959**).

Quanto aos anticorpos do sistema ABO, sabe-se que as aglutininas A e B são formadas após o nascimento em indivíduos que não possuem o antígeno correspondente em suas hemácias; são os chamados "anticorpos naturais", visto que eles ocorrem sem que haja, aparentemente, imunização anterior (**RACE & SANGER, 1975** e **STERN *et al.*, 1978**).

As isoaglutininas encontradas no sangue umbilical correspondem geralmente às de origem materna que são transmitidas através da placenta. Segundo **RACE & SANGER (1975)** pensava-se que qualquer anti-A e anti-B presente no sangue de cordão era de origem materna, mas sabe-se hoje que isso nem sempre é verdade. **TOIVANEN & HIRVONEN (1969)** encontraram no soro do sangue do cordão de oito dentre 44 neonatos, uma isoaglutinina que não poderia ter origem materna (e.g., anti-A, quando a mãe era do grupo A) e que, portanto, deveria ter sido sintetizada pelo feto.

Geralmente, o início da produção de isoaglutininas próprias ocorre entre o terceiro e o sexto mês de vida extra-uterina (**SMITH, 1928** e **STERN *et al.*, 1978**), e o título de anticorpos do sistema ABO aumenta com a idade, atingindo um nível máximo entre cinco e dez anos de idade, para depois decair gradualmente (**THOMSEN & KETTEL, 1929**).

Ainda que o termo anticorpos ou aglutininas "naturais" possa ser impróprio, uma vez que estes anticorpos são resultado de alguma forma de estímulo antigênico, é conveniente, do ponto de vista prático, diferenciá-los daqueles que resultam de um estímulo antigênico específico, como transfusão, gestação ou vacinas (antitetânica, antidiftérica, contra a febre tifóide ou paratifóide A ou B) (**WIENER, 1951** e **STERN *et al.*, 1978**).

É difícil explicar a origem dos anticorpos naturais. Acredita-se que eles são formados a partir de estímulos antigênicos produzidos por microrganismos, plantas ou alimentos que contêm os antígenos correspondentes, já que estes anticorpos aparecem no soro somente após alguns meses de vida extra-uterina. Para **WIENER (1951)**, os anticorpos naturais seriam o resultado de uma inaparente imunização. Esta hipótese é apoiada pelas clássicas experiências feitas com pintos

da raça Leghorn, os quais, após algumas semanas de vida, apresentam em seu soro um anticorpo que reconhece as hemácias humanas que contêm antígenos B. Quando tais pintos são mantidos em ambientes assépticos e recebem alimento esterilizado, o anticorpo anti-B não aparece em seu soro (**SPRINGER, HORTON, FORBES, 1959**).

WIENER (1951) sugeriu que as aglutininas naturais seriam de origem heterogenética e, portanto, menos "adaptadas" aos antígenos das hemácias (denominados por ele de aglutinógenos) quando comparadas com as aglutininas de origem homoespecífica, como as do sistema Rh.

Como a maioria dos anticorpos, as aglutininas A e B encontram-se na fração de gamaglobulina. Assim, nos casos de hipogamaglobulinemia ou agamaglobulinemia, adquirida ou congênita, as aglutininas apresentam títulos baixos ou estão ausentes (**STERN *et al.*, 1978**).

A quantidade, o peso molecular e as propriedades do anticorpo produzido variam de pessoa. Por razões ainda não completamente conhecidas, os indivíduos do grupo A ou B produzem predominantemente anti-A ou anti-B, do tipo IgM e os indivíduos do grupo O, anti-A e anti-B, principalmente do tipo IgG (**ABELSON & RAWSON, 1961**).

O anticorpo IgM aglutina melhor em solução salina; não produz hemólise "in vitro"; é neutralizado por substâncias grupo-específicas A ou B e não atravessa a barreira placentária. Já o anticorpo do tipo IgG aglutina em meio com albumina; produz hemólise "in vitro" (que não depende de complemento); resiste à neutralização por substâncias do grupo A ou B e é capaz de atravessar a placenta. (**OSKI & NAIMAN, 1972**).

Os anticorpos naturais são do tipo IgM e geralmente não estão envolvidos no processo hemolítico da incompatibilidade ABO, enquanto que, os anticorpos imunes são do tipo IgG e estão envolvidos com a doença hemolítica do recém-nascido do sistema ABO (**MOLLISON & CUTBUSH, 1959** e **OSKI & NAIMAN, 1972**).

1.2. Incompatibilidade materno-fetal no sistema ABO

A incompatibilidade ABO ocorre quando a mãe não apresenta em suas hemácias os antígenos do sistema ABO que estão presentes nas hemácias fetais, podendo produzir e/ou possuir em seu soro anticorpos contra os antígenos fetais. Contudo, a doença hemolítica do recém-nascido (DHRN) ocorre quase que exclusivamente nos casos em que a criança é do grupo A (mais freqüentemente do subgrupo A₁ do que do subgrupo A₂) ou do grupo B e em que a mãe é do grupo O (**ZUELZER & KAPLAN, 1954 b; ROSENFELD, 1955; GRUNDBACHER, 1965a,b** e **COOK, 1982**).

A raridade da imunização materna em combinações A x B (mãe A e filho B ou AB ou mãe B e filho A ou AB) até o momento não pode ser explicada. Na literatura, há poucas descrições de casos graves de DHRN envolvendo outras combinações de pares mãe-filho que não sejam O x A ou O x B. Dos raros casos descritos, pode-se citar os trabalhos de **DELAPORTE *et al.* (1984)**, que descreveram uma ocorrência grave de DHRN no sistema ABO onde a criança era do tipo AB e a mãe era do grupo A₂, e de **AUBERT, COCHRANE, ELLIS (1945)**, que relataram um caso de hidropisia fetal onde a criança era do grupo A e a mãe, do grupo B.

Em nosso meio, **NORATO, MAGNA, BEIGUELMAN** (dados não publicados) observaram que a frequência observada de recém-nascidos incompatíveis com a mãe no sistema ABO era maior do que a esperada num grupo de recém-nascidos ictericos. Verificaram ainda que havia neste grupo um maior número de pares mãe-filho onde a mãe era do grupo O e o filho era do grupo A ou B.

ZUELZER & KAPLAN (1954a) afirmaram que 20-25% das gestações são incompatíveis no sistema ABO, isto é, o soro da mãe contém anticorpo anti-A ou anti-B, enquanto que os eritrócitos fetais contêm antígenos A e B correspondentes. Contudo, segundo **OSKI & NAIMAN (1972)**, somente em 10% das gestações incompatíveis há manifestação clínica da doença, na maior parte dos casos com hiperbilirrubinemia moderada, sem anemia significativa, e em cerca de 1% há necessidade de exsangüinotransfusão (casos graves). Estes autores referiram também que aproximadamente dois terços dos casos de DHRN causada por incompatibilidade sangüínea deviam-se aos antígenos do sistema ABO, enquanto que um terço decorria de incompatibilidade devido ao antígeno D do sistema Rh e cerca de 2% devido aos antígenos E e c do sistema Rh, antígenos do sistema Kell e outros.

Com o declínio da incidência de DHRN causada pela incompatibilidade no sistema Rh, devido ao uso da imunoglobulina anti-Rh, a incompatibilidade ABO tem se tornado a causa mais comum de DHRN que requer terapia (**DUFOUR & MONOGHAN, 1980**).

Além disso, a morte fetal precoce está mais freqüentemente relacionada com a isoimunização pelos fatores A e B do que pelo fator Rh (**LEVINE, 1943**). Segundo **LEVINE (1943)**, isso se deve primeiramente ao fato dos

anticorpos anti-A e anti-B geralmente já estarem presentes na circulação materna no início da gravidez e, em segundo lugar, devido à ampla distribuição dos antígenos A e B nos tecidos do conceito, o que torna possível, embora faltem dados comprobatórios, um maior efeito letal no embrião e no feto. A reação dos anticorpos do sistema Rh, que se dá exclusivamente com as hemácias fetais, não afetaria órgãos ou tecidos vitais.

A associação da incompatibilidade ABO com as perdas fetais foi estudada por diversos autores.

A morte intra-uterina em fases adiantadas da gravidez dificilmente ocorre devido à incompatibilidade ABO (**BIANCALANA & BIANCALANA Jr., 1981**). De fato, na literatura são descritos casos raros de hidropisia fetal (**AUBERT *et al.*, 1945; MILLER & PETRIE, 1963; GILJA & SHAH, 1988 e SHERER *et al.*, 1991**).

HIRSZFELD & ZBOROWSKI, em 1925, (**apud Mc NEIL *et al.*, 1957b**) observaram pela primeira vez uma diminuição de crianças do grupo A entre os filhos de casais onde o pai é do grupo A e a mãe é do grupo O.

LEVINE (1943) observou uma maior incidência de incompatibilidade ABO entre um grupo selecionado de casais com história de perda fetal espontânea, precoce ou tardia, sem causa aparente.

Mc NEIL *et al.* (1954), num estudo envolvendo 404 casais, encontraram com maior frequência anticorpos anti-A ou anti-B imunes entre as mulheres que tinham dois ou mais abortos espontâneos, quando comparadas com aquelas que não tinham história de aborto. Além disso, entre casais incompatíveis quanto ao sistema ABO, a frequência de abortamentos era significativamente maior

do que entre os casais compatíveis. É interessante notar que estes autores encontraram uma frequência duas vezes maior de abortos entre os casais A x A em comparação com a taxa de abortos dos casais O x O, provavelmente devido aos subgrupos do grupo A. Sabe-se que, embora seja um achado pouco comum, o indivíduo A_2 pode produzir anti- A_1 que atua "a quente" (isto é, à temperatura corporal) (BEIGUELMAN, 1983).

Estudos mais recentes confirmaram esses achados. **JINDAL & BASU (1981)** estudaram o desempenho reprodutivo de 212 mulheres indianas casadas e que haviam completado a fase reprodutiva, considerando a compatibilidade do casal no sistema ABO, a idade materna a cada gravidez e a ordem de nascimento. Comparando-se as mulheres do grupo compatível com as mulheres do grupo incompatível, observou-se que nas faixas etárias mais jovens (menos de 24 anos) ocorreram mais perdas fetais (abortos e natimortos) e houve maior mortalidade pré-reprodutiva (neonatal e infantil) na prole das mulheres do grupo incompatível. Nas demais faixas etárias, as mulheres do grupo incompatível não apresentaram frequência significativamente maior de perda fetal do que as do grupo compatível.

Quanto à ordem de nascimento, a maior frequência de perdas fetais entre as mulheres do grupo incompatível só foi estatisticamente significativa em relação ao resultado da segunda gravidez. Já a mortalidade pré-reprodutiva era muito mais elevada, principalmente em relação ao primeiro filho, sendo a diferença estatisticamente significativa também quanto ao segundo filho. Não houve diferenças significativas entre os dois grupos (compatível e incompatível), do terceiro filho em diante, tanto em relação à perda fetal, como quanto à mortalidade pré-reprodutiva.

As observações de **JINDAL & BASU (1981)** estão, em parte, de acordo com os resultados de **KIRK *et al.* (1955)**, que observaram uma deficiência de crianças do grupo A e B, filhos de mães O, a partir do segundo filho, num estudo envolvendo 16.179 pares mãe-filho.

SCHAAP *et al.* (1984) também observaram uma maior taxa de abortamentos espontâneos entre as mães com incompatibilidade materno-fetal no sistema ABO num estudo realizado em Jerusalém, Israel, envolvendo 500 pares mãe-filho.

GUALTIERI, HICKS, MAYO (1985), analisando os dados de 14.732 gestações do "British Perinatal Study", observaram que a mortalidade perinatal aumentou com a paridade, qualquer que fosse o grupo sanguíneo da mãe, mas que este efeito era significativamente mais elevado entre as mães do grupo O, que estariam mais propensas a desenvolver uma reação imune contra os antígenos eritrocitários fetais.

O efeito seletivo que a incompatibilidade materno-fetal possa ter sobre o locus ABO tem sido investigado por diversos pesquisadores, visto que a DHRN e as perdas fetais devido à incompatibilidade no sistema ABO poderiam, a princípio, afetar a manutenção do polimorfismo neste sistema sanguíneo.

CHUNG & MORTON (1961) fizeram uma análise de segregação a partir dos dados de famílias caucasóides de estudos americanos e europeus e concluíram que a incompatibilidade materno-fetal no sistema ABO reduz a fertilidade e causa eliminação dos zigotos incompatíveis. Também observaram que a frequência de crianças incompatíveis, filhas de mães do grupo O, diminuiu com a paridade, o mesmo não ocorrendo com a frequência de crianças incompatíveis, filhas de mães do grupo A ou B. Em ambos os casos houve uma significativa deficiência

geral de crianças incompatíveis em comparação com os pares mãe-filho compatíveis. Estes dados, segundo **CHUNG & MORTON (1961)**, sugerem que a isoimunização por antígenos fetais foi o principal fator que levou às perdas fetais entre mães do grupo O, contudo os mecanismos heteroimunes foram mais importantes nos casos onde a mãe era do grupo A ou B.

Uma investigação similar feita por esses mesmos autores, a partir dos dados de estudos de famílias no Japão, levou-os a conclusões semelhantes, ainda que não tenham observado uma diminuição de crianças incompatíveis, filhas de mães O, com a paridade materna (**CHUNG, MATSUNAGA, MORTON, 1960**).

PENALVA da SILVA & KRIEGER (1981) reuniram dados de sua amostra às de **MORTON, KRIEGER, MI (1966)** e **CHUNG *et al.* (1960)** e observaram achados consistentes em relação aos efeitos da incompatibilidade A, sugerindo haver maior viabilidade dos fetos heterozigotos (AO) compatíveis com a mãe para compensar a perda dos heterozigotos incompatíveis, apesar de não terem excluído a possibilidade de haver uma desvantagem seletiva dos indivíduos O para compensar o efeito da incompatibilidade, mantendo-se, assim, o polimorfismo do sistema ABO.

De fato, **PENALVA da SILVA & KRIEGER (1981)** não encontraram desvios na distribuição ou segregação dos alelos A e B do sistema ABO em uma amostra relativamente grande de migrantes brasileiros que passaram por São Paulo (na maior parte nordestinos). Também não detectaram desvio das proporções mendelianas quando os casais foram agrupados em "compatíveis" e "incompatíveis" para o sistema ABO. Contudo, foi detectada na população estudada por **PENALVA da SILVA & KRIEGER (1981)** uma correlação significativa entre o título de anticorpos maternos nos casais incompatíveis e a mortalidade pós-natal, não tendo

sido encontrada uma correlação semelhante considerando-se os abortamentos e a mortalidade pré-natal.

HIRAIZUMI (1990), analisando os dados de um estudo anterior (**HIRAIZUMI *et al.*, 1973a,b**), realizado em duas cidades japonesas (Ohdate e Akita), confirmou sua primeira observação de que há um pequeno ou nenhum efeito da incompatibilidade ABO sobre a população japonesa atual. Entretanto, na opinião de Hiraizumi há um efeito seletivo atuando sobre o sistema ABO de forma que os fetos com o alelo A são mais freqüentemente eliminados do que os demais, em fases iniciais da gravidez, quando a perda fetal não pode ser identificada pela mulher. Tal seleção não se refletiria nas freqüências de segregação entre a prole, conforme demonstrado por **HIRAIZUMI *et al.* (1973a)**.

Tem sido proposta atualmente uma outra hipótese para explicar a manutenção do polimorfismo do sistema sangüíneo ABO. Esta nova hipótese proposta por **VALENZUELA & WALTON (1985)** partiu de alguns estudos apresentados a seguir.

KIRK *et al.* (1955) observaram pela primeira vez, num estudo realizado na Austrália, um excesso de recém-nascidos do grupo B, filhos de mães do grupo A, e de recém-nascidos do grupo A, filhos de mães do grupo B. Este achado foi confirmado por um estudo mais recente realizado por **VALENZUELA (1985)**, a partir de dados sobre pares mãe-filho da Austrália (20.575 pares), da Alemanha Oriental (4.507 pares) e do Chile (6.976 pares).

Esses achados levaram **VALENZUELA & WALTON (1985)** a proporem um mecanismo hipotético de indução da tolerância materna por zigotos ou embriões que contêm um gene ausente na mãe, o que explicaria tanto a manutenção do polimorfismo como a tolerância de gestações incompatíveis no sistema ABO. A

tolerância materna é explicada como um processo através do qual alguns antígenos ou marcadores da superfície celular dos espermatozóides ou zigotos induzem uma reação de proteção materna em relação a outros antígenos do zigoto que normalmente suscitam uma reação de rejeição. Por esta hipótese, os heterozigotos que possuem um gene paterno ausente na mãe deveriam ser melhor tolerados do que os homozigotos. Segundo estes autores isso explicaria as distorções na segregação no sistema ABO (e.g., excesso de pares mãe-filho AO x BO e BO x AO) observadas em populações chilenas, tanto na análise das matrizes de pares mãe-filho (**VALENZUELA & WALTON, 1985**) quanto no estudo de pares consecutivos de irmãos (**CIFUENTES & VALENZUELA, 1986**), classificados de acordo com o fenótipo materno.

CABELLO, FEITOSA, KRIEGER (1988) analisaram duas amostras brasileiras, cada uma com cerca de 1.000 pares de irmãos, com o objetivo de testar as discrepâncias observadas na segregação dos grupos sanguíneos ABO entre pares consecutivos de irmãos, como foi sugerido por **CIFUENTES & VALENZUELA (1986)**. Os resultados mostraram a inexistência de diferenças significativas tanto nas amostras totais como naquelas subdivididas de acordo com os fenótipos maternos, não permitindo, portanto, a generalização dos resultados obtidos no Chile. Além disso, as observações agrupadas das amostras brasileiras e chilenas não apóiam, segundo **CABELLO et al. (1988)**, a existência de um mecanismo de tolerância materna, como proposto por **VALENZUELA & WALTON (1985)**.

Numa publicação posterior, **VALENZUELA & CIFUENTES (1989)** apresentaram argumentos para explicar as discrepâncias entre os resultados dos estudos realizados na amostra chilena e nas duas amostras brasileiras, que, na opinião destes autores, não invalidam a hipótese de tolerância materna.

1.3. Doença hemolítica do recém-nascido (DHRN) do sistema ABO

Quando **LEVINE *et al.* (1941)** descreveram originalmente o papel da incompatibilidade Rh como causa da doença hemolítica do recém-nascido, estes autores sugeriram que, nos casos de DHRN onde as mães eram Rh positivo (7% dos casos estudados), a DHRN devia-se à isoimunização por outros fatores sangüíneos, dentre eles os antígenos do sistema ABO.

Em 1944, **HALBRECHT** sugeriu que a icterícia neonatal que ocorre nas primeiras 24 horas de vida (icterícia precoce) poderia ser causada por doença hemolítica decorrente de incompatibilidade no sistema ABO, diferenciando-se, assim, da icterícia fisiológica, cuja manifestação é mais tardia.

A doença hemolítica ABO é uma doença isoimune que implica na passagem transplacentária de anticorpos maternos e sua interação com os antígenos das hemácias fetais ou neonatais. Esta interação antígeno-anticorpo determina a hemólise e, conseqüentemente, ocorre um grau variável de anemia e hiperbilirrubinemia (**COOK, 1982**). Embora a demonstração *in vitro* da presença de anticorpos hemolíticos requeira a presença de complemento, os achados de **WANG & DESFORGES (1971)** sugerem que o complemento não participa na destruição *in vivo* das hemácias nos casos de DHRN do sistema ABO.

Os primogênitos são afetados em cerca de 40 a 50% dos casos (**OSKI & NAIMAN, 1972**). A DHRN do sistema ABO pode ocorrer na primeira gravidez porque o anticorpo imune anti-A e anti-B pode ser encontrado em níveis elevados em mulheres nuligestas (**GRUNDBACHER, 1968**) ou primíparas (**HUNTLEY *et al.*, 1976**). Frequentemente, crianças de uma mesma irmandade são afetadas. Contudo, uma criança incompatível, nascida após um irmão que teve a

DHRN do sistema ABO, pode permanecer não afetada ou desenvolver um processo hemolítico mais moderado (**MOLLISON & CUTBUSH, 1959**), ou ainda ter uma manifestação mais grave da DHRN (**WIENER *et al.*, 1960**).

Segundo **MOLLISON & CUTBUSH (1959)**, o diagnóstico da DHRN do sistema ABO envolve dois aspectos importantes. Primeiramente, deve-se demonstrar que as hemácias fetais estão expostas a um anticorpo incompatível capaz de produzir hemólise e, em segundo lugar, deve-se demonstrar que a taxa de destruição das hemácias está aumentada. Para satisfazer o primeiro critério, é necessário somente demonstrar que o soro materno tem o anticorpo hemolítico e que as hemácias do recém-nascido são incompatíveis. Contudo, é difícil, ou mesmo impossível, em certos casos demonstrar que a taxa de destruição das hemácias está aumentada. Além disso, concentrações baixas de anticorpos podem sensibilizar as hemácias, ocorrendo um grau leve de hemólise sem evidência de sensibilização *in vitro*. Portanto, é possível que a maioria, ou mesmo todos os recém-nascidos incompatíveis com a mãe no sistema ABO, tenham um certo grau de hemólise (**DESJARDINS, CHINTU, ZIPURSKI, 1979**).

Há variabilidade na manifestação clínica da DHRN do sistema ABO, podendo ocorrer desde icterícia leve, que se assemelha com a icterícia fisiológica, até icterícia grave, como a causada pela incompatibilidade Rh (**ZUELZER & COHEN, 1957**).

A incidência da DHRN do sistema ABO como causa de hiperbilirrubinemia neonatal é comparável, em certas populações, com a frequência da deficiência de G6PD como fator causal (**MADAN & SOOD, 1987**).

Vale salientar que há associação etiológica entre algumas variantes de G6PD, como a Mediterrânea e Cantão, que causam deficiência grave de G6PD e a

icterícia neonatal. Quanto à variante africana de G6PD, no estudo realizado por **GARLIPP (1987)**, verificou-se que está associada com a icterícia moderada (que requer fototerapia), mas não com a icterícia leve (onde não é necessário o tratamento).

Alguns autores, como **CLIFFORD *et al.* (1968)**, **FARRELL (1970)** e **DELAPORTE *et al.* (1984)**, consideram que a DHRN do sistema ABO é mais grave entre o par mãe-filho O x B, ainda que seja mais freqüente no par O x A. Outros autores, como **KANTO, MARINO, GODWIG (1978)**; **PEEVY & WISEMAN (1978)** e **EMILFORK, AMPUERO, DUFFAU (1981)**, não confirmaram estas suposições.

Na revisão da literatura observa-se que a incidência de DHRN do sistema ABO é de difícil determinação, não só devido à variabilidade na manifestação clínica, mas também como afirma **LEVINE & MEYER (1985)**, por não existir um critério diagnóstico único.

Segundo **OSKI (1978)**, o diagnóstico da DHRN do sistema ABO depende dos achados clínicos, sorológicos e hematológicos, que incluem: 1o.) presença de hiperbilirrubinemia inexplicada em uma criança do grupo A ou B, nascida de mãe do grupo O; 2o.) presença de leve anemia, reticulocitose e esferocitose; 3o.) presença de teste de COOMBS direto fracamente positivo e eluição dos anticorpos anti-A ou anti-B ligados às hemácias fetais; 4o.) presença de anticorpos anti-A e anti-B livres no soro do recém-nascido; 5o.) títulos relativamente elevados de anti-A ou anti-B do tipo IgG no soro materno.

Esses achados nem sempre podem ser avaliados, como discutiremos a seguir.

O aparecimento da icterícia e hiperbilirrubinemia não depende apenas da intensidade do processo hemolítico, mas também da capacidade do fígado do recém-nascido excretar a bilirrubina (ZUELZER & COHEN, 1957).

O nível de bilirrubina do cordão umbilical não permite o diagnóstico da DHRN do sistema ABO, embora possa prever, razoavelmente, o nível final de bilirrubina no neonato (RISEMBERG *et al.*, 1977; HAQUE, 1978; PEEVY & WISEMAN, 1978; WHYTE & GRAHAM, 1981 e LEVINE & MEYER, 1985).

A imprecisão no diagnóstico precoce e a dificuldade de se definir o prognóstico é um problema que se torna ainda mais significativo quando se leva em conta a prática da alta hospitalar precoce. Em muitos casos, a DHRN causada pela incompatibilidade ABO não é diagnosticada antes do aparecimento da icterícia e não é possível prever um aumento dos níveis de bilirrubina, porque eles podem elevar-se lentamente. Assim, o diagnóstico de DHRN grave poderá não ser feito antes da alta hospitalar e, por isso, a identificação precoce dos recém-nascidos que têm risco de desenvolver hiperbilirrubinemia adquire grande importância prática, que se reflete nos objetivos dos estudos mais recentes (RISEMBERG *et al.*, 1977; HAQUE, 1978; CARAPPELLA *et al.*, 1982; ORZALES *et al.*, 1983; LEVINE & MEYER, 1985 e HAN *et al.* 1988).

A anemia grave é rara. Geralmente as concentrações de hemoglobina são normais ou levemente baixas (ZUELZER & COHEN, 1957; KANTO *et al.*, 1978 e COOK, 1982). Mesmo quando os níveis de hemoglobina são normais, a contagem de reticulócitos revela uma compensação diante de um processo hemolítico, e percentuais de reticulócitos acima de 25 ou 30% não são incomuns nos casos de DHRN do sistema ABO (ZUELZER & COHEN, 1957).

A esferocitose é um achado bastante freqüente, bem como o aumento da fragilidade osmótica (**CRAWFORD *et al.*, 1953; ROSENFELD, 1955; ZUELZER & COHEN, 1957 e MOLLISON & CUTBUSH, 1959**).

CRAWFORD *et al.* (1953), num estudo envolvendo 11 recém-nascidos com diagnóstico de DHRN devido ao anti-A, concluíram que dois sinais são importantes para estabelecer o diagnóstico: a presença de α -hemolisina no soro materno e o aumento da fragilidade osmótica das hemácias. Em todos os 11 casos foi observado esferocitose, contudo em dois casos não houve icterícia ou hiperbilirrubinemia, apesar de existirem sinais sorológicos de hemólise. **BARBOSA (1988)** observou correlação entre o número de horas de início da icterícia e o número de esferócitos. Quanto mais precoce a icterícia, maior o percentual de esferócitos.

O teste de antiglobulina direta (teste direto de COOMBS) não é considerado por alguns autores como adequado para o diagnóstico da DHRN do sistema ABO ou para a predição da gravidade da doença, porque geralmente a reação é fraca ou negativa (**LEVINE & MEYER, 1985 e QUINN, WEIDLING, DAVIDSON, 1988a,b**), sendo positiva em apenas 11% (**BEL COMOS *et al.*, 1991**) a 33% (**QUINN *et al.*, 1988b**) dos casos de incompatibilidade ABO.

Outros autores, como **CLIFFORD *et al.* (1968); ALTER *et al.* (1969); ORZALESI *et al.* (1973); DUFOUR & MONOGHAN (1980); WHYTE & GRAHAM (1981); CARAPPELLA *et al.* (1982); BEL COMOS *et al.* (1991) e OWA, DUROSINMI, ALABI (1991)**, contudo, recomendaram que o teste de COOMBS direto seja realizado de rotina, visto que é um exame relativamente simples e barato e que consegue discriminar o grupo de recém-nascidos com maior risco de desenvolver hiperbilirrubinemia entre os casos de incompatibilidade

materno-fetal ABO. **PEEVY & WISEMAN (1978)**, por exemplo, conseguiram diminuir significativamente a necessidade de praticar exsanguíntansfusões através de um maior controle dos recém-nascidos com teste de COOMBS direto positivo e de um tratamento mais precoce e efetivo (fototerapia com luz azul especial).

A falha do teste de COOMBS direto nos casos de DHRN do sistema ABO deve-se ao baixo nível de anticorpos ligados às hemácias. Isso ocorre devido ao pequeno tamanho molecular dos anticorpos IgG e às distâncias relativamente grandes entre os sítios do antígeno A nas hemácias fetais (**VOAK & WILLIAMS, 1971**).

Segundo **ROMANO & MOLLISON (1975)**, a quantidade de IgG anti-A na DHRN geralmente é inferior a 0,6µg/ml, enquanto que, na doença hemolítica devido à incompatibilidade Rh, em casos de mesmo grau de gravidade, há mais anticorpos anti-Rh ligados às hemácias.

Portanto, a fraca reação do teste de COOMBS direto observada nos casos de DHRN do sistema ABO deve-se ao fato de que o número de moléculas anti-A ou anti-B nas células fetais está no limite mais baixo da sensibilidade do teste (**ROMANO, HUGHES - JONES, MOLLISON, 1973**). Modificações na técnica do teste de COOMBS podem aumentar a sua positividade (**HSU, ROSENFELD, RUBINSTEIN, 1974** e **KIRUBA, ONG, HAN, 1988**).

Segundo **DESJARDINS et al. (1979)**, a eluição "a quente" pode demonstrar a presença de anti-A ou anti-B ligado às hemácias, mesmo nos casos de teste de COOMBS direto negativo. Todavia, este achado nem sempre está associado com a DHRN do sistema ABO. Apesar disso, é o melhor teste para demonstrar a presença de anticorpos incompatíveis na circulação fetal, e segundo **VOAK &**

BOWLEY (1969), juntamente com a observação da icterícia precoce, constitui um parâmetro adequado para o diagnóstico da DHRN do sistema ABO.

De acordo com **CRAWFORD *et al.* (1953)** e **MOLLISON & CUTBUSH (1959)**, a presença de anticorpo hemolítico no soro materno contra as hemácias do grupo A ou B é importante para estabelecer o diagnóstico da DHRN do sistema ABO, porque a ausência de hemolisina anti-A ou anti-B descartaria esta hipótese diagnóstica.

Contudo, estudos posteriores (**POLLEY, ADINOLFI, MOLLISON, 1963**) demonstraram que a atividade hemolítica está associada tanto a anticorpos tipo IgM ou 19S (onde S significa "coeficiente de sedimentação") quanto ao tipo IgG ou 7S. Assim, o fato de um anticorpo ser hemolítico não indica que necessariamente ele é do tipo IgG e, portanto, passível de atravessar a placenta e causar danos ao feto.

Por outro lado, o mecanismo de destruição das hemácias fetais na DHRN do sistema ABO não está bem estabelecido, sendo provável que a destruição se faça pelo seqüestro das hemácias aglutinadas (**ROMANO & MOLLISON, 1975**).

Além desses aspectos relacionados ao diagnóstico da DHRN do sistema ABO, que tornam difícil a sua definição, alguns outros devem ser levados em consideração. Assim, em 1982, **COOK** referia: "a discordância entre a alta frequência de gestações incompatíveis e a baixa incidência da doença hemolítica, bem como a gravidade variável do processo hemolítico, podem ser atribuídas à natureza dos anticorpos maternos ou dos antígenos fetais, bem como a certos mecanismos de proteção fetal que modulam a interação antígeno-anticorpo" .

Portanto, faz-se necessário comentar sobre os fatores relacionados à manifestação da DHRN do sistema ABO.

1.4. Antígenos do sistema ABO

Segundo **MOLLISON & CUTBUSH (1959)**, as características dos antígenos fetais A e B representam um fator de proteção na DHRN do sistema ABO sob dois aspectos:

1. os antígenos A e B das hemácias fetais são mais "fracos" que os das hemácias adultas;
2. há uma ampla distribuição dos antígenos A e B nos tecidos do feto, que competem com os antígenos eritrocitários na sua ligação com os anticorpos anti-A e anti-B maternos.

KEMP (1930) demonstrou pela primeira vez que as hemácias da criança até os seis meses de idade têm somente cerca de 20% da sensibilidade para aglutinação ou força antigênica das hemácias adultas.

FISCHER & STEGE (1967) verificaram variações quantitativas no poder de combinação dos eritrócitos neonatais com o anticorpo, utilizando a técnica de imunofluorescência. No recém-nascido aparentemente há diferentes populações de hemácias num mesmo indivíduo, sendo que as células com alta capacidade de ligação com o anticorpo são destruídas prontamente, ao passo que as com menor capacidade são destruídas mais lentamente. O quadro clínico seria determinado pelo número de eritrócitos com elevada capacidade de ligação com o anticorpo, pela taxa de produção destes eritrócitos e pela quantidade de anticorpos maternos na

circulação do recém-nascido. As hemácias A_1 adultas apresentam uma mesma intensidade de fluorescência, o que revela uma forte ligação com o anticorpo. As hemácias adultas A_2 comportam-se como as hemácias dos recém-nascidos A_1 .

VOAK & WILLIAMS (1971) demonstraram que as hemácias A_1 fetais têm menos sítios antigênicos do que as hemácias A_1 adultas e que deve haver maior distância entre estes sítios. A menor força antigênica das hemácias fetais explica o fato de que, quando hemácias adultas do grupo A são transfundidas para um recém-nascido com anticorpos anti-A adquiridos da mãe, elas são rapidamente destruídas, ocorrendo hemólise intravascular, ao passo que as hemácias fetais não sofrem uma destruição tão intensa (**OSKI, 1978**). A reação transfusional com hemácias adultas pode ocorrer mesmo quando o teste de COOMBS direto e a eluição "a quente" são negativos (**FALTERMAN & RICHARDSON, 1980**).

HABIBI *et al.* (1986) investigaram a expressão dos antígenos eritrocitários nas hemácias fetais de fetos de 18 a 34 semanas. As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa da veia umbilical, guiada através de ultrassonografia. Estes autores constataram que os antígenos A_1 , I, Le^a e Le^b não se expressam nas hemácias fetais e os antígenos A, B, H, P, Lu^a e Lu^b mostram "desenvolvimento imaturo", uma vez que a "força" e a frequência destes antígenos estava diminuída em comparação com as hemácias adultas. Segundo estes autores, alguns antígenos, como os do sistema Rh, que são determinados por estruturas protéicas, estão bem desenvolvidos já na sexta semana de gestação. Outros antígenos, como o A, B, H, Lewis e I, que são determinados por açúcares imunodominantes e requerem uma ou mais enzimas (transferases) para o seu desenvolvimento, não têm total expressão ao nascimento.

Os antígenos A e B sofrem, portanto, alterações quantitativas durante a vida do indivíduo, tanto na fase intra-uterina como após o nascimento.

Devido ao aumento gradual da força antigênica das hemácias fetais, espera-se destruição maior das hemácias no final da gravidez ou nos primeiros dias após o nascimento, o que explica a frequência relativamente alta de casos de DHRN do sistema ABO com hiperbilirrubinemia e sem anemia precoce, indicando uma destruição eritrocitária recente, uma vez que a anemia está relacionada a um processo hemolítico prolongado das hemácias (**GRUNDBACHER, 1965a**).

O desenvolvimento relativo da criança pode ser também um fator relacionado à manifestação da DHRN do sistema ABO. **SCHELLONG (apud GRUNDBACHER, 1965a)** verificou que, via de regra, os recém-nascidos prematuros não desenvolvem a DHRN do sistema ABO, mesmo na presença de anticorpos maternos imunes anti-A e anti-B. Este autor explicou o seu achado pela "maturidade imperfeita" dos antígenos eritrocitários A e B nas crianças prematuras.

Outro achado que poderia ser explicado pela diferença no desenvolvimento quantitativo dos antígenos eritrocitários fetais é a preponderância de recém-nascidos do sexo feminino entre as crianças afetadas pela DHRN do sistema ABO (**GRUNDBACHER, 1965a**) e entre as formas graves da doença, que requerem exsanguíneotransfusão (**HODR, 1989**).

Sabe-se que o desenvolvimento pré e pós-natal é diferente nos dois sexos, sendo mais rápido no feminino, e que a força antigênica do antígeno A₁ é, em média, maior entre as meninas (**GRUNDBACHER, 1965a,b**).

O antígenos fetais do sistema ABO também sofrem uma variação em sua reação com o anticorpo de acordo com a raça e o peso ao nascer. Há uma

correlação positiva entre a força antigênica do antígeno A₁ e o peso ao nascer, independentemente do sexo do recém-nascido (**GRUNDBACHER, 1965b**), e a frequência de DHRN do sistema ABO é maior em negróides do que em caucasóides (**FARRELL, 1970; PEEVY & WISEMAN, 1978 e CARAPELLA *et al.*, 1982**). Estes fatos possivelmente podem ser explicados por diferenças no grau de desenvolvimento dos recém-nascidos.

Assim como há variação no grau de desenvolvimento de uma criança para outra ao nascimento, há uma variação muito grande na força antigênica das hemácias fetais, que em alguns casos pode ser semelhante à das hemácias adultas (**TOVEY, 1945; GRUNDBACHER, 1980 e KIRUBA *et al.*, 1988**). De um modo geral, como proposto inicialmente por **TOVEY (1945)**, parece haver um consenso de que, pelo menos em certos casos, a menor força antigênica das hemácias fetais pode ter um papel de proteção contra os anticorpos maternos.

1.5. Anticorpos do sistema ABO e a DHRN

POLAYES, LEDERER, WIENER (1929) observaram em 500 recém-nascidos que o exame de sangue do cordão não revelava a presença de aglutininas específicas contra as hemácias maternas. Em 25% dos casos, as hemácias fetais eram aglutinadas pelo soro materno, mas em nenhum caso houve aglutinação de hemácias da mãe pelo soro de sangue do cordão do recém-nascido.

Na década de 20, alguns trabalhos, como o de **SMITH (1928)**, comprovaram transferência passiva de anticorpos maternos para o feto através da placenta. Smith observou que as isoaglutininas anti-A e anti-B diminuía ou desapareciam da circulação dos recém-nascidos dias após o nascimento, o que o

levou a concluir que estas isoaglutininas não haviam sido produzidas pelo neonato; na verdade, haviam sido adquiridas, sendo, portanto, de origem materna.

Anos mais tarde, **HALBRECHT (1944)** associou a passagem transplacentária das isoaglutininas com a icterícia precoce. Segundo este autor, a icterícia devia-se à hemólise das hemácias fetais pela presença de anticorpos maternos na circulação do recém-nascido.

Por outro lado, **TOVEY (1945)** confirmou a observação prévia feita por outros pesquisadores como **SHERMAN, HAMPTON, COOKE (1940)**, de que a placenta impede a passagem de alguns anticorpos maternos. A este fenômeno **TOVEY** chamou "inibição placentária".

Posteriormente, alguns estudos mostraram que o grupo sangüíneo da mãe estava relacionado com a passagem transplacentária dos anticorpos anti-A e anti-B. Assim, **WIENER & UNGER (1955)** verificaram que nos pares O x O a diferença entre o título dos anticorpos anti-A e anti-B no soro materno e no soro do recém-nascido era menor do que a observada nos pares A x A (ou A x O) e B x B (ou B x O). Estes autores sugeriram, com base nestes achados, que as mães do grupo O têm maior capacidade de produzir anticorpos capazes de atravessar a barreira placentária.

ROSENFELD & OHNO (1955) chegaram a conclusões semelhantes ao verificar que os anticorpos anti-A e anti-B eram encontrados com maior freqüência no soro do sangue de cordão dos recém-nascidos do grupo O, filhos de mães O, do que no soro de recém-nascidos compatíveis, filhos de mães A e B (onde seria esperada a presença do anticorpo anti-B e anti-A respectivamente). Porém, a passagem transplacentária dos anticorpos maternos é uma condição necessária, mas não suficiente para a manifestação da DHRN.

GUNSON (1957), usando o teste da papaína de **LÖW (apud GUNSON, 1957)**, encontrou anticorpo anti-A ou anti-B livre no soro de sangue do cordão de todos os 17 recém-nascidos com DHRN estudados e em nenhum dentre os 25 recém-nascidos do seu grupo-controle (recém-nascidos incompatíveis com a mãe que não desenvolveram icterícia). Já **STERN (1958)**, embora tenha encontrado anticorpos incompatíveis livres no sangue de todos os recém-nascidos com DHRN, também os encontrou em 10% das crianças clinicamente normais.

Em razão da existência de anticorpos anti-A e anti-B na população em geral, incluindo mulheres nulíparas e homens (**ZUELZER & COHEN, 1957** e **GRUNDBACHER, 1968**), no estudo da DHRN do sistema ABO não só os aspectos quantitativos devem ser analisados, mas sobretudo os aspectos qualitativos dos anticorpos maternos.

Uma das características apresentadas apenas pelos anticorpos anti-A e anti-B produzidos por indivíduos do grupo O é a reação cruzada com hemácias heterólogas. **ROSENFELD & OHNO (1955)** observaram que os anticorpos anti-A e anti-B do soro de sangue do cordão de recém-nascidos do grupo O, filhos de mães O, podiam ser adsorvidos por hemácias B e A₁, respectivamente (reação cruzada).

Além disso, em mães do tipo O, os antígenos fetais A e B parecem suscitar a elevação dos títulos da aglutinina correspondente e também da outra aglutinina. **SMITH (1945)** observou que em gestações incompatíveis O x A e O x B ocorria, durante a gravidez, um aumento do título da aglutinina homóloga ao grupo sanguíneo da criança e uma leve ascensão do título da aglutinina heteróloga. Smith comparou este fenômeno com o aumento do título de anticorpos específicos e não-específicos, que pode ocorrer quando uma pessoa imunizada contra o *Bacillus typhosum*, *paratyphosum A* e *paratyphosum B* é infectada com o *B. typhosum* e tem

um aumento do anticorpo específico, juntamente com uma leve ascensão dos títulos dos anticorpos *anti-paratyphosum A e B*.

ZUELZER & KAPLAN (1954a), utilizando metodologia semelhante (titulação em salina e incubação à temperatura ambiente), confirmaram, pelo menos em parte, os achados de **SMITH (1945)**. No estudo destes autores, o grupo de mães com gestação incompatível O x A mostrou um leve, porém distinto, aumento do título de anti-A e de anti-B somente no período pós-parto (três semanas após o parto). Entre o grupo de mães O com filho B, a elevação de anti-B no período pós-parto foi menor e o título de anti-A manteve-se estável. Durante a gestação, ao contrário do observado por **SMITH (1954)**, não houve aumento do título dos anticorpos maternos.

Para **ROSENFELD (1955)**, a explicação para esses achados é que os indivíduos do grupo O produzem anti-A e anti-B com reatividade cruzada. Assim, o feto incompatível, filho de mãe do grupo O, poderia estar sujeito aos efeitos de mais de um anticorpo: ou anti-A mais anti-B em reação cruzada ou anti-B mais anti-A expressando reatividade cruzada.

DODD (1952) sugeriu que haveria uma ligação entre as moléculas de isoaglutininas anti-A e anti-B no soro de indivíduos do grupo O. Esta hipótese foi contestada por **UNGER & WIENER (1954)**, visto que dois anticorpos ligados dificilmente atravessariam a barreira placentária.

Uma outra hipótese foi apresentada por **WIENER & UNGER (1953, 1954, 1955)**, sugerindo que um outro anticorpo, denominado anti-C, com especificidade anti-AB, estaria envolvido na DHRN do sistema ABO. As denominações C e anti-C foram utilizadas pela primeira vez em relação ao sistema ABO, por **MOSS, em 1910 (apud WIENER, 1953)**, que postulou que os quatro

grupos sangüíneos eram determinados por três aglutinógenos e correspondentes aglutininas.

Segundo essa teoria defendida por **WIENER & KAROWE (1944)**, o indivíduo do grupo O produz anticorpos anti-A, anti-B e anti-C, enquanto que os indivíduos do grupo A ou B produzem apenas anti-B ou anti-A (respectivamente). Por outro lado, os indivíduos do grupo A,B e AB possuem um "fator sangüíneo C" ausente nas pessoas do grupo O.

UNGER & WIENER (1954) procuraram demonstrar e quantificar a aglutinina anti-C através de estudos de titulação dos anticorpos anti-A e anti-B do soro de mulheres do grupo O antes e após adsorção com hemácias A₁ ou B. Quando o soro de mulheres do grupo O era adsorvido com hemácias do grupo A₁ havia uma redução apreciável do título de anti-B (devido, segundo estes autores, à adsorção de anti-C além do anti-A). O mesmo ocorria quando se utilizava hemácias do grupo B, havendo uma redução do título de anti-A (pela adsorção de anti-C mais anti-B). O título de anti-C podia então ser obtido pela diferença entre os títulos de anti-A ou de anti-B antes e após adsorção com hemácias B e A₁, respectivamente.

Segundo **UNGER & WIENER (1954, 1955)**, além dos anticorpos anti-A e anti-B, pode-se encontrar o anticorpo anti-C no soro de sangue do cordão dos recém-nascidos filhos de mães O. Portanto, o anti-C atravessaria a barreira placentária, e o fato de em algumas gestações incompatíveis (O x A ou O x B) o anti-C ser encontrado "livre" no soro de sangue do cordão, isso indicaria que possivelmente o anti-C é um anticorpo de baixa avidéz, explicando a gravidade moderada ou ausência de DHRN na maioria dos casos de incompatibilidade ABO (**UNGER & WIENER, 1954**). Por outro lado, como o anti-C é produzido

exclusivamente por indivíduos do grupo O, isso justificaria o excesso de pares O x A e O x B nos casos de DHRN do sistema ABO (**WIENER & UNGER, 1955**).

Além dessas, há outras explicações para a reatividade cruzada do anti-A e do anti-B do soro de indivíduos do grupo O, mas nenhuma é universalmente aceita.

Outro aspecto qualitativo a ser considerado é a "característica" imune do anticorpo. **ZUELZER & KAPLAN (1954b)** demonstraram que o título de anticorpo imune é importante para o diagnóstico da DHRN. Estes autores investigaram a presença dos anticorpos imunes através da titulação das aglutininas anti-A e anti-B após neutralização com substância grupo-específica AB.

Vários pesquisadores (**ABELSON & RAWSON, 1961; KOCHWA et al., 1961** e **POLLEY et al., 1963**) posteriormente demonstraram que os indivíduos do grupo O produzem predominantemente anti-A ou anti-B do tipo IgG e os indivíduos do grupo A ou B, principalmente anticorpo do tipo IgM.

KOCHWA et al. (1961) demonstraram que somente anticorpos na fração 7S (IgG) do soro estão associados com a DHRN do sistema ABO, devido à sua capacidade de atravessar a placenta.

VOAK (1969) verificou, através de estudos de adsorção e eluição, que tanto o anticorpo específico como o que apresenta reatividade cruzada podem estar relacionados com a DHRN. Assim, **VOAK & BOWLEY (1969)** contestaram as hipóteses defendidas por **ROSENFELD (1955)** e por **WIENER & UNGER (1954, 1955)**, pois o excesso de mães do grupo O associado com a DHRN é, provavelmente, relacionado à quantidade produzida de anticorpo incompatível capaz de atravessar a placenta (IgG).

A investigação da patogênese da DHRN do sistema ABO envolve um estudo da inter-relação entre os anticorpos IgG anti-A e anti-B maternos e os vários componentes do mecanismo de proteção fetais (substâncias fetais A e B; força antigênica das hemácias fetais e barreira placentária) (VOAK, 1969).

Vários testes laboratoriais são utilizados para determinar a presença do anticorpo imune. A seguir, discutiremos os mais usados.

Uma das técnicas utilizadas é a adsorção do soro materno com substâncias grupo-específicas AB; é a chamada técnica de WITEBSKY (apud ZUELZER & KAPLAN, 1954a). Ela é adequada para demonstrar a presença do anti-A imune, porque a substância A neutraliza preferencialmente o anticorpo do tipo 19S (POLLEY *et al.*, 1963). Contudo, é um teste apenas qualitativo e não quantitativo porque, apesar de as substâncias AB de origem animal neutralizarem preferencialmente os anticorpos IgM, elas também neutralizam, quando em alta concentração, o anticorpo IgG (POLLEY *et al.*, 1965). Além disso, a substância B de origem animal não é adequada à identificação do anti-B imune, e a substância AB de origem humana, além de difícil obtenção, pode levar a resultados errôneos quando o título de IgM é elevado (VOAK & BOWLEY, 1969).

Atualmente, têm sido utilizados o 2-mercaptoetanol (2-ME) ou o dithiothreitol (DTT), que destroem as moléculas de IgM (ROSEMBLIT, 1986).

Utilizando-se técnicas adequadas, pode-se demonstrar uma significativa correlação entre o título do anticorpo IgG e a ocorrência e gravidade da DHRN do sistema ABO. Contudo, a DHRN só ocorre quando os anticorpos IgG anti-A e anti-B alcançam um nível suficientemente elevado, a fim de superar os mecanismos de proteção fetais (VOAK, 1969).

Há um equilíbrio na passagem dos anticorpos IgG através da placenta (KOCHWA *et al.*, 1961) que pode ser confirmado pelos níveis semelhantes de anticorpos IgG anti-A e anti-B na circulação materna e fetal dos pares mãe-filho O x O (VOAK, 1969 e RACCA *et al.*, 1988). Após o parto, separado o recém-nascido da mãe, o nível do anticorpo incompatível logo cai, provavelmente devido à combinação com substâncias grupo-específicas ou hemácias (VOAK, 1969). Por outro lado, a quantidade de anticorpo nas hemácias fetais é cerca de 2 a 3% da concentração do anticorpo no plasma materno devido à competição com as substâncias grupo-específicas AB (ROMANO *et al.*, 1973).

O critério mínimo para o diagnóstico da DHRN do sistema ABO, segundo VOAK & BOWLEY (1969), é a demonstração de anticorpos anti-A ou anti-B em um eluato das hemácias fetais juntamente com a observação clínica de icterícia no recém-nascido ou, mais raramente, palidez decorrente de anemia durante os primeiros dias após o nascimento. Na falta de eluição ou estudos sorológicos na amostra de sangue do recém-nascido, a presença de um título elevado (maior que 1:256) de anticorpo IgG no soro materno pode ser uma evidência de que o recém-nascido está com DHRN devido ao sistema ABO.

Outros autores confirmaram a existência de correlação entre o título de anticorpos imunes no soro materno e o desenvolvimento da DHRN. O valor crítico do título de anticorpo imune varia entre 1:32 (ZUELZER & COHEN, 1957) e 1:256 (GUNSON, 1957 e VOAK & BOWLEY, 1969). Esta variação no valor dos títulos deve-se não só ao emprego de diferentes métodos para demonstrar a presença do anticorpo imune (técnica de WITEBSKY, 2-ME ou DTT), como à própria técnica de titulação, que é de pobre reprodutibilidade.

Os títulos são afetados pela idade das hemácias-testes, temperatura, período de incubação e maneira de agitar os tubos quando o último tubo em que ocorre aglutinação visível é lido (**WIENER *et al.*, 1960**).

Como a correlação entre os títulos elevados de anti-A e anti-B e a DHRN nem sempre é observada (**POLLEY *et al.*, 1965** e **WANG & DESFORGES, 1971**), é provável que outros aspectos qualitativos dos anticorpos maternos estejam envolvidos. Soma-se a isso a variabilidade da força antigênica das hemácias fetais que levaria, em alguns casos e em outros não, à manifestação da DHRN, dependendo da maior ou menor força antigênica das hemácias diante de uma dada concentração de anticorpo (**GRUNDBACHER, 1980**). Em outras palavras, mesmo havendo títulos elevados de anticorpos maternos na circulação fetal, hemácias com força antigênica fraca poderiam sofrer um dano menor, não havendo manifestação clínica da DHRN.

Inicialmente, alguns autores consideravam essencial para o desenvolvimento da DHRN a presença de anticorpos com característica hemolítica, as chamadas hemolisinas (**CRAWFORD *et al.*, 1953** e **MOLLISON & CUTBUSH, 1959**), cuja produção parece depender das características imunológicas do indivíduo (**TOVEY, 1958** e **POLLEY *et al.*, 1963**).

Todavia, **ROMANO & MOLLISON (1975)** verificaram que a quantidade de anticorpo anti-A e anti-B é pequena nas hemácias fetais (menos de 0,6µg/ml), e como o complemento não é detectado em concentrações de IgG menores que 14µg/ml, é provável que a destruição das hemácias fetais se faça pelo seqüestro das hemácias aglutinadas.

Foi também observado que certos anticorpos IgG têm elevada atividade biológica, sendo capazes de levar à destruição das hemácias, mesmo em

baixas concentrações (GILLILAND, BAXTER, EVANS, 1971). Além disso, há algumas evidências de que as moléculas de IgG anti-A e anti-B são mais eficientes na destruição das hemácias do que as moléculas de anti-RH (ROMANO *et al.*, 1973).

Segundo CALICH (1988), sabe-se, atualmente, que, o fato da IgG ser o único tipo de anticorpo humano que atravessa a barreira placentária, está relacionado à composição química do fragmento Fc (fragmento cristalizável) e não ao peso molecular. A porção Fc serve para ativar o complemento, ligar imunoglobulinas a vários receptores celulares e transferir a imunoglobulina através de membranas. As duas outras porções, designadas por F_{ab} ("fragment antigen binding"), possuem a atividade específica do anticorpo, ou seja, ligação com os antígenos.

Uma possível explicação para a destruição de hemácias por anticorpos IgG que não fixam complemento é que as hemácias sensibilizadas aderem aos receptores nos macrófagos através da porção Fc da molécula de IgG e são destruídas por fagocitose ou lise citotóxica (BORNE, BECKERS, ENGELFRIET, 1977).

Os resultados dos experimentos de BORNE *et al.* (1977) com hemácias marcadas com ⁵¹Cr e sensibilizadas apenas com a porção F (ab')₂ da molécula de IgG anti-D mostraram que, mesmo as hemácias tendo sido sensibilizadas, não sofreram eliminação imune *in vivo*. Assim, a parte Fc dos anticorpos IgG parece ser essencial à eliminação *in vivo* das hemácias sensibilizadas.

Além disso, há absoluta correlação entre a aderência das hemácias aos monócitos *in vitro* e o aumento de hemólise *in vivo*, o que reforça a suposição de que os fagócitos mononucleares têm um papel importante na destruição *in vivo* das

hemácias sensibilizadas com anticorpos IgG que não fixam complemento (MEULEN *et al.*, 1978).

Considerando-se as subclasses de IgG, MEULEN *et al.* (1978) verificaram que os anticorpos IgG3 estão quase sempre associados com anemia hemolítica; os da subclasse IgG1, apenas em alguns casos; e os anticorpos da subclasse IgG2 e IgG4 não estão associados com a hemólise *in vivo*. Uma relação idêntica foi observada entre a composição da subclasse de IgG e a aderência das hemácias aos monócitos do sangue periférico *in vitro*.

Portanto, as subclasses de anticorpos IgG são, provavelmente, de importância crítica para a destruição das hemácias dos recém-nascidos do grupo A ou B, devido às suas propriedades biológicas essencialmente diferentes (BROUWERS *et al.*, 1987).

MEULEN *et al.* (1978) afirmaram que a aderência das hemácias sensibilizadas aos macrófagos pode ser inibida *in vitro* por IgG em baixas concentrações, provavelmente porque a IgG livre pode reagir com os receptores da porção Fc existentes nos macrófagos. Contudo, ainda segundo estes autores, a inibição da aderência das hemácias aos macrófagos pode não ocorrer *in vivo* no baço, que é um órgão importante na destruição de hemácias sensibilizadas com anticorpos que não fixam complemento.

As razões para isso, de acordo com MEULEN *et al.* (1978), são:

1º) no baço ocorre uma hemoconcentração com elevação do hematócrito a 70 - 80% e, segundo LO BUGLIO, COTRAN, JANDL (1967), a inibição da aderência pela IgG livre pode ser suplantada por uma elevação na concentração de hemácias sensibilizadas;

2º) é possível que os macrófagos no baço sejam mais ativos na ligação com as hemácias sensibilizadas do que os monócitos do sangue periférico.

Outro aspecto que deve ser considerado no estudo dos anticorpos relacionados com a DHRN do sistema ABO é a existência de diferenças hereditárias nas imunoglobulinas, os chamados alótipos, marcadores alotípicos, marcadores genéticos ou determinantes genéticos.

Em estudos realizados em indivíduos caucasóides, verificou-se que, apesar de o nível total de IgG ser aparentemente constante em relação aos fenótipos de Gm (marcadores Gm encontrados em cadeias pesadas, H, de IgG), os níveis das subclasses parecem estar relacionados com o tipo Gm do indivíduo; assim, por exemplo, os níveis de IgG3 são pelo menos duas vezes mais elevados nos indivíduos homozigotos para G3m (b) do que nos indivíduos homozigotos para G3m(g) (SCHANFIELD, 1980).

As propriedades biológicas das imunoglobulinas diferem segundo as subclasses e os diferentes determinantes alotípicos. Em relação ao alótipo e à porção Fc, no que se refere à destruição das hemácias sensibilizadas pelos macrófagos, estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que a ordem da atividade biológica é G3m(g) > G3m(b) > G1m(f) > G1m(a) (SCHANFIELD, 1980).

Pelo exposto, conclui-se que não só as subclasses de IgG, mas também os alótipos, devem ser considerados no estudo da DHRN do sistema ABO, visto que estes aspectos podem estar relacionados com a variabilidade da manifestação desta doença.

1.6. Relação entre os fenótipos do sistema secretor e a DHRN do sistema ABO

Segundo **VOAK (1969)**, há duas possíveis maneiras pelas quais o sistema secretor poderia estar relacionado com a DHRN do sistema ABO: como um fator de proteção ou como um estímulo antigênico para a produção de isoaglutininas anti-A e anti-B.

BOORMAN & DODD (1943) propuseram que os anticorpos anti-A e anti-B maternos não destruiriam as hemácias fetais porque eles seriam absorvidos pelas substâncias A e B hidrossolúveis presentes no plasma e fluidos corporais do feto. Como os indivíduos não-secretores não possuem as substâncias ABH na forma hidrossolúvel, os fetos não-secretores estariam sujeitos aos efeitos adversos dos anticorpos maternos, por não contar com este fator de proteção.

A capacidade de secretar as substâncias grupo-específicas está presente ao nascimento (**COOK, 1982**), contudo, tanto os recém-nascidos secretores quanto os não-secretores podem apresentar a substância grupo-específica no seu soro, ainda que a concentração nos não-secretores seja geralmente mais baixa (**HOSTRUP, 1963**).

Como somente os anticorpos do tipo IgG atravessam a barreira placentária e são resistentes à neutralização pelas substâncias grupo-específicas hidrossolúveis, a falha dos anticorpos imunes, em serem neutralizados *in vitro* por substâncias hidrossolúveis A ou B, pode indicar que o mesmo ocorra *in vivo* (**ZUELZER & COHEN, 1957**).

HALBRECHT (1944), por sua vez, sugeriu que as aglutininas anti-A e anti-B são agentes hemolíticos mais moderados do que as aglutininas anti-Rh, pelo fato de serem adsorvidas pelos antígenos teciduais.

Os indivíduos não-secretores bem como os secretores têm uma grande quantidade de substâncias grupo-específicas em suas células teciduais. Assim, segundo **ZUELZER & COHEN (1957)**, é provável que estas substâncias celulares tenham um papel mais importante do que as substâncias secretadas na neutralização ou fixação dos anticorpos. Além do mais, a placenta poderia desempenhar um papel importante adsorvendo os anticorpos maternos, uma vez que é, em parte, formada por tecidos fetais.

Como já comentado, a reação não exclusiva dos anticorpos anti-A e anti-B com as hemácias fetais poderia, por outro lado, provocar maior incidência de perda fetal precoce devido à reação dos anticorpos maternos com tecidos ou órgãos vitais do embrião ou feto (**LEVINE, 1943**).

Com o intuito de investigar uma possível associação entre a incidência de abortamentos, a incompatibilidade ABO e o sistema secretor, **Mc NEIL *et al.* (1957b)** estudaram 47 casais com história de abortamento espontâneo e 23 casais sem história de abortamento. Verificaram que os casais sem história de abortamento eram geralmente compatíveis no sistema ABO e também se assemelhavam na capacidade de secretar os fatores A, B e H. Nenhum "secretor aberrante" foi encontrado neste grupo de casais. Por outro lado, havia um número elevado de casais incompatíveis no sistema ABO e de "secretores aberrantes" entre aqueles com história de abortamento espontâneo. A associação com abortamento espontâneo ocorreu tanto quando a mãe tanto quando o pai era secretor aberrante.

Outros estudos, discutidos a seguir, sugerem que o fenótipo secretor (e não o fenótipo não-secretor) pode estar relacionado com maior incidência da DHRN do sistema ABO.

SMITH (1945) observou um aumento do título da aglutinina materna correspondente ao grupo sanguíneo da criança durante as gestações incompatíveis no sistema ABO. Contudo, em cerca de 13% das gestações incompatíveis não houve aumento da isoaglutinina durante a gravidez. Ao verificar o fenótipo secretor de 18 recém-nascidos cujas mães tiveram aumento do título de anticorpo e de seis recém-nascidos cujas mães não mostraram alteração durante a gravidez, constatou que os recém-nascidos que produziram isoimunização materna eram secretores e aqueles que não causaram isoimunização eram não-secretores. Estes achados levaram-no a propor que a isoimunização no sistema ABO ocorreria pela passagem de substâncias grupo-específicas hidrossolúveis através da placenta durante a gravidez e não pelo "escape" de hemácias fetais para a circulação materna, o que dependeria da existência de alterações placentárias.

Num estudo semelhante, **ZUELZER & KAPLAN (1954a)** verificaram que as mães de recém-nascidos A_1 secretores mostraram uma significativa elevação do título de anti-A em salina, mas somente no período pós-parto. As mães dos recém-nascidos A_1 não-secretores não apresentaram alterações no título após o parto. Já os títulos de anticorpo das mães de recém-nascidos A_2 secretores mostraram alterações mínimas. No grupo de mães O e crianças B, a influência do fenótipo secretor foi comparável à do grupo de mães O com filhos A_1 . Considerando-se conjuntamente os pares mãe-filho O x A_1 e O x B, os títulos dos anticorpos maternos correspondentes aumentaram sensivelmente no período pós-parto em aproximadamente 25% das mães dos recém-nascidos secretores. Além

disso, no estudo de **ZUELZER & KAPLAN (1954a)** quando o recém-nascido era secretor, freqüentemente o soro materno tornava-se hemolítico no período pós-parto.

Como a condição de secretor do recém-nascido na maioria das vezes não levou a um aumento dos títulos dos anticorpos maternos, **ZUELZER & KAPLAN (1954a)** propuseram que a estimulação antigênica efetiva da mãe fosse um acontecimento mais eventual do que uma regra, mesmo na presença de um feto secretor. Além disso, os resultados indicaram que não houve estimulação para a produção de anticorpos durante a gestação (porque os títulos só se elevaram no período pós-parto), e sim durante o trabalho de parto. A elevação dos anticorpos pós-parto é compatível, segundo estes autores, com a hipótese de que os antígenos fetais alcançariam a circulação fetal por absorção no espaço retroplacentário durante a dequitação. O fato de que a elevação dos anticorpos estaria limitada às mães de recém-nascidos secretores indica que o estímulo antigênico, como proposto por **SMITH (1945)**, seria a absorção de substâncias grupo-específicas hidrossolúveis. Estas evidências sugeririam, ainda, que o antígeno eritrocitário é menos efetivo para estimular a produção de anticorpos anti-A ou anti-B.

A hipótese de isoimunização após o parto, e não durante a gravidez, é reforçada pelo fato de que as substâncias grupo-específicas, em alta concentração no líquido amniótico, têm alto peso molecular e não atravessam a barreira placentária (**VOAK, 1969**).

Há um excesso de múltiparas com gestações anteriores incompatíveis entre os casos de DHRN do sistema ABO (**VOAK & BOWLEY, 1969**). Contudo, a ocorrência de DHRN, tanto em primíparas quanto em múltiparas, fala a favor da origem tanto isoimune quanto heteroimune dos anticorpos do sistema ABO (**VOAK, 1969**).

Num estudo extensivo somente a recém-nascidos com suspeita de DHRN do sistema ABO, **ZUELZER & KAPLAN (1954b)** verificaram que, dentre 28 recém-nascidos cujo fenótipo secretor foi averiguado, três (10,71%) foram não-secretore. Mesmo o número de não-secretore no grupo estudado sendo menor do que a frequência esperada, a diferença não foi estatisticamente significativa. Estes autores concluíram que, até aquele momento, não existiam provas de que o fenótipo secretor influenciaria o efeito dos isoanticorpos imunes maternos sobre o recém-nascido.

Outros autores como **WIENER, WEXLER, HURST (1949); CRAWFORD *et al.* (1953); WIENER *et al.* (1960)** e **VOAK (1969)** também observaram um leve excesso de crianças e de pais secretore entre os casos de DHRN do sistema ABO. Já **GRUNDBACHER (1965a)** não encontrou diferenças nas frequências de recém-nascidos secretore e não-secretore entre 41 casos de DHRN do sistema ABO.

Para **KOCHWA *et al.* (1961)**, o excesso de recém-nascidos secretore entre os casos de DHRN do sistema ABO pode refletir ou uma susceptibilidade dos recém-nascidos secretore, ou uma resistência dos não-secretore à DHRN, ou mesmo perda intra-uterina dos fetos não-secretore. Uma vez encontradas substâncias grupo-específicas tanto em secretore quanto em não-secretore, segundo estes autores devem existir diferenças quantitativas e/ou qualitativas entre elas explicando estes achados.

Entretanto, a relação entre o sistema secretor e os níveis de isoanticorpos maternos pode ser analisada de outra maneira. Ao contrário de **SMITH (1945)** e **ZUELZER & KAPLAN (1954a)**, **GRUNDBACHER (1968)** não observou relação do nível de anticorpo materno com o fenótipo do sistema secretor

do recém-nascido. Contudo, num estudo posterior, **GRUNDBACHER & SHREFFLER (1970)** demonstraram evidências de uma associação entre o sistema secretor do indivíduo e o seu nível de isoanticorpos e de imunoglobulinas IgG. Estes autores verificaram que os níveis de isoaglutinina anti-B e de IgG, por exemplo, são mais baixos nos indivíduos não-secretores.

Supondo que isso seja verdadeiro, o nível de anticorpo materno anti-A ou anti-B poderia estar associado com o fenótipo do sistema secretor da mãe e não do recém-nascido.

Tendo em vista o que foi exposto, a DHRN do sistema ABO, até o momento, não pode ser prevenida. Entretanto, há fatores a ela relacionados que podem discriminar os grupos de recém-nascidos com maior risco de desenvolver esta doença.

Como os critérios para os diagnósticos da DHRN do sistema ABO são de difícil definição, por não haver sinais patognomônicos, o que dificulta a identificação principalmente dos casos leves da doença, optamos por verificar a relação da incompatibilidade ABO com a incidência da icterícia neonatal, que é um sinal de mais fácil identificação.

Além disso, através de estudos caso-controle, comparamos dados maternos e neonatais relacionados à manifestação da icterícia neonatal nos casos de incompatibilidade ABO.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Verificar a relação da incompatibilidade ABO com a incidência da icterícia neonatal e a importância da força antigênica das hemácias fetais, do título de anticorpos imunes anti-A e anti-B na circulação materna e fetal, e a frequência dos fenótipos do sistema secretor na ocorrência de icterícia neonatal nos casos de incompatibilidade ABO.

2.2. Específicos

2.2.1. Verificar a frequência gênica do sistema ABO no grupo de mães e seus recém-nascidos;

2.2.2. Verificar a incidência de icterícia neonatal entre recém-nascidos incompatíveis com a mãe no sistema ABO, excluindo-se os casos de deficiência de G6PD e de incompatibilidade no sistema Rh;

2.2.3. Comparar a frequência esperada de recém-nascidos incompatíveis com a mãe no sistema ABO e a frequência observada;

2.2.4. Verificar a frequência de icterícia neonatal entre os recém-nascidos com e sem incompatibilidade ABO, de acordo com a hora de vida de detecção da icterícia;

2.2.5. Comparar os dados maternos (paridade e abortos anteriores, filhos anteriores com icterícia neonatal, transfusões sangüíneas anteriores,

vacinações recentes, cor da pele materna), razão de sexo do recém-nascido, peso ao nascer, idade gestacional, resultado do teste de COOMBS direto e eluição entre os seguintes grupos de recém-nascidos: com incompatibilidade ABO e com icterícia neonatal; com incompatibilidade ABO e sem icterícia neonatal; e sem incompatibilidade ABO (recém-nascidos do grupo O, filhos de mães do mesmo grupo);

2.2.6. Verificar a força antigênica das hemácias fetais e sua relação com o aparecimento de icterícia neonatal nos casos de incompatibilidade ABO;

2.2.7. Verificar o título de anticorpos imunes anti-A e anti-B na circulação materna e fetal e sua relação com o aparecimento de icterícia neonatal nos casos de incompatibilidade ABO;

2.2.8. Verificar a frequência dos fenótipos do sistema secretor e sua relação com a presença de icterícia neonatal nos casos de incompatibilidade ABO.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

A amostra foi constituída por pares mãe-filho que foram estudados pela seqüência de entrada no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher - Universidade Estadual de Campinas, (CAISM - UNICAMP), durante um período de seis meses (16 de outubro de 1990 a 16 de abril de 1991).

Foram excluídas da amostra as mães e recém-nascidos sem tipagem sanguínea no sistema ABO, os recém-nascidos com menos de 20 semanas e/ou com peso inferior a 500g e os natimortos. No caso de partos gemelares, foi considerado apenas um dos recém-nascidos escolhido por sorteio.

Nessa amostra foram analisadas as freqüências gênicas do sistema ABO das mães e seus recém-nascidos, a incidência de icterícia neonatal entre os recém-nascidos incompatíveis com a mãe no sistema ABO, excluindo-se os casos de deficiência de G6PD e de incompatibilidade Rh, a freqüência observada e esperada de recém-nascidos incompatíveis com a mãe no sistema ABO e a freqüência de icterícia neonatal de acordo com a hora de vida em que foi observada.

A partir dessa amostra foram selecionados um grupo de estudo e dois grupos-controles (controle I e controle II). *O grupo de estudo* foi composto por pares mãe-filho O x A ou O x B, onde os recém-nascidos desenvolveram icterícia neonatal durante o período de internação. *O grupo-controle I* foi formado por pares mãe-filho O x A e O x B, onde o recém-nascido não desenvolveu icterícia no período em que ficou internado. *O grupo-controle II* foi constituído por pares mãe-filho O x O sem levar em conta o desenvolvimento de icterícia.

O recém-nascido integrante dos grupos de estudo e controles deveria preencher as seguintes condições: ser nascido a termo, ter peso adequado para a idade gestacional (AIG), não ter incompatibilidade com a mãe no sistema Rh, ter pesquisa de anticorpos negativa no soro materno, não ter deficiência de G6PD, não ter desenvolvido infecção no período perinatal e neonatal.

A idade gestacional foi determinada, conforme rotina do Serviço de Neonatologia, pela equipe médica, através do método de **CAPURRO, KONICHEZKY, FONSECA, CALDEYRO-BARCIA (1978)**. A idade gestacional foi expressa em dias, a fim facilitar os cálculos estatísticos. A adequação do peso para a idade gestacional foi verificada pela equipe médica, com base no gráfico de **LUBCHENCO, SEARLS, BRAZIE (1972)**.

Foram excluídos os pares mãe-filho nos casos de: alta hospitalar antes da entrevista com a mãe; recusa materna em participar da pesquisa; e coagulação ou quantidade insuficiente de sangue de cordão ou de saliva para análise. Foi necessário limitar a coleta diária de sangue e saliva, colhendo amostras de até três pares mãe-filho devido à necessidade de neutralização da saliva no prazo máximo de uma hora; realização da pesquisa de anticorpos no soro materno no mesmo dia da coleta; realização imediata da dosagem de bilirrubina dos recém-nascidos ictericos; dificuldade e tempo prolongado de coleta das amostras de sangue e de saliva dos recém-nascidos.

O estudo comparativo entre os grupos de estudo e controles teve como objetivo comparar os dados maternos e neonatais (paridade e abortos anteriores, filhos anteriores com icterícia neonatal, transfusões sangüíneas anteriores, vacinações recentes, cor da pele materna, razão de sexo, peso ao nascer, idade gestacional, resultado do teste de COOMBS direto e eluição), a força antigênica das

hemácias fetais, o título dos anticorpos imunes anti-A e/ou anti-B e a frequência dos fenótipos do sistema secretor.

Quanto à coleta de dados, foi realizada consulta ao livro de registro de procedimentos do Centro Obstétrico, onde diariamente são registrados o nome das mães e o sexo dos recém-nascidos.

A tipagem sanguínea das mães foi extraída da ficha obstétrica ou do livro de registro do Laboratório de Imunoematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia (HEMOCENTRO) da UNICAMP.

A cor da pele materna foi obtida através dos dados do prontuário, ou através de inspeção quando a mãe fazia parte dos grupos de estudo ou controles. Foram eliminados os casos onde os dados maternos e do recém-nascido eram incongruentes (por exemplo, mãe "não-branca" e filho "branco"). Nos casos onde não havia registro da cor materna, mas o recém-nascido havia sido identificado como "branco" pela equipe médica, as mães foram consideradas "brancas". Os dois únicos casos em que constava da ficha neonatal que o recém-nascido era da cor "amarela" foram eliminados.

Não foi possível obter a cor do recém-nascido, uma vez que é rotina do Serviço de Neonatologia classificar o recém-nascido como "branco", "não-branco" ou "amarelo", de acordo com a cor materna.

A ocorrência de icterícia neonatal no período de internação foi obtida através do prontuário médico. Nos grupos de estudo e controle I, a observação da icterícia foi feita pela autora e confirmada por um membro da equipe médica ou pelo registro na ficha de evolução do prontuário médico.

Quanto aos grupos de estudo e controle, após o parto, as mães que compunham os grupos eram entrevistadas, solicitando-se a sua autorização por escrito para a realização da pesquisa (**ANEXO 1**). A seguir, era preenchido um formulário (**ANEXO 2**) onde constavam os seguintes dados: cor da pele da mãe; história obstétrica materna; transfusões sangüíneas anteriores; vacinações recentes; infecções maternas no período pré-natal; infecção fetal no período perinatal; sexo; peso e idade gestacional do recém-nascido. Vale salientar que não foi indagado à mãe sobre a evolução neonatal de cada filho anterior, mas apenas se a mãe havia ou não tido filhos com icterícia neonatal, e sobre o tratamento a que foram submetidos.

Para os testes laboratoriais, foram colhidos cerca de 10ml de sangue do cordão umbilical de todos os recém-nascidos por punção da veia umbilical com seringa e agulha, logo após a dequitação. As amostras de sangue foram divididas em dois frascos, com solução anticoagulante de citrato ácido e dextrose (ACD) na proporção de 1:3ml de sangue. Em alguns casos foi utilizada uma mesma amostra de 5ml na realização de todos os exames devido a dificuldades técnicas de coleta.

As mães que compuseram os grupos de estudo e controles foram submetidas a uma coleta de 8 a 10ml de sangue periférico em tubo seco sem anticoagulante e 3ml em frasco com solução anticoagulante (ACD).

Foram colhidas amostras de saliva das mães (1 a 5ml) e recém-nascidos (0,3 a 1ml) dos grupos de estudo e controles para investigação dos fenótipos do sistema secretor. Utilizou-se a técnica de aspiração para obtenção da saliva dos recém-nascidos (vide **FIGURA 1** e a técnica descrita no **ANEXO 3**).

Nos recém-nascidos do grupo de estudo foram realizados ainda o microematócrito e a dosagem de bilirrubina total, após a detecção da icterícia, pela autora ou pela equipe médica da Divisão de Neonatologia do CAISM, utilizando-se,

para tanto, amostras de sangue capilar obtido por punção de calcanhar do recém-nascido, colhido em três tubos capilares heparinizados. A análise das amostras foi realizada num bilirrubinômetro (AO UNISTAT - AMERICAN OPTICAL). A descrição da técnica consta do **ANEXO 4**.

Em uma das amostras de sangue do cordão foi realizada a investigação da deficiência de G6PD através do método de redução da metemoglobina (**BREWER, TARLOV, ALVING, 1960**). Nos casos positivos ou quando a amostra de sangue era muito pequena, foi realizado o ensaio enzimático quantitativo (**BEUTLER, 1975**). A descrição das técnicas são apresentadas no **ANEXO 5**. Consideraram-se deficientes em G6PD os recém-nascidos com níveis abaixo de 10,0UI/g Hb no ensaio enzimático quantitativo. Os casos falsamente positivos na triagem inicial pelo método de redução da metemoglobina não foram considerados deficientes em G6PD.

Os exames para investigação da deficiência de G6PD foram realizados pelo Laboratório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP.

A equipe do Laboratório de Imunoematologia do HEMOCENTRO da UNICAMP realizou os seguintes exames: determinação dos grupos sanguíneos do sistema ABO e Rh e teste de COOMBS direto de todos os recém-nascidos. Nos casos em que o teste de COOMBS direto era positivo, foi realizado, conforme a rotina, eluição do anticorpo aderido à hemácia, determinação da tipagem sanguínea materna e pesquisa de anticorpos no soro materno. As técnicas estão descritas nos **ANEXOS 6, 7 e 8**.

A determinação dos grupos sanguíneos do sistema ABO e Rh e a pesquisa de anticorpos no soro materno das mães integrantes dos grupos de estudo e

controles, a força antigênica das hemácias fetais, a titulação dos anticorpos maternos imunes no soro materno e plasma fetal e a determinação dos fenótipos do sistema secretor foram realizados pela autora deste trabalho no Laboratório de Imunoematologia do HEMOCENTRO da UNICAMP (de acordo com as técnicas descritas nos ANEXOS 3, 6, 8, 9 e 10).

Para a verificação da força antigênica das hemácias fetais, titulação dos anticorpos imunes no soro materno e plasma fetal e determinação dos fenótipos do sistema secretor foram utilizados os mesmos lotes de anti-soros e hemácias-padrões (A₁, A₂, B e O) conservados sob congelamento a -20°C em glicerol (ver técnica descrita no ANEXO 11). Em todos os procedimentos foi utilizada salina com pH=7 testada com tira reagente (Universalindikator - MERCK).

Os anti-soros anti-A, anti-B e soro de COOMBS foram produzidos pela BIOTEST S/A. O soro anti-H foi preparado pelo Laboratório de Imunoematologia do HEMOCENTRO a partir de sementes de *Ulex europaeus*.

Os anti-soros utilizados apresentaram os seguintes títulos e escores, determinados pelo Setor de Controle de Qualidade do Laboratório de Imunoematologia do HEMOCENTRO:

anti-soro anti-A: título: 1:64 escore: 48
anti-soro anti-B: título: 1:512 escore: 67
anti-soro anti-H: título: 1:32 escore: 43/46
soro de COOMBS: título: 1:64 escore: 36

As hemácias A₁ negativo foram obtidas de três doadores em diferentes momentos. As hemácias A₂, B e O provinham de um único doador. A força antigênica das hemácias-padrões foi testada semanalmente, mantendo-se o mesmo escore durante o período em que foram realizados os testes laboratoriais.

A força antigênica das hemácias-padrões foi verificada através da técnica descrita no **ANEXO 9**. Foram selecionadas as hemácias com os seguintes escores, determinados segundo a classificação das reações de aglutinação das hemácias da **TABELA 3** (adaptação de **MARSH, 1972**) e **FIGURA 2** (**ANEXO 6**):

hemácia A₁-: escore 44/45

hemácia A₂+: escore 27

hemácia B- : escore 45

hemácia O- : escore 36

TABELA 3 - Classificação das reações de aglutinação das hemácias

REAÇÃO	ESCORE
S (grumo sólido)	12
++++	12
+++	10
++	8
+	5
±/ pó	2
O (negativa)	0

Quanto à análise dos dados, as freqüências dos genes do sistema ABO foram calculadas pelas fórmulas de BERNSTEIN (**apud BEIGUELMAN, 1981, 1983**), sendo p , q e r as freqüências dos alelos A , B e O , respectivamente, e p' , q' e r' as estimativas preliminares das freqüências destes mesmos genes, nesta ordem.

$\bar{A}$, $\bar{B}$ e $\bar{O}$ = frequência fenotípica dos grupos sanguíneos A, B e O

$$p' = 1 - \sqrt{\bar{B} + \bar{O}}$$

$$q' = 1 - \sqrt{\bar{A} + \bar{O}}$$

$$r' = \sqrt{\bar{O}}$$

Depois de calcular o desvio (D) entre a unidade e a soma das estimativas preliminares, isto é, $D = 1 - (p' + q' + r')$, as estimativas corrigidas foram obtidas por intermédio de:

$$p = p' \left(1 + \frac{D}{2} \right)$$

$$q = q' \left(1 + \frac{D}{2} \right)$$

$$r = (r' + \frac{D}{2}) \left(1 + \frac{D}{2} \right) \text{ ou } r = 1 - (p + q)$$

Antes de corrigir as estimativas preliminares, foi investigado se as amostras provinham de uma população em equilíbrio de **HARDY & WEINBERG**, através de um teste de Qui-Quadrado (χ^2), que verificou se o desvio D poderia ser considerado como diferindo significativamente de zero. Foi utilizada a seguinte fórmula:

onde, n = tamanho amostral

$$\chi^2_{(1)} = 2n \left(1 + \frac{r'}{p'q'} \right) D^2$$

As mães foram discriminadas segundo a cor da pele em "brancas" e "não-brancas" e os recém-nascidos, em filhos de mães "brancas" e filhos de mães "não-brancas" para o cálculo das frequências gênicas e verificação do equilíbrio de **HARDY & WEINBERG**.

Foram comparadas as frequências de pares mãe-filho observadas com as esperadas através do teste χ^2 .

As frequências gênicas das amostras de mães "brancas" e "não-brancas" foram comparadas com as frequências gênicas de seus respectivos filhos através do método de círculos equivalentes de STEVENS (**apud BEIGUELMAN, 1981**). Foram construídos os círculos equivalentes de 80% e de 95% de probabilidade.

Entre os recém-nascidos, a análise das frequências do sistema ABO foi realizada, ainda, subdividindo-se o grupo de recém-nascidos em ictericos e não-ictericos, sendo verificado se estes subgrupos encontravam-se em equilíbrio de **HARDY & WEINBERG**.

Foi comparada, através do teste χ^2 , a incidência de icterícia entre os recém-nascidos normais e deficientes em G6PD, eliminando-se os casos de incompatibilidade Rh e ABO. O mesmo foi feito entre os recém-nascidos incompatíveis com a mãe no sistema Rh, eliminando-se os casos de deficiência de G6PD e de incompatibilidade ABO.

A seguir, foram eliminados, para as análises, os casos de recém-nascidos com deficiência de G6PD e de incompatibilidade Rh. Verificou-se a incidência de icterícia entre os recém-nascidos incompatíveis com a mãe no sistema ABO e se comparou, através do teste χ^2 , a incidência de icterícia neonatal entre os grupos com e sem incompatibilidade ABO, tanto levando-se em conta todos os pares incompatíveis quanto considerando-se apenas os pares O x A e O x B.

As frequências esperadas de recém-nascidos (RN) incompatíveis com a mãe no sistema ABO foram calculadas a partir das frequências maternas p , q e r . Para os cálculos foram utilizadas as seguintes fórmulas, propostas por **NORATO, MAGNA, BEIGUELMAN** (dados não publicados):

$$\text{RN incompatíveis, filhos de mãe O: } (p + q) r^2$$

RN incompatíveis, filhos de mãe A: $p^2q + 2pqr$

RN incompatíveis, filhos de mãe B: $pq^2 + 2pqr$

Total de RN incompatíveis: $pr^2 + qr^2 + p^2q + pq^2 + 4pqr$

Nestas análises os recém-nascidos foram discriminados segundo a cor da pele materna em filhos de mães "brancas" e filhos de mães "não-brancas". Fez-se a comparação das frequências esperadas com as frequências observadas através do teste χ^2 . A análise foi feita primeiramente com o grupo total de recém-nascidos incompatíveis no sistema ABO. A seguir, fez-se a mesma análise discriminando-se o grupo de recém-nascidos em ictericos e não-ictericos.

Verificou-se a frequência de icterícia entre os recém-nascidos de acordo com a hora de sua vida de sua detecção registrada nos prontuários médicos, tendo sido definidos os seguintes intervalos de tempo: menos ou igual a 24 horas, mais de 24 e menos ou igual a 48 horas e mais de 48 horas. A comparação entre os grupos compatível e incompatível no sistema ABO foi feita através do teste χ^2 .

Para a análise dos dados do grupo de estudo e controles I e II, a comparação de proporções foi feita com o emprego do teste χ^2 e, quando necessário, através do Teste Exato de FISHER. Para a análise dos dados quantitativos, empregou-se correlação, análise de variância ou, quando indicado, distribuição não-normal ou heterogeneidade das variâncias, os testes não-paramétricos de WILCOXON e KRUSKAL-WALLIS.

As referências bibliográficas foram apresentadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1989).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Frequências gênicas do sistema ABO e incidência de icterícia neonatal

Durante o período de estudo ocorreram 1.449 partos, sendo que, em 1.235 pares mãe-filho, foi possível obter a tipagem sanguínea. Destes, 16 partos foram gemelares (duplos). Após seleção, por sorteio, de um dos gêmeos, a amostra ficou constituída de 1.219 pares mãe-filho.

Foi possível verificar, através dos dados do prontuário, a cor da pele de 1.054 mães. Discriminando-se as mães em "brancas" e "não-brancas", observou-se que se encontravam em equilíbrio de HARDY & WEINBERG quanto às frequências dos genes *A*, *B* e *O* ($\chi^2_{(1)}=1,951$; $0,10 < P < 0,20$ e $\chi^2_{(1)}=0,061$; $0,80 < P < 0,90$, respectivamente) (TABELA 6).

TABELA 6 - Distribuição das 931 mães "brancas" e 123 mães "não-brancas" segundo os grupos sanguíneos do sistema ABO e frequências corrigidas *p*, *q* e *r* dos genes *A*, *B* e *O*

GRUPOS SANGÜÍNEOS	MÃES		FREQUÊNCIAS GÊNICAS	MÃES	
	BRANCAS No. (%)	NÃO-BRANCAS No. (%)		BRANCAS	NÃO-BRANCAS
A	361 (38,8)	29 (23,6)	p	0,238	0,140
B	113 (12,1)	20 (16,3)	q	0,079	0,098
AB	28 (3,0)	3 (2,4)	r	0,683	0,762
O	429 (46,1)	71 (57,7)	$\chi^2_{(1)}$	1,951 ^{NS}	0,061 ^{NS}

NS = não significativo; $P > 0,05$

Os recém-nascidos filhos de mães "brancas" e "não-brancas" também se encontravam em equilíbrio de HARDY & WEINBERG ($\chi^2_{(1)}=2,696$; $0,10 < p < 0,20$ e $\chi^2_{(1)}=3,052$; $0,05 < p < 0,10$, nesta ordem) (TABELA 7).

TABELA 7 - Distribuição dos 931 recém-nascidos (RN) filhos de mães "brancas" e 123 recém-nascidos filhos de mães "não-brancas" segundo os grupos sanguíneos do sistema ABO e frequências corrigidas p , q , e r dos genes A , B e O

GRUPOS SANGÜÍNEOS	FILHOS DE MÃES		FREQUÊNCIAS GÊNICAS	FILHOS DE MÃES	
	BRANCAS No. (%)	NÃO-BRANCAS No. (%)		BRANCAS	NÃO-BRANCAS
A	375 (40,3)	43 (35,0)	p	0,250	0,243
B	120 (12,9)	15 (12,2)	q	0,085	0,106
AB	31 (3,3)	10 (8,1)	r	0,665	0,651
O	405 (43,5)	55 (44,7)	$\chi^2_{(1)}$	2,696 ^{NS}	3,052 ^{NS}

NS = não significativo; $P > 0,05$

A análise dos pares mães-filhos do grupo de mães "brancas" mostrou um excesso de pares A x A e B x B e uma falta de pares A x O e B x O, conforme demonstrado na TABELA 8.

TABELA 8 - Frequências observadas e esperadas de pares mãe-filho de acordo com o grupo sanguíneo do sistema ABO

GRUPO SANGÜÍNEO DAS MÃES	GRUPO SANGÜÍNEO DOS FILHOS								TOTAL	$\chi^2_{(1)}$
	A		B		AB		O			
A	245	(227,4)	14	(12,2)	14	(16,4)	88	(105,0)	361	4,731*
B	9	(12,7)	62	(49,6)	12	(14,2)	30	(36,5)	113	5,676*
AB	13	(12,9)	10	(10,7)	5	(4,4)	-	-	28	0,128 ^{NS}
O	108	(101,9)	34	(33,9)	-	-	287	(293,2)	429	0,497 ^{NS}
TOTAL	375		120		31		404		931	

NS= não significativo; $P > 0,05$ / * $P < 0,05$

Obs: Entre parênteses foram assinalados os valores esperados

Não foi possível analisar os pares mãe-filho do grupo de mães "não-brancas" devido ao pequeno tamanho amostral. Os dados são apresentados na **TABELA 9**.

TABELA 9 - Distribuição de pares mãe-filho do grupo de mães "não-brancas" conforme o grupo sanguíneo do sistema ABO

GRUPO SANGÜÍNEO DAS MÃES	GRUPO SANGÜÍNEO DOS FILHOS				TOTAL
	A	B	AB	O	
A	19	0	3	7	29
B	3	7	5	5	20
AB	0	1	2	-	3
O	21	7	-	43	71
TOTAL	43	15	10	55	123

A comparação das frequências gênicas do sistema ABO entre as mães "brancas" e seus filhos e entre as mães "não-brancas" e seus filhos pelo método dos círculos equivalentes de STEVENS (apud BEIGUELMAN, 1981) é demonstrada nas **FIGURAS 3,4,5 e 6**. Os elementos para a construção dos círculos equivalentes de 80% e 95% de probabilidade são apresentados na **TABELA 10**.

TABELA 10 - Elementos para a construção dos círculos equivalentes de 80% e 95% de probabilidade (STEVENSON apud BEIGUELMAN, 1981) dos grupos de mães "brancas" e "não-brancas" e de seus respectivos filhos

COR	GRUPO	$\sqrt{p}$	$\sqrt{q}$	$\sqrt{n}$	RAIO (80%)	RAIO (95%)
BRANCAS	MÃES	0,487	0,281	30,512	0,020	0,027
	FILHOS	0,500	0,292	30,512	0,020	0,027
NÃO-BRANCAS	MÃES	0,374	0,314	11,091	0,055	0,075
	FILHOS	0,493	0,326	11,091	0,054	0,074

(p =frequência do gene A ; q = frequência do gene B ; n = tamanho da amostra)

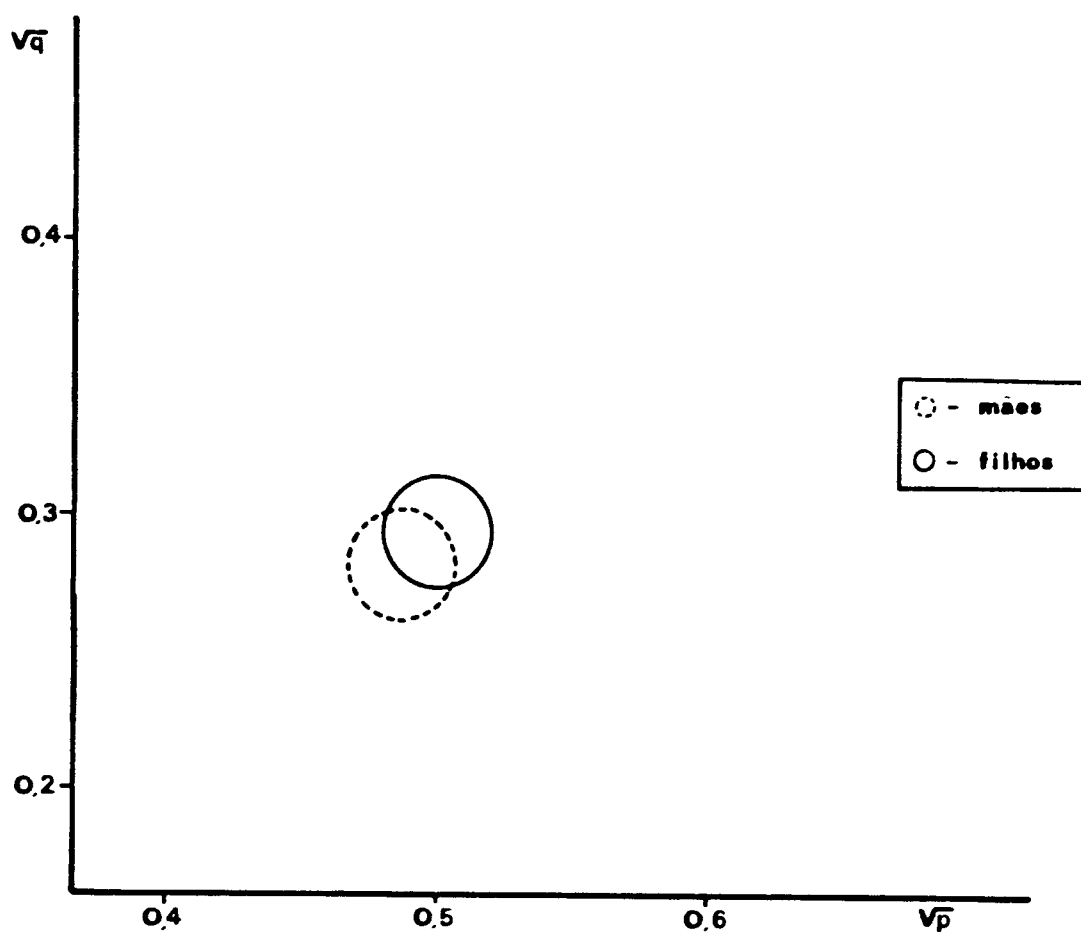


FIGURA 3 - Círculos equivalentes de 80% de probabilidade da amostra de mães "brancas" e de seus filhos. Os elementos para construção dos círculos equivalentes são apresentados na TABELA 10

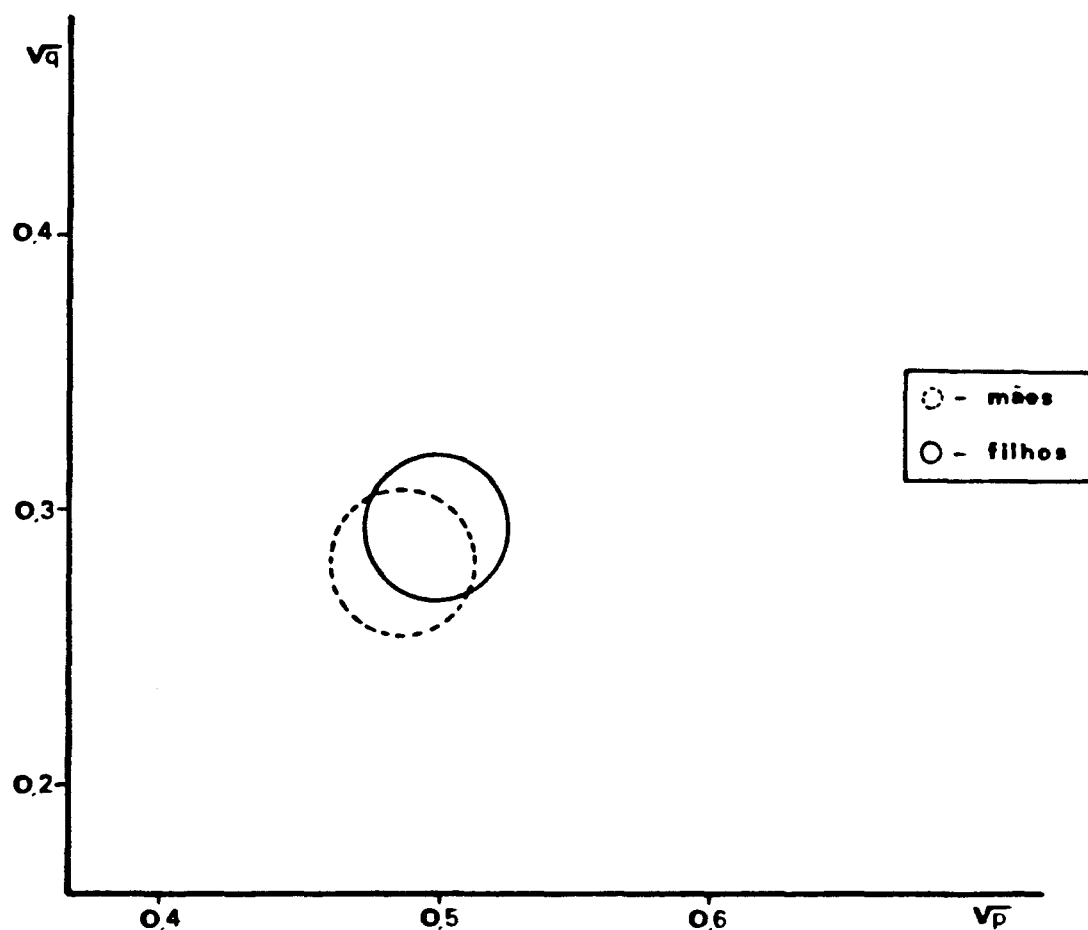


FIGURA 4 - Círculos equivalentes de 95% de probabilidade da amostra de mães "brancas" e de seus filhos. Os elementos para construção dos círculos equivalentes são apresentados na TABELA 10.

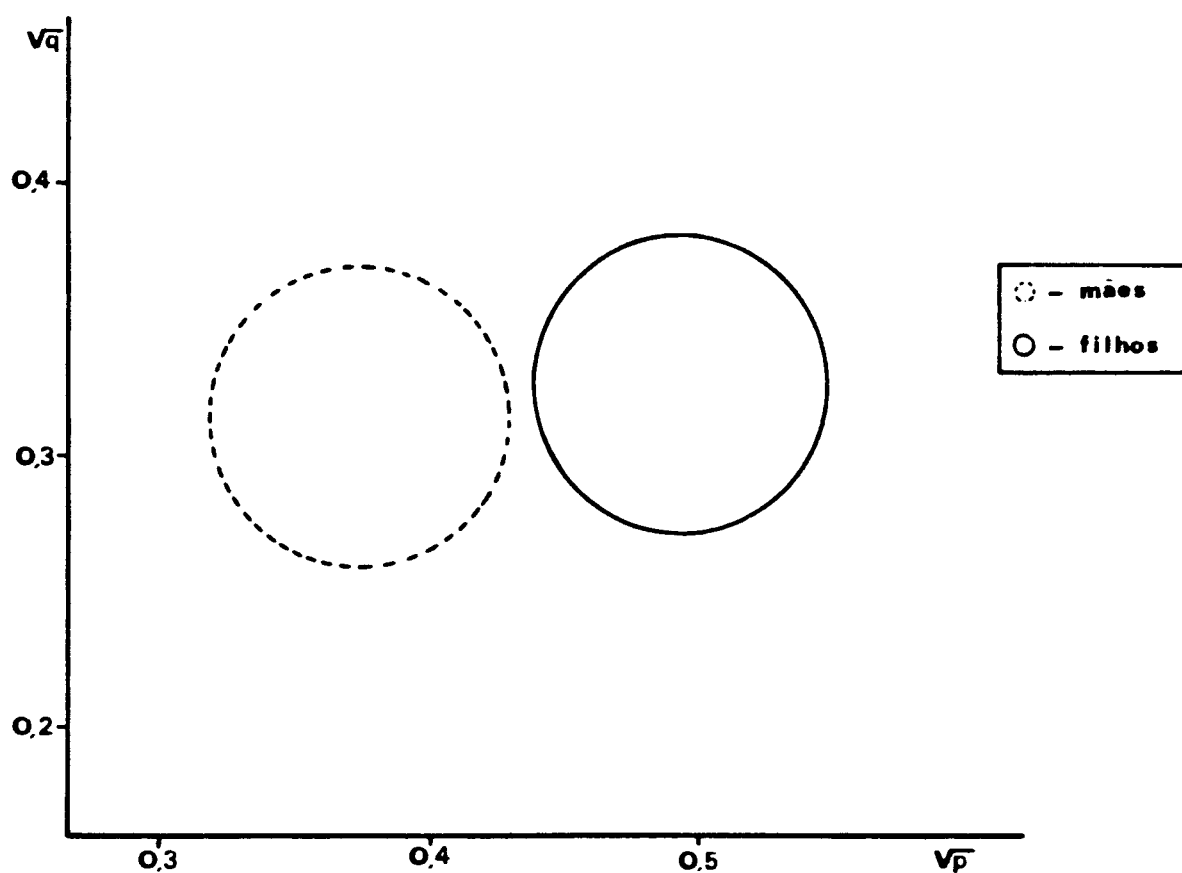


FIGURA 5 - Círculos equivalentes de 80% de probabilidade da amostra de mães "não-brancas" e de seus filhos. Os elementos para construção dos círculos equivalentes são apresentados na TABELA 10.

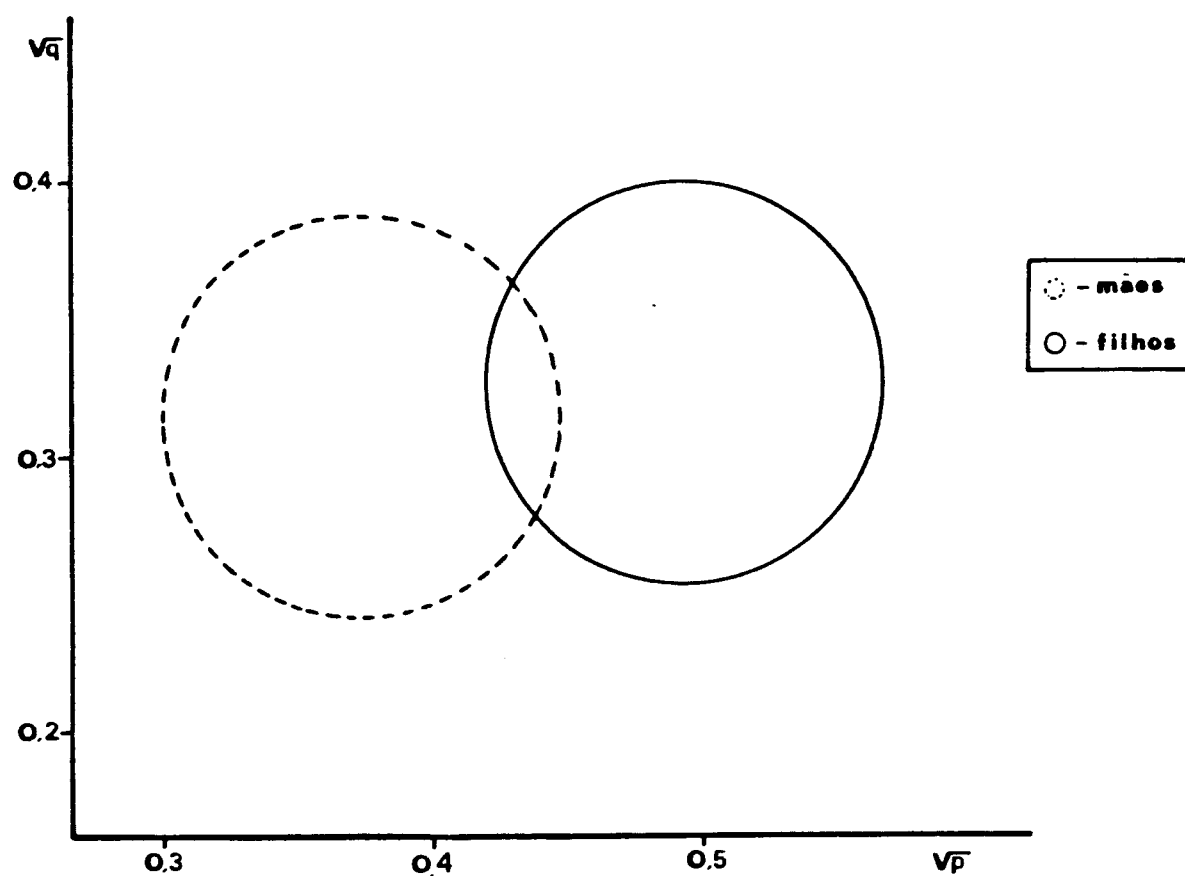


FIGURA 6 - Círculos equivalentes de 95% de probabilidade da amostra de mães "não brancas" e de seus filhos. Os elementos para construção dos círculos equivalentes são apresentados na TABELA 10.

A análise das figuras 3 e 4 permitem concluir que as frequências gênicas do sistema ABO das mães "brancas" e dos seus filhos não diferem entre si, tanto considerando-se os círculos equivalentes de 80% de probabilidade quanto os círculos de 95% de probabilidade.

O mesmo não é observado entre as mães "não-brancas" e seus filhos. Analisando-se a **FIGURA 5**, onde foram utilizados os círculos de 80% de probabilidade, mais adequados quando o tamanho amostral é pequeno, a não intersecção dos círculos, demonstra que as frequências gênicas dos filhos diferem das frequências gênicas maternas.

Discriminando-se os recém-nascidos segundo a cor da pele materna e o aparecimento ou não de icterícia durante o período de internação, observou-se que o grupo de recém-nascidos icterícos filhos de mães "brancas" e os recém-nascidos não-icterícos filhos de mães "não-brancas" não se encontravam em equilíbrio de HARDY & WEINBERG ($\chi^2_{(1)} = 4,288$; $P < 0,05$ e $\chi^2_{(1)} = 6,521$; $P < 0,02$, respectivamente) (**TABELAS 11 e 12**)

TABELA 11 - Distribuição dos 918 recém-nascidos (RN) filhos de mães "brancas" e 122 recém-nascidos filhos de mães "não-brancas" classificados como icterícos e não-icterícos conforme a detecção ou não de icterícia durante o período de internação

GRUPOS SANGÜÍNEOS	MÃES BRANCAS		MÃES NÃO-BRANCAS	
	RN ICTÉRICOS No. (%)	RN NÃO-ICTÉRICOS No. (%)	RN ICTÉRICOS No. (%)	RN NÃO-ICTÉRICOS No. (%)
A	177 (45,5)	191 (36,1)	24 (44,4)	18 (26,5)
B	50 (12,9)	67 (12,7)	7 (13,0)	8 (11,7)
AB	11 (2,8)	20 (3,8)	3 (5,6)	7 (10,3)
O	151 (38,8)	251 (47,4)	20 (37,0)	35 (51,5)

TABELA 12 - Frequências corrigidas *p*, *q* e *r* dos genes *A*, *B* e *O* dos 918 recém-nascidos (RN) filhos de mães "brancas" e 122 recém-nascidos filhos de mães "não-brancas" classificados como ictericos e não-ictericos conforme a detecção ou não de icterícia durante o período de internação

FREQUÊNCIAS GÊNICAS	MÃES BRANCAS		MÃES NÃO-BRANCAS	
	RN ICTÉRICOS	RN NÃO-ICTÉRICOS	RN ICTÉRICOS	RN NÃO-ICTÉRICOS
<i>p</i>	0,283	0,225	0,293	0,201
<i>q</i>	0,082	0,086	0,097	0,115
<i>r</i>	0,635	0,689	0,610	0,684
$\chi^2_{(1)}$	4,288*	0,019 ^{NS}	0,003 ^{NS}	6,521**

NS = não significativo; $P > 0,05$ / * $P < 0,05$ / ** $P < 0,02$

Dos 835 casos onde foi feita a investigação da deficiência de G6PD, eliminaram-se seis casos duvidosos (teste de redução da metemoglobina positivo, mas sem realização do ensaio enzimático quantitativo para confirmação do diagnóstico). Assim, dentre os 829 recém-nascidos da amostra 29(3,5%) apresentaram deficiência de G6PD.

Quanto à cor da pele da mãe e sexo dos recém-nascidos com deficiência de G6PD 12 eram filhos de mães "brancas" e 15 filhos de mães "não-brancas" (em dois casos não havia registro da cor da pele nos prontuários) (TABELA 13); 14 eram do sexo masculino e 14 do sexo feminino (em um caso não havia registro do sexo do recém-nascido) (TABELA 13).

De acordo com a TABELA 13, o valor médio da quantificação de G6PD foi 0,75 (DP=0,54) entre os recém-nascidos do sexo masculino e 4,42 (DP=2,66) entre os recém-nascidos do sexo feminino.

TABELA 13 - Valores da quantificação de G6PD entre os recém-nascidos deficientes classificados segundo o sexo e a cor da pele da mãe

CASO No.	COR	SEXO	G6PD (UI/gHb)
1	Branca	F	2,75
2	Branca	F	4,00
3	Branca	F	6,10
4	Branca	M	0,20
5	Não-branca	F	7,20
6	Branca	F	6,60
7	Não-branca	F	0,70
8	Não-branca	M	0,70
9	-	-	1,90
10	Não-branca	F	8,40
11	Branca	F	4,20
12	Não-branca	F	3,10
13	Não-branca	M	0,15
14	Não-branca	F	4,60
15	Branca	F	5,50
16	Não-branca	M	0,48
17	Não-branca	M	0,33
18	Branca	M	0,98
19	Não-branca	M	0,60
20	Não-branca	M	1,66
21	-	F	0,57
22	Não-branca	M	0,47
23	Não-branca	M	2,00
24	Branca	F	7,70
25	Não-branca	M	1,00
26	Branca	F	0,45
27	Não-branca	M	0,30
28	Branca	M	0,99
29	Branca	M	0,70

Eliminando-se os casos de incompatibilidade no sistema ABO e/ou Rh (incluindo um caso não confirmado de incompatibilidade pelo fator rh' ou C), dentre 17 recém-nascidos deficientes de G6PD, oito (47,1%) desenvolveram icterícia neonatal. Comparando-se com o grupo de 582 recém-nascidos normais,

onde 219 (37,6%) apresentaram icterícia, a diferença não foi significativa ($\chi^2_{(1)}=0,624$; $0,30<P<0,50$) (TABELA 14).

TABELA 14 - Comparação da incidência de icterícia neonatal entre os recém-nascidos (RN) normais e deficientes de G6PD, eliminando-se os casos de incompatibilidade ABO e Rh

EVOLUÇÃO DO RN	G6PD		TOTAL No. (%)
	DEFICIENTE No. (%)	NORMAL No. (%)	
COM ICTERÍCIA	8 (47,1)	219 (37,6)	227 (37,9)
SEM ICTERÍCIA	9 (52,9)	363 (62,4)	372 (62,1)
TOTAL	17	582	599 (100,0)

$$\chi^2_{(1)} = 0,624; 0,30 < P < 0,50$$

Em relação à incompatibilidade no sistema Rh, dentre 1.214 pares mãe-filho onde a tipagem Rh era conhecida, 85(7,0%) eram incompatíveis quanto ao fator Rho (D). Em um caso, que não foi incluído, possivelmente havia incompatibilidade em relação ao fator rh'(C). Quanto à frequência de indivíduos Rho (D) negativo, 121(10,0%) mães e 125(10,3%) recém-nascidos eram Rho (D) negativo.

Considerando-se a incidência de icterícia neonatal, não houve diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{(1)}=0,0003$; $P>0,95$) quando foram comparados os grupos de recém-nascidos com e sem incompatibilidade quanto ao fator Rho (D), eliminando-se os casos de incompatibilidade ABO e de deficiência de G6PD (TABELA 15).

TABELA 15 - Comparação da incidência de icterícia entre os recém-nascidos (RN) com e sem incompatibilidade quanto ao fator Rho (D), eliminando-se os casos de incompatibilidade no sistema ABO e de deficiência de G6PD

EVOLUÇÃO DO RN	INCOMPATIBILIDADE Rho (D)		TOTAL No. (%)
	COM No. (%)	SEM No. (%)	
COM ICTERÍCIA	15 (37,5)	219 (37,6)	234 (37,6)
SEM ICTERÍCIA	25 (62,5)	263 (62,4)	388 (62,4)
TOTAL	40 (100,0)	582 (100,0)	622 (100,0)

$$\chi^2_{(1)} = 0,0003; P > 0,95$$

A partir da amostra de 835 recém-nascidos onde foi realizada a investigação da deficiência de G6PD, foram identificados 742 recém-nascidos sem deficiência de G6PD e sem incompatibilidade no sistema Rh. Destes, 160(21,6%) eram incompatíveis com a mãe no sistema ABO e 582 (78,4%) eram compatíveis.

Observou-se uma frequência significativamente mais elevada de recém-nascidos ictericos no grupo de pares mãe-filho incompatíveis em comparação com o grupo de pares compatíveis ($\chi^2_{(1)}=22,955$; $P < 0,001$) (TABELA 16).

Considerando-se isoladamente cada par mãe-filho incompatível, verificou-se que nos pares O x A e O x B a frequência de recém-nascidos ictericos era significativamente maior quando comparada à do grupo de pares compatíveis ($\chi^2_{(1)}=18,617$; $P < 0,001$ e $\chi^2_{(1)}=7,990$; $P < 0,01$, nos pares O x A e O x B, respectivamente). Os demais pares agrupados não diferiram do grupo de pares compatíveis quanto à frequência de recém-nascidos ictericos ($\chi^2_{(1)}=2,014$; $0,10 < p < 0,20$) (TABELA 16).

TABELA 16 - Frequência de recém-nascidos (RN) com e sem icterícia nos pares mãe-filho incompatíveis e compatíveis no sistema ABO, eliminando-se os casos de deficiência de G6PD e de incompatibilidade no sistema Rh

PAR MÃE-FILHO	RN COM ICTERÍCIA	RN SEM ICTERÍCIA	TOTAL
O x A	56	35	91
O x B	18	10	28
A x B	5	5	10
A x AB	4	5	9
B x A	8	6	14
B x AB	3	5	8
TODOS OS PARES INCOMPATÍVEIS	94 (58,8)	66 (41,2)	160
TODOS OS PARES COMPATÍVEIS	219 (37,6)	363 (62,4)	582
TOTAL	313 (42,2)	429 (57,8)	742

$$\chi^2_{(1)}=22,955; P<<0,001$$

Obs.: Entre parênteses estão assinalados os valores em porcentagem e o χ^2 refere-se à comparação entre os pares compatíveis e incompatíveis

A partir das frequências gênicas maternas calcularam-se as frequências observadas e esperadas de recém-nascidos incompatíveis com a mãe no sistema ABO. No grupo de mães "brancas" observou-se que, considerando-se os recém-nascidos em geral, as frequências esperadas e observadas não apresentaram diferenças significativas ($\chi^2_{(1)}=0$; $P=1,00$) (TABELA 17). Contudo, entre os recém-nascidos ictericos, a frequência observada de recém-nascidos incompatíveis no sistema ABO diferiu significativamente da esperada devido ao maior número de mães O com filhos incompatíveis ($\chi^2_{(1)}=6,433$; $P<0,02$) (TABELA 17). Por outro lado, entre os recém-nascidos não-ictericos, a frequência observada de recém-nascidos incompatíveis no sistema ABO foi significativamente menor do que a esperada ($\chi^2_{(1)}=5,406$; $P<0,05$) (TABELA 19).

No grupo de mães "não-brancas", considerando-se os recém-nascidos em geral, as frequências observadas e esperadas de recém-nascidos incompatíveis diferiram significativamente ($\chi^2_{(1)}=14,580$; $P<0,001$) (TABELA 17), sendo a diferença ainda maior quando considerados apenas os recém-nascidos ictericos ($\chi^2_{(1)}=21,226$; $P<< 0,001$) (TABELA 18). Contudo, entre os não-ictéricos, a diferença entre as frequências observadas e esperadas de recém-nascidos compatíveis e incompatíveis não foi significativa ($\chi^2_{(1)}=1,201$; $0,20<P<0,30$) (TABELA 19).

TABELA 17 - Comparação entre as frequências observadas e esperadas de recém-nascidos (RN) incompatíveis e compatíveis com a mãe no sistema ABO, discriminando-se o grupo de mães em "brancas" e "não-brancas"

MÃES	GRUPO SANGÜÍNEO	RN	FREQUÊNCIA		$\chi^2_{(1)}$
			OBSERVADA	ESPERADA	
BRANCAS	O	INCOMPATÍVEIS	142	137,7	0,865 ^{NS}
	A	INCOMPATÍVEIS	28	28,0	
	B	INCOMPATÍVEIS	21	25,3	
	TOTAL	INCOMPATÍVEIS	191	191,0	0 ^{NS}
	TOTAL	COMPATÍVEIS	740	740,0	
NÃO-BRANCAS	O	INCOMPATÍVEIS	28	17,0	16,789****
	A	INCOMPATÍVEIS	3	2,8	
	B	INCOMPATÍVEIS	8	2,8	
	TOTAL	INCOMPATÍVEIS	39	22,6	14,580****
	TOTAL	COMPATÍVEIS	84	100,4	

NS = não significativo; $P>0,05$ / * $P<0,05$ / ** $P<0,02$ / *** $P<0,01$ / **** $P<0,001$

TABELA 18 - Comparação entre as frequências observadas e esperadas de recém-nascidos (RN) ictericos incompatíveis e compatíveis com a mãe no sistema ABO, discriminando-se o grupo de mães em "brancas" e "não-brancas"

MÃES	GRUPO SANGÜÍNEO	RN	FREQUÊNCIA		$\chi^2_{(1)}$
			OBSERVADA	ESPERADA	
BRANCAS	O	INCOMPATÍVEIS	82	57,5	
	A	INCOMPATÍVEIS	9	11,7	
	B	INCOMPATÍVEIS	9	10,6	11,304***
	TOTAL	INCOMPATÍVEIS	100	9,8	
	TOTAL	COMPATÍVEIS	289	309,2	6,433**
NÃO-BRANCAS	O	INCOMPATÍVEIS	18	7,5	
	A	INCOMPATÍVEIS	1	1,2	
	B	INCOMPATÍVEIS	4	1,2	21,267****
	TOTAL	INCOMPATÍVEIS	23	9,9	
	TOTAL	COMPATÍVEIS	31	44,1	21,226****

* P<0,05/ ** P<0,02/ *** P<0,01/ **** P<0,001

TABELA 19 - Comparação entre as frequências observadas e esperadas de recém-nascidos (RN) não-ictéricos incompatíveis e compatíveis com a mãe no sistema ABO, discriminando-se o grupo de mães em "brancas" e "não-brancas"

MÃES	GRUPO SANGÜÍNEO	RN	FREQUÊNCIA		$\chi^2_{(1)}$
			OBSERVADA	ESPERADA	
BRANCAS	O	INCOMPATÍVEIS	58	78,3	
	A	INCOMPATÍVEIS	18	15,9	
	B	INCOMPATÍVEIS	11	14,4	6,343**
	TOTAL	INCOMPATÍVEIS	87	108,6	
	TOTAL	COMPATÍVEIS	442	420,4	5,406*
NÃO-BRANCAS	O	INCOMPATÍVEIS	10	9,4	
	A	INCOMPATÍVEIS	2	1,6	
	B	INCOMPATÍVEIS	4	1,5	2,674 ^{NS}
	TOTAL	INCOMPATÍVEIS	16	12,5	
	TOTAL	COMPATÍVEIS	52	55,5	1,201^{NS}

NS = não significativo; P>0,05/ * P<0,05/ ** P<0,02/ *** P<0,01/ **** P<0,001

Na **TABELA 20** é apresentada a frequência de recém-nascidos ictericos com e sem incompatibilidade ABO de acordo com a hora em que a icterícia foi detectada, conforme registro em prontuário. Para a análise, os dados foram agrupados em intervalos de igual ou menos de 24 horas, ($\leq 24h$), entre 24 e 48 horas (>24 e $\leq 48h$) e mais de 48 horas ($>48h$). Foram excluídos os recém-nascidos com deficiência de G6PD e os incompatíveis com a mãe no sistema Rh. Houve diferença significativa entre os dois grupos de recém-nascidos ($\chi^2_{(2)}=12,145$; $P<0,01$).

As frequências de recém-nascidos ictericos com e sem incompatibilidade ABO não diferiram, considerando-se apenas os intervalos "entre 24 e 48 horas" e "mais de 48 horas" ($\chi^2_{(1)}=0,023$; $0,80<P<0,90$). Agrupando-se os dados destes dois intervalos e comparando-se com as frequências do intervalo "igual ou menos de 24 horas", constatou-se que a diferença era altamente significativa ($\chi^2_{\text{corr}}=10,444$; $P<0,01$), devido a maior frequência de recém-nascidos com incompatibilidade ABO com icterícia detectada às 24h de vida ou menos.

TABELA 20 - Distribuição da frequência de 208 recém-nascidos (RN) ictericos com e sem incompatibilidade ABO, excluindo-se os casos de deficiência de G6PD e de incompatibilidade Rh, de acordo com a hora de detecção da icterícia

RN ICTÉRICO	HORAS DE DETECÇÃO DA ICTERÍCIA			TOTAL
	$\leq 24h$ No. (%)	> 24 e $\leq 48h$ No. (%)	$> 48h$ No. (%)	
Com incompatibilidade ABO	14 (17,1)	37 (45,1)	31 (37,8)	82
Sem incompatibilidade ABO	4 (3,2)	65 (51,6)	57 (45,2)	126
TOTAL	18	102	88	208

$$\chi^2_{(2)}=12,145; P<0,01$$

4.2. Resultados do estudo caso-controle

Na **TABELA 21** é apresentada a composição do grupo de estudo (recém-nascidos ictericos incompatíveis com a mãe no sistema ABO), do grupo-controle I (recém-nascidos não-ictericos incompatíveis) e do controle II (recém-nascidos do grupo O, filhos de mães O) quanto à cor da pele materna, grupo sanguíneo e sexo do recém-nascido.

TABELA 21 - Composição dos grupos de estudo (recém-nascidos ictericos incompatíveis), controle I (recém-nascidos não-ictericos incompatíveis) e controle II (recém-nascidos do grupo O, filhos de mãe O) quanto ao tipo sanguíneo, sexo do recém-nascido e cor da pele materna

GRUPO	GRUPO SANGÜÍNEO RN	MÃE BRANCA		MÃE NÃO-BRANCA		TOTAL
		SEXO M	RN F	SEXO M	RN F	
ESTUDO	A	7	8	6	3	30
	B	3	1	1	1	
CONTROLE I	A	6	5	1	2	17
	B	1	0	2	0	
CONTROLE II	O	5	8	6	2	21

Os dados maternos e neonatais e os resultados dos exames laboratoriais são apresentados nas **TABELAS 22, 23 e 24**.

TABELA 22 - Dados maternos e neonatais e resultados dos exames clínicos e laboratoriais realizados em amostras de sangue e saliva das 30 mães e recém-nascidos (RN) do grupo de estudo (RN ictericos e com incompatibilidade ABO)

CASO No.	COR MATERNA	No. DE GESTAÇÕES	PARIDADE	FILHOS ANTERIORES COM ICTERICIA	TRATAMENTO	VACINAÇÕES RECENTES	TRANSFUSÕES ANTERIORES	SEXO RN	PESO RN (g)	IDADE GESTACIONAL (dias)
1	Não-branca	1	1	-	-	-	-	F	2.830	285
2	Não-branca	1	1	-	-	-	-	M	3.510	288
3	Branca	6	5	-	-	-	-	F	2.410	272
4	Branca	3	3	Sim	Fototerapia	-	Sim	M	3.020	280
5	Branca	4	4	Sim	Banho de sol	Anti-tetânica	-	F	3.660	288
6	Branca	4	4	Sim	Banho de sol	-	-	M	3.790	265
7	Não-branca	4	3	Sim	Fototerapia	-	-	M	3.250	270
8	Não-branca	2	2	Sim	Banho de sol	Anti-tetânica	-	F	3.570	288
9	Branca	2	2	-	-	-	-	F	3.338	288
10	Branca	1	1	-	-	-	-	M	3.010	275
11	Não-branca	3	2	-	-	-	-	F	2.720	283
12	Branca	1	1	-	-	-	Sim	F	2.400	265
13	Branca	1	1	-	-	-	-	F	2.780	280
14	Branca	1	1	-	-	Anti-tetânica	-	F	2.840	260
15	Branca	5*	6	Sim	Fototerapia	-	-	F	3.130	280
16	Branca	5	5	Sim	Banho de sol	Anti-tetânica	-	M	3.460	280
17	Branca	2	2	Ignorado	-	-	-	F	2.500	265
18	Branca	6	5	-	-	Anti-tetânica	-	M	3.090	288
19	Branca	2	2	Sim	Banho de sol	Anti-tetânica	-	M	3.460	280
20	Branca	3	3	Sim	Fototerapia	-	-	M	3.000	270
21	Não-branca	1	1	-	-	-	-	M	3.580	285
22	Não-branca	3	3	Sim	Banho de sol	-	-	M	3.640	275
23	Branca	1	1	-	-	-	-	M	3.210	293
24	Não-branca	1	1	Sim	-	-	-	M	3.660	280
25	Não-branca	4	3	-	Banho de sol	-	-	F	2.790	268
26	Não-branca	6	4	-	-	-	-	M	3.430	278
27	Não-branca	4	3	Sim	Banho de sol	Anti-tetânica	Sim	M	2.720	285
28	Branca	3	3	Sim	Chá de picão banho de sol	-	-	F	2.720	285
29	Branca	3	3	-	-	-	Sim	M	2.880	272
30	Branca	2	2	Sim	Fototerapia	-	-	M	3.210	280

* 1 parto gemelar

(Continuação)

TABELA 22 - Dados maternos e neonatais e resultados dos exames clínicos e laboratoriais realizados em amostras de sangue e saliva das 30 mães e recém-nascidos (RN) do grupo de estudo (RN icterícios e com incompatibilidade ABO)

CASO Nº	TS (MÃE)	TS (RN)	CD	ELUIÇÃO	TÍTULO AC IMUNE (MÃE)	ESCORE	TÍTULO AC IMUNE (RN)	ESCORE	FORÇA AG (RN)	FENÓ- TIPO SECRE- TOR (MÃE)	FENÓ- TIPO SECRE- TOR (RN)	HS/VIDA IC- TERICIA	(HS/VIDA) BT (mg%)	(HS/VIDA) MICROEMA- ICRÍTIO (%)	(HS/VIDA) RETÍCULO- CITO (%)	TRATAMENTO
1	O+	A+	+	anti-A imune	1:2048	82	1:8	4	31	Se	Se	13	(18) 9,4	(18) 45	-	Fototerapia
2	O+	A+	+	anti-A imune	1:256	37	1:8	4	31	sece	Se	20	(45) 14,6	(20) 38	-	Fototerapia
3	O+	A+	+	anti-A imune	1:2048	81	1:8	7	12	Se	Se	6	(15) 8,3	(23) 52	(16) 18,2	Fototerapia
4	O-	B-	-	-	1:32	22	-	0	30	Se	Se	52	(101) 13,7	(101) 54,55	(101) 1,3	-
5	O+	A+	+	anti-A imune	1:256	33	1:1	0	38	Se	Se	24	(24) 18,6	(24) 58	(24) 8,8	Fototerapia
6	O+	A+	+	anti-A imune	1:128	54	1:1	0	41	Se	Se	36	(~48) 17,5	(62) 45,47	(~48) 6,1	Fototerapia
7	O+	A+	+	anti-A imune	1:512	66	-	0	46	Se	Se	21	(~48) 13,2	(30) 47/49	-	Fototerapia
8	O+	A+	+	-	1:512	62	1:2	0	24	Se	Se	52	(76) 10,1	(76) 54	-	-
9	O+	A+	+	anti-A imune	1:256	42	-	0	37	Se	Se	41	(45) 10,0	(45) 51	-	-
10	O+	A+	-	-	1:128	40	-	0	6	Se	Se	31	-	-	-	-
11	O+	B+	-	-	1:64	28	-	0	51	Se	Se	18	(48) 9,6	(48) 56	-	-
12	O+	A+	+	anti-A imune	1:256	45	1:1	0	34	Se	Se	15	(35) 14,0	(35) 53	(35) 8,1	Fototerapia
13	O+	A+	-	-	1:64	13	-	0	27	Se	sece	42	(49) 6,8	(49) 57,58	-	-
14	O+	A-	+	anti-A imune	1:512	57	1:16	6	31	Se	Se	37	(42) 7,3	(42) 56/57	-	-
15	O+	A-	+	anti-A imune	1:512	68	1:8	4	29	Se	Se	28	(39) 11,6	(33) 39	(33) 9,3	Fototerapia
16	O+	A+	-	-	1:256	35	-	0	18	Se	Se	70	-	-	-	-
17	O+	A+	-	-	1:256	36	-	0	19	Se	Se	40	(67) 9,0	(67) 48	-	-
18	O+	B+	-	-	1:16	12	-	0	53	Se	Se	61	(63) 7,1	(63) 50	-	-
19	O+	B+	-	-	1:8	7	-	0	39	Se	sece	36	(42) 6,5	(42) 45	-	-
20	O+	A+	+	anti-A imune	1:1024	77	1:4	2	31	Se	Se	14	(14) 9,0	(14) 55	(20) 3,5	Fototerapia
21	O+	B+	-	-	1:16	15	-	0	43	Se	Se	48	(48) 8,0	(48) 44	-	-
22	O+	A+	-	-	1:1024	61	1:16	6	11	Se	Se	18	(44) 10,3	(44) 47/48	-	-
23	O+	A-	-	-	1:512	68	-	0	15	Se	Se	38	-	-	-	-
24	O+	A+	+	anti-A imune	1:1024	73	1:8	7	39	Se	Se	13	(41) 9,5	(41) 53	(41) 10,8	Fototerapia
25	O+	A+	+	anti-A imune	1:2048	93	1:64	19	25	Se	Se	8	(39) 16,2	(39) 37	(42) 9,5	Fototerapia
26	O+	A+	-	-	1:32	17	1:4	2	8	sece	Se	46	(59) 5,9	(59) 51/52	-	-
27	O+	A+	+	anti-A imune	1:2048	68	1:32	8	33	Se	Se	29	(29) 11,4	(29) 43	-	Fototerapia
28	O+	B+	+	anti-B imune	1:512	53	1:32	11	44	sece	Se	31	(36) 6,0	(36) 54	-	-
29	O+	A+	+	anti-A imune	1:512	66	1:4	2	28	Se	Se	60	-	-	-	-
30	O+	A+	-	-	1:256	26	1:2	0	10	Se	sece	52	-	-	-	-

TS = Tipagem sanguínea

CD = Teste de COOMBS direto

Ac = Anticorpo

Ag = Antígeno

BT = Bilirrubina total

TABELA 23 - Dados maternos e neonatais e resultados dos exames laboratoriais realizados em amostras de sangue e de saliva das 17 mães e recém-nascidos (RN) do grupo controle I (RN não ictericos e com incompatibilidade ABO)

CASO No.	COR MATERNA	No. DE GESTAÇÕES	PARIDADE	FILHOS ANTERIORES COM ICTERÍCIA	TRATAMENTO	VACINAÇÕES RECENTES	TRANSFUSÕES ANTERIORES	SEXO RN	PESO RN (g)	IDADE GESTACIONAL (dias)
1	Não-branca	4	4	-	-	-	Sim	M	3.390	283
2	Branca	1	1	-	-	anti-tetânica	-	F	3.440	280
3	Não-branca	3	3	-	-	-	Sim	F	2.980	285
4	Branca	1	1	-	-	-	-	F	2.840	280
5	Branca	1	1	-	-	anti-tetânica	-	F	3.080	280
6	Branca	4	4	-	-	-	-	F	3.120	285
7	Não-branca	1	1	-	-	não lembra	-	M	3.640	285
8	Branca	2	1	-	-	-	-	M	2.940	270
9	Não-branca	3	3	-	-	-	-	M	2.900	285
10	Branca	2	1	-	-	anti-tetânica	-	M	2.990	275
11	Branca	1	1	-	-	-	-	M	3.080	275
12	Branca	5	4	-	-	-	-	M	3.160	288
13	Branca	3	3	Sim	Banho de sol	-	-	M	3.440	293
14	Branca	2	2	-	-	-	-	F	3.000	288
15	Branca	2	2	-	-	anti-tetânica	-	M	2.840	280
16	Branca	7	6	Sim	Chá de picão	-	Sim	M	2.910	280
17	Não-branca	2	2	-	-	-	-	F	2.580	275

(Continuação)
TABELA 23 - Dados maternos e neonatais e resultados dos exames laboratoriais realizados em amostras de sangue e de saliva das 17 mães e recém-nascidos (RN) do grupo controle I (RN não-ictéricos e com incompatibilidade ABO)

CASO No.	TS (MÃE)	TS (RN)	CD	ELUIÇÃO	TÍTULO Ac IMUNE (MÃE)	ESCORE	TÍTULO Ac IMUNE (RN)	ESCORE	FORÇA Ag (RN)	FENÓTIPO SECRETOR (MÃE)	FENÓTIPO SECRETOR (RN)
1	O+	B+	+	anti-B imune	1:128	33	1:4	2	51	Se parcial	sese
2	O+	A -	+	anti-A imune	1:128	47	-	0	39	Se	Se
3	O+	A+	+	anti-A imune	1:128	24	-	0	37	Se	sese
4	O+	A+	-	-	1:64	27	1:1	0	11	Se	Se
5	O+	A+	-	-	1:128	21	1:1	0	8	Se	Se
6	O+	A+	-	-	1:128	27	1:1	0	31	Se	Se
7	O+	B+	-	-	1:16	6	-	0	41	Se	Se
8	O+	A+	-	-	1:8	4	-	0	25	sese	Se
9	O+	A+	-	-	1:8	4	-	0	37	Se	Se
10	O+	A -	-	-	1:4	2	-	0	39	Se	Se
11	O+	A+	-	-	1:32	17	-	0	13	sese	sese
12	O -	B -	-	-	1:128	35	1:4	2	53	sese	sese
13	O+	A+	+	anti-A imune	1:256	60	-	0	36	Se	Se
14	O+	A+	-	-	1:128	49	1:8	4	11	Se	Se
15	O+	A+	-	-	1:128	29	1:1	0	33	sese	Se
16	O+	A+	+	anti-A imune	1:512	65	1:4	2	27	Se	sese
17	O+	A+	-	-	1:256	44	1:16	6	13	Se	sese

TS = tipagem sanguínea
 CD = teste de COOMBS direto
 Ac = antígeno
 Ag = antígeno

TABELA 24 - Dados maternos e neonatais e resultados dos exames laboratoriais realizados em amostras de sangue e de saliva das 21 mães e recém-nascidos (RN) do grupo controle II (RN do grupo O, filhos de mães do mesmo grupo)

CASO No.	COR MATERNA	No. DE GESTA- ÇÕES	PARI- DADE	FILHOS ANTE- RIORES COM ICTERÍCIA	TRATA- MENTO	VACINA- ÇÕES RECEN- TES	TRANS- FUSÕES ANTE- RIORES	SEXO RN	PESO RN (g)	IDADE GESTA- CIONAL (dias)
1	Branca	6	5	-	-	-	-	M	3.400	287
2	Branca	1	1	-	-	-	-	F	3.140	280
3	Branca	3	3	-	-	-	-	F	3.330	285
4	Não-branca	1	1	-	-	Anti- tetânica	-	M	3.230	275
5	Não-branca	1	1	-	-	-	-	M	2.880	285
6	Não-branca	2	2	-	-	-	-	M	3.010	280
7	Não-branca	1	1	-	-	Anti- tetânica	-	M	3.710	292
8	Não-branca	2	2	-	-	Ignorado	-	M	3.580	288
9	Branca	2	1	-	-	-	-	M	3.000	275
10	Branca	2	1	-	-	-	-	M	3.410	280
11	Branca	1	1	-	-	-	-	F	3.740	288
12	Não-branca	3	3	-	-	-	-	F	3.540	278
13	Não-branca	1	1	-	-	-	-	F	3.100	275
14	Branca	5	5	Sim	Fototerapia	Anti- tetânica	-	F	3.630	280
15	Branca	1	1	-	-	-	-	F	3.200	280
16	Não-branca	2	1	-	-	-	-	M	2.830	293
17	Branca	1	1	-	-	Anti- tetânica	-	F	3.200	288
18	Branca	2	2	Sim	Banho de picão	-	-	M	3.070	288
19	Branca	3	3	Sim	Fototerapia	-	Sim	M	3.530	283
20	Branca	1	1	-	-	-	-	F	3.400	288
21	Branca	5	4	Sim	Banho de picão e fototerapia	-	-	F	3.080	280

(Continuação)

TABELA 24 - Dados maternos e neonatais e resultados dos exames laboratoriais realizados em amostras de sangue e de saliva das 21 mães e recém-nascidos (RN) do grupo controle II (RN do grupo O, filhos de mães do mesmo grupo)

CASO No.	TS (MÃE)	TS (RN)	CD	ELUIÇÃO	Ac IMUNE (MÃE)				Ac IMUNE (RN)				FORÇA Ag (RN)	FENÓ- TIPO SECRE- TOR (MÃE)	FENÓ- TIPO SECRE- TOR (RN)
					ANTI-A		ANTI-B		ANTI-A		ANTI-B				
					TÍTULO	ESCORE	TÍTULO	ESCORE	TÍTULO	ESCORE	TÍTULO	ESCORE			
1	O+	O+	[-]	-	1:1024	61	1:64	25	1:512	55	1:64	33	15	Se	Se
2	O+	O+	[-]	-	1:512	69	1:128	38	1:256	64	1:32	20	11	Se	Se
3	O+	O+	[-]	-	1:1024	61	1:8	7	1:256	47	1:8	4	8	Se	Se
4	O+	O+	[-]	-	1:4096	81	1:512	62	1:4096	67	1:256	39	8	Se	Se
5	O+	O+	[-]	-	1:128	38	1:16	9	1:128	27	1:4	2	6	Se	Se
6	O+	O+	[-]	-	1:1024	55	1:8	4	1:64	30	1:8	4	6	se	Se
7	O+	O+	[-]	-	1:1024	82	1:64	19	1:512	59	1:8	7	6	Se	Se
8	O+	O+	[-]	-	1:2048	79	1:16	12	1:256	53	1:16	9	6	se	se
9	O+	O+	[-]	-	1:64	21	1:64	36	1:64	19	1:32	26	2	Se	Se
10	O+	O+	[-]	-	1:8192	82	1:256	45	1:8192	96	1:256	53	6	Se	Se
11	O+	O+[-]	[-]	-	1:512	47	1:128	31	1:256	47	1:128	34	19	se	se
12	O+	O+	[-]	-	1:64	21	1:128	18	1:64	19	1:32	17	6	se	se
13	O+	O+[-]	[-]	-	1:256	47	1:16	9	1:256	37	1:16	6	16	Se	Se
14	O+	O+	[-]	-	1:8	4	1:256	43	1:8	7	1:128	43	4	Se	Se
15	O+	O+	[-]	-	1:32	8	1:32	17	1:32	14	1:16	15	19	Se	Se
16	O+	O+[-]	[-]	-	1:512	64	1:256	45	1:512	60	1:128	41	6	Se	Se
17	O+	O+[-]	[-]	-	1:32	20	1:64	27	1:32	14	1:32	11	4	Se	Se
18	O+	O+	[-]	-	1:256	46	1:128	48	1:128	41	1:128	39	6	Se	Se
19	O+	O+	[-]	-	1:1024	60	1:32	14	1:512	52	1:32	17	4	Se	Se
20	O+	O+	[-]	-	1:2048	77	1:128	36	1:1024	63	1:64	30	6	Se	Se
21	O+	O+[-]	[-]	-	1:512	62	1:256	49	1:256	53	1:256	47	2	se	Se

TS = tipagem sanguínea

CD = teste de COOMBS

Ac = anticorpo

Ag = antígeno

4.2.1. Paridade e abortos anteriores

No grupo de estudo, 9(30%) das mães eram primigestas, não havendo diferenças significativas em relação ao grupo-controle I e II, onde 5(29,4%) e 9(42,9%) eram primigestas, respectivamente ($\chi^2_{(2)}=1,109$; $P=0,57$).

Foram relatados abortos em gestações anteriores por 7(23,3%) das mães do grupo de estudo, 4(23,5%) das mulheres do grupo-controle I e 5(23,8%) das mães do grupo-controle II. Os grupos também não diferiram quanto ao antecedente de abortos ($\chi^2_{(2)}=0,002$; $P>0,95$).

4.2.2. Filhos anteriores com icterícia neonatal

No grupo de estudo, 14 mães (46,7%) tiveram filhos anteriores com icterícia neonatal, sendo que 5-(35,7%) referiram que tiveram filhos submetidos à fototerapia. No grupo-controle I, apenas duas mães (11,8%) tiveram filhos anteriores com icterícia no período neonatal e em nenhum caso foi realizada a fototerapia. No controle II, quatro mães (19,1%) tiveram filhos anteriores com icterícia e somente uma teve filhos submetidos à fototerapia. A diferença só foi significativa quando comparado o grupo de estudo com o grupo-controle I ($\chi^2_{\text{corr}}=4,791$; $P=0,03$).

4.2.3. Transfusões sangüíneas anteriores

Não houve diferença significativa entre os grupos estudados quanto à frequência de transfusões sangüíneas anteriores, que foram relatadas por 4(13,3%)

das mães do grupo de estudo, 3(17,6%) do grupo-controle I e 1(4,8%) do grupo-controle II ($\chi^2_{(2)}=1,630$; $P=0,44$).

4.2.4. Vacinações recentes

A frequência de mães que receberam vacinas durante o período pré-natal, nos três grupos, não foi significativamente diferente, tendo sido vacinadas 7(23,3%) das mães do grupo de estudo, 4(23,5%) do grupo-controle I e 5(23,8%) do grupo-controle II ($\chi^2_{(2)}=0,002$; $P>0,95$). No grupo-controle II, duas mães não sabiam referir o tipo da vacina; nos demais casos, tratava-se da vacina antitetânica.

4.2.5. Cor da pele das mães

No grupo de estudo, 19(63,3%) mães e no grupo-controle I e II 12(70,6%) e 13(61,9%), respectivamente, foram classificadas como "brancas". As demais foram consideradas "não-brancas". Não houve diferenças significativas entre os três grupos ($\chi^2_{(2)}=0,354$; $P=0,84$).

4.2.6. Sexo dos recém-nascidos

A razão de sexo foi de 131:100; 143:100; 110:100 nos grupos de estudo, controle I e controle II, respectivamente, não havendo diferença significativa entre os três grupos ($\chi^2_{(2)}=0,172$; $P=0,92$).

4.2.7. Peso e idade gestacional dos recém-nascidos

Todos os recém-nascidos eram nascidos a termo e com peso adequado para a idade gestacional. No grupo de estudo, a idade gestacional variou de 260 a 293 dias ($\bar{X}=278,37$; DP=8,55) e o peso, de 2.400g a 3.790g ($\bar{X}=3.138,93$; DP=392,26). No grupo-controle I, a idade gestacional foi de 270 a 293 dias ($\bar{X}=281,59$; DP=5,80) e o peso ao nascer foi 2.580g a 3.640g ($\bar{X}=3.078,24$; DP=267,80). No grupo-controle II, a variação da idade gestacional foi de 275 a 293 dias ($\bar{X}=283,24$; DP=5,48) e do peso, de 2.830g a 3.740g ($\bar{X}=3.286,19$; DP=269,42). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à idade gestacional e ao peso ($H=3,802$; $P=0,15$ e $F=2,097$; $P=0,13$, respectivamente).

4.2.8. Resultado do teste de COOMBS direto e eluição

O teste de COOMBS direto (CD) foi positivo em 16 casos (53,3%) no grupo de estudo e em cinco casos (29,4%) do grupo-controle I. No grupo-controle II, em todos os casos o teste de COOMBS direto foi negativo. No grupo de estudo, em 15 casos o anticorpo eluído foi o anti-A e em um caso, o anti-B. No grupo-controle I, em quatro casos foi eluído o anticorpo anti-A e em um caso, o anticorpo anti-B. A diferença entre os grupos de estudo e controle I não foi significativa ($\chi^2_{(1)}=2,512$; $P=0,11$).

Vale salientar que, na amostra inicial de 1.235 pares mães-filhos, o CD foi positivo em 71 casos (5,7%), considerando-se o total de recém-nascidos, e em 63 casos (23,7%) levando-se em conta apenas os recém-nascidos incompatíveis no sistema ABO.

A eluição realizada nos casos de **CD** positivo foi negativa em apenas uma amostra. Em 54 casos (76,1%) o anticorpo eluído foi o anti-A (em duas amostras, além do anticorpo anti-A, foi eluído o anticorpo anti-D); em oito casos (11,3%) foi eluído o anticorpo anti-B (em um caso foi eluído também o anti-D) e nos oito casos restantes (11,3%) os anticorpos eluídos foram anti-D (cinco casos); ou anti-D e anti-G (um caso); ou anti-D e anti-C (um caso) ou anti-C (um caso).

4.2.9. Dosagem de bilirrubina total, valor de microematócrito e contagem de reticulócitos

Em 25 recém-nascidos do grupo de estudo foram realizadas dosagens de bilirrubina total e microematócrito. O valor de bilirrubina total variou de 5,90 a 18,62mg% ($\bar{X}=10,54$; DP=3,59). Quando havia mais de uma dosagem de bilirrubina, considerou-se para a análise a de valor mais elevado. A manifestação de icterícia clínica está relacionada, segundo **VOAK (1969)**, a níveis de bilirrubina total iguais ou maiores que 5mg%.

O microematócrito variou de 37 a 58% ($\bar{X}=49,46$; DP=6,10). Nos casos onde foram realizados mais de um exame, considerou-se o resultado de menor porcentual. Foram considerados como normais os resultados entre 40 e 65%, conforme protocolo do Serviço de Neonatologia do CAISM, de acordo com a hora de vida dos recém-nascidos.

A contagem de reticulócitos efetuada em nove recém-nascidos variou de 1,3 a 18,2% ($\bar{X}=8,4$; DP=4,79). Foram considerados normais os valores inferiores a 8 - 10% e os superiores a 1 - 2% (**BLANCHETTE, & ZIPURSKY, 1984**), de acordo com a hora de vida dos recém-nascidos.

4.2.10. Fototerapia

Entre os recém-nascidos do grupo de estudo, 12 foram submetidos à fototerapia. Todos os recém-nascidos submetidos à fototerapia eram do grupo sanguíneo A.

Dentre os recém-nascidos submetidos à fototerapia, nove tiveram o aparecimento de icterícia dentro das primeiras 24 horas de vida. Os três restantes desenvolveram icterícia entre 24 e 36 horas de vida.

4.2.11. Força antigênica

A análise comparativa entre o grupo de estudo e os grupos-controles realizada através do teste não-paramétrico de **WILCOXON** para dois grupos mostrou que a força antigênica das hemácias fetais não diferiu entre o grupo de estudo e o grupo-controle I (*hemácias do grupo A*: $Z=0,121$; $P=0,90$ e *hemácias do grupo B*: $Z=0,775$; $P=0,44$).

Contudo, a força antigênica variou significativamente de acordo com o grupo sanguíneo ABO, sendo maior no grupo B, intermediária no grupo A e menor no grupo O (*hemácias A e B*: $Z=3,947$; $P=7,9 \times 10^{-5}$; *hemácias A e O*: $Z=5,359$; $P=8,37 \times 10^{-8}$ e *hemácias B e O*: $Z=4,277$; $P=1,90 \times 10^{-5}$).

Os escores da força antigênica das hemácias fetais segundo o grupo sanguíneo do sistema ABO são apresentados nas **TABELAS 22,23 e 24**.

O escore médio e o desvio-padrão das hemácias fetais dos 38 recém-nascidos do grupo A foram de $25,90 \pm 11,38$ (*grupo de estudo*: $\bar{X}=26,00$; $DP=11,28$; *grupo-controle I*: $\bar{X}=25,71$; $DP=11,98$); entre os nove recém-nascidos

do grupo B foram de $45 \pm 7,76$ (*grupo de estudo*: $\bar{X}=43,33$; $DP=8,36$; *grupo-controle I*: $48,33$; $DP=6,43$) e dos 21 recém-nascidos do grupo O foram de $7,90 \pm 5,10$.

Por outro lado, o escore médio das hemácias de adultos testadas para a seleção de hemácias-padrões foi como se segue, onde N é o número de indivíduos cujas hemácias foram examinadas:

hemácias A_1 , $N=8$, $\bar{X}=43,75 \pm 1,39$

hemácias A_2 , $N=2$, escore=27/28

hemácias B, $N=2$, escore=45/51

hemácias O, $N=5$, $\bar{X}=35 \pm 5,74$

O escore médio das hemácias fetais do grupo A diferiu significativamente do escore médio das hemácias A_1 adultas ($Z=4,159$; $P=3,20 \times 10^{-5}$) e foi semelhante ao das hemácias A_2 adultas. Já o escore médio das hemácias fetais do grupo B foi similar ao das hemácias B adultas. As hemácias fetais do grupo O, por sua vez, tinham um escore médio significativamente menor do que as hemácias O adultas ($Z=3,416$; $P=6,36 \times 10^{-4}$).

4.2.12. Título do anticorpo imune

Quanto aos escores de títulos de anticorpos imunes na circulação materna e fetal, a fim de tornar comparáveis os dados, considerou-se o título de 1:4 em diante na pontuação do escore, conforme descrito no **ANEXO 10**.

Em geral, os recém-nascidos incompatíveis apresentaram títulos mais baixos do que as mães. Mesmo considerando-se as diluições de 1:1 e 1:2 em 40%

dos casos do grupo de estudo e 47,1% dos casos do grupo-controle I, o anticorpo imune não foi identificado no plasma fetal.

Tanto no grupo de estudo como no grupo-controle I os escores do título de anticorpo imune no soro materno foram significativamente maiores do que no plasma fetal ($Z=4,782$; $P=1,73 \times 10^{-6}$ e $Z=3,621$; $P=2,93 \times 10^{-4}$, respectivamente).

Os 21 recém-nascidos do grupo O, filhos de mães O, apresentaram títulos de anticorpos imunes com escores em geral inferiores aos maternos, tanto em relação ao anticorpo anti-A ($Z=2,989$; $P=2,8 \times 10^{-3}$) quanto ao anticorpo anti-B ($Z=2,450$; $P=1,43 \times 10^{-2}$).

Comparando-se os escores dos títulos de anticorpos imunes no plasma fetal do grupo de estudo com os do grupo-controle I, não verificou-se diferença significativa (*anti-A*: $Z=1,604$; $P=0,11$; *anti-B*: $Z=0,904$; $P=0,37$).

O escore do título de anticorpo anti-A imune no soro materno foi significativamente mais baixo no grupo incompatível sem icterícia (controle I), apresentando diferenças significativas na comparação com o grupo de estudo ($Z=2,981$; $P=2,88 \times 10^{-3}$) e o grupo-controle II ($Z=2,408$; $P=1,61 \times 10^{-2}$). Os escores dos títulos de anti-A entre os grupos de estudo e controle II não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($Z=0,148$; $P=0,88$).

O escore do título de anti-B imune na circulação materna não diferiu entre os grupos de estudo e controle I ($Z=0,258$; $P=0,80$).

É interessante notar que no grupo-controle II, tanto no plasma fetal como no soro materno, os escores dos títulos de anti-A foram significativamente mais elevados que os de anti-B ($Z=3,069$; $P=2,15 \times 10^{-3}$ e $Z=3,144$; $P=1,66 \times 10^{-3}$, no plasma fetal e soro materno, respectivamente).

4.2.13. Fenótipos do sistema secretor

Na análise dos fenótipos do sistema secretor, os indivíduos "brancos" e "não-brancos" foram agrupados, uma vez que as frequências fenotípicas entre eles não apresentavam diferenças significativas ($X^2_{(1)}=0,254$; $P=0,61$, entre as mães e $\chi^2_{\text{corr}}=0,074$; $P=0,79$, entre os recém-nascidos).

Foram eliminados dois pares mãe-filho do grupo de estudo. Em um caso, por não ter sido possível a confirmação do fenótipo materno como secretor parcial, através do exame de nova amostra de saliva; em outro caso, pela quantidade insuficiente de saliva do recém-nascido para realizar o teste quantitativo (o recém-nascido demonstrou ser secretor pelo teste qualitativo). No grupo-controle I foi também eliminado um par mãe-filho devido à impossibilidade de confirmação do fenótipo secretor da mãe (secretor parcial).

As comparações entre os grupos de estudo e controle I e II não revelaram diferenças significativas nas frequências fenotípicas entre as mães ou entre os recém-nascidos (**grupo de estudo x grupo-controle I**: mães: $\chi^2_{\text{corr}}=0,669$; $P=0,41$; recém-nascidos: $\chi^2_{\text{corr}}=1,671$; $P=0,20$; **grupo de estudo x grupo-controle II**: mães: $\chi^2_{\text{corr}}=0,700$; $P=0,40$; recém-nascidos: $\chi^2_{\text{corr}}=0,004$; $P=0,95$; **grupo-controle I x grupo-controle II**: mães: $\chi^2_{\text{corr}}=0,092$; $P=0,76$; recém-nascidos: $\chi^2_{\text{corr}}=0,704$; $P=0,40$).

Na **TABELA 25** são apresentadas as frequências das mães e recém-nascidos secretores e não-secretores de cada grupo (estudo ou controle).

TABELA 25 - Distribuição das 65 mães e recém-nascidos (RN) de acordo com o fenótipo do sistema secretor

GRUPO		FENÓTIPO		TOTAL
		SECRETOR No. (%)	NÃO-SECRETOR No. (%)	
ESTUDO	MÃES	25 (89,3)	3 (10,7)	28
	RN	25 (89,3)	3 (10,7)	
CONTROLE I	MÃES	12 (75,0)	4 (25,0)	16
	RN	11 (68,8)	5 (31,2)	
CONTROLE II	MÃES	16 (76,2)	5 (23,8)	21
	RN	18 (85,7)	3 (14,3)	

A análise da correlação entre a ocorrência de icterícia neonatal e a força antigênica das hemácias fetais, o título de anticorpo imune no plasma do recém-nascido e no soro da mãe e o fenótipo secretor do recém-nascido e da mãe demonstrou só haver correlação significativa ($r=0,381$; $P<0,05$) entre a manifestação de icterícia e o título do anticorpo no soro materno.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A amostra de mães e recém-nascidos estudada provinha de uma população em equilíbrio de HARDY & WEINBERG.

As frequências gênicas do sistema ABO das mães "brancas" e dos seus filhos não diferiram entre si. Contudo, a análise dos pares mães-filhos mostrou um excesso de pares $A \times A$ e $B \times B$ e uma falta de pares $A \times O$ e $B \times O$. Os dados não permitiam outras análises, pois a tipagem sanguínea paterna era desconhecida. Porém, deve-se alertar para a possibilidade de contaminação da amostra de sangue do cordão com o sangue materno pela não observação da técnica correta de coleta (punção de veia umbilical em ponto distante da inserção do cordão).

Quando os recém-nascidos filhos de mães "brancas" foram discriminados em ictericos e não-ictericos, as frequências gênicas do sistema ABO dos recém-nascidos ictericos não se encontravam em equilíbrio de HARDY & WEINBERG, devido a um excesso de genes A. Além disso, eliminando-se os casos de incompatibilidade Rh e de deficiência em G6PD entre os recém-nascidos ictericos, havia um excesso de recém-nascidos incompatíveis, filhos de mães O (a frequência observada foi maior do que a esperada), o que evidencia a relação da incompatibilidade ABO com o aparecimento da icterícia neonatal.

Considerando-se o grupo de mães "não-brancas" e seus filhos, a análise dos dados igualmente confirmou a associação da incompatibilidade ABO com a icterícia neonatal. Todavia, alguns achados, como o fato das frequências gênicas do sistema ABO das mães e seus filhos diferirem entre si, dos recém-nascidos não-ictericos não estarem em equilíbrio de HARDY & WEINBERG e da frequência observada de recém-nascidos incompatíveis em geral (ictericos e não-

ictéricos) diferir da frequência esperada, falam a favor da miscigenação com o aumento de genes A e B (principalmente de genes A) de origem paterna entre os filhos.

Devido à prevenção da isoimunização materna pelo fator Rh com o uso de imunoglobulina anti-Rh e pela menor exposição dos recém-nascidos deficientes em G6PD a fatores que desencadeiam a hemólise (*e.g.*, uso de vitamina K₁ natural ao invés da vitamina K₁ sintética), é de se esperar que a incompatibilidade materno-fetal pelo sistema ABO evidencie-se ainda mais como causa de icterícia neonatal e de DHRN.

De fato não foi encontrada uma incidência maior de icterícia neonatal em relação à amostra em geral, considerando-se isoladamente os casos de incompatibilidade Rh e de deficiência de G6PD. Estes achados parecem divergir dos resultados obtidos por alguns autores, onde se demonstrou que a deficiência de G6PD é uma causa importante de icterícia neonatal (**MADAN & SOOD, 1987; GARLIPP, 1987; GARLIPP & RAMALHO, 1988** e **OWA *et al.*, 1991**).

Há muito tempo sabe-se que há associação etiológica entre algumas variantes de G6PD, como a variante Mediterrânea e Cantão, que causam deficiência grave de G6PD e a icterícia neonatal; contudo, entre os recém-nascidos negróides, que apresentam a variante africana de G6PD, os dados da literatura são contraditórios.

No Brasil, os resultados das investigações realizadas em São Paulo e na Bahia são discordantes. Provavelmente isso se deve ao emprego de diferentes critérios para a classificação dos recém-nascidos em ictéricos e não-ictéricos e às diferentes metodologias de investigação da deficiência de G6PD (**AZEVEDO &**

AZEVEDO, 1974; RAMALHO, 1981; RIVERO *et al.*, 1981; PAIXÃO *et al.*, 1986 e GARLIPP, 1987).

GARLIPP (1987), no mesmo Hospital-Escola onde se desenvolveu o nosso estudo, encontrou uma associação da variante africana de G6PD com a icterícia neonatal moderada (definida por ela como a que requer dosagem de bilirrubinas e fototerapia). Não houve associação com a icterícia leve (que requer apenas observação), e na amostra não houve casos de icterícia neonatal grave (que exige exsangüinotransfusão).

No nosso estudo, apenas um recém-nascido deficiente em G6PD desenvolveu a forma moderada da doença, como definida por **GARLIPP (1987)**. Os demais casos foram todos da forma leve, o que não permitiu a análise de acordo com o grau de gravidade da icterícia neonatal.

O fato de existir igual número de meninos e de meninas entre os recém-nascidos classificados como deficientes pela quantificação de G6PD provavelmente se deva à inclusão de meninas heterozigotas neste grupo.

Como em somente dez casos foi eluído o anticorpo anti-D das hemácias fetais, a incompatibilidade Rh não foi um fator importante para o desenvolvimento de icterícia neonatal na amostra estudada.

Por outro lado, os achados confirmaram a afirmação feita por outros autores, de que a incompatibilidade materno-fetal no sistema ABO é freqüente e é causa de icterícia neonatal principalmente entre os pares O x A e O x B (**ZUELZER & KAPLAN, 1954a,b; ROSENFELD, 1955; GRUNDBACHER, 1965; COOK, 1982 e MADAN & SOOD, 1987**).

É interessante notar que, embora a incompatibilidade ABO estivesse associada a uma maior frequência de icterícia nas primeiras 24 horas de vida, dentre os 12 recém-nascidos do grupo de estudo submetidos à fototerapia, 3 (25%) desenvolveram icterícia após este período (entre 24 e 36 horas de vida). Ainda que nestes casos a identificação da icterícia possa ter sido tardia, isto é, só foi percebida horas após o seu aparecimento, não se pode descartar a possibilidade da manifestação clínica da icterícia ou mesmo da DHRN após as primeiras 24 horas de vida, uma vez que o pico de bilirrubina geralmente ocorre por volta do terceiro ou quarto dia de vida, segundo **VOAK & BOWLEY (1969)**. Portanto, é desaconselhável a alta precoce sem acompanhamento domiciliar nos casos de incompatibilidade materno-fetal no sistema ABO.

Verificou-se que os grupos de estudo e controle I diferiram em relação à história de filhos anteriores com icterícia neonatal e quanto ao título de anti-A imune na circulação materna. No grupo de estudo, o anticorpo materno foi encontrado em níveis mais elevados e havia um maior número de mulheres com filhos anteriores que desenvolveram icterícia neonatal. É interessante notar que no grupo-controle I três mães apresentaram níveis elevados de anticorpo imune ($\geq 1:256$) e, destas, apenas uma não tinha filhos anteriores com icterícia neonatal.

Em relação aos níveis de anticorpos imunes maternos no plasma fetal dos recém-nascidos do grupo A e B, os títulos baixos podem ser explicados pela ligação com substâncias grupo-específicas e hemácias (**VOAK, 1969**). Quantos aos recém-nascidos do grupo O, os níveis mais baixos de anticorpos anti-A e anti-B em relação aos títulos maternos também foram observados por outros autores como **RACCA et al. (1988)**. Este achado talvez indique a passagem seletiva de parte da IgG produzida pela mãe.

Observou-se que o grupo de recém-nascidos incompatíveis ictericos (grupo de estudo) diferiu do grupo de recém-nascidos incompatíveis não-ictericos (grupo-controle I) apenas em relação aos títulos de anti-A. Além disso, as mães e recém-nascidos do grupo-controle II (pares O_xO) apresentaram títulos mais elevados de anti-A. Este achado está de acordo com o fato da DHRN do sistema ABO ser mais freqüente entre os recém-nascidos do grupo A (**CLIFFORD et al., 1968** e **FARRELL, 1970**) e com a observação feita por alguns autores de que o antígeno A suscita títulos mais elevados de anticorpos imunes do que o antígeno B (**PENALVA DA SILVA, 1975** e **BEIGUELMAN, 1983**).

Entretanto, embora os títulos de anti-B não tenham diferido entre o grupo de estudo e controle I, não se pode descartar a possibilidade da atividade biológica do anticorpo anti-B ser diferente entre os dois grupos.

É importante comentar que a utilização de escores para a determinação do título é mais adequada porque, segundo **MARSH (1972)**, reduz a subjetividade e permite mais facilmente a análise e a correlação entre dados de diferentes laboratórios. Infelizmente, na literatura específica, os trabalhos mais abrangentes e similares são anteriores aos de **MARSH (1972)** e, portanto, não utilizaram o sistema de escores.

Apesar da freqüência do teste de COOMBS direto positivo não ter diferido entre os dois grupos (estudo e controle I), ele foi positivo em mais de 50% dos casos do grupo de recém-nascidos incompatíveis ictericos. Portanto, este teste discrimina razoavelmente bem os recém-nascidos com maior risco de desenvolver icterícia neonatal, ao que concordam autores como **CLIFFORD et al. (1968)**; **ALTER et al. (1969)**; **ORZALESI et al. (1973)** e **CARAPELLA et al. (1982)**.

A frequência de 23,7% de resultados positivos do teste de COOMBS direto entre os casos de incompatibilidade ABO é comparável com a observada por outros autores como **ORZALEZI *et al.* (1973)** (31,4%); **WHITE & GRAHAN (1981)** (25,4%); **QUINN *et al.* (1988b)** (33,0%) e **BEL COMOS *et al.* (1991)** (11,3%).

Como a eluição só foi realizada nos casos com teste de COOMBS direto positivo, a frequência observada de eluição positiva foi provavelmente subestimada, uma vez que é possível a eluição de anticorpos anti-A e anti-B aderidos às hemácias fetais, mesmo nos casos em que o teste de COOMBS direto é negativo (**VOAK & BOWLEY, 1969** e **DESJARDINS *et al.*, 1979**).

O fato da força antigênica das hemácias fetais não diferir entre os grupos de recém-nascidos incompatíveis com e sem icterícia apóia a proposição feita inicialmente por **SMITH (1945)** e **ZUELZER & KAPLAN (1954a)**, de que o principal estímulo antigênico seria a absorção de substâncias grupo-específicas hidrossolúveis e de que o antígeno eritrocitário seria menos efetivo para estimular a produção de anticorpos anti-A ou anti-B. Reforça ainda mais esta proposição o fato de que apenas uma mãe com recém-nascido do grupo B apresentou níveis de anticorpo imune acima de 1:256 e, no entanto, a força antigênica das hemácias fetais do grupo B foi similar à das hemácias adultas.

A maior força antigênica das hemácias fetais do grupo B pode ser também observada nos dados do estudo de **VOAK (1969)**, onde apenas cerca de 18% das hemácias dos recém-nascidos do grupo B tinham força antigênica menor do que as hemácias B adultas, ao passo que 94% das hemácias fetais do grupo A apresentavam força antigênica igual ou menor do que as hemácias A₂ adultas.

Apesar de haver variabilidade da força antigênica das hemácias entre os recém-nascidos e em virtude da casuística ser pequena, os dados sugerem que, embora a força antigênica das hemácias fetais do grupo A e O seja menor do que a de indivíduos adultos, o mesmo não ocorre com as hemácias do grupo B.

Na literatura, os trabalhos sobre força antigênica das hemácias fetais utilizaram diferentes metodologias (**KEMP, 1930; TOVEY, 1945; WITEBSKY & ENGASSER, 1949; GRUNDBACHER, 1964, 1965a,b e 1980; FISHER & STEGE, 1967 e VOAK, 1969**), e algumas investigações restringiram-se apenas às hemácias do grupo A (**WITEBSKY & ENGASSER, 1949 e GRUNDBACHER, 1964 e 1965a,b**).

A força antigênica das hemácias fetais B, sendo similar à das hemácias adultas, poderia explicar o fato de alguns autores, como **CLIFFORD et al. (1968), FARRELL (1970) e DELAPORTE et al. (1984)**, terem observado que a DHRN no sistema ABO é mais grave entre os recém-nascidos do grupo B, ainda que seja mais freqüente entre os recém-nascidos do grupo A.

Quanto ao sistema secretor, a freqüência de mães e recém-nascidos não-secretores no grupo de estudo (10,71%), mesmo sendo menor do que a do grupo controle I, não diferiu significativamente. Coincidentemente, a freqüência observada foi idêntica à referida por **ZUELZER & KAPLAN (1954b)** em seu estudo, que apresentou o mesmo número amostral (28 recém-nascidos). Outros autores como **WIENER et al. (1949)** (15 recém-nascidos); **CRAWFORD et al. (1953)** (11 recém-nascidos), **WIENER et al. (1960)** (58 recém-nascidos) e **VOAK (1969)** (30 recém-nascidos) observaram um leve excesso de crianças e de pais secretores entre os casos de DHRN do sistema ABO. Já **GRUNDBACHER (1965a)** (41 recém-

nascidos) não encontrou diferenças nas frequências de recém-nascidos secretores e não-secretores entre os recém-nascidos com DHRN do sistema ABO.

Em todos os estudos, o tamanho amostral é pequeno. Todavia, se não são conclusivos, ao menos evidenciam que o estado secretor não é um fator de proteção como inicialmente supunham **BOORMAN & DODD (1943)** e **LEVINE (apud WIENER et al., 1960)**.

Quanto à técnica utilizada para a obtenção da saliva do recém-nascido (aspiração), esta mostrou-se adequada e de fácil realização. Comumente a coleta é realizada oferecendo-se pequenos chumaços de algodão à criança, para que ela sugue. Depois, os chumaços são espremidos dentro de um tubo de ensaio contendo soro fisiológico. Na técnica de coleta por aspiração, além da quantidade de saliva ser maior, porque ela não precisa ser extraída do algodão, a saliva não é diluída.

Finalizando, caso os dados referentes à icterícia neonatal estejam subestimados, ou por falha de registro ou porque o aparecimento da icterícia ocorreu após a alta hospitalar, isso apenas ressalta ainda mais a importância da incompatibilidade ABO como causa de icterícia neonatal.

Deve-se, portanto, controlar, rigorosamente os recém-nascidos incompatíveis com a mãe no sistema ABO, principalmente no caso de par OxA ou OxB. Tanto a equipe médica como a equipe de Enfermagem devem estar atentas para a identificação precoce da icterícia, a fim de que sejam, de imediato, tomadas outras medidas, tais como dosagem de bilirrubinas e se necessário, fototerapia.

Como a DHRN do sistema ABO não pode ser prevenida, já que a mulher pode ser imunizada por outros fatores que não a gestação ou transfusão, é importante a identificação dos grupos de recém-nascidos com maior risco de

desenvolvimento da DHRN para que as medidas terapêuticas sejam iniciadas o mais precocemente possível, evitando-se, com isso, as exsangüinotransfusões.

O nosso estudo oferece uma contribuição nesse sentido. A comparação entre os grupos de estudo e controles evidenciou indicadores importantes de risco da DHRN, como o resultado positivo do teste de COOMBS direto, o título elevado de anticorpo imune na circulação materna e a história de filhos anteriores com icterícia neonatal.

Seria interessante o desenvolvimento de estudos levando-se em conta os alótipos ou pelo menos as subclasses de IgG, a fim de se identificar quais estariam associadas com a DHRN, uma vez que mesmo em presença de títulos elevados de IgG na circulação materna observou-se que em alguns casos não ocorreu icterícia.

Quanto aos outros dois fatores analisados no grupo de estudo e controles, a saber, a força antigênica das hemácias fetais e os fenótipos do sistema secretor, estes não são relevantes para o desenvolvimento da icterícia neonatal. Porém, foram obtidos achados interessantes que não foram valorizados por outros autores, como **VOAK (1969)**, como o fato de que as hemácias do grupo B têm força antigênica comparável com as hemácias adultas, o mesmo não ocorrendo com as hemácias do grupo A e O. Assim, os resultados dos estudos envolvendo hemácias apenas do grupo A não são aplicáveis às hemácias do grupo B. Estudos mais amplos poderiam verificar também se há uma maior incidência de recém-nascidos do grupo B entre os casos graves da DHRN do sistema ABO, uma vez que os dados da literatura são contraditórios.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1. A amostra estudada encontrava-se em equilíbrio de **HARDY & WEINBERG**.

6.2. A incompatibilidade ABO está altamente relacionada com a icterícia neonatal, principalmente nos casos em que esta ocorre nas primeiras 24 horas de vida.

6.3. As frequências esperadas e observadas de recém-nascidos incompatíveis no grupo de crianças ictericas diferiram significativamente, e esta diferença foi devido ao maior número observado de recém-nascidos incompatíveis, filhos de mães O.

6.4. Nos casos de incompatibilidade ABO é desaconselhável a alta precoce, com 24 horas de vida, visto que a icterícia pode surgir após este tempo.

6.5. O resultado positivo do teste de COOMBS, o título elevado de anticorpos na circulação materna e a história de filhos anteriores com icterícia neonatal devem ser considerados na discriminação dos grupos de maior risco de desenvolvimento de icterícia devido à incompatibilidade ABO.

6.6. Na nossa amostra a força antigênica das hemácias fetais e o estado secretor do recém-nascido, não alteraram o desenvolvimento de icterícia neonatal nos casos de incompatibilidade ABO.

7. RESUMO

7. RESUMO

Foram estudados 1.235 pares mãe-filho para verificar a relação da incompatibilidade ABO com a incidência da icterícia neonatal. A partir desta amostra foram selecionados 68 pares mãe-filho em que a mãe era do grupo O, os quais compuseram o grupo de estudo (recém-nascidos A e B que desenvolveram icterícia) e os dois grupos-controles. Os três grupos foram comparados através de dados maternos e neonatais e achados laboratoriais, especialmente em relação à força antigênica das hemácias fetais, título de anticorpos imunes anti-A e anti-B na circulação materna e fetal, e frequência dos fenótipos do sistema secretor na ocorrência da icterícia neonatal. Concluiu-se que a incompatibilidade ABO está altamente associada à icterícia neonatal, sobretudo nas primeiras 24 horas de vida. No grupo de crianças ictericas as frequências esperadas e observadas de recém-nascidos incompatíveis diferiram significativamente. Esta diferença foi devida ao maior número observado de recém-nascidos incompatíveis, filhos de mães O. Devem ser considerados na discriminação dos grupos de maior risco de desenvolvimento de icterícia resultante da incompatibilidade ABO: 1º) o resultado positivo do teste de COOMBS direto; 2º) o título de anticorpo imune na circulação materna; 3º) a história de filhos anteriores com icterícia neonatal.

8. SUMMARY

8. SUMMARY

The author investigates the relationship between ABO incompatibility and neonatal jaundice in 1,235 mother/newborn pairs. Sixty eight pairs who were selected, the mother belonged to group O and were divided in a study group (newborns A and B that developed jaundice) and two control groups. The groups were compared in relation to maternal and neonatal data and laboratorial findings, specially concerning the role of fetal red cells antigenic strenght, anti-A and anti-B antibodies titulation in maternal and fetal circulation and frequency of secretor status in the development of neonatal jaundice. The findings led to the following conclusions: the ABO incompatibility is highly related to neonatal jaundice, specially in the first 24 hours after birth; the observed frequency of incompatible newborns in the group of jaundiced infants differs significantly from the expected and this difference was due to a larger number of incompatible newborns of mother O. The following factors must be considered when discriminating the groups with higher risk of neonatal jaundice due to ABO incompatibility: 1º) the positive result of direct COOMBS test; 2º) the immune antibodies titulation in maternal serum and, 3º) the history of previous children with neonatal jaundice.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELSON, N.M., RAWSON, A.J. Studies of blood group antibodies: V - Fractionation of examples of anti-B, anti-A,B, anti-M, anti-P, anti-Jk^a, anti-Le^a, anti-D, anti-CD, anti-K, anti-Fy^a, anti-s and anti-Good. Transfusion. v.1, p.116-123, 1961.
- ALTER, A.A., FELDMAN, F., TWERSKY, J. et al. Direct antiglobulin test in ABO hemolytic disease of the newborn. Obstet. Gynecol. v.33, n.6, p.846-851, 1969.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023 Referências bibliográficas. [s.l.], 1989. 19p.
- AUBERT, E.F., COCHRANE, J.B., ELLIS, M.E. An unusual case of erythroblastosis foetalis. Br. Med. J. v.2, p.648-649, 1945.
- AYRES,M., SALZANO,F.M., LUDWIG,O.K. Blood group changes in leukaemia. J. Med. Genet. v.3, p.180-185, 1966.
- AZEVEDO,E.S., AZEVEDO,T.F.S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal jaundice in Bahia, Brazil. Ciência e Cultura. v.26, n.11, p.1044-1047, 1974.
- BARBOSA,J. Esferócitos na doença hemolítica por incompatibilidade ABO. J. pediatr. (Rio de J.). v.64, n.5, p.155-158, 1988.

- BHENDE,Y.M., DESHPANDE,C.K., BHATIA,H.M. et al. A "new" blood-group character related to the ABO system. Lancet. v.1, p.903-904, 1952.
- BEIGUELMAN,B. Genética de populações: a lei de Hardy e Weinberg e suas aplicações. In: _____. Genética Médica. 2.ed. São Paulo: Edart, 1981. v.2, p.225-272.
- BEIGUELMAN,B. O sistema ABO. In: _____. - Genética Médica. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. v.3, p.100-111.
- BEL COMOS,J., RIBERA CRUSAFONT,A., NATAL PUJOL,A. et al. Valor del test de Coombs in la incompatibilidad ABO. An Esp. Pediatr. v.35, n.4, p.248-250, 1991.
- BERNSTEIN,F. Ergebnisse einer biostatistischen zusammenfassenden Betrachtung über die erblichen Blutstrukturen des Menschen. Klin. Wschr. v.33, p.1495-1497, 1924.
- BERNSTEIN,F. Zusammenfassende Betrachtungen über die erblichen Blutstrukturen des Menschen. Z. Indukt. Abstamm. u. Vererb. Lehre. v.37, p.237-270, 1925.
- BEUTLER,E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) an 6 - phosphogluconate dehydrogenase (6 - PGD). In: _____. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. 2.ed. London: Grune & Stratton, 1975. p.66-69.

- BIANCALANA, A., BIANCALANA Jr.,A. Incompatibilidade sangüínea materno-fetal. In: PEIXOTO,S. Pré-natal. 2.ed. São Paulo: Manole, 1981. p.665-671.
- BLANCHETTE,V.S., ZIPURSKY,A. Assessment of anemia in newborn infants. Clin. Perinatol. v.11, n.2, p.489-510, 1984.
- BOORMAN,K.E., DODD,B.E. The group specific substances A, B, M, N and Rh: their occurrence in tissues and body fluids. J. Pathol. v.55, p.329-339, 1943.
- BORNE,A.E.G. Kr. von dem, BECKERS,D.O., ENGELFRIET,C.P. Mechanisms of red cell destruction mediated by non-complement binding IgG antibodies: the essencial role *in vivo* of the Fc part of IgG. Br. J. Haematol. v.36, p.485-493, 1977.
- BREWER, G.J., TARLOV,A.R., ALVING,A.S. Methaemoglobin reduction test: a new simple in vitro test for identifying primaquine - sensitivity. Bull. W.H.O. v.22, p.633, 1960.
- BROUWERS,H.A.A., OVERBEEKE,M.A.M., GEMKE,R.J.B.J. et al. Sensitive methods for determining subclasses of IgG anti-A e anti-B in sera of blood-group-O women with a blood-group-A or-B child. B. J. Haematol. v.66, p.267-270, 1987.
- CABELLO, P.H., FEITOSA, M.F., KRIEGER, H. ABO segregation analysis of sib-pairs in two Brazilian samples. Rev. Bras. Genet. v.11, n.3, p.707-715, 1988.
- CALICH, V.L.G. Imunoglobulinas. In: CALICH, V.L.G., VAZ, C.A.C. Imunologia Básica. São Paulo: Artes Médicas, 1988. p.65-103.

- CAMERON, C., GRAHAM, F., DUNSFORD, I. et al. Acquisition of a B-like antigen by red blood cells. Br. Med. J. v.2, p.29-32, 1959.
- CAPURRO, H., KONICHEZKY, S., FONSECA, D. et al. A simplified method for diagnosis of gestacional age in the newborn infant. J. Pediatr. p.120-122, july, 1978.
- CARAPPELLA, E., GLORIA - BOTTINI, F., TUCCIARONE, L. et al. Annotations on the hyperbilirubinaemia of ABO incompatible infants. Haematologia. v.15, n.1, p.127-133, 1982.
- CHUNG, C.S., MATSUNAGA, E., MORTON, N.E. The ABO polymorphism in Japan. Jap. J. Hum. Genet. v.5, p.124-134, 1960.
- CHUNG, C.S., MORTON, N.E. Selection at the ABO locus. Amer. J. Hum. Genet. v.13, p.9-27, 1961.
- CIFUENTES, L., VALENZUELA, C.Y. Sib-sib segregation distortions for the ABO system. The influence of maternal phenotype. Rev. Brasil. Genet. v.4, n.4, p.727-734, 1986.
- CLIFFORD, J.H., MATHEWS, P., REIQUAM, C.W. et al. Screening for hemolytic disease of the newborn by cord blood Coombs testing: analysis of a five-year experience. Clin. Pediatr. (Phila). v.7, p.465-469, 1968.
- COOK, L.N. ABO hemolytic disease. Clin. Obstet. Gynecol. v.25, n.2, p.333-339, 1982.

- CRAWFORD, H., CUTBUSH, M., MOLLISON, P.L. Hemolytic disease of the newborn due to anti-A. Blood. v.8, n.7, p.620-632, 1953.
- DECASTELLO, A.V., STURLI, A. Ueber die Isoagglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen. Munchen. med. Wchnschr. v.49, p.1090-1095, 1902.
- DELAPORTE, B., SENDER, A., MAGNY, J.F. et al. Ictère néonatal au cours d'une incompatibilité foetomaternelle A-B. Arch. Fr. Pédiatr. v.41, n.1, p.73-74, 1984.
- DESJARDINS, L., CHINTU, C., ZIPURSKI, A. The spectrum of ABO hemolytic disease of the newborn infant. J. Pédiatr. v.95, n.3, p.447-449, 1979.
- DODD, B.E. Linked anti-A and anti-B antibodies from group O sera. Brit. J. Exptal. Pathol. v.33, n.1, p.1-18, 1952.
- DUFOUR, D.R., MONOGHAN, W.P. ABO hemolytic disease of the newborn: a retrospective analysis of 254 cases. Am. J. Clin. Pathol. v.73, n.3, p.369-373, 1980.
- DUNGERN, E.V., HIRSZFELD, L. Ueber gruppenspezifische Strukturen des Blutes. III. Z. Immunforsch. v.8, p.526-562, 1911.
- EICHER, C.A., WALLACE, M.E. et al. The Lui elution: a simple freezing method for antibody elution. Transfusion. v.18, p.647, 1978.
- EMILFORK, M., AMPUERO, G., DUFFAU, G. Incompatibilidad ABO: estudio comparativo in 153 recién nacidos. Pediatría (Santiago de Chile). v.24, n.112, p.32-34, 1981.

- ETCHEVERRY, S.B., CABUTTI, N.E.F., PALATNIK, M. Determinación del carácter secretor de ABH-Análisis metodológico. Sangre. v.27, n.6, p.1003-1010, 1982.
- FALTERMAN, C.G., RICHARDSON, C.J. Transfusion reaction due to unrecognized ABO hemolytic of the newborn infant. J. Pediatr. v.97, p.812-814, 1980.
- FARRELL, A.G.W. A-B-O incompatibility and haemolytic disease of the newborn. S. A. Medical Journal. v.44, n.8, p.211-213, 1970.
- FISCHER, K., STEGE, N. On the pathogenesis of ABO erythroblastosis: demonstration of quantitative variations in the power of neonatal erythrocytes to combine with antibody, using the immuno - fluorescent technique. Vox. Sang. v.12, p.145-150, 1967.
- FRIEDENREICH, V., ZACHO, A. Die Differentialdiagnose zwischen den "Unter" Gruppen A₁ und A₂. Z. Rassenphysiol. v.4, p.164-191, 1931.
- GARDAS, A., KOŚCIELAK, J. A, B and H blood group specificities in glycoprotein and glycolipid fractions of human erythrocyte membrane. Absence of blood group active glycoproteins in the membranes of non-secretors. Vox Sang. v.20, p.137-149, 1971.
- GARLIPP, C.R. Aspectos clínicos e laboratoriais da deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD) em recém-nascidos brasileiros. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, 1987.

- GARLIPP, C.R., RAMALHO, A.S. Aspectos clínicos e laboratoriais da deficiência de desidrogenase de 6 - fosfato de glicose (G-6-PD) em recém-nascidos brasileiros. Rev. Bras. Genet. v.11, n.3, p.717-728, 1988.
- GILJA, B.K., SHAH, V.P. Hidrops fetalis due to ABO incompatibility. Clin. Pediatr.(Phila) v.27, n.4, p.210-212, 1988.
- GILLILAND, B.C., BAXTER, E., EVANS, R.S. Red-cell antibodies in acquired hemolytic anemia with negative antiglobulin serum tests. N. Engl. J. Med. v.285, p.252-256, 1971.
- GRUNDBACHER, F.J. Changes in the human A antigen of erythrocytes with the individual's age. Nature. v.204, p.192-194, 1964.
- GRUNDBACHER, F.J. ABO hemolytic disease of the newborn: a family study with emphasis of the strength of the A antigen. Pediatrics. v.35, p.916-924, 1965a.
- GRUNDBACHER, F.J. Quantitative variation of the A antigen at birth: its significance in ABO hemolytic disease in the infant's development. Acta Paediatr. Scand. v.54, p.550-556, 1965b.
- GRUNDBACHER, F.J. Effects of ABO incompatible pregnancies and the origin of isoantibodies in mothers of infants with ABO hemolytic disease of the newborn. Z. Immunitaetsforsch. v.136, p.68-78, 1968.
- GRUNDBACHER, F.J. The etiology of ABO hemolytic disease of the newborn. Transfusion. v.20, n.5, p.563-568, 1980.

- GRUNDBACHER, F.J., SHREFFLER, D.C. Effects of secretor, blood and serum groups on isoantibody and immunoglobulin levels. Am. J. Hum. Genet. v.22, n.2, p.194-202, 1970.
- GUALTIERI, C.T., HICKS, R.E., MAYO, J.P. ABO incompatibility and parity effects on perinatal mortality. Soc. Biol. v.32, n.1/2, p.129-131, 1985.
- GUNSON, H.H. An evaluation of the immunohematological tests used in the diagnosis of AB hemolytic disease. Am. J. Dis. Child. v.94, p.123-129, 1957.
- HABIBI, B., BRETAGNE, M., BRETAGNE, Y. et al. Blood group antigens on fetal red cells obtained by umbilical vein puncture under ultrasound guidance: a rapid hemagglutination test to check for contamination with maternal blood. Pediatric. Res. v.20, p.1082-1084, 1986.
- HALBRECHT, I. Role of hemoagglutinins anti-A and anti-B in pathogenesis of jaundice of the newborn (icterus neonatorum precox). Am. J. Dis. Child. v.68, p.248-249, 1944.
- HAN, P., KIRUBA, R., ONG, R. et al. Haematolytic disease due to ABO incompatibility: incidence and value of screening in an Asian population. Aust. Paediatr. J. v.24, n.1, p.35-38, 1988.
- HAQUE, K.N. Value of measuring cord blood bilirubin concentration in ABO incompatibility. Br. Med. J. v.2, p.1604, 1978.

- HIRAIZUMI, Y., SPRADLIN, C.T. et al. Birth-order dependent segregation frequency in the ABO blood groups of man. Amer. J. Human. Genet. v.25, p.277-286, 1973a.
- HIRAIZUMI, Y., SPRADLIN, C.T. et al. Frequency of prenatal deaths and its relationship to the ABO blood groups in man. Amer. J. Human. Genet. v.25, p.362-371, 1973b.
- HIRAIZUMI, Y. Selection at the ABO locus in the Japanese population. Jpn. J. Genet. v.65, p.95-108, 1990.
- HIRSZFELD, L., ZBOROWSKI, H. Gruppenspezifische Beziehungen zwischen Mutter und Frucht und Elektive Durchlässigkeit der Placenta. Klin. Wchnschr. v.1, p.1152-1157, 1925, apud Mc NEIL et al., 1957b.
- HODR, R. ABO haemolytic disease: sex ratio and blood groups in the newborns requiring treatment. Czech. Med. v.12, n.3, p.125-133, 1989.
- HOERR, N., OSOL, A., (ed). Dicionário Médico Ilustrado Blakiston. São Paulo: Andrei, 1970. p.558.
- HOSTRUP, H. A and B blood group substances in the serum of the newborn infant and the foetus. Vox Sang. v.8, p.557-566, 1963.
- HUNTLEY, C.C., LYERLY, A.D., LITTLEJOHN, M.P. et al. ABO hemolytic disease in Puerto Rico and North Carolina. Pediatrics. v.57, n.6, p.827-998, 1976.

- HSU, T.C.S., ROSENFELD, R.E., RUBINSTEIN, P. Instrumented PVP-augmented antiglobulin tests. III-IgG-coated cells in ABO incompatible babies; depressed hemoglobin levels in type A babies to type O mothers. Vox Sang. v.26, p.326-333, 1974.
- JINDAL, A., BASU, S.K. ABO blood group incompatibility differentials in reproductive performance with respect to maternal age and parity among Dawvodi Bohras of Udaipur, Rajasthan. Indian J. Med. Res. v.74, p.688-695, 1981.
- KANTO, W.P.Jr., MARINO, B., GODWING, A.S. ABO hemolytic disease: a comparative study of clinical severity and delayed anemia. Pediatrics. v.62, n.3, p.365-369, 1978.
- KEMP, T. Über den Empfindlichkeitsgrad der Blutkörperchen gegenüber Isohämagglutininen im Fötalleben und im Kindesalter beim Menschen. Acta Pathol. Microbiol Scand. v.7, p.146-156, 1930.
- KIRK, R.L., SHIELD, J.W., STENHOUSE, N.S., et al. A further study of A-B-O blood groups and differential fertility among women in two Australian maternity hospitals. Brit. J. prev. soc. Med. v.9, p.104-111, 1955.
- KIRUBA, R., ONG, R., HAN, P. Direct enzyme linked antiglobulin tests (ELAT) for detecting in-vivo sensitized erythrocytes: evaluation of screening for ABO incompatibility of newborn. Pathology. v.20, p.147-151, 1988.
- KOCHWA, S., ROSENFELD, R.E. et al. Isoagglutinins associated with ABO erythroblastosis. J. clin. Invest. v.40, p.874-883, 1961.

- LANDSTEINER, K. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. Zbl. Bakt. v.27, p.357-362, 1900.
- LANDSTEINER, K. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. Wien. Klin. Wschr. v.14, p.1132-1134, 1901.
- LEVINE, P., BURNHAM, L. et al. The role of iso-immunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis. Am. J. Obstet & Gynec. v.42, n.6, p.925-937, 1941.
- LEVINE, P. - Serological factors as possible causes in spontaneous abortions. J. Hered. v.34, p.71-80, 1943.
- LEVINE, P. Ann. New York Acad. Sc. v.46, p.939, 1946, apud WIENER et al., 1960.
- LEVINE, D.H., MEYER, H.B.P. Newborn screening for ABO hemolytic disease. Clin. Pediatr. v.24. n.7, p.391-394, 1985.
- LO BUGLIO, A.F., COTRAN, R.S., JANDL, J.H. Red cells coated with immunoglobulin G: binding and sphering by mononuclear cells in man. Science. v.158, p.1582-1585, 1967.
- LOGHEM, J.J.Jr. van, DORFMEIER, H., HART, M. van der. Two A antigens with abnormal serologic properties. Vox Sang. v.2, p.16-24, 1957.
- LÖW, B. A practical method using papain and incomplete Rh antibodies in routine Rh blood grouping. Vox Sang. 5 : 94, 1955, apud GUNSON, 1957.

- LUBCHENCO, L., SERLS, D., BRAZIE, J. Neonatal mortality rate: relationship to birth weight and gestacional age. J. Pediatr. v.81, p.814, 1972.
- MADAN, N., SOOD, S.K. Role of G6PD, ABO incompatibility, low birth weight and infection in neonatal hyperbilirubinaemia. Trop. Geogr. Med. v.39, n.2, p.163-168, 1987.
- MARSH, W. L. Scoring of hemagglutination reactions. Transfusion. v.12, n.5, p.352-353, 1972.
- MATSUNAGA, E., HIRAIZUMI, Y. et al. Search for selection upon secretor status of ABO blood group substances. Annual Report of National Institute of Genetics. v.15, p.150-152, 1964.
- Mc NEIL, C., WARENSKI, L.C. et al. A study of the blood groups in habitual abortion. Am. J. Clin. Path. v.24, p.767-773, 1954.
- Mc NEIL, C., TRENTelman, E.F. et al. Aberrant secretion of salivary A, B and H group substances in human beings. Am. J. Clin. Path. v.28, n.1/6, p.145-151, 1957a.
- Mc NEIL, C., TRENTelman, E.F., FULLMER, C.D. et al. The significance of blood group conflicts and aberrant salivary secretion in spontaneous abortion. Amer. J. Clin. Path. v.28, p.469-480, 1957b.

- MEULEN, F.W. van der, HART, H. van der, FLEER, A. et al. The role of adherence to human mononuclear phagocytes in the destruction of red cells sensitized with non-complement binding Ig G antibodies. Br. J. Haematol. v.38, p.541-549, 1978.
- MILLER, D.F., PETRIE, S.J. Fatal erythroblastosis fetalis secondary to ABO incompatibility. Obstet. Gynecol. v.22, n.6, p.773-777, 1963.
- MOLLISON, P. L., CUTBUSH, H. Hemolytic disease of the newborn due to fetal-maternal ABO-incompatibility. Progr. Hematol. v.2, p.153-172, 1959.
- MORTON, N.E., KRIEGER, H., MI, M.P. Natural selection on polymorphisms in Northeastern Brazil. Am. J. Hum. Genet. v.18, n.2, p.153-171, 1966.
- MOSS, W.L. Studies on isoagglutinins and isohemolysins. Johns Hopk. Hosp. Bull. v.21, p.63, 1910, apud WIENER, 1953.
- NORATO, D.Y.J., MAGNA, L.A., BEIGUELMAN, B. Incompatibilidade sangüínea materno-fetal no sistema ABO (dados não publicados).
- ORZALESI, M., GLORIA, F. et al. ABO system incompatibility: relationship between direct Coombs test positivity and neonatal jaundice. Pediatrics. v.51, p.288-289, 1973.
- ORZALESI, M., GLORIA-BOTTINI, F., LUCARELLI, P. et al. ABO system incompatibility: evaluation of risk of hyperbilirubinaemia at birth by multivariate discriminant analysis. Experientia. v.39, n.1, p.89-91, 1983.

- OSKI, F.A. Problemas hematológicos. In: AVERY, G.B. Neonatologia, fisiopatologia e cuidado do recém nascido. Tradução por Samuel Schvartsman et al. São Paulo: Artes Médicas, 1978. p.376. Tradução de: Neonatology, pathophysiology and management of the newborn.
- OSKI, F.A., NAIMAN, J.L. Erythroblastosis fetalis. In: Hematologic problems in the newborn. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1972. p.176-235.
- OWA, J.A., DUROSINMI, M.A., ALABI, A.O. Determinants of severity of neonatal hyperbilirubinaemia in ABO incompatibility in Nigeria. Trop. Doct. v.21, n.1, p.19-22, 1991.
- PAIXÃO, A.C., GONÇALVES, A.L. et al. Testes de rastreamento da deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD). Rev. Bras. Pat. Clin. v.22, n.4, p.118-121, 1986.
- PALATNIK, M., BENEVIDES, M.J.F.S., SALZANO, F.M. ABH salivary secretion and white/negro gene flow in a Brazilian population. Hum. Biol. v.41, n.1, p.83-96, 1969.
- PEEVY, K.J., WISEMAN, H.J. ABO hemolytic disease of the newborn: evaluation of management and identification of racial and antigenic factors. Pediatrics. v.61, p.475-478, 1978.
- PENALVA da SILVA, F. A incompatibilidade ABO no nordeste brasileiro: aspectos formais e populacionais. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, 1975.

PENALVA da SILVA, F., KRIEGER, H. The maintenance of ABO polymorphism. Rev. Bras. Genet. v.4, n.4, p.705-712, 1981.

POLAYES, S.H., LEDERER, M., WIENER, A.S. Studies in isohemagglutination: II - The Landsteiner blood group in mothers and infants. J. Immunol. v.17, n.6, p.545-554, 1929.

POLLEY, M.J., ADINOLFI, M., MOLLISON, P.L. Serological characteristics of anti-A related to type of antibody protein(7S γ or 19S γ). Vox Sang. v.8, p.385-409, 1963.

POLLEY, M.J., MOLLISON, P.L., ROSE, J. et al. A simple serological test for antibodies causing ABO - haemolytic disease of the newborn. Lancet. v.1, p.291-295, 1965.

QUINN, M.W., WEINDLING, A.M., DAVIDSON, D.C. ABO incompatibility. Lancet. v.2, n.8618, p.1023, 1988a. [Letter].

QUINN, M.W., WEINDLING, A.M., DAVIDSON, D.C. Does ABO incompatibility matter? Arch. Dis. Child. v.63, n.10, p.1258-1260, 1988b.

RACCA, A.L., ROSASCO, M.M.G., RACCA, L.L. et al. Investigación de anticuerpos del sistema ABO en sangre de cordón de recién nacidos. Cuantificación de anti-A. Acta bioquim. clin. latinoam. v.22, n.3, p.411-417, 1988.

RACE, R.R., SANGER, R. The ABO blood groups. In: _____. Blood groups in man. 6. ed. Oxford: Blackwell, 1975. p.8-91.

- RAMALHO, A.S. Deficiência de 6 - fosfato de glicose(G-6-PD) em recém-nascidos brasileiros. Rev. Ass. Med. Brasil. v.27, n.12, p.343-345, 1981.
- RISEMBERG, H.M., MAZZI, E., MACDONALD, M.G. et al. Correlation of cord bilirubin levels with hyperbilirubinaemia in ABO incompatibility. Arch. Dis. Child. v.52, p.219-222, 1977.
- RIVERO, M.E.J., DINIZ, E.M.A., NONOYAMA, K. et al. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em recém-nascidos. Pediat. (S. Paulo). v.3, p.214-216, 1981.
- ROSEMBLIT, J. Doença hemolítica perinatal. In: VEGAS, D., VILHENA-MORAES, R. Neonatologia Clínica e Cirúrgica. Rio de Janeiro: Atheneu, 1986. v.1, p.621-625.
- ROSENFELD, R.E. A-B hemolytic disease of the newborn. Analysis of 1480 cord blood specimens, with special reference to the direct antiglobulin test and to the group O mother. Blood. v.10, p.17-28, 1955.
- ROSENFELD, R.E., OHNO, G. A-B hemolytic disease of the newborn. Rev. d'Hem. v.10, p.231-235, 1955.
- ROMANO, E.L., MOLLISON, P.L. Red cell destruction in vivo by low concentrations of IgG anti-A. Br. J. Haematol. v.29, p.121-127, 1975.
- ROMANO, E.L., HUGHES-JONES, N.C., MOLLISON, P.L. Direct antiglobulin reaction in ABO - haemolytic disease of the newborn. Br. Med. J. v.1, p.524-526, 1973.

- SALMON, C., SALMON, D. Déficit en antigène H chez certains sujets de groupe O atteints de leucémie aiguë. Rev. Franç. Études Clin. et Biol. v.10, p.212-214, 1965.
- SCHAAP, T., SHEMER, R. et al. ABO incompatibility and reproductive failure I- Prenatal selection. Am. J. Hum. Genet. v.36, p.143-151, 1984.
- SCHANFIELD, M.S. Marcadores genéticos de imunoglobulinas. In: FUNDENBERG, H.H. *Imunologia básica e clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. p.57-62.
- SCHELLONG, G. Ueber den Einfluss mütterlicher Antikörper des ABO - Systems auf die Reticulocytenzahl und Serumbilirubin bei Frühgeborenen. Z. Kinderheilk. v.90, p.134, 1964, apud GRUNDBACHER, 1965a.
- SCHIFF, F., SASAKI, H. Der Ausscheidungstypus, ein auf serologischen Wege nachweisbares mendelndes Merkmal. Klin. Woch. v.11, p.1426-1428, 1932.
- SHERER, D.M., ABRAMOWICZ, J.S., RYAN, R.M. et al. Severe fetal hydrops resulting from ABO incompatibility. Obstet. Gynecol. v.78, n.5, (Pt2), p.897-899, 1991.
- SHERMAN, W.B., HAMPTON, S.F., COOKE, R.A. The placental transmission of antibodies in the skin sensitive type of human allergy. J. Exp. Med. v.72, p.611-621, 1940.
- SMITH, C.H. Iso-agglutinins in the newborn - with special reference to their placental transmission. Amer. J. Dis. Child. v.36, p.54-69, 1928.

SMITH, G.H. Iso-agglutinins titres in heterospecific pregnancy. J. Path. & Bact. v.57, p.113-122, 1945.

SPRINGER, G.F., HORTON, R.E., FORBES, M. Origin of anti-human blood group B agglutinins in white Leghorn chicks. J. Exp. Med. v.110, p.221-244, 1959.

STERN, K. Clinical value of serologic examinations related to blood groups in pregnant patients. Am. J. Obst. & Gynec. v.75, n.2, p.369-375, 1958.

STERN, K., LEE, C.L., DAVIDSOHN, I. Grupos sanguíneos y su aplicación. In: TODD, J.C., SANFORD, A.H. Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6.ed. Barcelona: Salvat, 1978. p.357-423.

THOMSEN, V.O., KETTEL, K. Die Stärke der menschlichen Isoagglutinine und entsprechenden Blutkörperchenrezeptoren in verschiedenen Lebensaltern. Z. ImmunForsch. v.63, p.67-93, 1929.

TOIVANEN, P., HIRVONEN, T. Iso- and heteroagglutinins in human fetal and neonatal sera. Scand. J. Haemat. v.6, p.42-48, 1969.

TOVEY, A.D. The incidence, distribution and life history of the anti-A and anti-B haemolysins in the general population. Vox Sang. v.3, p.363-374, 1958.

TOVEY, G.H. A study of the protective factors in heterospecific blood group pregnancy and their role in the prevention of haemolytic disease of the newborn. J. Path. Bact. v.57, p.295-305, 1945.

UNGER, L.J., WIENER, A.S. Studies on the C antibody of group O serum with special reference to its role in hemolytic disease of the newborn. J. Lab. & Clin. Med. v.44, n.3, p.387-399, 1954.

VALENZUELA, C.Y. Confirmacion de las distorsiones de los sistemas ABO y Rh y de la proporcion sexual en recién nacidos. Rev. Méd. Chile. v.113, p.1175-87, 1985.

VALENZUELA, C. Y., WALTON, R. Selective interactions among Rh, ABO and sex ratio of newborns. Hum. Genet. v.71, p.53-57, 1985.

VALENZUELA, C.Y., CIFUENTES, L. Interpretation of ABO(genetic) segregation distortions. Rev. Bras. Genet. v.12, n.3, p.659-663, 1989.

VOAK, D. The pathogenesis of ABO haemolytic disease of the newborn. Vox Sang. v.17, p.481-513, 1969.

VOAK, D., BOWLEY, C.C. A detailed serological study on the prediction and diagnosis of ABO haemolytic disease of the newborn (ABO HD). Vox Sang. v.17, p.321-348, 1969.

VOAK, D., WILLIAMS, M.A. An explanation of the failure of the direct antiglobulin test to detect erythrocyte sensitization in ABO haemolytic disease of the newborn and observations on pinocytosis of Ig G anti-A antibodies by infant(cord)red cells. Br. J. Haematol. v.20, p.9-23, 1971.

WANG, M.Y.F.W., DESFORGES, J.F. Complement in ABO-hemolytic disease of the newborn. Pediatrics. v.48, p.650-653, 1971.

- WHYTE, J., GRAHAM, H. Prediction of the severity of ABO haemolytic disease of the newborn by cord blood tests. Acta Paediatr. Scand. v.70, p.217-222, 1981.
- WIENER, A.S. Group-specific substances in organs and body fluids: studies on their chemical nature. In:_____. Blood groups and transfusion. 3. ed. Springfield: C.C. Thomas, 1943. p.272-275.
- WIENER, A.S. Origin of naturally occurring hemagglutinins and hemolysins: a review. J. Immunol. v.66, p.287-295, 1951.
- WIENER, A.S. The blood factor C of the A-B-O system, with special reference to the rare blood group C. Ann. Eugenics. v.18, p.1-8, 1953.
- WIENER, A.S., KAROWE, H.E. Diagrammatic representation of the human blood-group reactions. J. Immunol. v.49, p.51-61, 1944.
- WIENER, A.S., UNGER, L.J. Excess of group O mothers in A-B-O hemolytic disease, with special reference to the role of the blood factor C. Exp. Med. Surg. v.13, p.204-224, 1955.
- WIENER, A.S., WEXLER, I.B., HURST, J.G. The use of exchange transfusion for the treatment of severe erythroblastosis due to A-B sensitization, with observations on the pathogenesis of the disease. Blood. v.4, p.1014-1032, 1949.
- WIENER, A.S., FREDERICK, V.J. et al. Pathogenesis of ABO hemolytic disease. Am. J. Obstet. & Gynecol. v.79, n.3, p.567-592, 1960.
- WITEBSKY, E. Interrelationship between the Rh system and the A-B system. Blood. Special Issue. v.2, p.66, 1948, apud ZUELZER, KAPLAN, 1954a.

WITEBSKY, E., ENGASSER, L.M. Blood groups and subgroups of the newborn.

I-The A factor of the newborn. J. Immunol. v.61, p.171-178, 1949.

ZUELZER, W.W., KAPLAN, E. ABO heterospecific pregnancy and hemolytic disease. Am. J. Dis. Child. v.88, p.158-178, 1954a.

ZUELZER, W.W., KAPLAN, E. ABO heterospecific pregnancy and hemolytic disease. Am. J. Dis. Child. v.88, p.319-338, 1954b.

ZUELZER, W.W., COHEN, F. ABO hemolytic disease and heterospecific pregnancy. Ped. Clin. North. Am. v.4, p.405-428, 1957.

ANEXOS

ANEXO 1

Prezada Senhora,

Estamos realizando uma pesquisa e para tanto, precisamos colher amostras de sangue e de saliva da Srª e de seu filho. A amostra de saliva será para investigar o sistema secretor, e com a amostra de sangue será feita a tipagem sangüínea e outros exames, que geralmente são realizados de rotina quando o tipo sangüíneo entre a mãe e o filho são incompatíveis.

As amostras de saliva serão colhidas uma única vez.

A amostra de sangue da Srª será colhida uma única vez e as amostras de sangue do seu filho serão colhidas do cordão umbilical após o parto (da parte do cordão que fica ligada à placenta) e de um pequeno corte feito no calcanhar (caso o tipo sangüíneo da criança seja incompatível com o seu).

A recusa em participar da pesquisa não implicará em prejuízo no seu tratamento ou no de seu filho.

De acordo

Campinas, de de 19 .

ANEXO 2
FORMULÁRIO

NOME: _____ HC: _____

COR: _____

HISTÓRIA OBSTÉTRICA:

GESTA: _____ PARA: _____

CESÁREAS: _____ ABORTOS: _____

FILHOS VIVOS: _____ FILHOS MORTOS: _____

FILHOS COM DHRN: SIM _____ NÃO _____

TRATAMENTO: _____

VACINAÇÕES RECENTES:

SIM: _____ NÃO: _____

QUAIS E EM QUE DATA? _____

TRANSFUSÕES ANTERIORES:

SIM: _____ NÃO: _____

INFECÇÕES MATERNAS NO PERÍODO PRÉ-NATAL:

SIM: _____ NÃO: _____ QUAIS: _____

INFECÇÕES FETAIS NO PERÍODO PERINATAL:

SIM: _____ NÃO: _____ QUAIS: _____

SEXO DO RN: MASC.: _____ FEM.: _____

PESO DO RN: _____ g

IDADE GESTACIONAL: _____ SEMANAS _____ DIAS

ANEXO 3

DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO DO SISTEMA SECRETOR

A pesquisa da substância grupo-específica ABH foi feita na saliva das mães e recém-nascidos dos grupos de estudo e controles.

Foram coletadas cerca de 1 a 5ml de saliva das mães em copos descartáveis, após três bochechos com água. A insalivação em alguns casos foi difícil porque a coleta foi realizada durante os meses mais quentes do ano. Além disso, as mães encontravam-se no puerpério mediato, amamentando exclusivamente ao seio, o que elevou ainda mais a perda hídrica.

Aos recém-nascidos foram oferecidos 5 a 10ml de água fervida para beber. A seguir, coletou-se cerca de 0,3 a 1ml de saliva através do uso de um aspirador (**FIGURA 1**), mantendo-se a criança em decúbito lateral.

A coleta foi muito difícil porque o recém-nascido produz normalmente pouca saliva, porque nos primeiros dias após o parto a produção de colostro é relativamente pequena e porque o ambiente era quente e algumas crianças foram submetidas à fototerapia.

A seguir, ou após no máximo uma hora, as amostras de saliva foram colocadas em um tubo de ensaio e mantidas em banho-maria com água em ebulição durante 15 minutos, para destruir as enzimas que poderiam inativar as substâncias grupo-específicas. A saliva foi centrifugada a 3000rpm durante 3 a 5min. O sobrenadante transparente e claro foi transferido para um tubo de ensaio limpo ou tubo de Eppendorf, e o material semi-sólido opaco foi descartado. As amostras foram mantidas congeladas a -20°C por oito a nove meses até a análise.

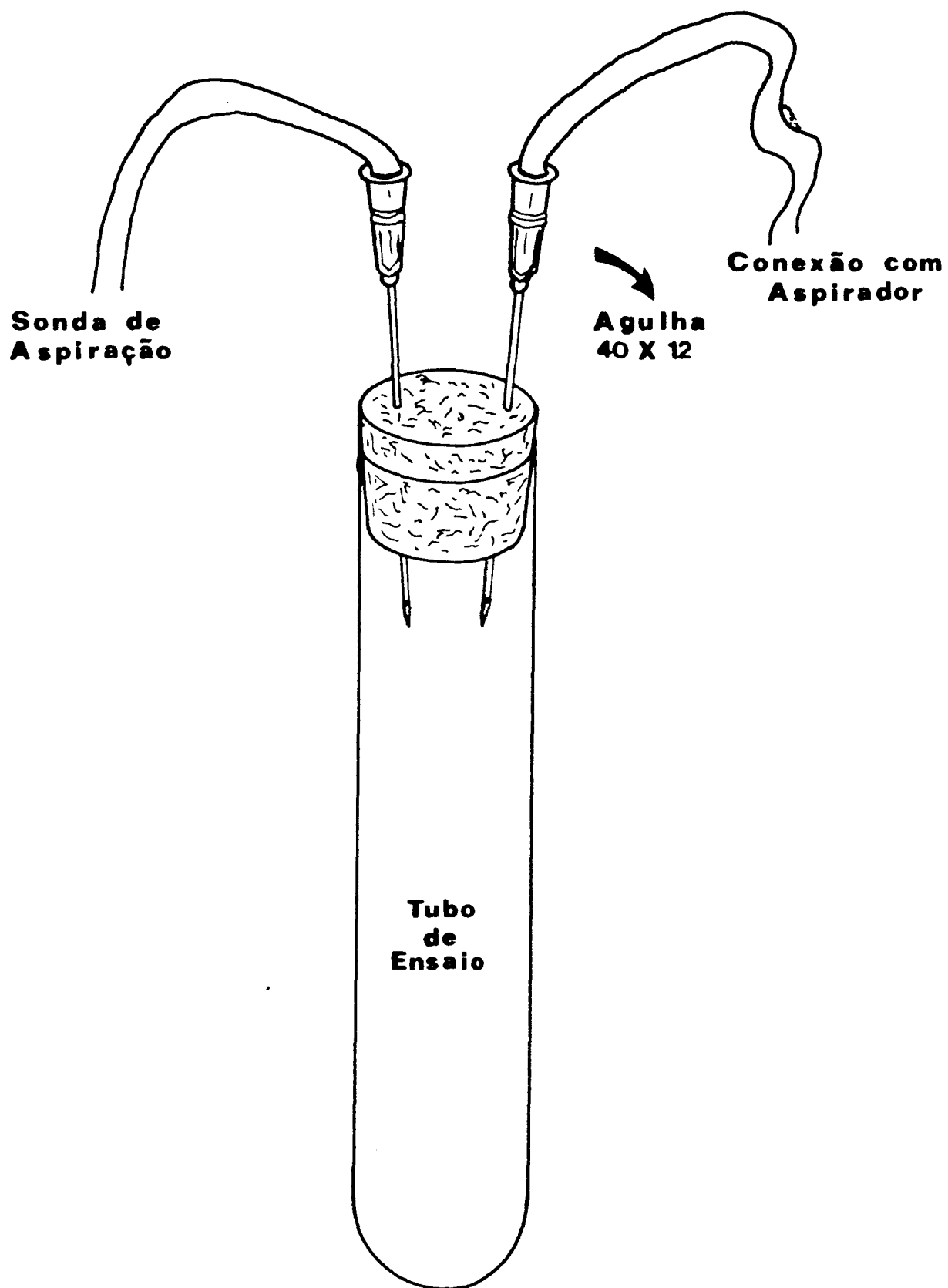


Figura I - Aspirador

Antes de iniciar o exame da saliva, foi feita a seleção da diluição do anti-soro, sendo utilizados os anti-soros anti-A, anti-B e anti-H (lectina de *Ulex europaeus*). Foi usada uma única alíquota de anti-A e anti-B. No caso do anti-H, foram utilizadas quatro alíquotas de um mesmo lote, que foram testadas antes do uso.

ETCHEVERRY, CABUTTI, PALATNIK (1982) enfatizaram a importância de se padronizar um título adequado, que não deveria ser muito elevado, pois impediria a detecção de antígenos fracos, ou muito baixo, porque levaria a se trabalhar na zona das inibições inespecíficas.

A diluição do anti-soro foi preparada em duplicata (1:1 a 1:1024). Em cada tubo, a um volume de anti-soro diluído foi acrescentado um volume de suspensão das hemácias correspondentes a 2% em salina. Os tubos foram incubados durante uma hora à temperatura ambiente. A seguir foram centrifugados a 2400rpm durante 15 segundos (centrífuga "SERO-FUGE II-CLAY ADAMS - BD) e lidos a olho nu.

Foi selecionada a diluição do anti-soro com um resultado macroscópico de aglutinação de pelo menos 2+ (duas cruzes).

O anti-soro foi preparado na diluição escolhida e testado pelo método quantitativo com as salivas de um indivíduo secretor e outro não-secretor, utilizadas nos testes como controles, a fim de confirmar a adequação da diluição.

Foram selecionadas, para os controles positivos e negativos, salivas de indivíduos secretores e não-secretores do grupo sanguíneo O, A e B. Estes controles foram estocados a -20°C em alíquotas de 0,3 a 0,5ml em tubos de Eppendorf.

As salivas dos recém-nascidos do grupo A e B foram testadas com dois anti-soros: anti-H e anti-A ou anti-H e anti-B, respectivamente, a fim de se discriminar o fenótipo "secretor aberrante".

A saliva de todas as mães e recém-nascidos foram testadas pelo método quantitativo, com exceção da saliva de um recém-nascido do grupo de estudo (caso nº 4), que, devido ao seu volume insuficiente, foi testada apenas pelo método qualitativo.

Para a análise pelo método qualitativo foram rotuladas uma ou duas séries de quatro tubos, conforme o tipo sanguíneo do indivíduo cuja saliva seria testada, como: "secretor", "não-secretor", "salina" e "desconhecido". Em cada tubo foi adicionada uma gota do anti-soro correspondente à substância grupo-específica a ser investigada (A, B ou H). No tubo "secretor" foi adicionada uma gota da saliva de um indivíduo secretor (controle); no tubo "não-secretor", a saliva de um indivíduo não-secretor (controle); no tubo "salina" foi utilizada uma gota de solução salina; e no tubo "desconhecido", uma gota da saliva para teste. Após agitação, os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante dez minutos.

A cada série de tubos foi adicionada uma gota de hemácias suspensas a 5% em salina e correspondentes aos anti-soros colocados nos tubos. Assim, nos tubos onde foi colocado o anti-soro anti-H, adicionou-se uma gota de hemácias O; nos tubos com anti-A, hemácias A₂; e nos tubos contendo anti-B, hemácias B. Após leve agitação, os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante uma hora. A seguir, foram centrifugados a 2400rpm durante 15 segundos e lidos a olho nu. A interpretação do teste foi feita de acordo com a **TABELA 4**.

TABELA 4 - Interpretação do teste qualitativo de investigação de substâncias grupo-específicas ABH na saliva

SALIVA DESCONHECIDA	SALIVA DE INDIVÍDUO SECRETOR	SALIVA DE INDIVÍDUO NÃO-SECRETOR	SALINA	INTERPRETAÇÃO
2+	0	2+	2+	não-secretor
0	0	2+	2+	secretor

No exame pelo método quantitativo foi feita uma ou duas séries de diluições (1:1 a 1:1024) de um volume de saliva, de acordo com o grupo sanguíneo do sistema ABO (grupo O - uma série; grupo A ou B - duas séries). As diluições não foram feitas em duplicata porque em alguns casos a amostra de saliva era insuficiente. No caso de resultados duvidosos, o teste era repetido.

A cada tubo foi adicionado um volume do anti-soro correspondente. Após agitação, os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 15min. A seguir, foi adicionado um volume de suspensão a hemácias O, A₂ ou B a 2%. Os tubos foram agitados e mantidos em incubação durante uma hora à temperatura ambiente. Após agitá-los, os tubos foram centrifugados a 2400rpm durante 15 segundos. A leitura foi feita a olho nu.

A definição do título foi dada pela diluição final de saliva anterior a uma aglutinação ótima, isto é, duas cruzes (escore S2, de **ETCHEVERY *et al.*, 1982**).

ANEXO 4

DOSAGEM DE BILIRRUBINA E MICROEMATÓCRITO

A dosagem de bilirrubina total foi realizada apenas nas amostras de sangue dos recém-nascidos que apresentaram icterícia clínica (grupo de estudo).

Foram colhidas amostras de sangue através de punção de calcanhar com lanceta ou lâmina de bisturi após aquecimento prévio do calcanhar com água a 40°C durante 3 a 5min. Foi feita a coleta em três tubos capilares heparinizados. Após vedação de uma das extremidades com chama de fogo, os tubos foram centrifugados a 3500rpm durante 15 minutos.

A leitura do microematócrito foi feita contrapondo-se os tubos num papel-escala. O resultado do microematócrito foi calculado como a média dos valores observados nos três tubos capilares.

A dosagem de bilirrubina total foi realizada num bilirrubinômetro (AO UNISTAT - AMERICAN OPTICAL). O plasma dos tubos foi transferido para duas cubetas, que foram introduzidas no aparelho, e lido o resultado. O valor da bilirrubina total foi calculado como a média das duas aferições. A diferença das duas medidas não deveria ser superior a 95%, caso contrário novo exame deveria ser realizado utilizando-se uma nova amostra de sangue.

ANEXO 5

INVESTIGAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DE G6PD (DESIDROGENASE DE 6-FOSFATO DE GLICOSE)

O Laboratório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP realizou o teste de **BREWER *et al.* (1960)** e a quantificação de G6PD (**BEUTLER, 1975**) nos casos em que o teste de BREWER foi positivo. Para a realização dos exames foram utilizadas amostras de sangue do cordão colhidas em frascos com ACD.

5.1. Teste de BREWER (teste de redução de metemoglobina)

Soluções:

a) Nitrito de sódio/glicose:

6g de glicose (0,28M)

1,25g de nitrato de sódio (0,18M) em 100ml de água destilada

b) Solução de cloreto de azul de metileno

150mg de cloreto de azul de metileno trihidratado "Carlo Erba" em 1000ml de água destilada

Técnica:

Foram adicionados 0,5ml de sangue a tubos identificados pelas letras a, b e c. Após acrescentar 0,05ml da solução de nitrito de sódio/glicose aos tubos b e c e 0,05ml de solução de cloreto de azul de metileno ao tubo c, o sangue foi misturado suavemente com os reagentes e os tubos incubados em banho-maria a

37°C durante três horas. Em seguida, foi transferida numa alíquota de 0,1ml de cada tubo para outros contendo 10ml de água destilada (tubos a', b' e c'). Após a hemólise, a cor do tubo c' (tubo-teste) foi comparada visualmente com a dos tubos a' e b'.

Os casos em que a cor do tubo c' era igual à do tubo a' (vermelho claro) foram considerados normais (teste de BREWER negativo). Já aqueles em que a cor do tubo-teste mostrou-se igual à do tubo b' (marrom acastanhado) foram considerados deficientes em G6PD (teste de BREWER positivo).

O tubo-teste podia revelar ainda uma cor intermediária entre as cores dos tubos a' e b'. Neste caso, o indivíduo foi considerado como deficiente parcial em G6PD.

5.2. Quantificação de G6PD

Preparou-se um hemolisado adicionando-se as hemácias lavadas a uma solução estabilizadora contendo 10μM de NADP, 7mM de β-mercaptoetanol e 2,7mM de EDTA sódico pH=7,0 numa proporção de hemácias: solução estabilizadora igual a 1:19. O material foi homogeneizado e a hemólise obtida por congelamento e aquecimento. Mediu-se então a hemoglobina do hemolisado.

Para a quantificação enzimática foram usados dois tubos, contendo cada um 580μl de água desionizada, 100μl de NADP, 100μl de tampão tris-HCl 1,0M, pH=8,0 e 100μl de MgCl₂ 0,1M. Foram adicionados 20μl de hemolisado em cada tubo, tendo sido incubados a 37°C por 10min. Em seguida, foram colocados 100μl de G6-P (6mM) no tubo-padrão e 100μl de água desionizada no "blank". Leu-se a densidade óptica a 37°C durante dez minutos, em cubetas com percurso óptico de 1cm, em comprimento de onda de 340nm, com auxílio de espectrofotômetro.

A atividade de G-6-PD foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{atividade (U.I.)/g Hb} = \frac{(\Delta \text{ D.O./min}) \cdot 10^5}{6,22 \cdot (\text{Hb}) \cdot (\text{vol. enzima})}$$

- $\Delta \text{ D.O./min}$ =diferença de absorbância por minuto obtida com a leitura após a estabilização da solução.
- Hb=hemoglobina do hemolisado em g/dl.
- vol. enzima=volume do hemolisado colocado nos tubos-padrões e "blank"=20 μ l.

ANEXO 6

DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS SANGÜÍNEOS DO SISTEMA ABO E Rh

De acordo com os procedimentos de rotina do Laboratório de Imunematologia do HEMOCENTRO - UNICAMP, as amostras de sangue periférico ou de sangue do cordão umbilical foram centrifugadas a 2000rpm durante três minutos, para se obter o concentrado de hemácias e o plasma. As hemácias maternas foram lavadas três vezes e as fetais, oito vezes, com salina a 37°C (para a retirada de resíduos da geléia de Wharton do cordão umbilical).

A determinação dos grupos sangüíneos do sistema ABO foi feita através de duas provas: a prova da hemácia ou direta e a prova do soro ou inversa. Na prova de hemácia ou direta foi preparada uma suspensão de hemácias a 10% em salina. Sobre uma placa opaca foi colocada uma gota de cada um dos seguintes anti-soros: anti-AB, anti-A e anti-B, acrescentando-se uma gota da suspensão de hemácias para teste. Os reagentes foram misturados com o fundo de um tubo de ensaio, de forma a se obter um círculo de 2 a 3cm de diâmetro.

A placa foi então agitada com movimentos de rotação durante alguns segundos e, a seguir, lida a reação. Na prova do soro, realizada apenas com as amostras de sangue materno, foram colocadas duas gotas do soro para teste em três regiões da placa, identificadas como "A", "B" e "O", adicionando-se uma gota da hemácia-teste correspondente A₁, B ou O suspensa a 5% em salina. Os reagentes foram misturados com a ajuda do fundo de um tubo de ensaio, formando-se três

círculos de 2 a 3cm de diâmetro. Após agitação da placa com movimentos de rotação, foi lida e anotada a reação.

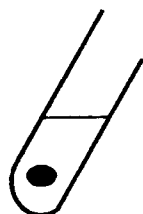
Para a determinação dos grupos sanguíneos do sistema Rh foi feita uma suspensão das hemácias lavadas a 10% em salina. Numa região da placa opaca foram colocadas duas gotas de anti-soro anti-D e uma gota de suspensão de hemácias. Noutra região, foi colocada uma gota de soro-controle Rh (albumina bovina e soro AB) e uma gota de suspensão de hemácias. Os reagentes foram misturados com o auxílio do fundo de um tubo de ensaio. A reação foi lida após agitada a placa por movimentos de rotação.

As amostras de sangue classificadas inicialmente como D-negativo (Rh negativo) foram submetidas à investigação dos genótipos $r'r$ (Cde/cde) e $r''r$ (cdE/cde), bem como da variante D^u . Foram rotulados três tubos: "D", "C" e "CDE". Em cada um deles foi colocada uma gota de suspensão de hemácias a 5% e uma dos seguintes anti-soros: anti-D (no tubo "D"), controle Rh (no tubo "C") e anti-CDE (no tubo "CDE"). Os tubos foram agitados lentamente e incubados a 37°C durante 30 minutos. A seguir, foram centrifugados a 3500rpm durante um segundo e lidos sobre um fundo branco ou aglutinoscópio. Depois as hemácias foram lavadas três vezes com salina, retirando-se toda salina da última lavada. Foram adicionadas então duas gotas de soro antiglobulina humana (soro anti-humano), e os tubos foram submetidos a nova centrifugação e leitura em aglutinoscópio.

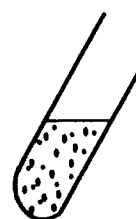
O resultado das reações de aglutinação das hemácias obedeceu à classificação descrita na **FIGURA 2**.

FIGURA 2 - Interpretação da aglutinação, diferenciando-se os graus de reação (observação macroscópica)

SÓLIDO: um grumo sólido com fundo claro



1 cruz (+): poucos grumos pequenos, com fundo róseo



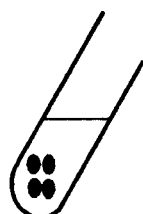
4 cruces(++++):um grumo sólido com poucos grumos pequenos e fundo claro



pó (±): poucos grumos bem pequenos, formando um pó, com fundo bem róseo

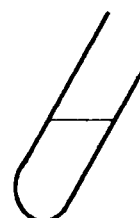
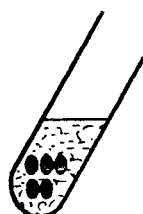


3 cruces (+++): vários grumos grandes com fundo claro



0 cruz (-): reação negativa; suspensão uniforme

2 cruces (++): grumos menores com fundo levemente róseo



ANEXO 7

TESTE DE COOMBS DIRETO E ELUIÇÃO DOS ANTICORPOS ADERIDOS ÀS HEMÁCIAS FETAIS

O teste de COOMBS direto foi realizado rotineiramente em todos os recém-nascidos. Os casos de COOMBS direto positivo foram submetidos à técnica de eluição por congelamento/descongelamento ou técnica de LUI (EICHER *et al.*, 1978) nos casos de incompatibilidade materno-fetal no sistema ABO. Foram utilizadas outras técnicas de eluição quando o par mãe-filho era compatível no sistema ABO, ou quando havia também incompatibilidade no sistema Rh, ou ainda quando um outro anticorpo, que não o anti-A ou anti-B, era encontrado no soro materno.

A eluição consiste da retirada de anticorpos ligados às hemácias fetais, sendo realizado com a finalidade de identificar o anticorpo (BEIGUELMAN, 1983).

Para o teste de COOMBS direto foram utilizadas as mesmas amostras de sangue do cordão umbilical acondicionadas em frascos com ACD, que foram utilizadas para os testes de tipagem sanguínea.

A técnica que descrevemos a seguir é adotada pelo Laboratório de Imunoematologia da UNICAMP.

Após lavar as hemácias oito vezes, foi feita uma suspensão a 5% em salina. Foram rotulados dois tubos. Em ambos foi colocada uma gota de suspensão de hemácias: no primeiro tubo foram acrescentadas duas gotas de soro anti-humano e, no segundo, duas gotas de soro de COOMBS (antigamaglobulina humana). Os

tubos foram agitados e mantidos em incubação à temperatura ambiente durante 15 minutos. Então foram centrifugados e lidos num aglutinoscópio. O COOMBS direto foi considerado positivo quando havia aglutinação em pelo menos um tubo.

De acordo com a técnica de eluição de LUI, as hemácias foram lavadas seis vezes, guardando-se a salina da última lavagem para controle. Duas gotas de hemácias foram adicionadas num tubo e bem misturadas com duas gotas de salina. O tubo foi fechado e girado na posição horizontal, de modo a se formar uma fina camada de hemácias em sua superfície interna. A seguir, foi colocado horizontalmente, à temperatura de cerca de -20°C durante 20 minutos. Foi feito o descongelamento rápido das hemácias colocando-se o tubo em banho-maria a 37°C. O tubo foi centrifugado a 3500rpm durante cinco minutos. Foram transferidas duas gotas do eluato sobrenadante para um tubo limpo e testadas em paralelo com duas gotas do sobrenadante da lavagem final, colocadas num segundo tubo. A cada tubo foi adicionada uma gota de hemácias-testes A₁ ou B (de acordo com o tipo sanguíneo do recém-nascido) e duas gotas de albumina bovina a 22%. Os tubos foram incubados a 37°C durante 30 minutos.

A seguir, as hemácias foram lavadas três vezes com salina, retirando-se bem a salina da última lavagem. Foram acrescentadas duas gotas de soro anti-humano a cada tubo. Depois os tubos foram agitados e centrifugados a 2400rpm durante 15 segundos. A leitura foi feita por leve agitação sobre um aglutinoscópio. A eluição foi considerada positiva quando havia aglutinação visível.

ANEXO 8

PESQUISA DE ANTICORPOS (PAC)

A pesquisa de anticorpos foi realizada no soro materno de todas as mães que compuseram os grupos de estudo e controles. Foram utilizadas as amostras de sangue periférico colhidas em tubos secos.

Após a formação do coágulo, os tubos foram centrifugados a 2000 - 2500rpm durante três e cinco minutos, a fim de se obter o soro. A realização da PAC foi imediata na grande maioria dos casos. Quando isso não foi possível, o soro foi mantido congelado durante um período nunca superior a 24 horas.

Para a realização do exame foram rotulados dois tubos (I e II). Em cada um deles foram colocadas duas gotas do soro para teste. Adicionou-se uma gota de hemácia-teste I (Triacel I-BIOTEST) ao tubo I e uma gota de hemácia-teste II (Triacel II-BIOTEST) ao tubo II, misturando-se delicadamente. O teste foi realizado em quatro fases, anotando-se o resultado das reações de aglutinação das hemácias:

1ª fase: centrifugação dos tubos a 2400rpm durante 15 segundos seguida de leitura.

2ª fase: adição de uma gota de albumina bovina a 22%; centrifugação e leitura.

3ª fase: incubação dos tubos a 37°C durante 30 minutos; centrifugação e leitura.

4ª fase: lavagem das hemácias três vezes; retirada de toda a salina da última lavada; adição de duas gotas de soro anti-humano a cada tubo; centrifugação e leitura.

O resultado da PAC foi considerado positivo quando ocorria aglutinação em pelo menos um tubo, ao menos numa das fases.

Como as hemácias-testes I e II são do grupo O, este exame não identifica a presença de anticorpos do sistema ABO, contudo revela a presença de anticorpos contra antígenos dos outros sistemas sanguíneos.

Os casos com PAC positiva foram eliminados da amostra.

ANEXO 9

FORÇA ANTIGÊNICA DAS HEMÁCIAS FETAIS

As hemácias foram lavadas pelo menos seis vezes e suspensas a 2-3% em salina.

Um volume do anti-soro correspondente (anti-A, anti-B ou anti-H) foi diluído numa série de tubos contendo salina na proporção de 1:2 a 1:1024. A cada tubo foi acrescentado um volume da suspensão de hemácias. Após duas horas de incubação à temperatura ambiente, fez-se a leitura dos tubos sem centrifugá-los.

As aglutinações de cada tubo foram anotadas e o escore determinado pela somatória dos valores de cada reação de acordo com a **TABELA 3**.

ANEXO 10

PESQUISA E TITULAÇÃO DE ANTI-A E ANTI-B IMUNE NO SORO MATERNO E PLASMA FETAL

Após a colheita da amostra de sangue periférico das mães em tubo seco, o soro foi separado e congelado num período nunca superior a seis horas e mantido congelado por até oito meses.

O plasma da amostra de sangue do cordão em alguns casos foi separado após um período de 24 horas ou mais. Isso ocorreu por terem sido utilizadas para o estudo as mesmas amostras de sangue usadas para tipagem sanguínea ou investigação da deficiência de G6PD, dado que o sangue do cordão, colhido da veia umbilical após a dequitação, muitas vezes não pôde ser obtido em volume suficiente para ser fracionado em pelo menos dois frascos.

O plasma também foi mantido congelado por até oito meses.

Em nosso estudo, utilizamos a técnica do DTT, empregada pelo Laboratório de Imunoematologia da UNICAMP.

Previamente foi preparada uma solução de DTT (SIGMA) a 0,01M dissolvendo-se 15,43mg de DTT em 10ml de tampão fosfato salino (pH=7,3). A solução foi dividida em alíquotas de 0,5-1,0ml e mantida congelada a -20°C até o momento do uso.

Em um tubo, a um volume de DTT (0,01M) foi adicionado um volume do soro para teste. Como controle, foi preparado um tubo com um volume de soro e um de tampão (PBS). Os dois tubos (teste e controle) foram incubados a 37°C

durante 30min. A seguir, foram feitas diluições seriadas em salina do soro tratado com DTT. Foi colocado um volume do soro com PBS num tubo rotulado como "controle". A cada tubo, inclusive no tubo-controle, foi adicionado um volume de hemácia-padrão A₁ ou B em suspensão a 2% em salina, de acordo com o grupo sanguíneo do recém-nascido.

As hemácias-padrões foram mantidas congeladas até o momento do uso. Foi colocada uma gota de albumina bovina a 22% em cada tubo e, após leve agitação, os tubos foram incubados a 37°C durante 30min. A seguir, as hemácias foram lavadas três vezes com salina, retirando-se toda a salina da última lavagem. A cada tubo foi adicionada uma gota de soro de COOMBS. Após agitar os tubos, eles foram centrifugados a 2400rpm durante 15s. A leitura dos tubos foi feita num aglutinoscópio. O valor do título foi o correspondente ao do último tubo em que ocorreu aglutinação visível (pó).

Como a IgM não atravessa a barreira placentária, e, portanto, não é encontrada no sangue fetal, apenas o soro materno foi tratado com DTT. Por dificuldades técnicas, não foram feitas diluições do soro materno não tratado com DTT. Contudo, o DTT em uso foi testado após o término das titulações com anti-soro anti-A e anti-B comerciais.

Como o soro materno foi diluído ao ser empregado o DTT, considerou-se o título de 1:4 em diante na pontuação do escore (ver TABELA 3).

ANEXO 11

CONGELAMENTO DE HEMÁCIAS EM GLICEROL

O método de congelamento pelo glicerol possibilita a preservação das hemácias por mais de um ano.

O método descrito a seguir é utilizado pelo Laboratório de Imunoematologia do HEMOCENTRO - UNICAMP.

Foram utilizados os seguintes reagentes:

1. Glicerol tamponado a 40%

19,4g de citrato de potássio tribásico ($K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$)

3,1g de fosfato de sódio monobásico ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)

2,8g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)

600ml de água destilada

Após dissolução foi adicionado 400ml de glicerol ($C_3H_5[OH]_3$).

2. Citrato trissódico a 5%

50g de citrato trissódico ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)

1000ml de água destilada (q.s.p.)

Em menos de 24h, as amostras de sangue colhido em ACD foram lavadas três ou mais vezes com solução salina. O concentrado de hemácias foi dividido em aliquotas de cinco gotas. Para cada gota de hemácias foi adicionada uma gota de glicerol tamponado a 40%, agitando-se o tubo constantemente. Após misturar bem, as aliquotas foram identificadas e congeladas a $-20^\circ C$.

No momento do uso, as alíquotas foram descongeladas a 37°C. Para cada um volume de hemácias foram adicionados quatro volumes da solução A (TABELA 5). Após misturar bem, os tubos foram centrifugados a 2000rpm durante cinco minutos e foi descartado o sobrenadante.

As hemácias foram lavadas da mesma maneira com as soluções B, C e D (TABELA 5) e, a seguir, procedeu-se à lavagem com solução salina preaquecida a 37°C até que o sobrenadante ficasse límpido.

TABELA 5 - Soluções para desglicerinização

	SOLUÇÃO			
	A	B	C	D
Concentração	12%	5%	2,5%	-
Glicerol tamponado a 40%	12ml	5ml	2,5ml	-
Citrato trissódico a 5%	88ml	95ml	97,5ml	50ml
Salina isotônica	-	-	-	50ml

E R R A T A

TESE: " ESTUDO DA FORÇA ANTIGÊNICA DAS HEMÁCIAS FETAIS, DO TÍTULO DOS ANTICORPOS IMUNES MATERNOS E DOS FENÓTIPOS DO SISTEMA SECRETOR NA INCOMPATIBILIDADE ABO MATERNO-FETAL"

AUTORA: MARIA HELENA BAENA DE MORAES LOPES

PÁGINA

- 7 GARDAS & KOŚCIELAK (1971)
- 55 (linha 9) conservadas
- 62 (tabela 8) Frequências observadas e esperadas de pares mãe-filho entre as mães "brancas" de acordo com o grupo sanguíneo do sistema ABO
- 73 (tabela 15, RN sem incompatibilidade Rho e sem icterícia) 363
- 74 (linha 27) ...($\chi^2_1 = 6,433$; $P < 0,02$) (TABELA 18)
- 85 (linha 9) ...14 mães (48,3%)
- 91 (linha 11) ...não se verificou ...
- 96 (linha 2) ...aumento de genes A de origem paterna entre os filhos ...
- 112 (linha 6) BEIGUELMAN, B. O sistema ABO. In: _____. Farmacogenética e sistemas sanguíneos eritrocitários. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p.100-111.
- 112 (linha 9) ... test de Coombs en la incompatibilidad ABO ...