

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/8890
IB/80505

DOUTORADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1987

ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA
DEFICIÊNCIA DE DESIDROGENASE DE 6-FOSFATO DE GLICOSE (G-6-PD)
EM RECÉM-NASCIDOS BRASILEIROS

*Este exemplar corresponde à redação final da
Tese defendida pela candidata Célia Regina Garlipp
e aprovada pela Comissão julgadora.*

Antonio Sérgio Ramalho

22/Nov./1987

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção de título de Doutor
em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho

Campinas

1987

Classif.	T
Author	6184a
V	
Index	8890
1B	/745

1B/80505
34/8890

Orientador: Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho,
Professor Adjunto do Departamento
de Genética Médica da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas.

Ao Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho,
meu exemplo maior de honestidade e
rigor científico, dedico este
trabalho que não teria passado de
sonho, sem seu estímulo, sua amizade
e confiança em mim.

Aos meus pais,

"O laço que une a verdadeira
família não é de sangue,
mas de respeito e alegria
pela vida um do outro"

- meu mais profundo reconhecimento
por me ensinarem a compreender
e a viver plenamente o sentido
das palavras deste verso.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Dr. Djalma Thomaz da Silva Filho - cujo interesse e dedicação às crianças deram origem à dúvida que tornou possível este trabalho.

Aos funcionários do Serviço de Líquidos Biológicos da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP - pela compreensão, apoio e auxílio prestados durante esta longa etapa.

AGRADECIMENTOS

A execução deste trabalho não teria sido possível se não houvésssemos contado com a colaboração e amizade de muitas pessoas.

Não tendo palavras que possam expressar com justiça a minha gratidão para com todos e a cada um, limito-me a mencioná-los na certeza de ser compreendida.

- Prof. Dr. Bernardo Beiguelman, Professor Titular - Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Profa. Dra. Cecília Mattos Ulson, Professor Adjunto - Chefe do Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Profa. Dra. Lêda Luzia Alves de Sena, Laboratório de Genética - Departamento de Biologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte;
- Prof. Dr. Luís Alberto Magna - Chefe do Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Prof. Dr. Luiz Sebastião Prigenzi - Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;

- Prof. Dr. Orlando César de Oliveira Barretto - Professor Livre-Do-cente - Laboratório de Pesquisas Hematológicas, Laboratórios de Investigações Médicas do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;
- Prof. Dr. Robert Wayne Slenes - Departamento de História, Universidade Estadual de Campinas;
- Profa. Dra. Solange Bento Farah - Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Profa. Denise Yvonne Janovitz Norato - Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Dra. Paula Virgínia Bottini - Serviço de Líquidos Biológicos, Divisão de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Dr. Abimael Aranha Neto - Serviço de Neonatologia, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Dra. Lígia Bailloní Narbot - Serviço de Neonatologia, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;

- Dra. Maria Aparecida Brenelli - Serviço de Neonatologia, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Bibliotecária Ana Gagliardi - Diretora Técnica, Biblioteca do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas;
- Bibliotecária Marisabel Regina Rodrigues do Amaral - Diretora Técnica, Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Bióloga Paula Sílvia Gonçalves da Cunha Martins - Serviço de Microbiologia, Divisão de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Farmacêutica-bioquímica Kimiyo Nonoyama - Laboratório de Pesquisas Hematológicas, Laboratório de Investigações Médicas, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;
- Psicóloga Beatriz Rocha Brito Gerim - Instituto de Análise do Comportamento, Campinas;
- Sr. Djalma Garcia Gonçalves - Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas;
- Sra. Ed: Lúcia Sartorato - Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;

- Sr. Emílio Sambo Júnior - Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Sra. Inára Ignacchitti de Sena - Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Sra. Lucila Freire - Laboratório de Pesquisas Hematológicas, Laboratórios de Investigações Médicas, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;
- Srta. Maria Cláudia Furlan - Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Srta. Nanci das Neves - Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Sra. Sílvia Concettina Margarete Panebianco - Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
- Sra. Sônia Aparecida Alípio dos Santos - Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas e,
- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética.

INDICE

	pg.
I. INTRODUÇÃO	
I.1. A desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD)	01
I.2. A deficiência de G-6-PD	10
I.3. Deficiência de G-6-PD e icterícia neo-natal	17
II. OBJETIVOS	24
III. CASUÍSTICA E MÉTODOS	26
IV. RESULTADOS	34
V. DISCUSSÃO	40
VI. RESUMO E CONCLUSÕES	53
VII. SUMMARY	57
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. A desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD)

A desidrogenase de 6-fosfato de glicose, também conhecida pela sigla G-6-PD (do inglês *glucose-6-phosphate dehydrogenase*) ou pela notação NADP oxidoreductase de 6-fosfato de D-glicose (EC 1.1.1.49), é uma enzima amplamente distribuída entre quase todos os organismos e tecidos. Nos seres humanos, apesar de sua ampla distribuição, a G-6-PD exerce função muito importante no metabolismo das hemácias, onde atua em uma das vias metabólicas utilizadas por estas células para a obtenção de energia.

Como é sabido, a hemácia é muito diferente de todas as outras células, pois não possui núcleo, mitocôndrios, ribossomos e aparelho de Golgi, não tem capacidade de divisão e não sintetiza DNA e RNA. Tais características acarretam a essa célula algumas restrições metabólicas, tornando-a incapaz, por exemplo, de sintetizar proteínas ou de obter energia a partir do ciclo de Krebs. Para tanto, ela se utiliza do metabolismo da glicose, valendo-se do ATP (trifosfato de adenosina) produzido durante a glicólise. Contudo, apesar de suas deficiências, a hemácia é uma célula complexa e metabolicamente ativa, cuja integridade é mantida por três unidades celulares em interação: a hemoglobina, a membrana celular e os elementos solúveis intracelulares, principalmente enzimas, coenzimas e substratos do metabolismo da glicose. Estas unidades são aquelas que capacitam a hemácia a desenvolver suas funções primárias de transporte de oxigênio e de dióxido de carbono (OSKI & NAIMAN, 1972).

A ausência de depósitos de glicogênio na hemácia normal faz com que essa célula necessite de suprimento constante de carboidrato para a obtenção da energia necessária a mantê-la funcionalmente ativa e em circulação durante um período aproximado de 120 dias. Embora o carboidrato preferido na produção de energia seja a glicose, a hemácia também pode metabolizar outros açúcares tais como a frutose, a manose e a galactose (OSKI & NAIMAN, 1972).

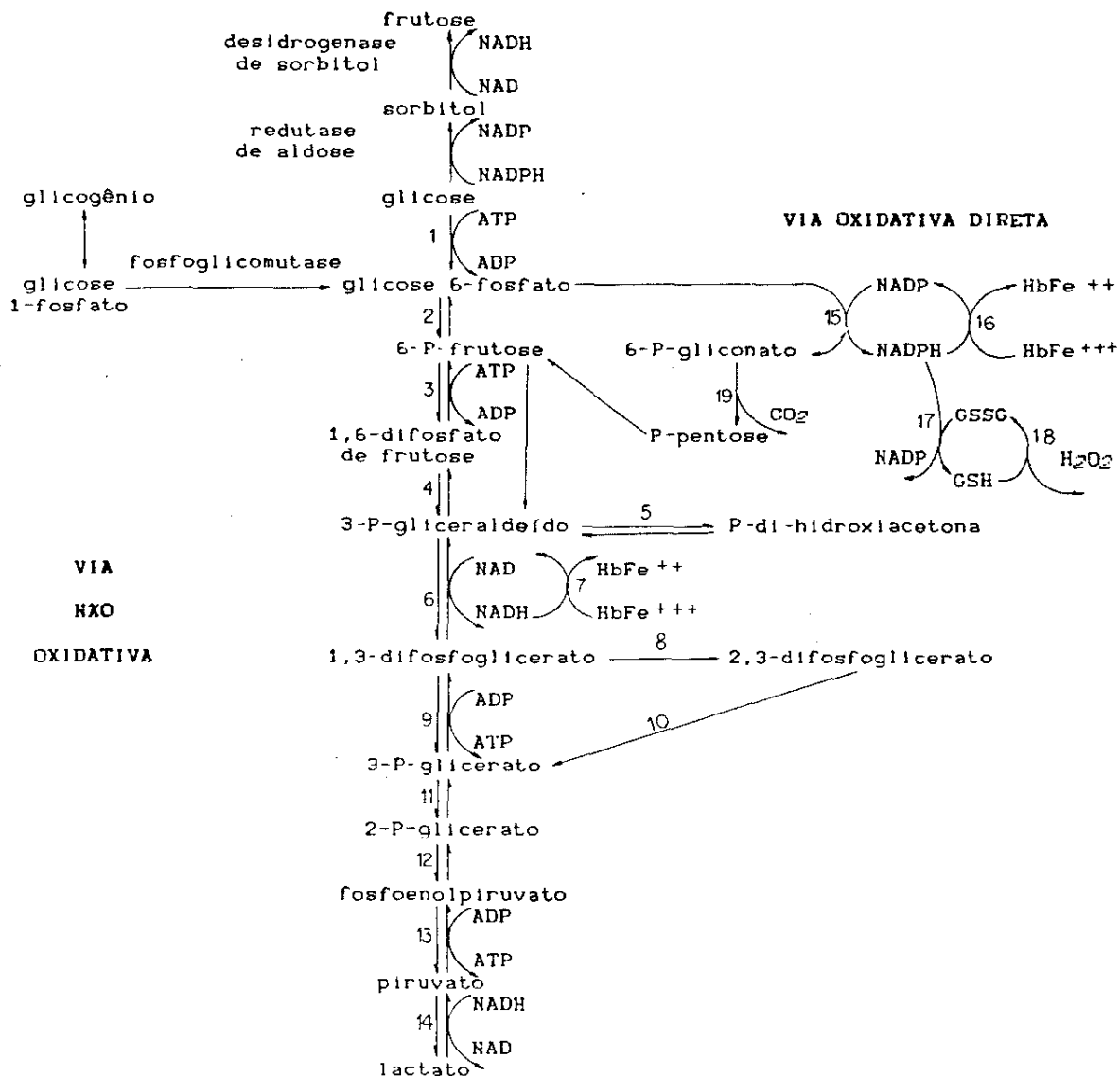
A glicose penetra facilmente nas hemácias, quase independentemente da sua concentração extracelular e, uma vez dentro da célula, é fosforilada a glicose-6-fosfato ou reduzida a seu derivado poliol (o sorbitol) que é então convertido a frutose.

A seguir, a glicose-6-fosfato formada é metabolizada por intermédio de uma das 3 vias metabólicas seguintes:

1. Via metabólica anaeróbica de Embden-Meyerhof, que conduz à formação de piruvato e lactato e na qual são produzidos o trifosfato de adenosina (ATP), que fosforila proteínas da membrana e fornece energia para a bomba de sódio e potássio, e a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), que é importante para manter o potencial redutor intracelular;
2. Via metabólica da pentose-fosfato ou via oxidativa direta, que produz dióxido de carbono e uma pentose fosforilada a qual após uma série de rearranjos moleculares, retorna à via de Embden-Meyerhof;
3. Conversão de glicose-6-fosfato a glicose-1-fosfato e eventualmente, a glicogênio (OSKI & NAIMAN, 1972) (Fig. 1).

Em condições normais, 90% da glicólise é feita nas hemácias pela via de Embden-Meyerhof e 10% pela via oxidativa direta.

Fig. 1 - ESQUEMA DO METABOLISMO DA GLICOSE NAS HEMACIAS HUMANAS
(OSKI & NAIMAN, 1972; BEIGUELMAN, 1983).



1) hexoquinase; 2) isomerase de 6-P-glicose; 3) fosfofrutoquinase; 4) aldolase; 5) isomerase de 6-fosfato de triose; 6) desidrogenase de 3-P-gliceraldeído; 7) NADH redutase de metemoglobina; 8) difosfogliceromutase; 9) fosfogliceratoquinase; 10) fosfato de difosfoglicerato; 11) fosfogliceratomutase; 12) enolase; 13) piruvatoquinase; 14) desidrogenase láctica; 15) desidrogenase de 6-fosfato de glicose; 16) NADPH redutase de metemoglobina; 17) redutase de glutatíon; 18) peroxidase de glutatíon; 19) desidrogenase de 6-fosfogliconato.

A via oxidativa direta, também conhecida por via metabólica da pentose-fosfato ou via metabólica das hexoses monofosfatadas (HMP), é o principal caminho metabólico alternativo da glicólise no glóbulo vermelho. Por esse meio, a glicose-6-fosfato sofre descarboxilação oxidativa, com liberação de dióxido de carbono.

No primeiro passo desse caminho, a glicose-6-fosfato é oxidada a 6-fosfogliconolactona, reação essa catalisada pela G-6-PD. A seguir, a 6-fosfogliconolactona é hidrolisada a 6-fosfogliconato, que é então oxidado a ribulose-5-fosfato na presença de desidrogenase 6-fosfoglicônica, com a produção de dióxido de carbono.

Na via oxidativa direta, as reações catalisadas pelas enzimas desidrogenase de 6-fosfato de glicose e desidrogenase 6-fosfoglicônica requerem como cofator essencial o fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP) que atua como receptor de íons de hidrogênio, resultando no aparecimento do fosfato reduzido de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH).

Após a produção de ribulose-5-fosfato, as reações que se seguem são agora não-oxidativas, isto é, a ribulose-5-fosfato formada retorna à via de Embden-Meyerhof (OSK1 & NAIMAN, 1972).

O papel mais importante da via oxidativa direta é, sem dúvida alguma, a geração de NADPH, substância redutora essencial sobretudo à manutenção do glutatião em estado reduzido (GSH), uma vez que a redutase de glutatião oxidado (GSSG) requer NADPH como coenzima.

O GSH, por sua vez, é fundamental à manutenção da estabilidade da hemoglobina e das enzimas intracelulares e à proteção de lípidos da membrana contra a peroxidação, além de constituir a principal fonte de grupos sulfidrila no interior da hemácia (JANDL & ALLEN,

1960; JAFFÉ, 1970; OSKI & NAIMAN, 1972). Tal composto é imprescindível, portanto, à defesa das hemácias contra a agressão de agentes oxidantes que atuam principalmente sobre os grupos sulfidrílicos ativos de varias enzimas eritrocitárias do citoplasma e da membrana, além do grupo sulfidrílico da posição β^{93} da hemoglobina, favorecendo a hemólise.

Esses agentes oxidantes, que podem ser de origem endógena ou exógena, são representados sobretudo pelo peróxido de hidrogênio e, provavelmente, por outros peróxidos orgânicos gerados durante processos infecciosos, pela ação de drogas ou mesmo durante alguns processos metabólicos normais (COHEN & HOCHSTEIN, 1964; BAEHMER *et al*, 1971). Os alvos iniciais da oxidação são o GSH, os grupos sulfidrílicos de proteínas, o heme e possivelmente os lípides.

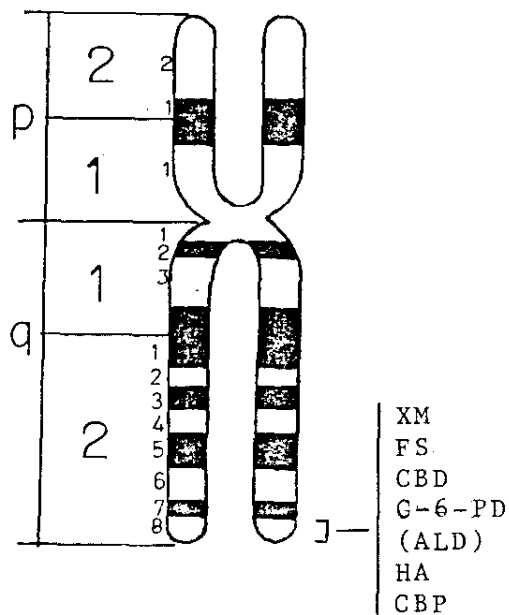
A oxidação do ferro na forma ferrosa (Fe^{++}) dos grupos heme da hemoglobina para a forma férrica (Fe^{+++}) leva à formação de metemoglobina, que é um pigmento sem função respiratória. Para evitar um acúmulo de metemoglobina no seu interior, a hemácia é dotada de um sistema de redutases de metemoglobina, sendo a principal dessas enzimas dependente de NADH (NADH redutase de citocromo b5; E.C.1.6.2.2), havendo também outras redutases dependentes de NADPH. A via das pentoses é responsável por 17% da redução da metemoglobina, sendo 12% pela ação da redutase de glutatíão e 5% pela ação da NADPH-redutase de metemoglobina (BEUTLER, 1983). Ambas as enzimas são evidentemente dependentes do NADPH sendo estimuladas, em pessoas não deficientes de G-6-PD, pelo azul de metileno e pela cistamina. A redutase de glutatíão é estimulada também pela riboflavina, sendo a coenzima FAD (flavina-adenina dinucleotídeo) necessária à perfeita ação dessa enzima.

Frente ao exposto, pode-se concluir que a atividade normal da G-6-PD é indispensável à manutenção da integridade das hemácias e que uma deficiência acentuada dessa enzima pode produzir alterações metabólicas muito sérias, sobretudo na presença de substâncias oxidantes. A principal consequência destas alterações metabólicas é a hemólise, determinada fundamentalmente pela precipitação da hemoglobina e formação de corpúsculos de Heinz (ALLEN & JANDL, 1961), pela oxidação dos grupos tiol das enzimas citoplasmáticas e da membrana celular (JACOB & JANDL, 1962; 1966) e secundariamente, pela peroxidação de lípidos da membrana (BENATTI *et al*., 1981).

Nos seres humanos, a G-6-PD tem a sua síntese determinada por um gene (Gd) localizado na região subtelomérica do braço longo do cromossomo X (RACE & SANGER, 1975), mais precisamente na região da banda Xq 28 (PAI *et al*., 1980). Ele faz parte de um grupamento denominado G-6-PD daltonismo, cujos genes, de acordo com os estudos de KEATS (1983), estariam na seguinte disposição: XM-deutan daltonismo-G-6-PD-hemofilia A-protan daltonismo-q terminal (Fig. 2).

Descobertas recentes permitiram o reconhecimento quase completo da sequência dos aminoácidos da G-6-PD do eritrócito humano (BEUTLER, 1983), porém o fato de a elucidação da estrutura primária da G-6-PD ainda não estar totalmente esclarecida constitui um obstáculo ao prosseguimento dos estudos moleculares a respeito dessa enzima. De fato, em seres humanos, o objetivo da maioria das pesquisas ainda tem recaído sobre a identificação de mutações que comprometem em maior ou menor grau a função da G-6-PD. Estas mutações poderiam explicar em detalhes quais resíduos dentro da molécula enzimática são fundamentais às ligações desta aos substratos e/ou aos inibidores específicos e, ac

Fig. 2 - DIAGRAMA DO CROMOSSOMO X HUMANO MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DO GRUPAMENTO G-6-PD DALTONISMO NA REGIÃO DA BANDA Xq28 (SANDBERG, 1980; KEATS, 1983, modificado por LUZZATTO, & BATTISTUZZI, 1985).



XM-uma proteína plasmática
 FS-sítio frágil
 CBD-daltonismo deutan
 ALD-leucodistrofia adrenal
 HA-hemofilia A
 CBP-daltonismo protan

mesmo tempo, com uma maior quantidade de informações sobre a organização dos genes, poder-se-ia estabelecer as diferenças existentes a nível de DNA entre as muitas variantes de G-6-PD associadas à deficiência da atividade enzimática.

Trabalhos nesse sentido levaram ao isolamento de um clone de cDNA da G-6-PD humana (PERSICO *et al*, 1981) que tem sido usado na triagem de uma biblioteca genômica humana para a detecção das sequências homólogas ao gene Gd. Assim, o completo esclarecimento sobre a estrutura deste gene ainda não foi conseguido embora os estudos continuem em andamento.

A maioria dos seres humanos possui G-6-PD com atividade normal porém, em algumas populações, o número de indivíduos que apresentam G-6-PD com atividade alterada pode ser bastante elevado. De fato, estudos bioquímicos da G-6-PD permitiram reconhecer até 1982 um total de 279 variantes genéticas dessa enzima. Dentre estas, a variante com atividade normal mais comumente encontrada nos seres humanos é a denominada variante B. Quase que a metade dessas variantes de G-6-PD, entretanto, não apresentam interesse clínico, seja porque não exibem atividade deficiente, seja porque a deficiência que manifestam é pequena. É o caso, por exemplo, da variante A de G-6-PD, encontrada em cerca de 20% dos homens negróides, que pode apresentar desde 80% da atividade da variante B até atividade igual à dela (YOSHIDA, 1967; BEIGUELMAN, 1983).

O grande número de variantes de G-6-PD determinadas bioquimicamente tem proporcionado análises detalhadas de várias características da enzima e, atualmente, pensa-se que a maioria das variantes genéticas apareceram por intermédio de pontos de mutação que leva-

ram à simples substituição de aminoácidos. Uma prova direta de tal evento, no entanto, foi conseguida somente em poucas variantes, como é o caso, por exemplo, da variante A, onde houve uma substituição do ácido aspártico por asparagina (YOSHIDA, 1967) e da variante Hektoen, onde uma tirosina foi substituída pela histidina (YOSHIDA, 1970).

As variantes de G-6-PD são, regra geral, designadas por nomes geográficos, que indicam a localidade onde foram descobertas ou a região de procedência dos portadores da variedade enzimática (Ohio, Hong Kong, Minas Gerais, etc). Apenas três variantes de G-6-PD são designadas por letras, ou seja, as variantes B e A e a variante A^- , também chamada Africana por ser frequente entre indivíduos negróides.

Em vista disso, os genes determinantes das variantes B, A e A^- são representados por GdB, GdA e Gd A^- , enquanto que os outros alelos são simbolizados pelas letras Gd encimadas pelo nome da variante, como, por exemplo, Gd^{Ohio}, Gd^{Minas Gerais} e outras (BEIGUELMAN, 1983).

No que concerne ao fenótipo dos indivíduos do sexo masculino, aqueles que não têm atividade deficiente de G-6-PD são indicados pela notação Gd(+) acompanhada de vírgula e seguida da indicação da variante. Assim, os homens com a variante B ou A terão seu fenótipo representado por Gd(+),B ou Gd(+),A. Aquelles com atividade deficiente têm seu fenótipo indicado por Gd(-) seguido de vírgula e da designação da variante como no caso de Gd(-), A^- ; Gd(-), Mediterrânea, etc. No que concerne à notação fenotípica atribuída às pessoas do sexo feminino, deficientes ou não de G-6-PD, ela não difere daquela dada às pessoas do sexo masculino. Contudo, quanto à notação genotípica para essas mesmas pessoas, a maioria dos autores costuma separar os dois ge-

nes determinadores de G-6-PD por um traço oblíquo. Assim, por exemplo, tem-se Gd^B/Gd^B , Gd^B/Gd^A , Gd^A/Gd^{A^-} , $Gd^B/Gd^{Mediterrânea}$, etc. Entretanto, nas heterozigotas de genes determinadores de variantes deficientes, com tais genes mostrando alguma expressão fenotípica, adota-se o símbolo $Gd(\pm)$. Assim, se uma heterozigota Gd^A/Gd^{A^-} apresentar uma deficiência parcial de G-6-PD, seu fenótipo será indicado por $Gd(\pm), A, A^-$. Visto que entre as heterozigotas também é possível o encontro daquelas com expressão fenotípica de uma das homozigotas, então o genótipo heterozigoto poderá ser responsável por três tipos de expressão fenotípica, como por exemplo: o genótipo Gd^A/Gd^{A^-} poderá resultar nos fenótipos $Gd(+), A, A^-$, $Gd(\pm), A, A^-$ ou $Gd(-), A^-$; do mesmo modo as heterozigotas Gd^B/Gd^{A^-} poderão ter fenótipo $Gd(+), B, A^-$ e $Gd(-), A^-$ (BEIGUELMAN, 1983).

1.2 - A deficiência de G-6-PD

Das centenas de variantes de G-6-PD descritas, algumas dezenas têm atividade normal ou muito pouco deficiente, não estando por isso associadas a manifestações clínicas significativas. Por outro lado, cerca de 179 variantes genéticas mostram atividade muito deficiente e estão ou não associadas à anemia hemolítica crônica não esferocítica constitucional, enquanto que as restantes, apesar de sua pequena atividade enzimática, somente estão associadas à hemólise quando os indivíduos que as possuem são expostos a fatores desencadeantes desse processo. A Tabela I mostra alguns dados a respeito das variantes de G-6-PD, bem como a sua classificação (LUZZATTO & BATTISTUZZI, 1985).

De acordo com YOSHIDA e colaboradores (1971) as variantes de G-6-PD podem ser agrupadas em cinco classes, a saber:

Classe I - Variantes deficientes associadas à anemia hemolítica crônica.

Classe II - Variantes com deficiência grave da atividade enzimática (menos de 10% da atividade normal).

Classe III - Variantes com deficiência moderada ou suave da atividade enzimática (10% a 60% da atividade normal).

Classe IV - Variantes com deficiência muito suave da atividade enzimática ou sem deficiência (60% a 100% da atividade normal).

Classe V - Variantes com atividade enzimática aumentada (mais que o dobro da atividade normal).

Do ponto de vista clínico são mais importantes, evidentemente, as variantes com atividade deficiente decorrentes de mutações que determinam a diminuição da síntese enzimática, ou a produção de moléculas com atividade catalítica diminuída ou ainda, a produção de moléculas instáveis. Dentre essas variantes deficientes, são particularmente importantes as das classes II e III, uma vez que as da classe I, apesar de seu significado médico, são muito raras nas populações.

A importância dada às variantes das classes II e III deve-se ao fato de elas poderem provocar crises hemolíticas em seus portadores, quando os mesmos são expostos a determinados agentes desencadeantes, tais como drogas, favas, acidose diabética, hipoglicemia (SHALEV *et al*, 1985), ou infecções, como o especificado na Tabela II.

Estudos recentes visando elucidar a razão pela qual alguns indivíduos são susceptíveis somente à hemólise induzida, enquanto

Tabela I - Classificação e número de variantes de G-6-PD (LUZZATTO & BATTISTUZZI, 1985).

CLASSE	ESPORADICAS	POLIMÓRFICAS	TOTAL
II. Deficiência enzimática grave com anemia hemolítica crônica	79	0	79
III. Deficiência enzimática grave	54	46	100
III. Deficiência de moderada a suave	40	25	65
IV. Atividade enzimática normal	17	16	33
V. Atividade enzimática aumentada	2	0	2
T O T A L	192	87	279

Tabela II - Fármacos que podem produzir crises hemolíticas em indivíduos com deficiência de G-6-PD.

EMPREGO	FARMACOS
Analgésicos e Antipiréticos	Acetanilida, acetofenetidina*, ácido acetil salicílico*, aminopirina (C), antipirina (C)
Antibacterianos sulfonamídicos e sulfônicos	Diaminodifenilsulfona (DDS), salicilazulfapiridina (Azulfadina), sulfacetamida, sulfadiazina, sulfameracina, sulfametoxipiridazina, sulfanilamida, sulfapiridina, sulfatiazol, sulfisoxazol (Gantrisona), sulfoxona, tiazolsulfona
Antibacterianos não sulfônicos	Ácido p-aminosalicílico (PAS), cloranfenicol, furadantina (Nitrofurantoína), furaltodona (Altotur), furazolidona, nitrofurazona (Furacina)
Antimaláricos	Pamaquina, pentaquina, primaquina, quinacrina, quinina, quinidina (C)
Diversos	Ácido ascórbico*, ácido nalidíxico, azul de metileno*, dimercaprol (BAL), fenilhidrazina, naftalina, nitritos*, trinitrotolueno, vitamina K sintética*

(C) - Apenas em indivíduos com a variante Mediterrânea.

* - Quando associados a infecções e outros fatores predisponentes, como doenças crônicas (BEIGUELMAN, 1979).

outros manifestam anemia hemolítica crônica não esferocítica, apontam na direção de que esse fato deve residir primariamente nas propriedades de cada variante individual de G-6-PD. Enquanto algumas das propriedades mais relevantes já foram identificadas, outras constituem-se ainda em objeto de estudo, como é o caso das propriedades decorrentes das anormalidades de membrana.

Assim não restam dúvidas que a sequência de eventos que levam à hemólise induzida esteja relacionada à incapacidade da célula em se proteger com o consumo de glutatíão sob stresse oxidativo. No entanto, a sequência de eventos que conduzem à hemólise crônica apenas começa a ser elucidada. É o caso, por exemplo, dos resultados obtidos a partir de análises das membranas protéicas das hemácias. Assim, enquanto que nas hemácias Gd(-) sem hemólise crônica parece não haver alterações de membrana, em quatro diferentes variantes Gd(-) associadas à anemia hemolítica crônica não-esferocítica foram constatadas tais alterações, apresentando a membrana celular agregados polipeptídicos incomuns, de alto peso molecular. Pode-se distinguir duas espécies distintas desses agregados, uma consistindo de espectrina e outra contendo espectrina associada a outras proteínas não globínicas (LUZZATTO & BATTISTUZZI, 1985).

Uma vez que esses agregados podem ser destruídos pelo mercaptoetanol, sugeriu-se que eles apareceriam através da formação de pontes dissulfídicas intermoleculares, as quais seriam normalmente evitadas pelo glutatíão reduzido. Sugeriu-se também que essas alterações de membrana poderiam ser as responsáveis pelas propriedades físicas alteradas dos eritrócitos Gd(-), como capacidade de filtração reduzida, por exemplo, e pela viscosidade bastante diminuída da membrana

que é observada nas células Gd(-) com anemia hemolítica crônica não-esferocítica.

Dentre as variantes da classe II, merece especial destaque a variante Mediterrânea, que é encontrada mais usualmente em italianos, principalmente da Sardenha e da Sicília, em gregos, judeus orientais, árabes, persas e hindus. Já o exemplo mais ilustrativo da variante de G-6-PD da classe III é, sem dúvida alguma, o fornecido pela variante Africana ou A⁻, bastante frequente em populações negróides.

As hemácias jovens ou velhas que contêm a variante Mediterrânea da G-6-PD apresentam uma atividade enzimática muito pequena, variando de 0% a 7% do normal, sendo por essa razão, muito susceptíveis à ação hemolítica de drogas, favas e outros fatores. A mobilidade eletroforética dessa variante é semelhante à da enzima B normal e as suas constantes de Michaelis para a G-6-P e para a NADP situam-se entre 19 e 26 e 1,2 e 1,6, respectivamente. A sua estabilidade está diminuída frente ao calor e é sorologicamente distinguível da variante B normal (KIRKMAN *et al*, 1965; W.H.O., 1967).

Já a variante Africana ou A⁻ de G-6-PD apresenta, em hemácias com mais de 50 dias, atividade entre 8% e 20% da normal. Sua migração eletroforética é mais rápida que a da enzima normal e suas constantes de Michaelis para G-6-P e para a NADP são normais. Além disso, ela apresenta estabilidade normal frente ao calor, não se distingue sorologicamente da variante B e sua atividade é praticamente normal nos eritrócitos mais jovens (BEUTLER, 1983).

Como já foi comentado anteriormente, cerca de 20% dos homens negróides apresentam uma variante de G-6-PD da classe IV, denominada variante A, cuja migração eletroforética é mais rápida que a da enzima normal, mas cuja atividade enzimática é apenas um pouco menor que dessa última (80% a 100% da atividade normal). Como decorrência de sua atividade enzimática praticamente normal, os portadores dessa variante da G-6-PD não manifestam alterações clínicas, não sendo sensíveis ao efeito hemolítico de medicamentos (BEIGUELMAN, 1983).

De todas as variedades de G-6-PD com atividade deficiente, as que mostram maior importância pela sua frequência, são as variantes Negróide, Africana ou A⁻, a variante Mediterrânea e a variante Cantão, frequente no Sul da China.

Nas populações negróides e caucasóides brasileiras, a frequência da deficiência de G6-PD pode alcançar proporções consideráveis entre os homens. De fato, estudos realizados em diferentes regiões do Brasil constataram entre os homens negróides prevalências de deficientes de G-6-PD em torno de 10%. Já entre os homens caucasóides dos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, foram encontradas frequências de deficientes de G-6-PD em torno de 2% (BEIGUELMAN, 1968; RAMALHO & BEIGUELMAN, 1976; HUTZ *et al*, 1977; WEIMER *et al*, 1981; BEIGUELMAN, 1983; SENA, 1983; RAMALHO, 1986a). As variantes deficientes mais comumente encontradas nesses estudos brasileiros foram, evidentemente, a Negróide ou A⁻ e a Mediterrânea, embora também tenham sido observadas algumas variantes raras de G-6-PD. Além disso, foram descritas em nosso país novas variantes dessa enzima, como é o caso das variantes Minas Gerais (AZEVEDO & YOSHIDA, 1969) e Porto Alegre (HUTZ *et al*, 1977) além, possivelmente, da variante Guaíba (WEIMER *et al*, 1981).

Analisando a literatura nacional a respeito da deficiência de G-6-PD, constata-se que, apesar do grande número de trabalhos publicados, ainda são poucos os que abordaram os aspectos médicos desse tema. De fato, as únicas avaliações de morbidade dessa enzimopenia em populações brasileiras foram as realizadas por AZEVEDO e colaboradores (1978) entre homens negróides de Salvador, BA e por SENA & RAMALHO (1985) entre homens negróides e caucasóides de Campinas, SP. No estudo realizado em Salvador, os autores concluíram que a deficiência de G-6-PD não é suficientemente grave no Nordeste do Brasil para provocar um aumento significativo do número de hospitalizações entre os seus portadores, embora seja capaz de causar icterícia clinicamente detectável. Da mesma forma, os resultados obtidos por SENA & RAMALHO, indicam que a deficiência de G-6-PD não determina o aparecimento de alterações clínicas graves na maioria dos enzimopênicos da região de Campinas. Nesse estudo pôde-se constatar ainda que, embora os deficientes de G-6-PD mantenham contacto frequente com fatores ambientais potencialmente hemolíticos, tais como naftalina, sulfas e outros medicamentos, a intensidade do contato parece ser insuficiente para desencadear, na maioria dos casos, hemólise importante.

A baixa morbidade da deficiência de G-6-PD observada nesses estudos realizados em Salvador e Campinas deve-se, em grande parte, ao fato de a maioria dos deficientes examinados apresentar a variante Africana ou A⁻ da enzima, mais benigna, pois a deficiência enzimática está limitada às hemácias com mais de cinquenta dias.

Um aspecto clínico importante da deficiência de G-6-PD, se bem que ainda bastante controvertido, é o da transfusão de sangue de doadores enzimopênicos. Embora os autores não sejam unânicos em

contra-indicar tal procedimento, é inegável a existência de um risco, pelo menos teórico, de destruição das hemácias deficientes transfundidas a receptores medicados com drogas capazes de desencadear a hemólise. Além disso, existem evidências de diminuição da viabilidade das hemácias deficientes durante a estocagem do sangue (ORLINA *et al*, 1970). Também nesse caso, a transfusão de hemácias com a variante Mediterrânea de G-6-PD oferece maiores riscos ao receptor, uma vez que, na variante A⁻, a hemólise está limitada às hemácias mais velhas.

Em um estudo realizado na cidade de Campinas, a frequência de reações pós-transfusionais não foi significativamente maior entre receptores que haviam sido transfundidos com sangue Gd(-), A⁻ do que a observada entre 133 controles que haviam recebido hemácias Gd(+) (RAMALHO, SENA & VENTURELLI, 1985). Isso talvez se deva ao fato de a maioria dos enzimopênicos doadores de sangue dessa cidade apresentar a variante A⁻ de G-6-PD (SENA, BARRETO & RAMALHO, 1984). É importante ressaltar, no entanto, que esse resultado não exclui a possibilidade de ocorrência de reações pós-transfusionais graves em casos esporádicos de uso de sangues deficientes de G-6-PD, sobretudo se o doador apresentar a variante Mediterrânea (RAMALHO & BEIGUELMAN, 1976). Tal variante apresenta incidência significativa entre descendentes de italianos do Rio Grande do Sul (WEIMER *et al*, 1981) e do Estado de São Paulo (SENA, BARRETO & RAMALHO, 1984).

4.3. Deficiência de G-6-PD e interferência neonatal

Em 1960, PANIZON chamou pela primeira vez a atenção para o problema da deficiência de G-6-PD no período neonatal, ao descre-

ver onze casos de icterícia grave em crianças da Sardenha em cujas famílias haviam casos de favismo. Duas dessas crianças faleceram no período neonatal e cinco sobreviveram com graves lesões cerebrais consequentes à hiperbilirrubinemia. Nesse mesmo ano, SMITH & VELLA descreveram em Singapura treze casos de crianças chinesas com *Kernícterus* associado à deficiência de G-6-PD e WEATHERALL relatou mais quatro casos semelhantes em crianças procedentes da mesma área.

Na Grécia, DOXIADIS e colaboradores (1961) observaram que um terço das crianças que necessitavam transfusão de substituição não apresentavam evidências de isoimunização. Examinando mais detalhadamente essas crianças, verificaram que em quase a sua totalidade elas eram deficientes de G-6-PD. A partir daí, a associação entre essa enzimopenia e a icterícia neonatal vem sendo investigada por vários autores em diversos países, como é possível observar pelos dados reunidos na tabela III. Segundo OSKI & NAIMAN (1972), a deficiência de G-6-PD chega a constituir, em determinados grupos étnicos, a principal causa de hiperbilirrubinemia neonatal e de encefalopatia bilirrubínica, bem como de indicação de transfusões de substituição.

A associação etiológica entre algumas variantes que causam deficiência grave de G-6-PD, como é o caso das variantes Mediterrânea e Cantão, e a icterícia neonatal está perfeitamente estabelecida na literatura (PANIZON, 1960 b,c; DOXIADIS, 1960; SMITH & VELLA, 1960; WEATHERALL, 1960; DOXIADIS *et al*, 1961; JIM & CHU, 1963; SCHAEFER *et al*, 1963; LU *et al*, 1966; W.H.O, 1967; OSKI & NAIMAN, 1972; MILBAUER *et al*, 1973; TAN, 1981, entre outros). Tal icterícia pode atingir graus variáveis e não está, necessariamente, associada a evidências de anemia hemolítica (MILBAUER; *et al*, 1973; TAN, 1981).

Tabela III - Alguns estudos sobre a associação entre a deficiência de G-6-PD e a ictêria neonatal em várias localidades.

Localidade geográfica	Ano	Autores
Africa do Norte (Dacar)	1971	Tchernia <i>et alii</i>
Africa Ocidental (Nigéria)	1963	Capps <i>et al</i>
	1966	Ifekwunigwe & Luzzatto
	1980	Olowe & Ransome-Kutt
Africa do Sul	1964	Levin <i>et alii</i>
(Cidade do Cabo)	1982	Roux <i>et alii</i>
Brasil (São Paulo)	1971	Segre
(Salvador)	1974	Azevêdo & Azevedo
(Campinas)	1979/81	Ramalho
Canadá	1964	Naiman & Kosoy
China	1963	Strickland & Hu
	1968	Lai <i>et alii</i>
	1981	Tan
Cuba	1983	Estrada & González
Estados Unidos (Baltimore)	1963	Zinkham
(Havaí)	1963	Jim & Chu
	1963	O'Flynn & Hsia
(Filadélfia)	1967	Eshaghpour <i>et al*</i>
(Nova Iorque)	1967	Wolff <i>et al</i>
	1973	Karayalcin <i>et al</i>
Grécia (Atenas)	1961	Doxiadis <i>et al</i>
	1961	Valaes
	1962	Fessas <i>et al</i>
	1964	Doxiadis & Valaes
	1968	Zannos-Mariotea <i>et al</i>
	1969	Panagopoulos <i>et al</i>
	1969	Valaes <i>et alii</i>
(Ilha de Lesbos)	1964	Doxiadis <i>et al</i>
Índia (Região Oeste)	1964	Baxi <i>et al</i>
(Região de Maharashtra)	1968	Deshmuk & Sharma
(Poona)	1968	Dutta <i>et al</i>
	1982	Bhandari <i>et al</i>
Israel	1963	Szeinberg <i>et alii</i>
	1983	Ashkenazi <i>et al</i>
Itália	1962	Babini & Salvioli
	1962	Gaburro <i>et al</i>
	1964	Vechio
	1964	Tunioli
	1965	Vechio
	1966	Chiappe & Leone
	1980	Meloni <i>et alii</i>
	1980	Meloni <i>et al</i>
	1980	Baldini <i>et alii</i>
Jamaica	1979	Gibbs <i>et al</i>
Malásia	1968	Brown & Wong
	1977	Lie-Injo <i>et alii</i>
México	1969	Bornstein <i>et alii</i>
	1981	Vaca <i>et alii</i>
	1984	Vaca <i>et al</i>
	1985	Velázquez <i>et alii</i>
Suíça	1963	Schaerer <i>et al</i>
Tailândia	1963	Flatz <i>et al</i>
Vietname (Saigon)	1968	Chat <i>et al</i>

* estudo feito em prematuros.

Já entre recém-nascidos negróides, que apresentam a variante Africana ou A⁻ de G-6-PD, os dados disponíveis na literatura ainda são bastante contraditórios no que diz respeito à icterícia neonatal. De fato, enquanto na Nigéria a deficiência de G-6-PD pode determinar icterícia que pode variar da ligeira hemólise ao *Kernicterus* (CAPPS *et al*, 1963; IFEKWUNIGWE & LUZZATTO, 1966), entre negróides norte-americanos a associação entre essa enzimopenia e a icterícia neonatal foi constatada no trabalho de KARAYALCIN e colaboradores (1973), mas não nos de O'FLYNN & HSIA (1963), ZINKHAM (1963) e WOLFF e colaboradores (1967). Também entre recém-nascidos bantos, encontrou-se uma frequência maior de deficientes de G-6-PD entre aqueles com icterícia do que no grupo controle (LEVIN *et al*, 1964).

A possibilidade de a variante Africana ou A⁻ de G-6-PD causar icterícia neonatal tem sido sugerida por vários autores (GILLES & TAYLOR, 1961; HENDRICKSE, 1965; ESHAGHPOUR *et al*, 1967; LOPEZ & COOPERMAN, 1971; KARAYALCIN *et al*, 1973; BIENZLE *et al*, 1976; GIBBS *et al*, 1979, entre outros) embora sempre se ressalte a não obrigatoriedade dessa associação e o fato de ela, curiosamente, parecer ser mais comum nas populações negróides não norte-americanas. Além disso, o aparecimento da icterícia neonatal em negróides deficientes de G-6-PD mostrou-se claramente associado ao uso da vitamina K em alguns estudos (ZINKHAM, 1963) e não em outros (CAPPS *et al*, 1963).

No Brasil, a associação entre a deficiência de G-6-PD e a icterícia neonatal só foi investigada no Estado de São Paulo e na Bahia, com resultados também discordantes. No primeiro desses estudos, realizado na cidade de São Paulo, SEGRE (1971) observou um aumento significativo da frequência de deficientes de G-6-PD entre recém-nas-

cidos ictéricos caucasóides e negróides do Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira" (HSPE-FMO), que apresentavam níveis de bilirrubina iguais ou superiores a 12 mg%. Nesse estudo, a deficiência de G-6-PD foi investigada laboratorialmente apenas por intermédio de um teste de triagem, ou seja, do teste de redução da metemoglobina (BREWER *et al*, 1960), realizado em amostras de sangue colhidas por punção venosa. Não foram examinadas as crianças com icterícia leve e nem confirmados os casos de deficiência de G-6-PD por exames mais específicos. Quanto a esse aspecto, é importante ressaltar que o teste de redução da metemoglobina pode acusar resultados falsamente positivos na presença de anemia e falsamente negativos na vigência de episódio hemolítico (OSKI & NAIMAN, 1972; BAPAT *et al*, 1976; BEIGUELMAN, 1983), razão pela qual deve ser interpretado com cautela quando empregado em pacientes ictéricos.

Já em 1974, AZEVEDO & AZEVEDO, investigando recém-nascidos mestiços da cidade de Salvador, Bahia, observaram que a frequência de deficientes de G-6-PD era praticamente a mesma entre recém-nascidos ictéricos e não ictéricos, afastando a possibilidade de a deficiência de G-6-PD ser um fator etiológico importante, nessa população, de hiperbilirrubinemia neonatal. Nesse estudo, a deficiência de G-6-PD foi investigada apenas por eletroforese em amostras de sangue colhidas por punção digital ou calcânea, não tendo sido realizado o ensaio enzimático quantitativo. Dentre os 30 deficientes de G-6-PD examinados, 29 provavelmente apresentavam a variante Africana ou A⁻ dessa enzima, e apenas um apresentava a variante Mediterrânea. Não é mencionado nesse trabalho o grau exato da icterícia apresentada pelos recém-nascidos examinados, embora as autoras refiram terem excluído da amostra as crianças com icterícia discreta ou duvidosa.

RAMALHO (1979, 1981), retomando o problema na cidade de Campinas, SP, examinou recém-nascidos a termo do Hospital de Clínicas da UNICAMP, investigando a deficiência de G-6-PD em amostras de sangue do cordão umbilical e seguindo clinicamente os recém-nascidos deficientes para verificar o aparecimento ou não de icterícia. A investigação da deficiência de G-6-PD em sangue do cordão umbilical possibilita a aplicação do teste de triagem antes da ocorrência de um eventual episódio hemolítico pós-natal, diminuindo, portanto, a interferência de fatores como a anemia e a preponderância de eritrócitos jovens no resultado do exame. O diagnóstico laboratorial da deficiência de G-6-PD também foi feito nesse estudo apenas pelo teste de redução da metemoglobina (BREWER *et al*, 1960), embora as crianças deficientes tenham sido re-examinadas com um mês de vida, para exclusão dos casos falsamente positivos na triagem inicial.

Cerca de 26% das crianças levadas à fototerapia por ocasião desse estudo eram deficientes de G-6-PD, o que levou o autor a suspeitar que tal enzimopenia pudesse ser uma causa importante na região de Campinas de icterícia moderada, que requer tal procedimento.

Outra evidência indireta de uma possível associação entre a deficiência de G-6-PD e a icterícia neonatal em populações paulistas foi fornecida pelo trabalho de RIVERO e colaboradores (1981), já que esses autores puderam constatar casos de *Kernícterus* entre os deficientes de G-6-PD matriculados no Instituto da Criança, na cidade de São Paulo.

Recentemente, PAIXÃO e colaboradores (1986) investigaram a deficiência de G-6-PD em amostras de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos caucasóides e negróides do Hospital de Clínicas de

Ribeirão Preto, SP. Infelizmente, no entanto, esses autores não fazem referência quanto ao aparecimento ou não de icterícia nos deficientes de G-6-PD por eles diagnosticados.

Concluindo esse item, parece importante comentar que, apesar dos recentes avanços tecnológicos e científicos, a icterícia neonatal continua sendo um problema importante para os neonatologistas, frente ao grande número de diagnósticos diferenciais possíveis com que deparam esses profissionais quando diante do recém-nascido icterico.

Das conhecidas isoimunizações dos sistemas ABO e RH às síndromes de Gilbert e Crigler-Najjar, tais diagnósticos diferenciais incluem situações tão díspares quanto a fibrose cística, o cisto colédoco e a sífilis congênita entre outras, todas com características laboratoriais próprias, mas com manifestações clínicas nem sempre bem diferenciadas (LEE & HENRY, 1979; ZIMMERMAN, 1979).

Dentre os diagnósticos mais frequentes, o da "icterícia fisiológica do recém-nascido", caracterizada por icterícia tardia, com pico entre 3º e 5º dias e declínio lento até o 10º dia, é, sem dúvida, o que aparece em mais alta percentagem nas crianças levadas à fototerapia nos hospitais. Tal diagnóstico, no entanto, pode ser contestado em grande número de casos, já que muitas causas de icterícia neonatal não são investigadas laboratorialmente na maioria dos serviços brasileiros de neonatologia. Dentre tais causas possíveis de hiperbilirrubinemia do recém-nascido encontra-se, evidentemente, a deficiência de G-6-PD.

II. OBJETIVOS

A investigação rotineira da deficiência de G-6-PD em recém-nascidos é um procedimento bastante útil em nosso meio por várias razões, tais como:

1. permite o diagnóstico precoce de um dos erros inatos do metabolismo mais frequentes em nossas populações, possibilitando a prevenção de crises hemolíticas em seus portadores;
2. permite uma escolha mais criteriosa da medicação a ser prescrita para o recém-nascido deficiente de G-6-PD e/ou à sua nutriz;
3. esclarece alguns casos de icterícia neonatal.

Infelizmente, no entanto, tal investigação, apesar de insistentemente recomendada por alguns autores (BEIGUELMAN, 1979, 1983; RAMALHO, 1979, 1981, 1986 a,b; SENA *et al*, 1984; PAIXAO *et al*, 1986), ainda é realizada de forma apenas excepcional em nosso país. Alguns serviços brasileiros de neonatologia limitam-se, na melhor das hipóteses, a investigar a deficiência de G-6-PD em alguns casos de hiperbilirrubinemia acentuada, sem evidências de isoimunização.

Isso talvez se deva, pelo menos em parte, ao fato de a relação entre a deficiência de G-6-PD e a icterícia neonatal ainda não estar perfeitamente caracterizada em nosso meio. Realmente, como já foi comentado no item anterior, os poucos trabalhos realizados no Brasil sobre esse assunto, além de empregarem diferentes metodologias, ainda obtiveram resultados muitas vezes contraditórios. Além disso, a variante deficiente de G-6-PD mais frequente na maior parte do território brasileiro, a variante Africana ou $\bar{A}$, tem um papel controvertido como determinante da icterícia do recém-nascido.

Tendo em vista a situação exposta, a autora julgou importante que esse assunto fosse esclarecido através de um estudo prospectivo realizado em uma amostra suficiente de recém-nascidos, empregando metodologia apropriada.

Este trabalho tem por objetivos, portanto:

1. Investigar se a deficiência de G-6-PD é realmente uma causa importante de icterícia neonatal moderada (++), em nosso meio;
2. Investigar se essa enzimopenia está correlacionada etiologicamente à icterícia neonatal leve (+);
3. Verificar se o aparecimento de icterícia no recém-nascido deficiente de G-6-PD está correlacionado a algum fator desencadeante, tal como medicação incompatível na criança ou em sua nutriz, infecção, hipóxia, acidose, hipoglicemia, etc;
4. Investigar a relação entre a variante Africana ou A⁻ de G-6-PD e a icterícia neonatal em nossa população;
5. Comparar os resultados obtidos na investigação da deficiência de G-6-PD em amostras de sangue do cordão umbilical realizada por dois testes de triagem, ou seja, pelo teste de redução da metemoglobina (BREWER *et al*, 1960) e pelo teste de descoramento do azul cresil brilhante (MOTULSKY & CAMPBELL-KRAUT, 1961) com os observados pelo ensaio enzimático quantitativo e pela eletroforese de G-6-PD.
6. Sugerir procedimentos que permitam a investigação simples, econômica e eficiente da deficiência de G-6-PD em recém-nascidos brasileiros.

Uma vez que a icterícia neonatal grave (+++) é mais rara, a sua associação com a deficiência de G-6-PD está sendo investigada pela autora em outro trabalho.

III. Casuística e Métodos

Para a realização do presente trabalho, foram examinados 697 recém-nascidos a termo da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Dentre estes, 351 eram filhos de parturientes negróides e 346 apresentavam genitora caucasóide.

Todas as crianças examinadas apresentavam idade gestacional, determinada segundo o método somático de CAPURRO e colaboradores (1978), igual ou superior a 37 semanas e inferior a 42 semanas. O peso dos recém-nascidos variou de 1780g a 4450 g. Não foram examinadas crianças pré-termo, uma vez que a prematuridade pode determinar uma deficiência transitória de G-6-PD (VULLO & TUNIOLI, 1961; OSKI & NAIMAN, 1972).

Foram condições constantes e uniformes a todos os recém-nascidos: a) clampeamento do cordão umbilical, sem ordenha, conforme conduta do Serviço de Obstetrícia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas; b) administração de uma dose de 0,5 mg de vitamina K1 natural (Kanakion) por via intramuscular, logo após o nascimento, independente do peso e da idade gestacional; c) aleitamento materno a partir de 2 horas de vida, em regime de livre demanda em alojamento conjunto, de acordo com a Rotina do Serviço de Neonatologia do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Entre os recém-nascidos negróides, 178 eram do sexo masculino e 173 do sexo feminino enquanto que, entre as crianças caucasóides examinadas, 192 eram do sexo masculino e 154 do sexo feminino.

Foram coletados de cada recém-nascido 5 a 6 ml de sangue do cordão umbilical, acondicionados em 2 frascos esterilizados contendo, respectivamente, uma solução anticoagulante de sal potássico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%, na proporção de 1 mg por ml de sangue (DACIE & LEWIS, 1970) e, uma solução anticoagulante de ACD, na proporção de 3 ml de sangue para 1 ml de ACD (0,44g de ácido cítrico anidro; 1,32g de citrato de sódio; 1,47g de dextrose e água destilada q.s.p. 1000 ml).

Os frascos contendo sangue fresco do cordão umbilical foram mantidos sob refrigeração e transportados ao Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a realização dos exames laboratoriais dentro do prazo máximo de 12 horas nas amostras colhidas com EDTA e no prazo máximo de sete dias nas amostras colhidas com ACD.

Para comparação dos resultados obtidos nos diferentes testes, a deficiência de G-6-PD foi investigada simultaneamente pelos métodos de redução da metemoglobina (BREWER *et al*, 1960), descoramento do azul cresil brilhante (MOTULSKY & CAMPBELL-KRAUT, 1961), ensaio enzimático quantitativo (BEUTLER, 1975) e eletroforese em gel de amido (W.H.O., 1967) em uma subamostra inicial de 257 recém-nascidos. Dentre esses, 140 eram filhos de parturientes negróides (72 do sexo masculino e 68 do sexo feminino) e 117 apresentavam genitora caucasóide (59 do sexo masculino e 58 do sexo feminino).

Para a realização do teste de redução da metemoglobina, adicionou-se 1 ml de sangue colhido com EDTA a tubos identificados pelas letras a, b e c. Após acrescentar 0,05 ml de solução de nitrito de sódio/glicose (5g de glicose e 1,25g de nitrito de sódio em 100 ml de

água destilada) aos tubos b e c, e 0,05 ml de solução de cloreto de azul de metileno (150 mg de cloreto de azul de metileno tri-hidratado "Carlo Erba" em 1000 ml de água destilada) ao tubo c, misturou-se suavemente o sangue com os reagentes e incubou-se os tubos de ensaio em banho-maria a 37°C durante 3 horas. Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 0,1 ml de cada tubo para outros tubos (a', b' e c') contendo 10 ml de água destilada. Após a hemólise, a cor do tubo c' (tubo teste) foi comparada visualmente com as dos tubos a' e b'. Os casos em que a cor do tubo teste mostrou-se igual à do tubo a' (vermelho claro) foram considerados normais. Já aqueles em que a cor do tubo teste mostrou-se igual à do tubo b' (marrom acastanhado) foram considerados como deficientes de G-6-PD.

Com o intuito de verificar a possível ocorrência de casos falsamente positivos com o teste da redução da metemoglobina, os sangues positivos foram incubados por mais uma hora e, posteriormente submetidos a nova leitura após 4 horas de incubação, conforme recomendado por BAPAT e colaboradores (1976).

Para a realização do teste de descoramento do azul cresil brilhante, adicionou-se 0,02 ml de sangue a tubos de ensaio contendo 1 ml de água destilada. Após a hemólise, adicionou-se a esses tubos 0,1 ml de solução de G-6-P (825 mg de sal sódico de 6-fosfato de glicose em 100 ml de água destilada), 0,1 ml de solução de NADP (50 mg de NADP em 100 ml de água destilada), 0,25 ml de corante (32 mg de azul cresil brilhante da "National Aniline Dye" em 100 ml de água destilada) e 0,2 ml de tampão (8,96g de tris-hidroximetil-aminometano, 3 ml de ácido clorídrico concentrado e 97 ml de água destilada). Os tubos foram homogeneizados por inversão, incubados em banho-maria a 37°C

e observados após 40, 60, 90 e 120 minutos de incubação. Foram consideradas como deficientes de G-6-PD as amostras que não tiveram sua cor inicial modificada após 90 e 120 minutos de incubação, já que nas amostras com atividade normal dessa enzima, o descoramento do azul cresil-brilhante é observado entre 40 e 65 minutos. Para melhor controle, usou-se em cada bateria de tubos, amostras de sangue com atividade de G-6-PD normal e outras deficientes de G-6-PD.

Para a realização do ensaio enzimático quantitativo e da eletroforese de G-6-PD, foram utilizadas as amostras de sangue de cordão umbilical colhidas em ACD e mantidas sob refrigeração (4°C), que foram examinadas no Setor de Enzimopatias do Laboratório de Pesquisas Hematológicas do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O ensaio enzimático para a medida da atividade de G-6-PD foi feito de acordo com a técnica de BEUTLER (1975), que baseia-se no aumento da absorbância determinado pela geração de NADPH. Para tanto, preparou-se o hemolisado adicionando-se as hemácias lavadas a uma solução estabilizadora contendo 10 μ M de NADP, 7 mM de β -mercaptoetanol e 2,7 mM 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 2 tubos contendo, cada um, 580 μ l de água deionizada, 100 μ l de NADP, 100 μ l de tampão tris-HCl 1,0 M, pH= 8,0 e 100 μ l de $MgCl_2$ 0,1 M. Adicionou-se 20 μ l de hemolisado em cada tubo e incubou-se a 37°C por 10 min. Em seguida, colocou-se 100 μ l de G6-P 6 mM no tubo padrão e 100 μ l de

água deionizada no "blank". Leu-se a absorvância (A) (densidade óptica) a 37°C durante 10 minutos, em cubetas com percurso óptico de 1 cm, em comprimento de onda de 340 nm, com auxílio de espectrofotômetro.

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

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

- $\Delta A/\text{min}$ = diferença de absorvância por min. obtida com a leitura após a estabilização da solução.
- Hb = hemoglobina do hemolisado em g/dl.
- Vol. enzima = volume do hemolisado colocado nos tubos padrão e "blank" = 20 μl .

Já a eletroforese de G-6-PD foi realizada de acordo com a técnica recomendada pela Organização Mundial de Saúde (W.H.O., 1967). Para tanto, preparou-se uma suspensão de 13% de amido hidrolisado (Connaught) em 150 ml de solução 0,5 M de tris-cloreto, pH 8,8 (a 25°C), 15 ml de solução 0,27 M de EDTA sódico, pH 7,0 e 1350 ml de água destilada. Tal suspensão foi homogeneizada sob alta temperatura e agitação constante, até a formação do gel de amido. Após o resfriamento a aproximadamente 60°C, adicionou-se NADP até uma concentração final de 10 μM . A seguir, o gel foi depositado em um recipiente retangular de bordos elevados, que permaneceu por 40 minutos em câmara fria e que foi, em seguida, mantido em temperatura inferior a 4°C durante 4 horas.

As amostras de sangue total foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos, retirando-se, a seguir, o plasma sobrenadante. O concentrado de hemácias foi lavado 3 vezes com solução de cloreto de

sódio a 0,9%. Ao volume final de hemácias foi então, adicionado 30 volumes de solução hemolisante (NADP 10 μ M, betamercaptoetanol 7 mM e EDTA sódico 2,7 mM). A mistura foi homogeneizada por agitação e, em seguida, centrifugada a 900 rpm durante 30 minutos. O hemolisado sobrenadante foi diluído em água e tampão em concentração igual à usada na dissolução do amido, mantendo-se sempre a concentração de hemoglobina inferior a 1g%.

As amostras de hemolisado foram embebidas em tiras de papel de filtro, que foram colocadas em fendas feitas no gel. Toda a superfície do gel foi, em seguida, recoberta por uma película plástica.

A corrida eletroforética foi realizada a 22°C durante 16 horas, sob a diferença de potencial de 2 volts por centímetro, valendo-se de um sistema horizontal. Utilizou-se na cuba de eletroforese um litro da mesma solução tampão usada na preparação do gel, acrescida de 3g de cloreto de sódio. No compartimento do cátodo adicionou-se NADP em quantidade suficiente para obter-se uma solução 10 μ M.

Após a corrida eletroforética, a placa de gel de amido foi cortada em duas, com a ajuda de um fio de cobre, retirando-se a camada superior. A camada inferior foi levada, então, para a câmara escura, onde se procedeu à identificação das zonas de atividade de G-6-PD. Para tanto, recobriu-se o gel com a solução corante (10 mg de sal sódico de G6-P, 2 mg de MTT tetrazólio, 2 mg de metassulfato de fenazina, 2 mg de NADP e 10 ml de tampão tris-HCl 0,1 M, pH 8,0), procedendo-se à leitura após 2 horas.

A distância entre a banda de G-6-PD e o ponto de aplicação foi medida em centímetros e comparada com a migração de um padrão normal Gd(+), B, à qual se atribuiu o valor de 100%.

Após a comparação dos resultados obtidos pelos diferentes métodos de investigação da deficiência de G-6-PD nessa subamostra inicial de 257 recém-nascidos, adotou-se no restante da casuística a triagem pelo método de redução da metemoglobina, sendo os casos triados novamente examinados pelo teste do descoramento do azul cresil brilhante e, posteriormente, submetidos ao ensaio enzimático quantitativo e à eletroforese de G-6-PD. Evidentemente, os casos falsamente positivos na triagem inicial não foram considerados como deficientes de G-6-PD.

Cada criança examinada mereceu uma ficha especial (anexo_1) na qual, além da identificação, foram registrados dados de interesse para a interpretação da icterícia eventualmente manifestada pelo recém-nascido. Foi dada ênfase especial à medicação recebida pela criança e pela sua nutriz.

Como conduta normal dos Serviços de Obstetrícia e Neonatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, a tipagem sanguínea do recém-nascido e da sua mãe foi realizada logo após o nascimento, de tal forma que as prováveis isoimunizações por incompatibilidade sanguínea materno-fetal pudessem ser prontamente identificadas. Sempre que necessário, foi realizado o teste direto de Coombs.

Os recém-nascidos icterícios foram ou não encaminhados à fototerapia, conforme os critérios de indicação desse procedimento terapêutico, estabelecidos pelo Serviço de Neonatologia do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, especificados no Anexo_2.

Todos os recém-nascidos foram examinados clinicamente a cada 12 horas, sendo a sua eventual icterícia classificada em termos do número de horas de vida em que se iniciou, das zonas de progressão crânio-caudal (KRAMER, 1969) e da conduta clínica exigida. Assim, a icterícia leve (+) não desperta maiores cuidados, requerendo apenas observação, a moderada (++) requer dosagem de bilirrubinas e fototerapia e a grave (+++) exige transfusão de substituição. A dosagem de bilirrubinas foi feita em função do grau de icterícia manifestada pelo recém-nascido, que recebeu, evidentemente, os cuidados de rotina para controle de hiperbilirrubinemia (vide Anexo_2).

A comparação da incidência de icterícia entre recém-nascidos Gd(+) e deficientes de G-6-PD foi feita pelo teste do qui-quadrado (χ^2), empregando-se, sempre que necessária a correção de Yates. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

IV. RESULTADOS

Foram diagnosticados 25 recém-nascidos deficientes de G-6-PD, 21 dos quais do sexo masculino e 4 do sexo feminino.

A frequência da enzimopenia entre os recém-nascidos do sexo masculino foi igual a 9,5% (17 em 178) entre os filhos de genitoras negróides e a 2% (4 em 192) entre os filhos de genitoras caucasóides. Entre as meninas negróides, 2,3% (4 em 173) eram deficientes de G-6-PD.

Todas as crianças deficientes de G-6-PD, com exceção de apenas uma, apresentaram uma variante da enzima com migração eletroforética rápida, compatível com a variante Africana ou A⁻. Apenas um deficiente caucasóide apresentou uma enzima com características eletroforéticas altamente sugestivas da variante Mediterrânea.

Verificando-se a exposição dos casos examinados a medicamentos e outros fatores do meio ambiente potencialmente desencadeantes de hemólise, constatou-se que todas as crianças haviam sido medicadas exclusivamente com vitamina K1 (0,5 mg de "Kanakion por via intra-muscular), tendo as suas mães recebido no puerpério cloranfenicol ("Quemicetina") e oxiótico ("Syntocinon"). As crianças deficientes de G-6-PD não foram expostas a outros fatores medicamentosos ou ambientais capazes de desencadear hemólise. O teste direto de Coombs mostrou-se negativo em todas as crianças deficientes de G-6-PD nas quais ele foi realizado.

Na tabela IV são apresentados alguns dados clínicos e laboratoriais dos recém-nascidos diagnosticados como deficientes de

G-6-PD. Conforme é possível observar nessa tabela, 14 enzimopênicos (56%) não manifestaram icterícia neonatal, 4 (16%) manifestaram icterícia leve (+) e 7 (28%) foram levados à fototerapia por apresentarem icterícia moderada (++).

A incidência de icterícia não diferiu significativamente entre os recém-nascidos deficientes de G-6-PD e as crianças com atividade normal dessa enzima (Tabela V). Retirando-se da amostra o único portador da variante Mediterrânea de G-6-PD, a incidência de icterícia também não diferiu significativamente entre os recém-nascidos enzimopênicos e os controles Gd (+) (Tabela VI).

Levando-se em consideração, entretanto, o grau da icterícia manifestada pelos recém-nascidos, foram obtidos, curiosamente, resultados diferentes no que diz respeito à icterícia leve e à moderada. Assim, enquanto que a incidência de icterícia leve (+) não diferiu significativamente entre recém-nascidos normais e deficientes de G-6-PD (Tabela VII), a incidência de icterícia moderada (++) foi significativamente maior entre as crianças enzimopênicas (Tabela VIII), mesmo quando se excluiu da amostra o recém-nascido portador da variante Mediterrânea (Tabela IX). Esses resultados indicam, evidentemente, que a deficiência de G-6-PD não se mostrou associada à icterícia leve na amostra examinada, embora tenha se mostrado fortemente associada à icterícia moderada.

Quanto a esse último aspecto, cumpre ressaltar que dentre as 697 crianças examinadas apenas 32 (4,6%) foram levadas à fototerapia por terem manifestado icterícia moderada, 7 das quais (21,8%) eram deficientes de G-6-PD.

Tabela IV - Alguns dados clínicos e laboratoriais dos recém-nascidos com deficiência de G-6-PD.

Nº DO	SEXO	GRUPO RACIAL	TIPO SANGÜÍNEO	ICTERÍCIA		
RN		DA MÃE	DA MÃE DO RN	Início	GRAU	BILIRRUBINAS
34	M	Negróide	O-RH(+) O-RH(+)	-	-	-
56	F	Negróide	B-RH(+) O-RH(-)	12-24 hs	++	7,0 mg% (17h)
64	M	Negróide	O-RH(+) A-RH(-)	após 48hs	+	-
73	M	Caucasóide	A-RH(+) A-RH(+)	24-36 hs	+	-
78*	M	Caucasóide	O-RH(+) O-RH(+)	1as. 12hs	++	10,0 mg% (44h)
104	M	Negróide	O-RH(+) B-RH(+)	-	-	-
1216	F	Negróide	RH(-) A-RH(+)	-	-	-
1225	M	Negróide	O-RH(+) O-RH(+)	-	-	-
1231	F	Negróide	O-RH(+) B-RH(+)	-	-	-
1247	M	Negróide	O-RH(+)	-	-	-
1259	M	Negróide	A-RH(+) A-RH(+)	-	-	-
1260	M	Negróide	B-RH(+) B-RH(+)	24 hs	++	9,9 mg% (36h)
1270	M	Caucasóide	O-RH(-) O-RH(+)	24 hs	++	10,5 mg% (30h)
1282	F	Negróide	O-RH(+) O-RH(+)	-	-	-
1290	M	Negróide	A-RH(+) A-RH(+)	-	-	-
1309	M	Negróide	O-RH(-) O-RH(-)	12 hs	++	11,5 mg% (20h)
1313	M	Negróide	A-RH(-) A-RH(+)	48 hs	+	-
1353	M	Negróide	O-RH(+) O-RH(+)	24 hs	++	10,7 mg% (48h)
1379	M	Negróide	O-RH(+) O-RH(+)	-	-	-
1397	M	Negróide	B-RH(+) O-RH(+)	-	-	-
1407	M	Negróide	A-RH(+) O-RH(+)	36 hs	+	-
1447	M	Caucasóide	O-RH(+) O-RH(+)	-	-	-
1540	M	Negróide	O-RH(+) O-RH(+)	-	-	-
1582	M	Negróide	B-RH(+) O-RH(+)	24 hs	++	12,3 mg% (36h)
1652	M	Negróide	A-RH(+) A-RH(+)	-	-	-

* Recém-nascido portador da variante Mediterrânea de G-6-PD.

Todas as demais crianças são portadoras da variante Africana ou A⁻ dessa enzima.

Tabela V - Comparação da incidência de icterícia entre os recém-nascidos normais e os deficientes de G-6-PD.

AMOSTRA	ICTÉRICOS	NAO ICTÉRICOS	TOTAL
Normais*	175	497	672
Deficientes de G-6-PD	11	14	25
T O T A L	186	511	697

* Recém-nascidos com atividade normal de G-6-PD

$$\chi^2_{(1)} = 3,96; 0,02 < p < 0,05.$$

$$\chi^2_{(1)} \text{ cor.} = 3,108; 0,05 < p < 0,10.$$

Tabela VI - Comparação de incidência de icterícia entre os recém-nascidos normais e os portadores da variante Africana ou A de G-6-PD.

AMOSTRA	ICTÉRICOS	NAO ICTÉRICOS	TOTAL
Normais*	175	497	672
Deficientes de G-6-PD	10	14	24
T O T A L	185	511	696

* Recém-nascidos com atividade normal de G-6-PD.

$$\chi^2_{(1)} = 2,89; 0,05 < p < 0,10.$$

Tabela VII - Comparação da incidência de icterícia discreta entre recém-nascidos normais e deficientes de G-6-PD.

AMOSTRA	COM ICTERÍCIA DISCRETA (+)	SEM ICTERÍCIA DISCRETA (+)	TOTAL
Normais*	150	522	672
Deficientes de G-6-PD	04	21	25
T O T A L	154	543	697

* Recém-nascidos com atividade normal de G-6-PD.

$$\chi^2_{(1)} = 0,558; 0,3 < p < 0,5.$$

Tabela VIII - Comparação da incidência de icterícia moderada entre recém-nascidos normais e deficientes de G-6-PD.

AMOSTRA	COM ICTERÍCIA MODERADA (++)	SEM ICTERÍCIA MODERADA (++)	TOTAL
Normais*	25	647	672
Deficientes de G-6-PD	07	18	25
T O T A L	32	665	697

* Recém-nascidos com atividade normal de G-6-PD.

$\chi^2 = 32,44$; $p < < < 0,001$.

$\chi^2_{(1)} \text{ cor.} = 27,132$; $p < < < 0,001$.

Tabela IX - Comparação da incidência de icterícia moderada entre os recém-nascidos normais e os portadores da variante Africana ou A⁻ de G-6-PD.

AMOSTRA	COM ICTERÍCIA MODERADA (++)	SEM ICTERÍCIA MODERADA (++)	TOTAL
Normais*	25	647	672
Deficientes de G-6-PD	6	18	24
T O T A L	31	665	696

* Recém-nascidos com atividade normal de G-6-PD.

$\chi^2 = 24,65$; $p < < < 0,001$.

$\chi^2_{(1)} \text{ cor.} = 19,910$; $p < < < 0,001$.

Tabela X - Resultados obtidos pelos diferentes métodos de investigação da deficiência de G-6-PD empregados na subamostra de 257 recém-nascidos.

Resultados	Normais (nº)	Deficientes de G-6-PD (nº)	% da defici- ciência na amostra	% de casos falsamente positivos
Redução da metemoglobina 3 horas incub.	237	20	8,4%	9/20 = 45%
Redução da metemoglobina 4 horas incub.	245	12	4,8%	1/12 = 8,3%
Descoramento do azul cresil brilhante	246	11	4,4%	0
Ensaio enzimático + eletroforese	246	11	4,4%	0

OBS: % de casos falsamente positivos = $\frac{\text{nº de casos falso positivos}}{\text{nº de falso positivos} + \text{nº de verdadeiro positivos}}$

Na tabela X são apresentados os resultados obtidos pelos diferentes métodos de investigação da deficiência de G-6-PD empregados na subamostra de 257 recém-nascidos. As onze crianças dessa subamostra diagnosticadas como seguramente deficientes de G-6-PD apresentaram resultados positivos nos quatro testes. Não foram observados casos falsamente negativos nessa amostragem.

V. DISCUSSÃO

Ao analisar os resultados obtidos no presente trabalho, é possível verificar, inicialmente, que as frequências de deficientes de G-6-PD observadas entre os indivíduos do sexo masculino, filhos de parturientes caucasóides e negróides (2% e 9,5%, respectivamente), não diferiram significativamente das encontradas em outras populações masculinas do Estado de São Paulo (BEIGUELMAN *et alii*, 1968; RAMALHO & BEIGUELMAN, 1976; RAMALHO, 1979; 1981). Da mesma forma, a frequência de meninas negróides deficientes de G-6-PD também não diferiu significativamente da esperada entre indivíduos do sexo feminino da população negróide desse Estado, desde que esta esteja em equilíbrio genético estável (BEIGUELMAN, 1981).

É importante ressaltar que 96% dos deficientes de G-6-PD detectados (100% dos deficientes negróides e 75% dos caucasóides) apresentavam a variante Africana ou A⁺ dessa enzima. Tal preponderância dessa variante também foi observada por SENA, BARRETTO & RAMALHO (1984) entre 57 deficientes de G-6-PD examinados no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, dentre os quais 55 (41 negróides e 14 caucasóides) apresentavam a variante Africana dessa enzima e, apenas 2 deficientes caucasóides apresentavam a variante Mediterrânea. Da mesma forma, dentre os 30 deficientes de G-6-PD detectados por AZEVEDO & AZEVEDO (1974) em uma população de recém-nascidos mestiços de Salvador, BA, 29 apresentavam a variante Africana e apenas 1 a variante Mediterrânea dessa enzima.

Frente ao exposto, é importante comentar que o fato de essa investigação ter sido realizada em um hospital-escola e, portanto, em uma população de baixo nível sócio-econômico, provavelmente contribuiu para o encontro de alta proporção de portadores da variante Africana de G-6-PD. Convém salientar ainda, que a amostra examinada, embora reflita uma parcela considerável da população de Campinas, não chega a representá-la como um todo, já que dela estiveram excluídas as minorias de nível sócio-econômico mais elevado. Aliás, nessas últimas, é possível que a miscigenação com italianos seja mais frequente e, portanto, a participação da variante Mediterrânea seja mais significativa. De qualquer forma, a preponderância da variante Africana de G-6-PD favoreceu os objetivos da presente tese, uma vez que os aspectos controversos da literatura dizem respeito, fundamentalmente, à possibilidade dessa variante determinar icterícia neonatal. Realmente, como já foi comentado no capítulo introdutório deste trabalho, a associação entre a variante Mediterrânea de G-6-PD e a icterícia neonatal já está praticamente estabelecida na literatura internacional. Além disso, é importante lembrar que a variante Africana ou A⁻ certamente é a responsável pela grande maioria dos casos de deficiência de G-6-PD na maior parte do território nacional, ou seja, nos Estados do Sudeste, Norte, Nordeste e Centro-Oeste (SENA, BARRETTO & RAMALHO, 1984). A variante Mediterrânea de G-6-PD provavelmente ocupa lugar de destaque nas populações dos Estados do Sul e entre os descendentes de italianos do Estado de São Paulo.

Quanto aos aspectos acima mencionados, é curioso citar que dentre os nove deficientes de G-6-PD caucasóides examinados por WEIMER e colaboradores (1981) em Porto Alegre, RS, cinco apresentava:

a variante Mediterrânea, três apresentavam a variante Africana e um apresentava a variante rara "Seattle-like". Já dentre os dezoito deficientes negróides examinados por esses autores, dezessete apresentavam a variante Africana e um apresentava a variante Mediterrânea. Ressalte-se, portanto, que, mesmo em se tratando de uma população gaúcha, 74% dos deficientes de G-6-PD detectados nessa pesquisa apresentavam a variante Africana dessa enzima.

No que diz respeito à icterícia neonatal, os resultados obtidos no presente estudo parecem comprovar a existência de uma associação entre a deficiência de G-6-PD, ou melhor, entre a variante Africana de G-6-PD, e a icterícia neonatal moderada em nosso meio, conforme havia sido anteriormente suspeitado por RAMALHO (1979, 1981).

O fato de a deficiência de G-6-PD estar claramente associada à icterícia neonatal moderada, mas não à icterícia neonatal leve, talvez explique os dados controvertidos observados na literatura. Assim, trabalhos que incluam em sua casuística um grande número de casos de icterícia leve, correm o risco de não encontrar nenhuma associação entre a deficiência de G-6-PD e a icterícia neonatal. Já os trabalhos que incluam em sua casuística um grande número ou exclusivamente casos de icterícia mais acentuada, terão maior probabilidade de encontrar tal associação. É o que aconteceu, por exemplo, com o trabalho de SEGRE (1971), realizado na cidade de São Paulo, no qual só foram examinados casos de icterícia mais acentuada.

Do exposto, pode-se concluir que a probabilidade de encontro da associação entre deficiência de G-6-PD e a icterícia neonatal em uma pesquisa dependerá:

1º) da proporção de portadores das variantes Mediterrânea e Africana presentes na casuística;

22) da proporção de portadores de icterícia leve e moderada presentes nessa casuística.

A eventual associação entre a deficiência de G-6-PD e a icterícia neonatal grave, merece ser avaliada em um trabalho realizado a longo prazo, já que a incidência desse tipo de icterícia é mais rara. De fato, durante os períodos em que estivemos trabalhando no Berçário do Hospital de Clínicas da UNICAMP, não houve registro de nenhum caso de icterícia grave. No entanto, logo após o término da coleta de dados deste trabalho, ocorreu um caso de icterícia grave nesse berçário, afetando, curiosamente, uma criança deficiente de G-6-PD.

Por outro lado, deve-se considerar que, mesmo que essa deficiência enzimática não seja uma causa frequente de icterícia grave em nossos berçários, a possibilidade de alguns casos esporádicos de deficiência de G-6-PD desenvolverem grande hiperbilirrubinemia, com risco de *Kernícterus*, não pode ser desprezada. Segundo OSKI & NAIMAN (1972), a hiperbilirrubinemia do deficiente de G-6-PD pode chegar, em alguns casos, a 50 mg%, devendo-se lembrar que a partir de 20 mg% já existe sério risco de *Kernícterus* (MOLLISON, 1974).

Outro aspecto importante a ser discutido é o da exposição do recém-nascido deficiente de G-6-PD a fatores desencadeantes de hemólise. SZEINBERG e colaboradores (1963) sugeriram que nos países em que se observou associação evidente entre a doença hemolítica do recém-nascido e a deficiência de G-6-PD poderiam estar atuando fatores do meio ambiente, tais como a ingestão de favas pelas mães dos recém-nascidos, que possibilitariam a transmissão de fatores hemolisantes pelo leite materno. Outro fator hemolisante poderia ser aquele secun-

dário à ação de drogas, conhecidas ou não, sobre os indivíduos com deficiência de G-6-PD. Por outro lado, o fato de a ocorrência da doença hemolítica do recém-nascido por deficiência de G-6-PD estar concentrada em algumas genealogias pode tanto falar a favor de um outro componente genético condicionando doença hemolítica em indivíduos deficientes, quanto falar a favor de um componente puramente ecológico (RAMALHO, 1981).

Brown (1966) encontrou uma incidência muito grande de deficientes de G-6-PD entre recém-nascidos negróides com hiperbilirrubinemia inexplicável. Estudos posteriores, no entanto, revelaram que a maioria dessas crianças estava infectada ou que suas mães estavam recebendo medicação incompatível, sobretudo sulfonamidas de longa ação. Sabe-se, além disso, que a hipóxia e a acidose também podem favorecer o aparecimento de hiperbilirrubinemia nos deficientes de G-6-PD (LEVIN *et al.*, 1964; LOPEZ & COOPERMAN, 1971). Ainda segundo TARLOV e colaboradores (1962), a hipoglicemia também é um agente potencialmente hemolítico, capaz de determinar hiperbilirrubinemia em recém-nascidos susceptíveis. A possibilidade de a hipoglicemia recorrente ser um determinante de hemólise em deficientes de G-6-PD também foi sugerida recentemente por SHALEV e colaboradores (1985).

Da mesma forma, o contato com roupas impregnadas por naftalina certamente é um fator desencadeante de hemólise em recém-nascidos deficientes de G-6-PD (OSKI & NAIMAN, 1972; SENA & RAMALHO, 1985). Por outro lado, o uso de produtos que contenham mentol ou cânfora também pode estar associado ao desencadeamento de icterícia neonatal em deficientes de G-6-PD. Tal fato foi observado por OLOWE & RANSOME-KUTI (1980), quando analisavam as possíveis causas da icterí-

cia neonatal grave, aliás bastante frequente, entre as crianças nascidas em Lagos, na Nigéria. Segundo esses autores, embora a incidência da deficiência de G-6-PD nessa região também fosse muito alta, a ocorrência de icterícia neonatal grave era mais frequente entre os recém-nascidos deficientes de G-6-PD que não estavam internados no Berçário do Hospital-Escola da Universidade de Lagos. Isso porque o uso de talcos mentolados em quantidades apreciáveis, após a limpeza do cordão umbilical e da área abdominal dessas crianças, era prática comum na população extra-hospitalar daquela região.

Outro aspecto que também deve ser considerado é o de que a hemólise dos deficientes de G-6-PD também pode ocorrer durante a vida intra-uterina, em decorrência da ingestão pela mãe de agentes potencialmente hemolisantes, como ácido ascórbico, sulfas, favas e outros (PERKINS, 1971 e MENTZER & COLLIER, 1975). Tal hemólise pode causar hidropsia fetal e, às vezes, a morte intra-útero ou ao nascimento.

Segundo ROUX e colaboradores (1982), os fatores responsáveis pela maior gravidade da icterícia nas crianças deficientes de G-6-PD não estão inteiramente esclarecidos, mas pelo menos quatro causas podem ser consideradas: 1. hemólise devida à própria deficiência enzimática; 2. agentes hemolíticos exógenos; 3. fatores endógenos, tais como acidose, hipóxia ou níveis alterados de ácido ascórbico e vitamina E, e 4. predisposição étnica.

Com relação às crianças examinadas na presente amostra o único contato com um agente potencialmente hemolisante foi o representado pelo cloranfenicol eliminado pelo leite materno, já que as suas mães estavam sendo medicadas com esse antibiótico no puerpério. É pouco provável, no entanto, que esse antibacteriano seja responsável

pela icterícia manifestada pelos recém-nascidos deficientes de G-6-PD, já que ele é capaz de desencadear hemólise apenas em indivíduos com a variante Mediterrânea e na presença de fatores predisponentes, sobretudo infecções (OSKI & NAIMAN, 1972).

Investigando minuciosamente outros fatores de natureza exógena ou endógena que pudessem estar eventualmente correlacionados com a icterícia manifestada pelos deficientes de G-6-PD detectados neste trabalho, nada foi observado. De fato, a vitamina K₁ recebida pelos recém-nascidos foi a de ocorrência natural ("Kanakion"), que, ao contrário do que acontece com os seus análogos sintéticos, solúveis em água, não tem a capacidade de desencadear hemólise nas crianças com a deficiência de G-6-PD (OSKI & NAIMAN, 1972). Da mesma forma, tais crianças também não tiveram contato com naftalina, talco mentolado ou cânfora durante o seu período de permanência no berçário, nem manifestaram hipóxia, acidose, infecções ou hipoglicemia. As suas mães só receberam, além do cloranfenicol, uma administração de ocitócico, droga que favorece as contrações do útero, não oxidante e que não deve desencadear hemólise em deficientes de G-6-PD.

Do exposto, conclui-se que as crianças deficientes de G-6-PD que manifestaram icterícia, o fizeram na ausência de um fator desencadeante de hemólise evidenciável. É possível, inclusive, que elas tenham manifestado uma icterícia não-hemolítica.

Analisando a literatura, é possível encontrar algumas referências ao fato de a icterícia neonatal do deficiente de G-6-PD também poder ocorrer na ausência de um acidente hemolítico. VALAES e colaboradores (1969), por exemplo, observaram que na maioria dos recém-nascidos deficientes de G-6-PD ictéricos por eles examinados em

diferentes regiões da Grécia, não havia aumento rápido de bilirrubina e/ou valores baixos de hemoglobina, o que tornava duvidoso para eles se o fator predominante no mecanismo da icterícia era realmente a hemólise ou apenas uma metabolização deficiente de bilirrubina.

Segundo TARLOV e colaboradores (1962), como a própria deficiência de G-6-PD leva à uma diminuição do tempo de vida do eritrócito e portanto, a um pequeno aumento da taxa de destruição das hemácias, esse mecanismo, embora insuficiente para produzir anemia, não pode ser excluído como causa de icterícia mais grave em um neonato cujo fígado ainda não atingiu a sua capacidade máxima de conjugação da bilirrubina. Na opinião de MELONI e colaboradores (1973), em muitos casos a icterícia neonatal do deficiente de G-6-PD não é hemolítica, podendo estar relacionada à deficiência de G-6-PD nos hepatócitos e ao grau variável de maturidade hepática dos recém-nascidos.

TAN (1981), estudando crianças recém-nascidas chinesas, observou uma hemólise discretamente aumentada em deficientes de G-6-PD, não proporcional ao grau de icterícia por eles manifestada. Segundo esse autor, tal comportamento poderia ser o reflexo de uma maturação hepática mais lenta, o que parece ser uma característica étnica das crianças chinesas. Da mesma forma, ROUX e colaboradores (1982), ao analisarem recém-nascidos ictéricos da Cidade do Cabo, não observaram hemólise franca na maioria (85%) das crianças deficientes de G-6-PD estudadas. Também para esses autores, a predisposição étnica seria um fator importante para o aparecimento de hiperbilirrubinemia neonatal do deficiente de G-6-PD, fator esse responsável, em grande parte, pelos dados controvertidos observados em estudos realizados em diferentes populações.

Do exposto, parece claro que, embora o aparecimento da icterícia em recém-nascidos deficientes de G-6-PD nem sempre dependa da exposição da criança a fatores hemolisantes, tal exposição, caso ocorra, agravará a icterícia neonatal. Por isso, seria conveniente afixar nos berçários e nas maternidades listagens dos fármacos capazes de provocar hemólise em portadores da deficiência de G-6-PD, que orientariam o clínico na escolha das drogas a serem prescritas para os enzimopênicos e para as suas nutrizes. Também seria conveniente que os próprios deficientes recebessem um documento explicativo de sua particularidade metabólica, documento esse que deveria ser apresentado ao clínico sempre que o paciente necessitasse de cuidados médicos ou que fosse convocado, por exemplo, para doar sangue no futuro.

Terminando a presente discussão, seria interessante comentar a importância do reconhecimento sistemático da deficiência de G-6-PD em berçários brasileiros, uma vez que esse procedimento, além de prevenir futuras crises hemolíticas nos deficientes, ainda permite esclarecer muitos casos de icterícia neonatal. Tal investigação pode ser feita através do exame do sangue do cordão umbilical ou do sangue colhido por punção digital ou calcânea, conforme recomendado por AZEVEDO & AZEVEDO (1974), evitando-se a punção venosa da criança.

Dentre os exames laboratoriais disponíveis para a detecção dos deficientes de G-6-PD, o teste de redução da metemoglobina, ou teste de BREWER (BREWER *et al*, 1960), é um dos mais adequados para grandes estudos populacionais, por ser extremamente simples e econômico, já que utiliza apenas reagentes de baixo custo, ou seja, nitrito de sódio, glicose e azul de metileno. Já outros testes de triagem da deficiência de G-6-PD são pouco adequados para o uso em larga escala

em nosso meio, seja por utilizarem reagentes muito tóxicos, como é o caso do teste do ascorbato-cianeto (JACOB & JANDL, 1966), ou senão muitos caros, como é o caso do teste do descramento do azul cresil brilhante (MOTULSKY & CAMPBELL-KRAUT, 1961).

Segundo BAPAT e colaboradores (1976), no entanto, o teste de redução da metemoglobina apresenta a desvantagem de diagnosticar muitos casos falsamente positivos, superestimando a frequência real da enzimopenia nas populações estudadas. Tal conclusão, além de gerar controvérsias na literatura especializada, já que outros autores, como é o caso de OSKI & NAIMAN (1972), por exemplo, afirmam que o teste de redução de metemoglobina é extremamente confiável, ainda colocou em dúvida as prevalências da enzimopenia encontradas em vários estudos que se valeram dessa técnica.

Com o objetivo de verificar a eficiência desse teste, RAMALHO, SENA & BARRETTO (1985) aplicaram-no em uma amostra de 57 indivíduos adultos certamente deficientes de G-6-PD pelo ensaio enzimático quantitativo e pela eletroforese e não constatarem casos falsamente positivos. Revendo o trabalho de BAPAT e colaboradores (1976), os autores acima citados verificaram que todos os casos falsamente positivos mencionados eram recém-nascidos e, por isso, recomendaram cuidados especiais no uso do teste em amostras de sangue do cordão umbilical.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam essa possibilidade da ocorrência de casos falsamente positivos quando o teste de redução da metemoglobina é aplicado em recém-nascidos, usando-se as clássicas três horas de incubação recomendadas por BREWER e colaboradores (1960). A razão da ocorrência desses casos falsamente

positivos merece ser melhor investigada, já que ela tanto pode ser atribuída às características hematológicas, sobretudo enzimáticas, do recém-nascido, quanto ao fato de o exame realizado em sangue do cordão umbilical dificilmente utilizar material recém-colhido. Assim, a eficiência do exame dependerá muito dos cuidados dispensados às amostras de sangue pela equipe hospitalar responsável pela sua colheita e por sua estocagem. Em ambas as situações, evidentemente, o re-exame da criança com um mês ou mais de vida pelo método da redução da metemoglobina, utilizando amostras de sangue recém-colhido por punção venosa, conforme o realizado por RAMALHO (1979, 1981), talvez de fato aumente a eficiência do exame.

Os dados deste trabalho também concordam com os de BAIAT e colaboradores (1976) tanto no que no diz respeito à diminuição dos casos falsamente positivos quando se aumenta o tempo de incubação do teste de redução da metemoglobina para quatro horas, quanto no que diz respeito à maior eficiência do teste de descoramento do azul cresil brilhante. Aliás, a precisão deste último teste também foi constatada por RAMALHO, SENA & BARRETTO (1985) e ressaltada por BEIGUELMAN (1983).

O teste de fluorescência (BEUTLER, 1966; BEUTLER *et al.*, 1979) é recomendado pelo Comitê Internacional de Padronização em hematologia como teste discriminatório para a detecção da deficiência de G-6-PD (SAAD, 1987). Recentemente, PAIXÃO e colaboradores (1986) compararam os resultados obtidos pelos testes de fluorescência e de redução da metemoglobina, aplicados em uma amostra de 200 recém-nascidos do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP. Embora esses autores não tenham confirmado os casos deficien-

tes de G-6-PD pelo ensaio enzimático quantitativo e pela eletroforese, eles constataram uma provável maior sensibilidade do teste de fluorescência. Assim, pelo teste de redução da metemoglobina, foram diagnosticados dez meninos deficientes de G-6-PD, uma menina homozigota deficiente e quatro heterozigotas. Já pelo teste de fluorescência, eles diagnosticaram treze meninos deficientes, uma menina homozigota deficiente e dez heterozigotas. Assim sendo, a maior sensibilidade do teste de fluorescência constatada por esses autores dizia respeito, sobretudo, à detecção de heterozigotas.

O teste de descoramento do azul cresil brilhante e o teste de fluorescência, além de precisos, também são muito simples. Os reagentes empregados nesses testes, no entanto, são bem mais caros que os usados no teste de redução da metemoglobina, o que pode representar um empecilho importante ao seu emprego em larga escala em alguns hospitais brasileiros. Vale a pena comentar, entretanto, que a pequena quantidade de reagentes empregada em cada exame reduz o custo do teste por indivíduo examinado.

Do exposto, pode-se concluir que os serviços brasileiros interessados em realizar a investigação rotineira da deficiência de G-6-PD no período neonatal terão à sua disposição várias metodologias simples e eficientes, podendo escolher a que melhor se adaptar às suas condições. Levando em conta, porém, que o teste de redução da metemoglobina é muito econômico, parece lógico que ele continue a ser utilizado como teste de triagem, e que apenas os casos positivos detectados por seu intermédio após quatro horas de incubação sejam submetidos à investigação quantitativa da atividade de G-6-PD. Quanto a esse último aspecto, é importante lembrar que as amostras de sangue

dos casos triados podem ser enviadas para centros de referência para a realização de ensaio enzimático quantitativo e da eletroforese, desde que refrigeradas e preservadas em ACD.

Concluindo estas observações, não é demais salientar que os testes de triagem para a deficiência de G-6-PD nunca devem ser aplicados em amostras de sangue com hematócrito inferior a 40% (BREWER *et al*, 1960; MOTULSKY & CAMPBELL-KRAUT, 1961; BEIGUELMAN, 1983). Para a realização desses exames, os sangues com hematócrito baixo devem ter esse valor corrigido para cerca de 45%, por remoção da quantidade necessária de plasma.

Em oposição, sangues com alta contagem de reticulócitos podem dar falsos resultados normais, porque os reticulócitos de indivíduos Gd(-), A têm atividade de G-6-PD maior do que as hemácias adultas (YOSHIDA *et al*, 1967; BEIGUELMAN, 1983). Essa condição tem especial importância quando o teste é feito logo após um episódio hemolítico ou na vigência de uma doença hemolítica crônica.

HERZ e colaboradores (1970) empregaram com êxito uma microtécnica de redução do número de reticulócitos em amostras de sangue, possibilitando a detecção da deficiência de G-6-PD em negróides na vigência de crise hemolítica. Desde então, esse método é recomendado para identificação da deficiência de G-6-PD em situações de reticulocitose. Assim, por exemplo, SAAD (1987), investigando recentemente a deficiência de G-6-PD em uma amostra de brasileiros portadores de síndromes falcêmicas, demonstrou que a técnica de HERZ e colaboradores (1970) aumenta sensivelmente a eficácia do teste de fluorescência nesses pacientes.

VI. RESUMO E CONCLUSSES

A investigação da deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD) em recém-nascidos é um procedimento bastante útil em nosso meio pois, entre outras razões, contribui para o esclarecimento de alguns casos de icterícia neonatal, que, ainda hoje, constitui um importante problema para os neonatologistas.

Contudo, apesar de tal investigação ser insistentemente recomendada por alguns autores brasileiros, ela ainda é realizada de forma apenas excepcional em nosso país. Isso talvez se deva ao fato de a relação entre a deficiência de G-6-PD e a icterícia neonatal ainda não estar perfeitamente caracterizada em nosso meio.

De fato, enquanto que a associação etiológica entre a icterícia neonatal e algumas variantes que causam deficiência grave de G-6-PD, como é o caso da variante Mediterrânea, está perfeitamente estabelecida na literatura internacional, o mesmo não se observa em relação à variante Africana ou A⁻, que é a variante deficiente de G-6-PD mais frequente na maior parte do território brasileiro. Além disso, alguns estudos a respeito da associação entre a deficiência de G-6-PD e a icterícia neonatal realizados com diferentes metodologias nos Estados de São Paulo e da Bahia obtiveram resultados discordantes.

Diante do exposto, pretendeu-se com o presente trabalho, esclarecer esse assunto de forma definitiva na população paulista, através de um estudo prospectivo realizado em uma grande amostra de recém-nascidos.

Para tanto, foram estudados 697 recém-nascidos a termo, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, com os seguintes objetivos:

- 1º) Investigar se a deficiência de G-6-PD é realmente uma causa importante em nosso meio de icterícia neonatal moderada, que requer fototerapia, conforme havia sido suspeitado anteriormente por RAMALHO (1979, 1981);
- 2º) Verificar se essa enzimopenia também está correlacionada etiologicamente à icterícia neonatal leve, que requer apenas observação;
- 3º) Investigar se o aparecimento de icterícia no recém-nascido deficiente de G-6-PD está correlacionado com algum fator desencadeante de hemólise, como medicação incompatível na criança ou em sua nutriz, infecção, hipóxia, acidose e hipoglicemia entre outros;
- 4º) Investigar se especificamente a variante Africana ou A de G-6-PD está associada à icterícia neonatal em nossas populações.
- 5º) Comparar os resultados obtidos na investigação da deficiência de G-6-PD em amostras de sangue do cordão umbilical realizada por dois testes de triagem, ou seja, pelo teste de redução da metemoglobina (BREWER *et alii*, 1960) e pelo teste de descoramento do azul cresil brilhante (MOTULSKY & CAMPBELL-KRAUT, 1961) com os observados pelo ensaio enzimático quantitativo e pela eletroforese de G-6-PD;
- 6º) Sugerir procedimentos que permitam a investigação simples, econômica e eficiente da deficiência de G-6-PD em recém-nascidos brasileiros.

Para atender a esses objetivos, a deficiência de G-6-PD foi investigada por testes de triagem e de confirmação em amostras de sangue do cordão umbilical e os recém-nascidos foram seguidos clínica-

mente no Berçário, com o fim de verificar o aparecimento ou não de icterícia. Os resultados obtidos permitiram à autora chegar às seguintes conclusões:

1º) existe uma indiscutível associação em nosso meio entre a deficiência de G-6-PD, ou melhor, entre a variante Africana de G-6-PD, e a icterícia neonatal moderada;

2º) a variante Africana ou A⁻ de G-6-PD parece não estar correlacionada etiologicamente à icterícia neonatal leve,

3º) a possibilidade de encontro da associação entre deficiência de G-6-PD e a icterícia neonatal em um trabalho brasileiro de pesquisa dependerá da proporção de portadores de icterícia moderada presentes na casuística, além de outros fatores como, por exemplo, do grau de maturidade hepática das crianças examinadas;

4º) as crianças deficientes de G-6-PD que manifestaram icterícia, o fizeram na ausência de um fator desencadeante de hemólise evidenciável. É possível, inclusive, que a icterícia por elas manifestada seja uma icterícia não-hemolítica;

5º) embora o aparecimento da icterícia em recém-nascidos deficientes de G-6-PD nem sempre dependa da exposição da criança a fatores hemolizantes, tal exposição, caso ocorra, agravará a icterícia neonatal;

6º) o teste de redução da metemoglobina pode fornecer resultados falsamente positivos quando aplicado em amostras de sangue do cordão umbilical. A eficiência desse exame pode ser melhorada aumentando-se o tempo de incubação para quatro horas, conforme recomendado por BAPAT e colaboradores (1976);

7º) o teste do descoramento do azul cresil brilhante fornece resultados concordantes com os do ensaio enzimático quantitativo, quando aplicado a amostras de sangue do cordão umbilical;

8º) o teste de redução da metemoglobina pode ser utilizado como teste econômico de triagem da deficiência de G-6-PD no período neonatal, desde que os casos positivos detectados por seu intermédio após quatro horas de incubação sejam submetidos à investigação quantitativa da atividade de G-6-PD;

9º) a associação do teste de redução da metemoglobina com o teste de descoramento do azul cresil brilhante (confirmando os casos positivos) também garante praticamente 100% de eficiência na identificação de recém-nascidos deficientes de G-6-PD, quando comparada com o ensaio enzimático e a eletroforese de G-6-PD.

VII. SUMMARY

The etiological association of neonatal jaundice and G-6-PD deficiency due to the African variant or A⁻ variant has not been defined in previous works and Brazilian studies done in São Paulo and Bahia with different methodologies showed discordant results. The purpose of this work was to establish this association in a prospective study of 697 newborn infants excluding those presenting blood incompatibility, infections or prematurity. All icteric newborn infants had negative Coombs test. The G-6-PD deficiency was investigated in umbilical cord blood by screening tests (methemoglobin reduction test and brilliant cresyl blue dye test) and confirmed by enzymatic activity assay and starch gel electrophoresis. Twenty five newborn infants had G-6-PD deficiency. The enzymopeny frequencies were 9,5% in the negroid boys, 2% in the caucasoid boys and 2,3% in the negroid girls. All of the G-6-PD deficient infants examined had the mild African ou A⁻ type of G-6-PD deficiency with exception of one caucasoid boy who showed an enzyme with electrophoretic pattern highly suggestive of the Mediterranean type. The infants were clinically followed in the nursery for detection of jaundice. Jaundice was classified as mild or moderate. No infants had severe jaundice. The incidence of moderate jaundice was significantly higher ($p < 0,001$) in the enzymopenic infants but the same was not observed ($0,3 < p < 0,5$) in the deficient with mild jaundice. These results permitted the conclusion that in the population from the Campinas area, State of São Paulo, there is an irrefutable association of the African G-6-PD deficient variant (the most frequent in Brazilian territory) and

moderate jaundice but not with the mild jaundice. The probability of detecting this association depends on the proportion of infants with moderate jaundice present in the sample as well as other factors which can provide moderate jaundice such as the degree of hepatic maturity in the examined infants. No hemolytic agents were discovered in the jaundiced G-6-PD deficient infants suggesting that this jaundice was non-hemolytic although it can be aggravated by exposure to those agents. The methemoglobin reduction test, done in umbilical cord blood, can give false-positive results but its efficiency can be improved if the incubation time is extended to 4 hours, permitting its use as an economic screening test. In case of positive results these are subsequently confirmed by the G-6-PD enzymatic assay. As the brilliant cresyl blue dye test is always concordant with the enzymatic activity assay, the detection of G-6-PD deficient newborn infants with this test in association with the methemoglobin reduction test is 100% effective, when compared to the enzymatic activity assay and G-6-PD electrophoresis.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALLEN, E.W. & JANDL, J.H. - Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. II. Role of thiols in oxidant drug action. *J. Clin. Invest.*, 40:454-460, 1961.
- AZEVEDO, E.S. & YOSHIDA, H. - Brazilian variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase (Gd Minas Gerais). *Nature*, 222:380-382, 1969.
- AZEVEDO, E.S. & AZEVEDO, T.F.S. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal jaundice in Bahia, Brazil. *Ciência e Cultura*, 26:1044-47, 1974.
- AZEVEDO, W.C.; SILVA, M.L.F.; GRASSI, C.B. & AZEVEDO, E.S. - Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes de um hospital de Salvador, Bahia, Brasil. *Rev. Bras. de Pesquisas Med. e Biol.*, 11:49-52, 1978.
- ASHKENAZI, S.; MINOUNI, F.; MERLOB, P. & REISNER, S.H. - Neonatal bilirubin levels and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in preterm and low-birth-weight infants in Israel. *Isr. J. Med. Sci.*, 19:1056-58, 1983.
- BABINI, B. & SALVIOLI, G.P. - Incidenza della deficienza de glucose-6-fosfato deidrogenasi nell'ittero grave del neonato. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 38:1092-95, 1962.
- BAHEMER, R.L.; NATHAN, D.G. & CASTLE, W.B. - Oxidant injury of Caucasian G-6-PD deficient red blood cells by phagocytosing leukocytes during infection. *J. Clin. Invest.*, 50:2466-72, 1971.
- BALDINI, M.G.; D'ONOFRIO, A.F.; FORTE, A.; MEIATTINI, M.T. & UNGARO, P. - Ittero neonatale e deficit intra eritrocitario di G-6-PD. *Minerva Pediatr.*, 32:563-70, 1980.

- BAPAT, J.P.; BAXI, A.J. & BHATIA, H.M. - Is methemoglobin reduction test a true index of G-6-PD deficiency? *Indian J. Med. Res.*, 64:1687-90, 1976.
- BAXI, A.J.; UNDEVIA, J.V. & BHATIA, H.M. - Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in acute hemolytic crisis and neonatal jaundice. *Indian J. Med. Sci.*, 18: 574-83, 1964.
- BEIGUELMAN, B.; PINTO JR., W.; DALL'AGLIO, F.F.; SILVA, E. & VOZZA, J.A. - G-6-PD deficiency among lepers and healthy people in Brazil. *Acta Genet. (Basel)*, 18:159, 1968.
- BEIGUELMAN, B. - Polimorfismos genéticos de importância clínica no Brasil. *Ciência e Cultura*, 29:876-87, 1977.
- BEIGUELMAN, B. - *Farmacogenética e sistemas sanguíneos eritrocitários* (Coleção Genética Médica, v.3), São Paulo, EDART, 1979.
- BEIGUELMAN, B. - *Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações* (Coleção Genética Médica, v. 2), São Paulo, EDART, 1981.
- BEIGUELMAN, B. - A deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose. In: _____ *Farmacogenética e sistemas sanguíneos eritrocitários*, 1a. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983, Unidade I, Cap. 2, p. 13-24.
- BENATTI, U.; MORELLI, A.; MELLONI, T.; SPARATORE, B.; SALAMINO, G. MICETTI, M.; MELLONI, E.; PENTREMOLLI, S. & DE FLORA, A. - Comparative patterns of "in vitro" oxidative hemolysis of normal and G-6-PD deficient erythrocytes. *FEBS Lett.*, 128:225-29, 1981.
- BEUTLER, E. - A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and glutathione reductase deficiency. *Blood*, 28:553-62, 1966.

- BEUTLER, E. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) and 6-phosphogluconase dehydrogenase (6-PGD). In: _____, *Red cell metabolism - a manual of biochemical methods*. 2a. ed., London, Grun & Stratton, 1975, p. 66-69.
- BEUTLER, E.; BLUME, K.G.; KAPLAN, J.C.; LOHR, G.W.; RAMOT, B. & VALENTINE, W.N. - International committee for standardization in haematology: recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *Br. J. Haematol.*, 43:469-77, 1979.
- BEUTLER, E. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: STANBURY, J.B.; WYNGAARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.S.; GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M.S. *The metabolic basis of inherited disease*. 5a. ed., New York, Mc Graw-Hill, 1983. Parte 10, p. 1629-53.
- BHANDARI, A.; CROWELL, E.B.; CROWELL, C. & KHANNA, S.D. - Incidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in jaundiced Punjabi neonates. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, 25:279-82, 1982.
- BIENZLE, V.; EFFIONG, C.E.; AIMAKU, V.E. & LUZZATTO, L. - Erythrocyte enzymes in neonatal jaundice. *Acta Haematol.*, 55:10, 1976.
- BORNSTEIN, A.A.; SEPTIEN, J.M.; DE LOS COBOS, J.A.; CORINA, N.C. & ESCALANTE, E.V. - Deficiencia de la deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato como causa de hiperbilirrubinemia del recién-nacido. *Ginecol. Obstet. Mex.*, 25:203-9, 1969.
- 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.*, 22:633, 1960.
- BROWN, A.K. - Erythrocyte metabolism and hemolysis in the newborn. *Pediatr. Clin. North Am.*, 13:879, 1966.

- BROWN, W.R. & WONG, H.B. - Hyperbilirubinemia and kernicterus in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient infants in Singapore. *Pediatrics*, 41:1055-62, 1968.
- CAPPS, F.P.A.; GILLES, H.M.; JOLLY, H. & WORLLEDGE, S.H. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal jaundice in Nigeria. *Lancet*, 2:379-83, 1963.
- CAPURRO, H.; KONICHEZKY, S.; FONSECA, D. & CALDEYRO-BARCIA, R. - A simplified method for diagnosis of gestacional age in the newborn infant. *J. Pediatr*, 93:120-22, 1978.
- CHAT, L.X.; QUANG, L.S.; HUMBERT, C. & CIAO, C.Q. - Le déficit en glucose-6-phosphate déhydrogénase au Viet-nam. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 8:878-84, 1968.
- CHIAPPE, S. & LEONE, A. - Importanza del deficit di glucosio-6-fosfato -deidrogenasi in alcuni itteri gravi e protratti del neonato e risultati della terapia exsanguinotransfusionale e cortisonica. *Ann. Ital. Pediatr.*, 17:356-63, 1966.
- COHEN, G. & HOCHSTEIN, P. - Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. *Biochemistry*, 3:895-900, 1964.
- DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. - Collection of blood and normal values. In: _____, *Practical Haematology*. 5a. ed. Edimburgo, Churchill, 1975. Cap. 1, p. 1-20.
- DESHMUK, V.V. & SHARMA, K.D. - Deficiency of erythrocyte G-6-PD as a cause of neonatal jaundice in India. *Indian Pediatr.*, 5:401-5, 1968.
- DOXIADIS, S.A.; FESSAS, P. & VALAES, T. - Erythrocyte enzyme deficiency in unexplained kernicterus. *Lancet*, 2:44, 1960.

- DOXIADIS, S.A.; FESSAS, P.; VALAES, T. & MASTROKALOS, N. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a new aetiological factor of severe neonatal jaundice. *Lancet*, *1*:297, 1961.
- DOXIADIS, S.A.; VALAES, T.; KARAKLIS, A. & STAVRAKAKIS, D. - Risk of severe jaundice in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency of the newborn. Differences in population groups. *Lancet*, *2*:1210-12, 1964.
- DOXIADIS, S.A. & VALAES, T. - The clinical picture of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in early infancy. *Arch. Dis. Child*, *39*:545-53, 1964.
- DUTTA, R.N.; MAJID, J.; HASAN, M.I. & CHOKSEY, N.J. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in newborn infants. *J. Indian Med. Assoc.*, *51*:315-19, 1968.
- ESHAGHPOUR, E.; OSKI, F.A. & WILLIAMS, M. - The relationship of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency to hyperbilirubinemia in Negro premature infants. *J. Pediatr.*, *70*:595-601, 1967.
- ESTRADA, M. & GONZALES, R. - Ictericia neonatal y deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la ciudad de la Habana. *Rev. Invest. Clin. (Méx.)*, *35*:297-99, 1983.
- FESSAS, P.; DOXIADIS, S.A. & VALAES, T. - Neonatal jaundice in Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient infants. *Br. Med. J.*, *2*:1359-62, 1962.
- FLATZ, G.; SRINGAM, S.; PREMYOTHIN, C.; PENBHARKKUL, S.; KETUSINGH, R. & CHULAJATA, R. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal jaundice. *Arch. Dis. Child*, *38*:566-70, 1963.

- GABURRO, D.; VOLPATO, S. & SCARPA, P. - Pathologie érythrocytaire néonatale par défaut en glucose-6-phosphate déshydrogénase. *Ann. Pediatr.*, 9:625-27, 1962.
- GILLES, H.M. & TAYLOR, B.G. - The existence of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient trait in Nigeria and its clinical implications. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 55:64, 1961.
- GIBBS, W.N.; GRAY, R. & LOWRY, M. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal jaundice in Jamaica. *Br. J. Haematol.*, 43:263-74, 1979.
- GOODFELLOW, P.N.; DAVIES, K.E. & ROPERS, H.H. - The X chromosome. Report of the committee on the genetic constitution of the X and Y chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 40:296-352, 1985.
- HENDRICKSE, R.G. - In discussion of paper by A-Motulsky, theoretical and clinical problems of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: Its occurrence in Africans and its combination with hemoglobinopathy. In: JONXIS, J.H., ed. *Abnormal Haemoglobins in Africa Symposium*. Oxford, Blackwell, 1965. p. 208.
- HERZ, F.; KAPLAN, E. & SCHEYE, E.S. - Diagnosis of erythrocyte G-6-PD deficiency in the negro male despite hemolytic crisis. *Blood*, 35:90-93, 1970.
- HUTZ, M.H.; YOSHIDA, A. & SALZANO, F.M. - Three rare G-6-PD variants from Porto Alegre, R.S., Brazil. *Hum. Genet.*, 37:191-97, 1977.
- IFEKWUNIGWE, A.E. & LUZZATTO, L. - Kernicterus in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*, 1:667, 1966.
- ISHERWOOD, D.M. & FLETCHER, K.A. - Neonatal jaundice: investigation and monitoring. *Ann. Clin. Biochem.*, 22:109-28, 1985.

- JACOB, H.S. & JANDL, J.H. - Effects of sulphhydryl inhibition on red blood cells. I - Mechanism of hemolysis. *J. Clin. Inv.*, 41:779-92, 1962.
- JACOB, H.S. & JANDL, J.H. - Effects of sulphhydryl inhibition on red blood cells. II - Glutathione in the regulation of the hexose monophosphate pathway. *J. Biol. Chem.*, 241:4243-50, 1966.
- JAFFÉ, E. - Hereditary hemolytic disorders and enzymatic deficiencies of human erythrocytes. *Blood*, 35:116-34, 1970.
- JANDL, J.H. & ALLEN, D.W. - Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. Heinz body anemia as an accelerated form of red cell aging. *J. Clin. Invest.*, 39:1000-1008, 1960.
- JIM, R.T.S. & CHU, F.K. - Hyperbilirubinemia due to glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in a newborn chinese infant. *Pediatrics*, 31:1046, 1963.
- KARAYALCIN, G.; KIM, K.Y.; ABALLI, A.J. & LANZKOWSKY, P. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency and hyperbilirubinemia in black American term infants. *Am. Soc. Haematol.*, (abstract 165):92, 1973 (Citado por Beutler).
- KEATS, B. - Genetic mapping: X chromosome. *Hum. Genet.*, 64:28-32, 1983.
- KIRKMAN, H.N.; DOZIADIS, S.A.; VALAES, T.; TASSOPOLOS, N. & BRINSON, A.G. - Diverse characteristics of G-6-PD from Greek children. *J. Lab. clin. Med.*, 65:212-21, 1965.
- KRAMER, L.I. - Advancement of dermal icterus in the jaundiced newborn. *Am. J. Dis. Child.*, 118:454-58, 1969.
- LAI, H.C.; LAY, M.P.Y. & LEUNG, K.S.N. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Chinese. *J. Clin. Pathol.*, 21:44-7, 1968.

- LEE, C.L. & HENRY, J.B. - Immunohematology, blood banking and hemotherapy. In: HENRY, J.B., Tood-Sanford-Davidsohn - *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 16a. ed. Philadelphia, Saunders, 1979. Cap. 43. p. 1409-506.
- LEVIN, S.E.; CHARLTON, R.W. & FREIMAN, I. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal in South African Bantu infants. *J. Pediatrics*, 65:757-64, 1964.
- LIE-INJO, L.E.; YIRIK, H.K.; LIM, A.K. & GANESAN, J. - Red cell metabolism and severe neonatal jaundice in West Malaysia. *Acta Haematol.*, 58:152-60, 1977.
- LOPEZ, R. & COOPERMAN, J.M. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hyperbilirubinemia in the newborn. *Am. J. Dis. Child.*, 122:66-70, 1971.
- LU, T.C.; WEI, H. & BLACKWELL, R.Q. - Increased incidence of severe hyperbilirubinemia among newborn Chinese infants with G-6-PD deficiency. *Pediatrics*, 37:994, 1966.
- LUZZATTO, L. & BATTISTUZZI, G. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Adv. Hum. Genet.*, 14:217-329, 1985.
- MELONI, T.; CAGNAZZO, M.D. & CUTILLO, S. - Phenobarbital for prevention of hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient newborn infants. *J. Pediatr.*, 82:1048-51, 1973.
- MELONI, T.; CORTI, R.; COSTA, S.; MELE, G. & FRANCA, V. - -Thalassaemia and hyperbilirubinaemia in G-6-PD-deficient newborns. *Arch. Dis. Child.*, 55:482-84, 1980(a).
- MELONI, T.; ERRE, S.; GALLISAI, D. & CUTILLO, S. - -thalassemia trait and hyperbilirubinemia in G-6-PD deficient newborn infants. *Eur. J. Pediatr.*, 134:119-20, 1980(b).

- MENTZER JR., W.C. & COLLIER, E. - Hydrops fetalis associated with erythrocyte G-6-PD deficiency and maternal ingestion of fava beans and ascorbic acid. *J. Pediatr.*, 86:565-67, 1975.
- MILBAUER, B.; PELED, N. & SUIRSKY, S. - Neonatal hyperbilirubinemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Isr. J. Med. Sci.*, 9:1547, 1973.
- MOLLISON, P.L. - Haemolytic Disease of the Newborn. In: *Blood transfusion in clinical medicine*, 5a. ed. Oxford, Blackwell, 1974. Cap. 14. p. 617-78.
- MOTULSKY, A.G. & CAMPBELL-KRAUT, I.M. - Population genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency of the red cells. In: CONF. GENET. POLYMORPHISM AND GEOGRAPHICAL VARIATIONS IN DISEASE PROCEEDINGS. N. York, Grune, 1961. p. 159.
- NAIMAN, J.L. & KOSOY, M.H. - Red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency - a newly recognized cause of neonatal jaundice and kernicterus in Canada. *Can. Med. Assoc. J.*, 91:1243-49, 1964.
- O'FLYNN, M.E.D. & HSIA, D.Y.Y. - Serum bilirubin levels and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in newborn american negroes. *J. Pediatr.*, 63:160-61, 1963.
- OWE, S.A. & RANSOME-KUTI, O. - The risk of jaundice in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient babies exposed to menthol. *Acta Paediatr. Scand.*, 69:341-45, 1980.
- ORLINA, A.R.; JOSEPHSON, A.M. & Mc DONALD, B.J. - The poststorage viability of G-6-PD deficient erythrocytes. *J. Lab. Clin. Med.*, 15:930-36, 1970.

- OSKI, F.A. & NAIMAN, J.L. - Disorders of Red Cell Metabolism. In: _____ . *Hematologic Problems in the Newborn*. 2a. ed. Philadelphia: Saunders, 1972. Cap. 5. p. 83-132.
- PAI, G.S.; SPRENKLE, J.A.; DO, T.T.; MARENI, C.E. & MIGEON, B.R. - Localization of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of non-random X chromosome expression from studies of a human X-autosome translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:2810-13, 1980.
- PAIXAO, A.C. ; GONÇALVES, A.L.; BORGES, E.G. & TONE, L.G. - Testes de rastreamento da deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD). *Rev. Bras. Patol. Clin.*, 22:118-21, 1986.
- PANIZON, F. - Erythrocyte enzyme deficiency in unexplained kernicterus. *Lancet*, 2:1039, 1960(a).
- PANIZON, F. - Dimostrazione della anomalia enzimática nel fegato di soggetti con difetto eritrocitario di glicose-6-fosfato desidrogenasi. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 36:106, 1960(b).
- PANIZON, F. - L'ictère grave du nouveau-né associé à une déficience en glicose-6-phosphate dehydrogénase. *Biol. Neonate*, 2:167-77, 1960(c).
- PANNAGOPOULUS, G.; VALAES, T. & DOXIADIS, S.A. - Morbidity and mortality related to exchange transfusion. *J. Pediatr.*, 74:247-54, 1969.
- PERKINS, R.P. - Hydrops fetalis and still-birth in a male glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient fetus possibly due to maternal ingestion of sulfisoxazole. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 111:379-81, 1971.

- PERSICO, M.G.; TONIOLO, D.; NOBILE, C.; D'URSO, M. & LUZZATTO, L. - cDNA sequences of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in pBr322. *Nature*, 294:778-80, 1981.
- RACE, R.R. & SANGER, R. - Xg and X-chromosome mapping. In: _____ *Blood Groups in Man*. 6a. ed., Oxford, Blackwell, 1975. Cap. 29, p. 594-618.
- RAMALHO, A.S. & BEIGUELMAN, B. - Deficiência de desidrogenase-6-fosfato de glicose (G-6-PD) em doadores de sangue brasileiros. *FONEAN*, 73:281-83, 1976.
- RAMALHO, A.S. - *Estudo médico de polimorfismos genéticos de importância clínica no Brasil*. Campinas, 1979. (Tese Livre-Docência - Universidade Estadual de Campinas).
- RAMALHO, A.S. - Deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD) em recém-nascidos brasileiros. *Rev. Ass. Med. Brasil*, 27:343-45, 1981.
- RAMALHO, A.S. & SENA, L.L.A. - Deficiência de G-6-PD e terapêutica no Brasil. *FONEAN*, 91:67-69, 1985(a).
- RAMALHO, A.S.; SENA, L.L.A. & BARRETTO, O.C.O. - Os testes de triagem para deficiência de G-6-PD. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 17:23-25, 1985(b).
- RAMALHO, A.S.; SENA, L.L.A. & VENTURELLI, L.E. - Deficiência de G-6-PD e hemoterapia no Brasil. *Rev. Paul. Med.*, 103:11-14, 1985 (c).
- RAMALHO, A.S. - Uma alteração genética frequentemente associada às hemoglobinopatias: a deficiência de G-6-PD. In: *As Hemoglobinopatias Hereditárias: Um Problema de Saúde Pública no Brasil*. 1a. ed., Ribeirão Preto, Editora da Revista Brasileira de Genética, 1986(a). Cap. 15, p. 149-60.

- RAMALHO, A.S. - Alterações genéticas na resposta a medicamentos em populações brasileiras. *Arq. Bras. Med.*, 60:9-11, 1986(b).
- RIVERO, M.E.J.; DINIZ, E.M.A.; NONOYAMA, K.; BARRETO, O.C.O. & VAZ, F.A.C. - Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em recém-nascidos. *Pediatr. (São Paulo)*, 3:214-16, 1981.
- ROUX, P.; HARABUS, C.D. & HARTLEY, P.S. - The effect of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the severity of neonatal jaundice in Cape Town. *S. Afr. Med. J.*, 61:781-82, 1982.
- SCHAERER, K.; HERZKA, H. & MARTI, H.R. - Kernicterus bei mangel an glukose-6-phosphat dehydrogenase der erythrocyten. *Helv. Paediatr. Acta*, 2:148, 1963.
- SAAD, S.T.O. - Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD) em doenças falciformes. Campinas, 1987. (Tese - Mestrado, Universidade Estadual de Campinas).
- SCOTT, E.M.; DUNCAN, I.W. & EKSTRAND, V. - The reduced pyridine nucleotide dehydrogenases of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 240:481-85, 1965.
- SEGRE, C.A.M. - Contribuição ao estudo da importância da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase como causa de icterícia neonatal. São Paulo, 1971. (Tese - Doutorado - Escola Paulista de Medicina).
- SENA, L.L.A. - Estudo médico da deficiência da desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD) na região de Campinas, S.P. Campinas, 1983. (Tese - Doutorado - Universidade Estadual de Campinas).
- SENA, L.L.A.; BARRETO, O.C.O. & RAMALHO, A.S. - Variantes de G-6-PD em uma população brasileira. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, 20:113-15, 1984.

- SENA, L.L.A. & RAMALHO, A.S. - Clinical evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency in a Brazilian population. *Braz. J. Genet.*, 8:89-96, 1985.
- SHALEV, O.; ELIAKIM, R.; LUGASSY, G.L. & MENCZEL, J. - Hypoglycemia-induced hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Acta Haematol.*, 74:227-29, 1985.
- SMITH, G. & VELLA, F. - Erythrocyte enzyme deficiency in unexplained kernicterus. *Lancet*, i:1133-34, 1960.
- STRICKLAND, M. & HU, S.C. - Erythrocyte G-6-PD deficiency associated with acute haemolytic anaemia in three Chinese children. *Bull. Hong Kong Med. Assoc.*, 14:81, 1963.
- SZEINBERG, A.; OLIVER, M.; SCHIMIDT, R.; ADAM, A. & SHEBA, C. - G-6-PD deficiency and haemolytic disease of the newborn in Israel. *Arch. Dis. Child.*, 38:23, 1962.
- TAN, K.L. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase status and neonatal jaundice. *Arch. Dis. Child.*, 56:874-77, 1981.
- TARLOV, A.R.; BREWER, G.J.; CARSON, P.E. & ALVING, A.S. - Primaquine sensitivity. *Arch. Intern. Med.*, 109:209-34, 1962.
- TCHERNIA, G.; ZUCKER, J.M.; OUDART, J.L.; BOAL, M.R. & KUAKUVI, N. - Fréquence et incidences du déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase érythrocytaire chez le nouveau-né Africain à Dakar. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 11:145-58, 1971.
- TUNIOLI, A.M. - Ittero nucleare in soggetti con enzimopatia eritrocitaria. *Arch. Ped. S. Anna Ferrara*, 17:149-60, 1964.
- VACA, G.; IBARRA, B.; HERNANDEZ, A.; OLIVARES, N.; MEDINA, C.; SANCHEZ-CORONA, J.; WUNSCH, C.; GODINEZ, B.; MARTINEZ-BASALO, C. & CANTU, J.M. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and

- abnormal hemoglobins in Mexican newborns with jaundice. *Rev. Invest. Clin. (Méx.)*, 33:259-61, 1981.
- VACA, G.; VELASQUEZ, A.L. & CANTU, J.H. - Las eritroenzimopatías hereditarias - I. Aspectos bioquímicos y genéticos. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 97:225-37, 1984.
- VALAES, T. - Red cell enzymes and severe neonatal jaundice. *Cereb. Palsy Bull.*, 3:431-34, 1961.
- VALAES, T.; KARAKLIS, A.; SATRAVRAKAKIS, D.; BAVELA-STRAVRAKAKIS, K.; PERAKIS, A. & DOXIADIS, S.A. - Incidence and mechanism of neonatal jaundice related to glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res.*, 3:448-58, 1969.
- VECHIO, F. - La sindrome itterica in neonati con deficit eritrocitario di glucoso-6-fosfatodeidrogenasi. *Pediatria (Napoli)*, 72:1-19, 1964.
- VECHIO, F. - La terapia exsanguinotransfusionale dell'ittero neonatale da deficit di G-6-PDH. *Pediatria (Napoli)*, 73:425-36, 1965.
- VELAZQUEZ, A.L.; RICO, N.G.; IBARRA, B.; BLAUCARTI, R.; CARDOSA, J.; FONSECA, S.; MALDONADO, E.; ENRIQUEZ, M.A.; MEDINA, C.; CANTU, J.M. & VACA, G. - Eritroenzimopatías hereditarias en neonatos con hiperbilirrubinemia. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, 42:466-69, 1985.
- VULLO, C. & TUNIOLI, A.M. - Ittero neonatale con deffeto transitorio della G-6-PD eritrocitaria. *Pediatria (Napoli)*, 69:327, 1961.
- WEATHERALL, D.J. - Enzyme deficiency in disease of the newborn. *Lancet*, i:835-37, 1960.
- WEIMER, T.A.; SALZANO, F.M. & HUTZ, M.H. - Erythrocyte isozymes and hemoglobin types in a Souther Brazilian population. *J. Hum. Evol.*, 10:319-28, 1981.

- W.H.O. - Technical report series n° 366. Standardization of procedures for study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *World Health Organization*, Geneva, 1967, p.1-56.
- WOLFF, J.A.; GROSSMAN, B.H. & PAYA, K. - Neonatal serum bilirubin and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Relationship of various perinatal factors to hyperbilirubinemia. *Am. J. Dis. Child.*, 113: 251-54, 1967.
- YOSHIDA, A. - Human G-6-PD: Purification and characterization of Negro type variant (A) and comparison with normal enzyme (B). *Biochem. Genet.*, 1:81-88, 1967.
- YOSHIDA, A. - Amino acid substitution (histidine to tyrosine) in a glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G-6-PD Hektoen) associated with overproduction. *J. Mol. Biol.*, 52:483-90, 1970.
- YOSHIDA, A.; BEUTLER, E. & MOTULSKY, A.G. - Human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Bull. W.H.O.*, 45:243-53, 1971.
- ZANNOS-MARIOLEA, L.; THOMAIDIS, T.H.; GEORGIZAS, G.; GAVRIELIDOU, E. & BENETOS, S. - Diagnostic problems in severe neonatal jaundice and G-6-PD deficiency in Greece. *Arch. Dis. Child.*, 43:36-41, 1968.

ZINKHAM, W.H. - Peripheral blood and bilirubin values in normal full-term primaquine-sensitive negro infants; effect of vitamin K. *Pediatrics*, 31:983-95, 1963.

ZIMMERMAN, H.J. - Evaluation of the function and integrity of the liver. In: HENRY, J.B. *Tood-Sanford-Davidsohn - Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 16a. ed. Philadelphia. Saunders. 1979. Cap. 11. p. 305-46.

Revisão Bibliográfica feita segundo consulta a:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. PROJETO NB-66, 1977.

ANEXO 1
HOSPITAL DE CLÍNICAS

RN de: _____ HC nº: _____
Data Nascimento: _____ Local Nascimento: _____ Hora: _____

DADOS DA MÃE

Nome: _____ SAME nº: _____
Residência: _____
Local nascimento: _____ Procedência: _____
Cor: _____ Idade: _____
Grupo Sanguíneo: _____
Ant. sens. RH: _____
Enf. Hemol. RN: _____
Amamentando: _____
Tipo de parto: _____
Medicação em uso: _____

DADOS DO RN

Idade Gestac. Clínica (Capurro somático): 204 + _____ dias / _____ sem _____ dias
Idade gestacional: _____ Peso: _____ Altura: _____
Apgar 1º min: _____ Apgar 5º min: _____
Sexo e tipo de parto: _____
Cor: _____ ABO/RH: _____
Coombs: _____
Medicação em uso: _____

Pesquisa para Deficiência de G-6-PD em cordão umbilical

Teste de Brewer: _____
Teste de Motulsky: _____
Eletroforese de G-6-PD: _____
Ensaio enzimático: _____
Icterícia: _____ NÃO () _____ SIM ()

	Zona 1 - Cabeça e pescoço ()
Zonas dérmicas de	Zona 2 - Tronco até umbigo ()
progressão crânio	Zona 3 - Hipogastrio e coxas ()
caudal da icterícia	Zona 4 - Joelhos e cotovelos até punhos ()
	Zona 5 - Mãos e pés / palmas e plantas ()

Início icterícia: primeiras 12 hs (), entre 12 e 24 hs (), entre 24 e 36 hs (), entre 36 e 48 hs (), após 48 hs ().

Grau de icterícia alcançada: Leve () Moderada () Grave ()

Dosagem(s) de bilirrubina

Horas de vida: BD _____
BI _____
BT _____

ANEXO 2
SERVIÇO DE NEONATOLOGIA - DEPTO. DE PEDIATRIA - UNICAMP

FOTOTERAPIA

1. MECANISMOS DE AÇÃO: A bilirrubina IX alfa, na sua configuração natural Z-Z, sofre uma isomerização foton-induzida para a forma Z-E (fotobilirrubina). Estas fotobilirrubinas, que são substâncias mais hidrossolúveis que a bilirrubina na forma natural, desprendem-se de seus locais de ligação na pele e se difundem pela circulação. Sua eliminação pelo fígado, para as vias biliares, pode ser feita sem prévia conjugação com ácido glicurônico, SO, etc.
2. INDICAÇÕES:
 - 2.1. RN com peso > 2500 gr, SEM doença hemolítica 15 mg/dl de bilirrubina indireta ou total, exceto os portadores de colestase.
 - 2.2. RN com peso entre 2001 e 2500 gr 10 mg/dl bilirrubina indireta ou total, exceto os portadores de colestase.
 - 2.3. RN abaixo de 2000 gr por, pelo menos 96 horas, iniciando-se nas primeiras 24 horas de vida.
 - 2.4. RN COM DOENÇA HEMOLÍTICA: Fototerapia indicada a partir do aparecimento da icterícia clínica, independente dos níveis de bilirrubina sérica.
3. CUIDADOS:
 - 3.1. Todas as crianças submetidas a Fototerapia deverão ter uma avaliação diária laboratorial de bilirrubina total.
 - 3.2. Em casos especiais (doença hemolítica do RN por ex.), justificam-se avaliações mais frequentes.
 - 3.3. A criança submetida a Fototerapia deverá permanecer apenas de fraldas e com seus olhos devidamente vendados.
 - 3.4. Toda criança submetida a Fototerapia deverá ter controle de eliminação urinária, bem como determinações frequentes de densidade urinária.
Sua hidratação deverá ser aumentada (cálculo base: 50 ml/Kg/dia a mais do basal) no sentido de manter débito urinário entre 1 e 3 ml por Kg/hora e densidade entre 1006 e 1010.
 - 3.5. É comum o aparecimento de eritema mesmo quando se utilizam aparelhos com filtro de "plexiglass".
 - 3.6. Se houver disponibilidade de radiômetro, a radiação deverá ser mantida entre 4 e 10 mcw/cm/nm ao nível da pele.
4. DURAÇÃO:

A suspensão da fototerapia será realizada quando os níveis de bilirrubina total estiverem abaixo dos níveis de indicação e já tenha decorrido o período habitual de conjugação deficiente (pico máximo da bilirrubina: 5º dia de vida para o RN com peso maior que 2500 gr e 7º dia de vida para o RN com peso menor que 2500 gr).
5. BIBLIOGRAFIA
 1. Maisels, M.J.: Jaundice in the newborn. *Pediatrics in Review*, 3:305, 1982.
 2. Wishingrad, L. et al.: Studies of non-hemolytic hiperbilirubinemia in premature infants: Prospective randomized selection for exchange transfusion with observations on the levels of serum bilirubin with and without exchange transfusion and neurologic evaluations one year after birth. *Pediatrics*, 36:102, 1965.

3. Behrman, R.E. et al.: Preliminary report of the Committes on Phototherapy in the newborn infant. *J. Pediat.*, 84:135, 1974.
4. Bjure, J. et al.: A follow-up study of hiperbilirrubinemia in full term infants without isoimmunization. *Acta Paediat. Scand.*, 50:437, 1961.
5. Watchko, J.F. and Oski, F.A.: Bilirubin 29 mg/dl = Vigintiphobia. *Pediatrics*, 71:660, 1983.
6. National Institute of Child Health and Human Development: Randomized, Controlled Trial of Phototherapy for Neonatal Hyperbilirubinemia. *Pediatrics*, 75 n° 2 part 2(supplement), February, 1986.