

ROOSEVELT DE CARVALHO WANDERLEY

**CONTRIBUIÇÃO DO KERNLUTE TESTE
À PREVENÇÃO DA
ENCEFALOPATIA BILIRRUBÍNICA**

*Dissertação ao Nível de Mestrado em Pedi-
tria, apresentada à Universidade Federal
do Paraná.*

- DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA -

CURITIBA

ESTADO DO PARANÁ - BRASIL

- 1979 -

ao Departamento Materno- Infantil
da U.F. Paraíba, pela compreensão e estímulos;

ã Srta. Suzana Guimarães Castilho
e suas auxiliares, pelas orientações na pesquisa e organização
bibliográficas;

ã Srta. Suely Terezinha Kaminski,
pelo magnífico trabalho dactilográfico;

ã Doles Reagentes e Equipamentos,
pelo fornecimento dos "KITS" para as determinações de albumina
e bilirrubinas.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	08
CASUÍSTICA	10
MATERIAL E MÉTODOS	15
1. CRITÉRIOS DE ESCOLHA	16
2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	17
3. IDADE GESTACIONAL	17
4. ESTADO NUTRICIONAL	17
5. CRITÉRIOS DE CONDUTAS NO BERÇÁRIO	18
6. COLHEITA DO SANGUE	18
7. EXAMES DE LABORATÓRIO	19
8. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	22
RESULTADOS	24
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	47
ANEXOS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Embora seja bastante conhecida a relação entre concentração elevada de bilirrubina no soro e Encefalopatia Bilirrubínica (EB) (24 e 27), não existe ainda uma concordância a respeito de qual método preditivo seja capaz de informar com segurança a ocasião em que um determinado nível de bilirrubina esteja colocando em risco um recém-nascido (RN).

Em trabalho realizado por WENBERG et alii (75), ficou demonstrado ser pouco segura a utilização dos níveis de bilirrubina e do hematócrito do sangue do cordão umbilical para fins prognósticos, quanto à gravidade de hiperbilirrubinemia.

MARAKINA & TABOLIN (44), sugeriram que os níveis críticos de bilirrubina, a partir dos quais começaria a haver risco quanto a EB, situavam-se entre 18 e 20 mg/dl nos RN a termo e em torno de 15 mg/dl para os RN pré-termo.

Outras observações têm demonstrado a presença da EB com níveis de bilirrubina indireta bastante inferiores a estes valores, principalmente entre os RN pré-termo (1,50, 68 e 69). Nestas circunstâncias, apesar dos níveis de bilirrubina indireta serem considerados baixos, a instalação da EB estaria relacionada com a presença de outros fatores, tais como: hipo-albuminemia (49), acidose (13, 16, 17 e 60), ocorrência de uma albumina fetal com características estruturais diferentes (35 e 26), presença no soro de hematina (49), ácidos graxos li

vres em proporções superiores a 1:5 (51 e 79), benzoato de sódio e salicilatos (8 e 61), sulfonamidas (32,49 e 61) e vários antibióticos (23,43 e 57), bem como aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica e duração da exposição à bilirrubina (50 e 79).

Por outro lado, foram encontradas hiperbilirrubinemias com níveis superiores a 20 mg/dl, sem que se constatassem manifestações clínicas da EB e nem impregnação bilirrubínica no SNC, fatos estes confirmados por estudos anatomopatológicos (22,36,66 e 71).

É sabido que a bilirrubina existe no soro sob duas formas: conjugada ou de reação direta e não conjugada. A forma conjugada existe em quantidades desprezíveis no RN; é praticamente destituída de toxicidade e já está em vias de eliminação sob a forma de mono e diglucuronídeos (66). A forma não conjugada ou de reação indireta, tanto pode estar ligada às proteínas séricas, principalmente à albumina, como aos eritrócitos (7 e 52) ou estar na forma livre (BL) ou difusível. Atualmente é aceito como sendo, esta última, a responsável pela EB (40,46 e 66).

Para SELIGMAN et alli (66), a bilirrubina, devido à sua atividade de superfície, se concentraria nas camadas de ácidos graxos e proteínas da membrana plasmática, reduzindo sua atividade biológica e ocasionando a destruição celular.

Com relação aos fenômenos que decorrerem da penetração da BL na célula, pouco tem sido acrescentado aos dados obtidos por ZETTERSTROM & ERNSTER (80), em 1956.

Através de estudos "in vitro", soube-se que a bilirrubina em concentrações superiores a 3×10^{-4} M, desacopla a fosforilação oxidativa da respiração celular e que a

adição de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD) e citocromo c, restaura a capacidade respiratória das mitocôndrias, além de provocar uma acentuada elevação da atividade da ATPase mitocondrial, efeito este, semelhante ao produzido pelo 2.4-dinitrofenol (80). Como consequência deste efeito tóxico ocorreria: diminuição da utilização do oxigênio, aumento da glicólise e inibição da síntese protêica (14).

ODELL (49), em 1959, foi um dos primeiros a chamar a atenção para as implicações da BL, ao publicar um artigo de revisão sobre a dissociação entre bilirrubina e albumina. Neste trabalho o autor cita que a quantidade de bilirrubina difundida para os tecidos dependeria mais do gradiente de bilirrubina forma dissociada (livre) que atravessava a membrana, do que da concentração total das bilirrubinas. A bilirrubina nesta forma livre, também poderia estar presente por ocasião de uma hipo-albuminemia ou por uma diminuição da afinidade da albumina para com a bilirrubina, sob a influência de diversos fatores circunstanciais. Em vista disso, discute o autor sobre a utilidade da administração de albumina.

Os dados acima mencionados, assim como os achados da literatura, levaram os pesquisadores a aprimorar os métodos e a correlacionar os novos resultados com aqueles já existentes, na tentativa de detectar a presença de BL.

A este respeito, já em 1949, MARTIN (45) havia estudado a influência das variações do pH na capacidade de ligação da albumina e, em 1965, SCHMID et alii (63) demonstravam o valor prático da relação molar bilirrubina/albumina.

JACOBSEN (27), em 1969, através de estudos "in vitro", constatou que 1.0 Mol de bilirrubina ligar-se-ia de forma íntima e com muito baixa constante de dissol

ciação (7×10^{-9}) com 1.0 Mol de albumina e supôs que duas moléculas adicionais poderiam se ligar, porém mais frouxamente.

JACOBSEN & FEDERS (28), em 1970, verificaram que a concentração de BL era extremamente baixa até que o "situs" primário de ligação da albumina fosse ocupado, após o que, a BL aumentaria rapidamente. A semelhantes conclusões chegaram LIE & BRATLID (41).

Realizando dosagens de BL nos soros de 40 RN, SCHIFF et alii (62) em 1972, verificaram que em 38 deles, os pontos de saturação das respectivas albuminas foram atingidos quando os valores das bilirrubinas indiretas situavam-se entre 15.7 e 31.7 mg/dl.

NELSON et alii (48), em 1974, utilizando células de cultura de tecido, encontraram que a afinidade da albumina pela bilirrubina não sofria influência direta das variações do pH entre 7.0 e 7.4, mas que poderia haver, nesta faixa de pH, um aumento da afinidade das células pela bilirrubina.

Em importante trabalho de cunho prospectivo realizado por ODELL et alii (50), foram estudadas e acompanhadas durante cinco anos, 32 crianças com antecedentes de hiperbilirrubinemia no período neonatal. Destas 32 crianças, 18 apresentaram sequelas neurológicas, as quais foram correlacionadas com índices de saturação das albuminas em torno de 8.0 que, segundo os critérios utilizados, significavam risco de EB ou que a mesma já existisse. Resultados semelhantes também foram obtidos por SINGH et alii (67), ao realizarem estudo com evolução de seis meses em 25 crianças que também tinham antecedentes de hiperbilirrubinemia no período neonatal.

Posteriormente foi verificado por

NAKAMURA et alii (47) e SCHRAMM et alii (64), que o efeito tóxico da bilirrubina não podia ser avaliado medindo-se apenas a capacidade de reserva da albumina ou o seu índice de saturação, visto que a BL poderia estar presente mesmo antes que este fato ocorresse.

Um outro aspecto importante, é o fato da bilirrubina impregnar o tecido nervoso, principalmente núcleos da base, ao passo que impregnação em outros tecidos tenha sido raramente comprovada (14).

Segundo MARAKINA & TABOLIN (44), o efeito tóxico da BL dependeria não só do caráter de sua distribuição no organismo mas também de sua penetração ativa através da estrutura dos tecidos.

Sabe-se porê, que existem nas células do fígado, rins e intestino, proteínas especiais conhecidas como Y e Z, (19 e 34). A proteína Y ou "ligandins" tem a propriedade de se ligar à bilirrubina ou a outros ânions, podendo prevenir os efeitos tóxicos da BL sobre a fosforilação oxidativa (34).

Para KAMISAKA et alii (34), o fato de estas proteínas não serem encontradas nas células do tecido nervoso, poderia explicar a ocorrência da EB.

Foi também verificado que nas células, hepáticas a albumina está, na sua maior parte, concentrada nas vesículas de Golgi e retículo endoplasmático, enquanto que os "ligandins" e a bilirrubina encontram-se dispersos no citoplasma. Este fato sugere portanto, que sejam os "ligandins" as proteínas solúveis mais eficazes para a ligação com a bilirrubina no interior das células (34).

Ultimamente, diversos trabalhos

(11,12,21,65,70 e 73) têm demonstrado que o fenobarbital pode exercer ação nas várias etapas da eliminação da bilirrubina circulante. Admite-se que ele estimule a produção dos "ligandins" pelo hepatócito, visto que foi evidenciado um aumento intracelular destas proteínas, como também um aumento na conjugação e na excreção da bilirrubina após a administração do fonobarbital (7 e 11).

Foi portanto, tentando suprimir esta defasagem existente entre os avançados conhecimentos da fisiopatogenia da EB e os insuficientes meios de reconhecimento das situações em que ela estivesse para ocorrer, que começaram a surgir os métodos de detecção da BL. Dentre os inúmeros métodos podem ser citados: a diálise (54), a eletroforese (3) e a espectrofotometria (6) da bilirrubina; métodos indiretos de competição com a bromosulfoneftaleína (BSP) (54), com o 2-(4-hidroxifenilazo) do ácido benzoico (HBABA) (56 e 74) e com salicilatos (10 e 67); métodos de adsorção em carbonato de cálcio (59) e em gel de Sephadex (31,37,38 e 55); método de oxidação da bilirrubina em presença de peroxidase (29 e 47) e até associações entre estes (6 e 54).

Recentemente, vem sendo dada grande importância ao método da diminuição da fluorescência das proteínas (40).

Mesmo assim, a despeito das divergências em torno destas variadas metodologias, já existem formulados os critérios mínimos exigidos para um bom método preditivo (40). Segundo estes critérios, na atualidade, somente os métodos de oxidação da bilirrubina em presença da peroxidase e da diminuição da fluorescência das proteínas podem ser considerados os mais seguros.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Considerando que a afinidade pela Bilirrubina Livre, apresentada pelo gel de Sephadex, seja semelhante em ordem de grandeza à afinidade também apresentada pelo tecido nervoso (36), o objetivo deste trabalho consistiu em verificar a contribuição da detecção desta bilirrubina como mais um subsídio, nas condutas frente aos RN ictéricos.

Procurou-se verificar também em que valores da Relação molar BI/Alb, ocorreria o aparecimento desta bilirrubina livre, numa população de RN ictéricos.

CASUÍSTICA

CASUÍSTICA

Entre setembro de 1977 e julho de 1978, foram estudados 42 RN internados nos berçários da maternidade do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Deste total 40 nasceram na referida maternidade e 2, foram admitidos, provenientes de outras localidades. Destes casos, somente em 10 foi possível um "follow-up" entre 1 e 23 meses, onde os exames clínicos, por nós realizados, foram normais.

A distribuição por sexo e os diagnósticos etiológicos das hiperbilirrubinemias, constam das Tabelas I e II.

Tabela I

Distribuição dos RN quanto ao SEXO

sexo	nº	%
masculino	27	64.28
feminino	15	35.72
Total	42	100.00

Quanto às etiologias das icterícias, em 11 RN ela resultou de isoimunização pelo fator Rh (26.20%), em 25, foi devida a incompatibilidade ao sistema ABO (59.50%) e em 6 (14.40%), a etiologia da icterícia não foi excluída.

Tabela II

Distribuição dos RN quanto a ETIOLOGIA
da hiperbilirrubinemia

<u>etiologia</u>	<u>nº</u>	<u>%</u>
Incompatibilidade Rh	11	26.20
Incompatibilidade ABO	25	59.50
desconhecida	6	14.30
Total	42	100.00

Com relação a idade gestacional, 9 RN foram clasificados como pré-termo (21.43%) e 33, foram considerados RN a termo (78.57%).

Tabela III

Distribuição dos RN quanto a IDADE GESTACIONAL

<u>Idade gestacional</u>	<u>Nº</u>	<u>%</u>
RN pré-termo	9	21.43
RN a termo	33	78.57
Total	42	100.00

Quanto ao estado nutricional, 9RN foram classificados como sendo de baixo peso para a idade gestacional, incluindo 2 pré-termo e 12 a termo, 27 tinham peso adequado para a idade gestacional, sendo 07 pré-termo e 20 a termo e

apenas 1 foi classificado como RN grande para a idade gestacional. Figuras 1 e 2.

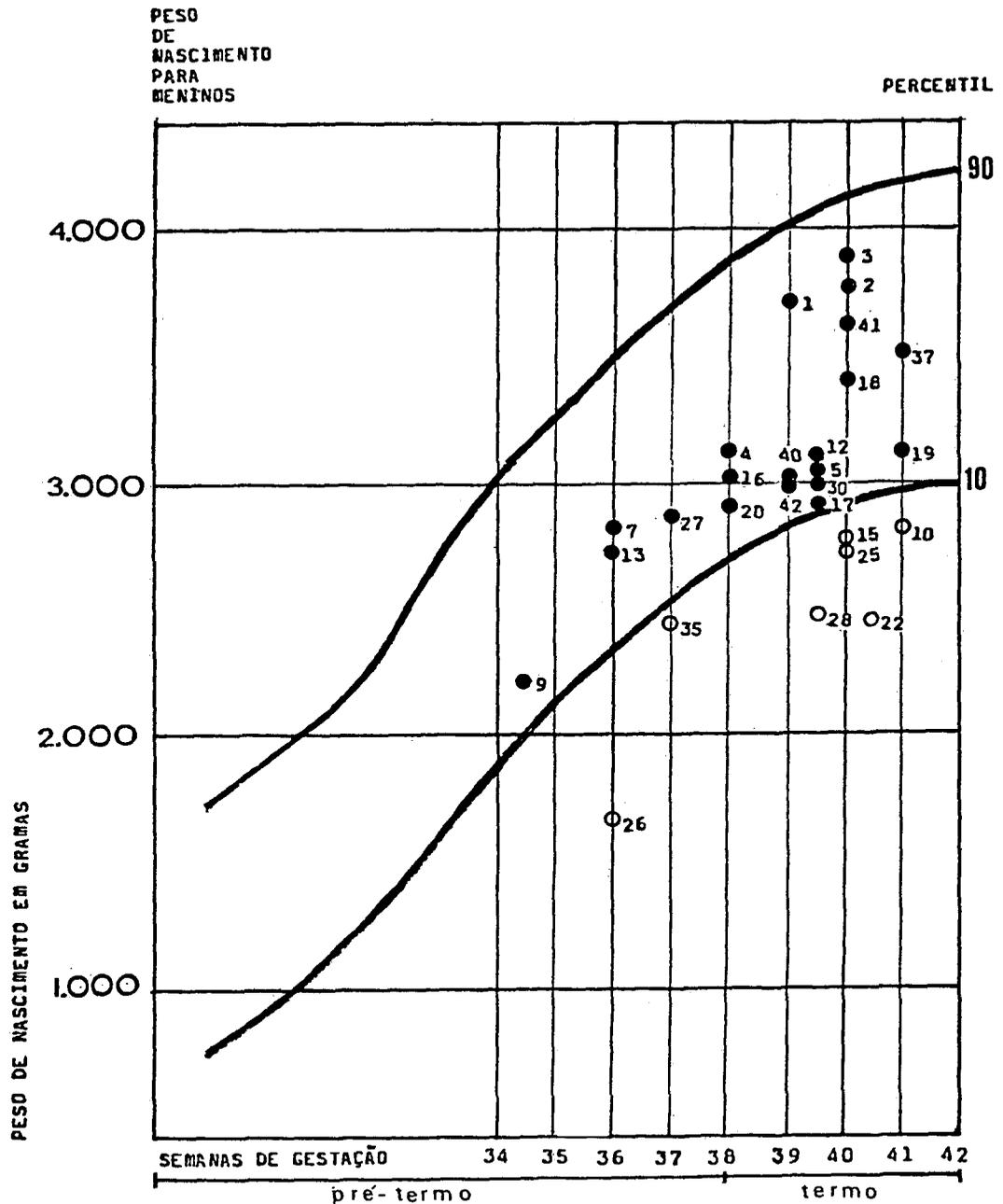


FIGURA 1

Distribuição do peso de nascimento e idade gestacional nos quatro grupos de recém-nascidos do sexo masculino.

- - Recém-nascidos pré-termo e a termo com peso adequado para a idade gestacional.
- - Recém-nascidos pré-termo e a termo com baixo peso para a idade gestacional. Segundo DAVIES et alii (15).

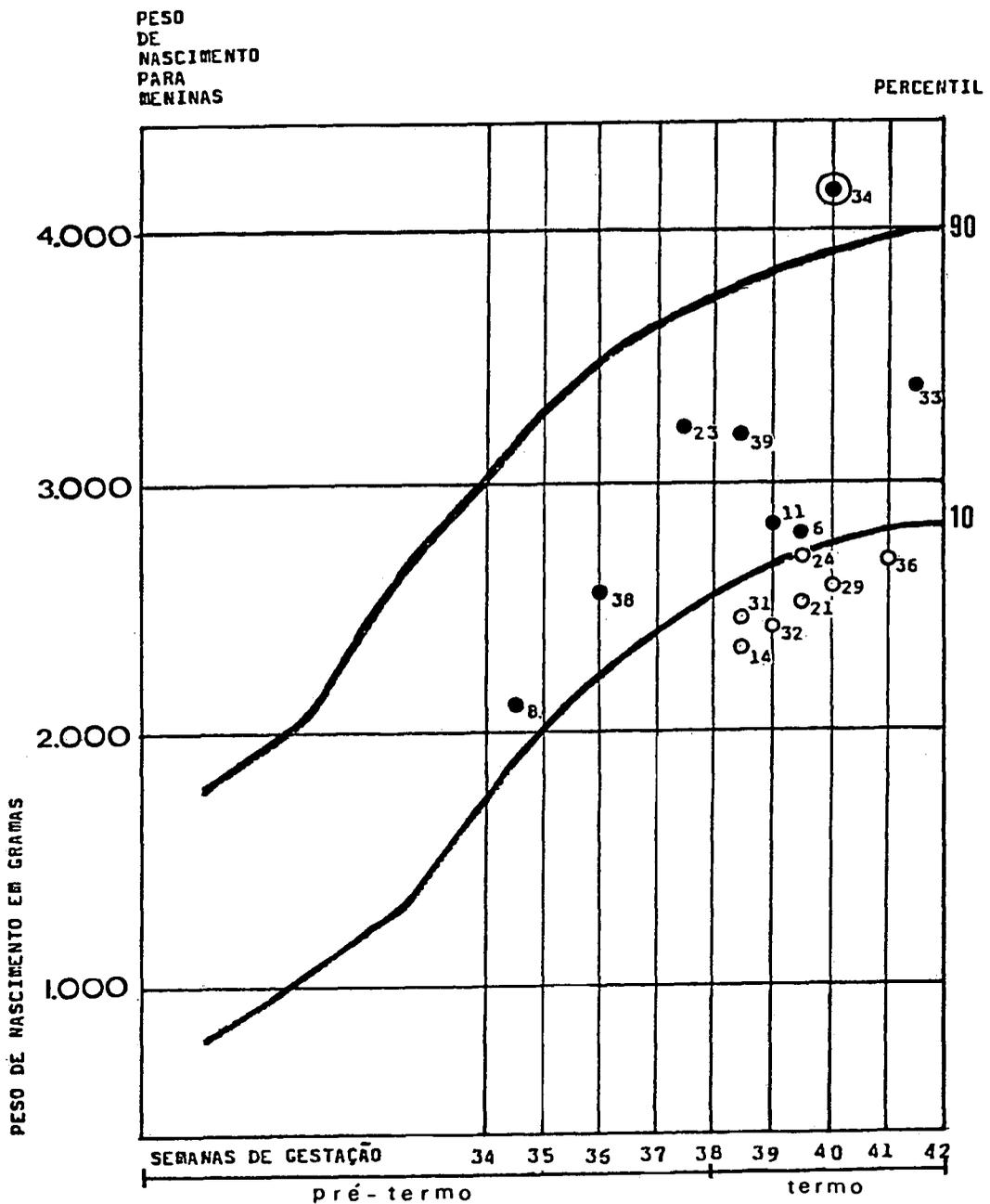


FIGURA 2 Distribuição do peso de nascimento e idade gestacional nos cinco grupos de recém-nascidos do sexo feminino.

- ⊙ - Recém-nascido a termo, grande para a idade gestacional.
- - Recém-nascidos pré-termo e a termo com peso adequado para a idade gestacional.
- - Recém-nascidos pré-termo e a termo com baixo peso para a idade gestacional. Segundo DAVIES et alii (15).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. CRITÉRIOS DE ESCOLHA

Os RN que apresentassem icterícia eram acompanhados com determinações periódicas da bilirrubinemia total (de 4 em 4 ou de 6 em 6 horas, conforme a evolução de cada caso), em sangue capilar obtido por punção de extremidade.

Para isso o calcanhar era aquecido com água morna, a pele do local limpa com álcool etílico comercial e a punção efetuada com lanceta descartável (Microlance BD). Após desprezar a primeira gota, colhia-se o sangue em tubo capilar de micro-hematócrito (Propper Manufacturing CO, INC. Long Island City, N. Y.).

O soro era separado por centrifugação utilizando-se Centrífuga de micro-hematócrito (FANEM, mod. 207 - NA), e a bilirrubina total determinada em Bilirrubinômetro (American Optical Corp. Buffalo, N. Y.).

Os RN cujos níveis de bilirrubinemia, determinados naqueles intervalos de tempo, não mais demonstrassem elevação nos seus valores, eram separados para o estudo, muito embora permanecendo sob os cuidados de rotina do Berçário.

2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão dos RN foram os seguintes:

- a - RN com mais de 5 dias de vida, pelo fato de após esta época o comportamento da albumina já poder apresentar-se modificado (36, 46 e 66).
- b - RN cujos níveis de bilirrubina total não atingissem pelo menos 8.0 mg/dl, uma vez que não se encontrou descrita, manifestação clínica de EB a baixo desses níveis (20 e 27).
- c - RN cujos níveis de bilirrubina direta (BD) fossem superiores a 3.0 mg/dl, em virtude da possibilidade de levar a resultados falso-positivos (10, 18 e 58).
- d - RN que apresentassem estado geral mau ou evidências de infecção (9 e 36).
- e - RN que apresentassem Apgar baixo, hipóxia, hipotermia ou hipoglicemia.

3. IDADE GESTACIONAL

A idade gestacional foi avaliada segundo o método de PARKIN et alii (53), e os RN classificados segundo LUBCHENCO (42) em: pré-termo, quando tinham idade gestacional igual ou inferior a 37 semanas e 6 dias, e a termo aqueles RN com idade gestacional compreendida entre 38 e 41 semanas e 6 dias.

4. ESTADO NUTRICIONAL

Para a classificação dos RN quanto ao estado nutricional foram aplicados as curvas de pesos, isoladas para ambos os sexos, propostas por DAVIES et alii (15), as quais definiram: RN grandes para a idade gestacional os de peso situado acima do 90º percentil, RN de peso adequado para a idade

gestacional os de peso situado entre o 10º e 90º percentis e RN pequenos para a idade gestacional os de peso inferior ao 10º percentil.

5. CRITÉRIOS DE CONDUTAS NO BERÇÁRIO

Para as diferentes condutas aplicadas pela Disciplina de Neonatologia em cada RN e em cada etapa da metodologia (antes e após os aumentos nos níveis de bilirrubina), foram utilizadas as Curvas de Bilirrubina inicialmente propostas por ALLEN & DIAMOND (33), atualmente modificadas pelo Department of Child Health, King's College Hospital Medical School, London. (ANEXO V). Desse modo os RN foram agrupados em:

- a - RN com Exanguinotransfusão (Exo)
- b - RN na Zona Indefinida (Ind)
- c - RN em Fototerapia (Fot)
- d - RN em Observação quanto a fototerapia (Obs)

6. COLHEITA DO SANGUE

Empregando-se seringa descartável de 10.0 ml e sem anti-coagulante, foram colhidos 3.0 a 4.0 ml de sangue da artéria radial, os quais depois de transferidos para um tubo de centrifugação de polietileno, foram protegidos da luz e deixados em repouso à temperatura ambiente ($\pm 20^\circ\text{C}$), até coagular. Simultaneamente e do mesmo local da punção foi colhida amostra do mesmo sangue arterial, em tubo capilar heparinizado, destinada a determinação do pH real.

Após a retração do coágulo o soro foi separado por centrifugação e imediatamente utilizado, visto que, com a sua estocagem mesmo em temperaturas inferiores a

-20°C, haveria uma diminuição nos níveis de BL os quais, mesmo em condições patológicas alcançam apenas valores mínimos (47).

7. EXAMES DE LABORATÓRIO

a - DETECÇÃO DA BILIRRUBINA LIVRE

A detecção da BL foi realizada em empregando-se o método de filtração e adsorção em gel de Sephadex G - 25, conforme a técnica originalmente proposta por KAUFMANN et alii (38), em 1973, utilizando-se o "KERNLUTE TEST KIT", da Ames Yissum Ltda., Jerusalem, Israel. As etapas do procedimento técnico foram as seguintes:

- 0.1 ml do soro icterico foi misturado a 0.75 ml de um tam pão fosfato, de pH 7.4, no interior de uma coluna de Sephadex G-25 medindo h=2.5 cm X Ø = 1.3 cm, a qual filtrava o complexo bi lirrubina/albumina e retinha a BL que assim permanecia mesmo a pões a lavagem da coluna com 2.5 ml do mesmo tampão. A presença da BL retida na resina foi revelada mediante diazo-reação obtida a partir de uma solução preparada, no interior da própria colu na, dissolvendo-se um comprimido de ICTOTEST (Ames Co. Elkhart, Indiana), o qual acompanha o "KIT", em 0.75 ml de água destila da. -

Todas as etapas foram realizadas em recinto protegido da luz e os resultados finais assim inter pretados:

NEGATIVO (-) : nenhuma modificação na cor da coluna (sugerindo níveis de BL inferiores a 0.05 mg/dl ou a sua ausência) (46).

POSITIVO (+) : aparecimento de faixa horizontal de cor azul-clara na parte superior da coluna (sugerindo ní

veis de BL equivalentes a 0.05 mg/dl, e consequentemente, risco de Encefalopatia Bilirrubínica) (36 e 46).

POSITIVO (\ddagger) : aparecimento de faixa azul-intenso sobre fundo vermelho (sugerindo níveis de BL superiores a 0.05 mg/dl, compatível com Encefalopatia já estabelecida (36 e 46). Figura 3.

Naqueles casos em que o KT não mostrasse coloração suficiente para ser interpretado como POSITIVO (+), mas que também não poderia ser NEGATIVO (-) devido à modificação na cor da coluna, resolvemos adotar o termo DUVIDOSO (\ddagger) dado a não encontrarmos nada descrito na literatura.

Nos casos em que a BL não fosse detectada inicialmente foi então repetido todo o procedimento técnico, utilizando-se uma nova coluna com igual alíquota do mesmo soro icterico e aplicou-se um recurso que permitiu aumentar os níveis de bilirrubina "in vitro", por adições de 0.2 e 0.4 ml de uma solução de bilirrubina padronizada. Esta solução foi preparada na ocasião, dissolvendo-se em 2.0 ml de uma solução de carbonato de cálcio a 0.25%, em banho-maria, a 37°C e durante 5 (cinco) minutos, uma cápsula de bilirrubina liofilizada (Bilirubin Caps), que acompanha o "KIT" e que contém 50 μ g da substância.

As adições assim efetuadas, responderam a aumentos nos níveis de bilirrubina "in vitro", equivalentes a 5.0 e 10.0 mg/dl respectivamente, conforme é mostrado no fluxograma.

Os resultados do KT, obtidos com estas adições "in vitro", foram interpretados da mesma forma que

anteriormente (-, ±, + e †) e seus significados encarados como previsões "in vitro", do que poderia ocorrer "in vivo", caso os níveis de bilirrubinemia sofressem elevações equivalentes.

b - DETERMINAÇÃO DO pH REAL

A determinação do pH real foi feita dentro dos primeiros 5 (cinco) minutos após a colheita do sangue arterial, segundo a técnica de ASTRUP et alii (2), em micro equipamento Astrup, AME - 1C, Radiometer A/S Copenhagen.

c - DETERMINAÇÃO DA ALBUMINA

A albumina sérica foi determinada pelo método do VBC (verde bromo-cresol), segundo a técnica de MYIADA (25). Para tanto foi usado um "KIT" comercial (KIT A - 320) da Doles Reagentes. Valores normais: 3.5 - 5.5 g/dl.

d - DETERMINAÇÃO DAS BILIRRUBINAS (total e direta)

As bilirrubinas total (BT) e direta (BD) foram determinadas segundo a técnica de JENDRASSIK & GROF (4 e 30) utilizando-se um "KIT" comercial (KIT A - 060) da Doles Reagentes. Valores normais: BD até 0,4 mg/dl e BT até 1,2 mg/dl.

Para as leituras da albumina e das bilirrubinas (BT e BD), foi usado um espectrofotômetro Coleman Junior modelo 6 - A da Coleman Instruments Maywood, Yll.USA.

e - CALCULO DA RELAÇÃO MOLAR BI/ALB

Para efeito de cálculo da relação molar bilirrubina indireta/albumina (Rel mol BI/Alb), considerou-se como sendo 1.0 Mol de bilirrubina igual a 8.5 mg e 1.0 Mol

de albumina igual a 1.0 g (35 e 37).

Obs.: Todos os exames foram realizados pelo autor.

8. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O estudo estatístico compreendeu: aplicação da média, do erro padrão e do desvio padrão.

Para a comparação de médias foi empregado o teste "t" de Student, segundo a fórmula:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{S_{M_1 - M_2}}$$

sendo: M_1 e M_2 , as médias obtidas e
 $S_{M_1 - M_2}$, o erro da diferença das médias.

FLUXOGRAMA

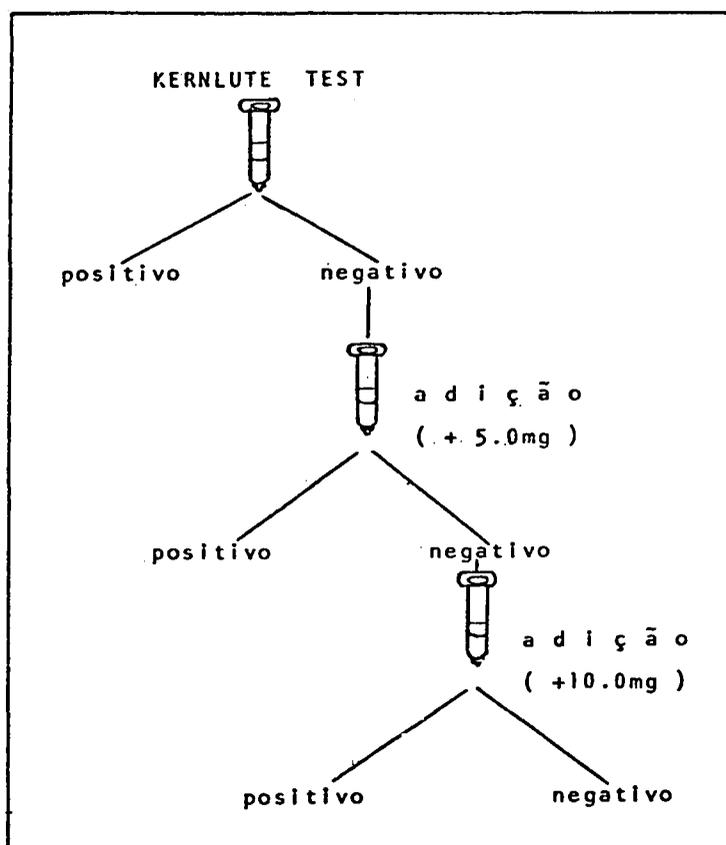


FIGURA 3

Referente ao KT (‡) do caso 20.
Note-se a faixa azul-intenso so
bre fundo vermelho. Ao lado, um
resultado negativo.

RESULTADOS

RESULTADOS

A idade, cor, sexo, idade gestacional e peso de nascimento de cada RN, as etiologias e início da icterícia, bem como, os valores das bilirrubinas (direta e indireta) e da albumina séricas, do pH do sangue e das Rel Mol BI/Alb constam do ANEXO I.

Os valores médios e os limites encontrados, dos exames laboratoriais da casuística, são mostrados na Tabela IV.

Tabela IV

Resultados dos exames complementares

exames	limites *	valores médios
bilir. ind. (mg/dl)	6.84 - 31.50	14.36 ± 0.86
albumina (g/dl)	2.65 - 4.20	3.36 ± 0.17
rel. mol. BI/Alb	0.20 - 1.22	0.51 ± 0.02
pH	7.20 - 7.48	7.39 ± 0.02

* Valores limites encontrados antes de qualquer adição.

Os resultados do KERNLUTE TEST (KT), antes e após as adições de bilirrubina e os respectivos valores de bilirrubina indireta, de albumina e da Rel mol BI/Alb, constam do ANEXO II. Verifica-se por ele que em apenas 3 casos (20, 23 e

42), foi detectada a BL, através do KT positivo, sem a necessidade de qualquer adição. Dos outros 39 casos, nos quais o KT foi negativo, 10 se tornaram positivos após a adição de 5.0 mg de bilirrubina e dos 20 restantes em 13, foi efetuada uma segunda adição de bilirrubina (10.0 mg), havendo positividade do KT em apenas 3 casos (30, 31 e 35).

Da comparação dos dois grupos de RN distribuídos quanto a idade gestacional, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos resultados da bilirrubina indireta, da albumina, das Rel mol BI/Alb e do pH. Tabela V.

Tabela V

Comparação entre os resultados dos exames complementares nos dois grupos de RN distribuídos quanto a Id. Gest.

	RN prē-termo	RN a termo	Sig. *
Bil. indireta (mg/dl)	6.84 - 31.50 ** (14.35 ± 0.69)	8.50 - 26.05 (15.50 ± 0.81)	t = 0.56 gl= 40 P > 0.80
Albumina (g/dl)	2.65 - 4.20 (3.39 ± 0.06)	2.70 - 4.10 (3.32 ± 0.07)	t = 0.11 gl= 40 P > 0.80
Rel.Mol.BI/Alb	0.20 - 1.22 (0.51 ± 0.03)	0.37 - 1.10 (0.55 ± 0.03)	t = 0.29 gl= 40 P > 0.80
pH	7.25 - 7.48 (7.38 ± 0.01)	7.20 - 7.47 (7.39 ± 0.01)	t = 0.12 gl= 40 P > 0.80

* nível de significância.

** Valores limites encontrados antes de qualquer adição

Da comparação entre os resultados dos exames laboratoriais, nos dois grupos de RN, classificados quanto a idade gestacional (prē-termo e a termo) e distribuídos

quanto aos resultados do KT, também não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas. (Tabela VI).

Tabela VI

Comparação dos resultados dos exames laboratoriais nos dois grupos de RN (pré-termo e a termo) em relação aos resultados do KT

	RN pré-termo		RN a termo	
	KT (-)	KT (+)	KT (-)	KT (+)
bil. indireta (mg/dl)	13.50 - 28.70 (19.30 ± 0.63)	17.00 - 29.38 (22.69 ± 0.93)	13.50 - 27.85 (18.54 ± 0.65)	13.67 - 31.00* (21.75 ± 0.79)
albumina (g/dl)	2.70 - 4.10 (3.33 ± 0.09)	2.78 - 4.10 (3.31 ± 0.09)	2.80 - 4.20 (3.46 ± 0.06)	2.65 - 4.20 (3.28 ± 0.07)
Rel mol BI/Alb	0.59 - 0.94 (0.69 ± 0.02)	0.53 - 1.10 (0.83 ± 0.04)	0.44 - 0.95 (0.68 ± 0.02)	0.38 - 1.22 (0.78 ± 0.04)
pH	7.39 - 7.47 (7.42 ± 0.003)	7.20 - 7.47 (7.37 ± 0.02)	7.25 - 7.48 (7.39 ± 0.02)	7.28 - 7.44 (7.36 ± 0.007)

* Valores limites encontrados após as adições

De forma semelhante, a comparação entre os parâmetros: bilirrubina indireta > 20.00 mg/dl e < 20.00 mg/dl; albumina < 3.00 g/dl; Rel mol BI/Alb > 0.60 e < 0.60, e as variáveis albumina, bilirrubina indireta, Rel mol BI/Alb e pH, nos dois grupos de RN (a termo e pré-termo), não revelou diferenças estatisticamente significativas. (ANEXO III).

Da comparação entre os resultados dos exames laboratoriais, nos dois grupos de RN, classificados quanto ao estado nutricional (de baixo peso e de peso adequado) e distribuídos quanto aos resultados do KT, foi verificado tam

bém que não houve diferenças estatisticamente significativas (Tabela VII).

Tabela VII

Comparação dos resultados dos exames laboratoriais nos dois grupos de RN (baixo peso e peso adequado*) em relação aos resultados do KT

	RN de baixo peso		RN de peso adequado	
	KT (-)	KT (+)	KT (-)	KT (+)
Billindireta (mg/dl)	14.00 - 24.80 (20.00 ± 0.62)	18.35 - 29.38 (23.47 ± 1.60)	13.50 - 28.70 (19.65 ± 0.70)	13.67 - 31.00** (21.33 ± 0.87)
Alumina (g/dl)	2.80 - 4.20 (3.44 ± 0.09)	2.65 - 4.20 (3.61 ± 0.63)	2.70 - 4.10 (3.38 ± 0.04)	2.65 - 3.62 (3.15 ± 0.05)
Rel.mol.BI/Alb	0.51 - 0.82 (0.66 ± 0.02)	0.53 - 1.04 (0.78 ± 0.03)	0.44 - 0.94 (0.68 ± 0.02)	0.53 - 1.22 (0.81 ± 0.03)
pH	7.25 - 7.48 (7.39 ± 0.01)	7.20 - 7.47 (7.36 ± 0.02)	7.37 - 7.48 (7.42 ± 0.005)	7.31 - 7.44 (7.37 ± 0.006)

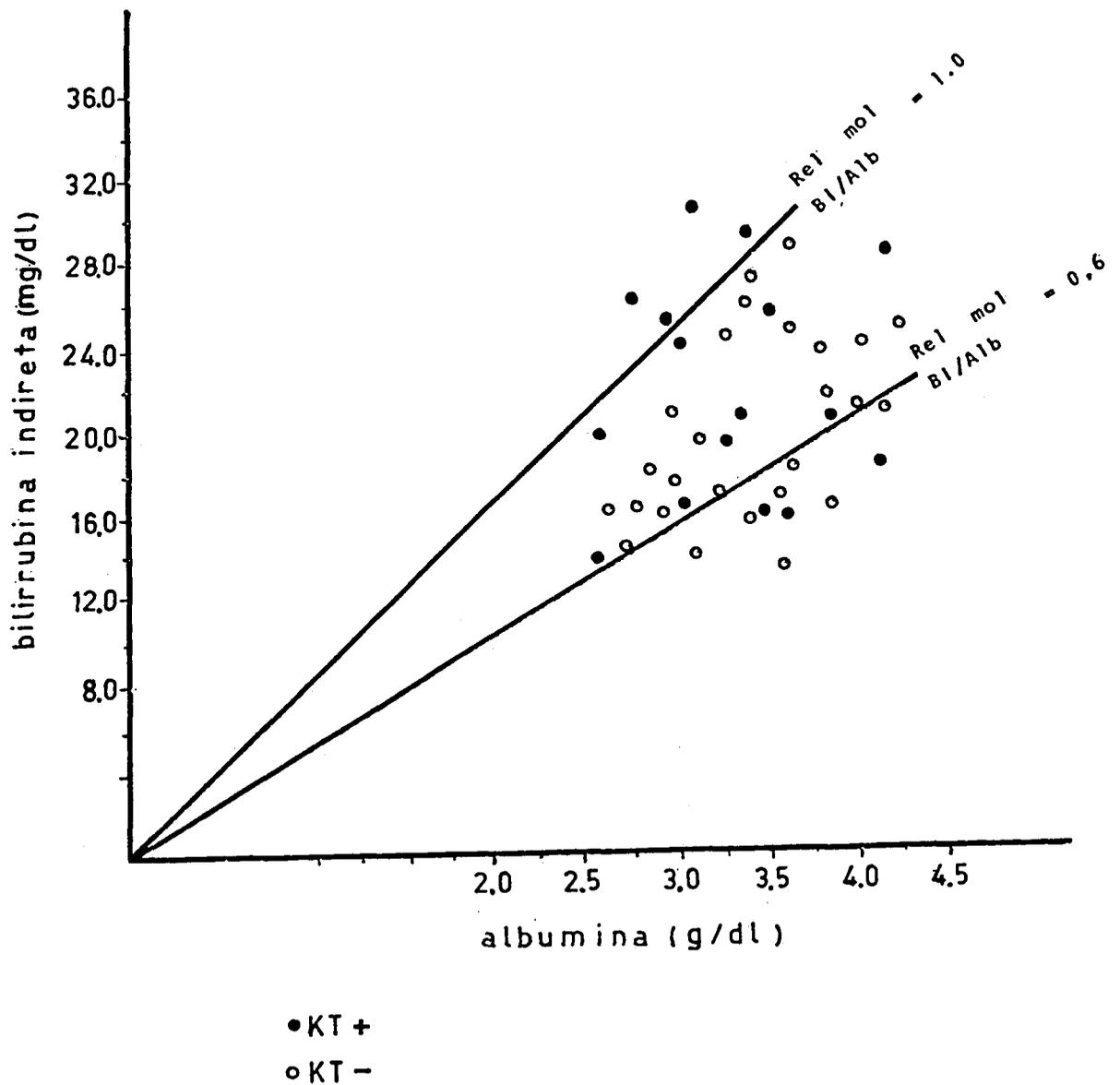
* excluído o RN grande para a idade gestacional

** Valores limites encontrados após as adições

Da comparação entre os resultados do KT nos 42 RN e as respectivas Rel mol BI/Alb, verificou-se que dos 16 casos em que o KT positivou, em 4 isto ocorreu quando as Rel mol BI/Alb se encontravam acima de 1.00, em 9 quando as mesmas situavam-se entre 1.00 e 0.60 e em 3, quando elas foram inferiores a 0.60. Verificou-se ainda que entre os casos que o KT foi negativo, em 19 as Rel mol BI/Alb estavam entre 1.00 e 0.60 e em 7, elas estavam abaixo de 0.60, chamando a atenção para a ocorrência de 3 casos com KT positivo frente a Rel mol BI/Alb inferiores a 0.60. (Figura 4).

FIGURA 4

COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DO KT
E AS RESPECTIVAS REL. MOL. BI/ALB



Considerando os aumentos de 5.0 e 10.0 mg de bilirrubina, equivalentes às adições "in vitro" e, aplicando-se as curvas de bilirrubina em cada caso, resultaria o seguinte:(Figura 6 à Figura 7a).

1 - Naqueles casos em que o KT foi negativo, mesmo após a adição de 5.0 mg de bilirrubina, observou-se que em 14 dos 28 RN, já seria indicada a Exo utilizando as curvas de Bilirrubina (Tabela VIII).

DISTRIBUIÇÃO DOS RN EM QUE O KT PERMANECEU negativo APÓS A ADIÇÃO DE 5.0 mg DE BILIRRUBINA.

Pac.	Idade gest. sem.	Idade atual dias	APÓS 5 mg Bil.ind. mg/dl	CONDUTAS
1	39	2.5	11.84	Fot
4	38	2.0	13.50	Fot
7	36	3.0	13.50	Fot
8	34.5	2.5	18.53	Exo
9	34.5	4.5	16.50	Fot
10	41	2.5	16.07	Fot
11	39	3.4	19.72	Fot
12	39.5	4.5	17.30	Fot
14	38.5	1.0	14.15	Exo
16	38	5.0	16.80	Fot
17	39.5	4.0	17.30	Fot
18	40	3.0	19.27	Fot
19	41	2.4	17.00	Fot
21	39.5	0.7	16.05	Exo
22	40.5	2.0	20.76	Exo
24	39.5	1.5	18.50	Exo
25	40	2.5	19.80	Ind
27	37	2.0	21.48	Exo
28	39.5	3.0	21.98	Exo
30	39.5	3.5	20.60	Exo
31	38.5	2.0	23.05	Exo
32	39	5.0	18.60	Fot
33	41.5	2.5	16.50	Fot
34	40	2.0	22.85	Exo
36	41	0.9	19.58	Exo
37	41	2.0	21.30	Exo
38	36	4.0	23.70	Exo
39	38.5	2.0	20.10	Exo

2 - Nqueles casos em que o KT continuou negativo após a adição de 10.0 mg de bilirrubina, utilizando as curvas de bilirrubina, em 9 dos 10 RN, já estaria sendo indicada a Exo (Tabela IX)

Tabela IX DISTRIBUIÇÃO DOS RN EM QUE O KT PERMANECEU negativo APÓS A ADIÇÃO DE 10.0 mg DE BILIRRUBINA.

Pac	Idade gest. sem.	Idade atual dias	APÓS 10 mg	
			Bil. ind. mg/dl	CONDUTAS
1	39	2.5	16.84	Fot
18	40	3.0	24.27	Exo
25	40	2.5	24.80	Exo
32	39	5.0	23.60	Exo
33	41.5	2.5	21.50	Exo
34	40	2.0	27.85	Exo
36	41	0.6	24.58	Exo
37	41	2.0	26.30	Exo
38	36	4.0	28.70	Exo
39	38.5	2.0	25.10	Exo

3 - Dos 10 casos, em que o KT tornou-se positivo após a adição de 5.0 mg de bilirrubina em 4, também já estaria sendo indicada a Exo utilizando-se as curvas de bilirrubina (tabela X)

Tabela X

DISTRIBUIÇÃO DOS RN EM QUE O KT TORNOU-SE positivo APÓS A ADIÇÃO DE 5.0 mg DE BILIRRUBINA

Pac	Idade gest. sem.	Idade atual dias	APÓS 5 mg	
			Bil. ind. mg/dl	CONDUTAS
2	40	1.4	23.68	Exo
3	39	1.5	20.50	Exo
5	39.5	2.0	13.67	Fot
6	39.5	3.0	16.25	Fot
13	36	3.7	17.00	Fot
15	40	4.4	19.77	Ind
26	36	5.0	18.35	Exo
29	40	1.5	21.80	Exo
40	39	2.4	19.65	Ind
41	40	2.5	16.20	Fot

4 - Nos 3 RN em que o KT somente positivou após a adição de 10.0 mg de bilirrubina, a indicação de Exo, utilizando as curvas de bilirrubina, abrangeria a todos (Tabela XI).

Tabela XI DISTRIBUIÇÃO DOS RN EM QUE O KT TORNOU-SE positivo APÓS A ADIÇÃO DE 10.0 mg DE BILIRRUBINA

Pac	Idade gest. sem.	Idade atual dias	APÓS 10.0mg Bil. ind. mg/dl	CONDUTAS
30	39.5	3.5	25.60	Exo
31	38.5	2.0	28.05	Exo
35	37	2.5	29.38	Exo

Ao analisar as condutas adotadas pela Disciplina de Neonatologia, de acordo com os níveis iniciais de bilirrubina indireta e, utilizando para as mesmas, as curvas de bilirrubina, observou-se que em 8 RN, foram realizadas Exo (Grupo A), 5 foram situados na Ind (Grupo B), 25 receberam apenas Fot (Grupo C) e 4 ficaram em Obs (Grupo D).

Se estas decisões, baseadas nas curvas de bilirrubina, fossem confrontadas com os resultados do KT, obtidos em cada caso e a cada etapa da metodologia (antes e após as adições) Figuras 5 à 7a, teríamos as seguintes constatações:

(Grupo A), Dos 8 RN em que foram realizados Exo (casos 2, 20, 23, 27, 35, 36, 38 e 42), o KT foi positivo em apenas 3 antes de qualquer adição. Dentre os 5 negativos, no caso nº 2 o KT tornou-se positivo após a adição de 5.0 mg de bilirrubina. No caso 35 o KT foi duvidoso com a adição de 5.0 mg de bilirrubina, somente positivando, após a adição de 10.0 mg de bilirrubina. Tabela XII

Tabela XII

RN QUE RECEBERAM EXANGUINOTRANSFUSÃO

Pac	SITUAÇÃO INÍCIO		A P Ó S (5 mg)		A P Ó S (10 mg)	
	<u>Bil.ind.</u> mg/dl	KT	<u>Bil.ind</u> mg/dl	KT	<u>Bil.ind</u> mg/dl	KT
2	18.68	(-)	23.68	(+)		
20	31.00	(±)				
23	26.05	(+)				
27	16.48	(-)	21.48	(-)		
35	19.38	(-)	24.38	(+)	29.38	(+)
36	14.58	(-)	19.58	(-)	24.58	(-)
38	18.70	(-)	23.70	(-)	28.70	(-)
42	25.00	(±)				

(Grupo B). Dos 5 casos situados na Ind, considerados portanto, de alto risco, salientamos que em 2 (casos 3 e 29), o KT tornou-se positivo após a adição de 5.0 mg de bilirrubina. No caso 31, a positividade do KT verificou-se após a adição de 10.0 mg de bilirrubina. (Tabela XII)

Tabela XIII

RN SITUADOS NA ZONA INDEFINIDA

Pac	SITUAÇÃO INÍCIO		A P Ó S (5 mg)		A P Ó S (10 mg)	
	<u>Bil.ind</u> mg/dl	KT	<u>Bil.ind</u> mg/dl	KT	<u>Bil.ind</u> mg/dl	KT
3	15.50	(-)	20.50	(+)		
14	9.15	(-)	14.15	(-)		
21	11.05	(-)	16.05	(-)		
29	16.80	(-)	21.80	(+)		
31	18.05	(-)	23.05	(-)	28.05	(+)

(Grupo C). Dentre os RN que estavam em Fot, o KT foi duvidoso (±) em 2 (casos 13 e 15), antes de qualquer adição de bilirrubina. Nestes mesmos casos, o KT positizou após a adição de 5.0 mg de bilirrubina. O mesmo foi verificado com mais 4 casos (6, 26, 40 e 41). No caso 30 porém, o

KT somente positivou após a adição de 10.0 mg de bilirrubina.

Tabela XIV.

Tabela XIV

RN QUE FICARAM EM FOTOTERAPIA

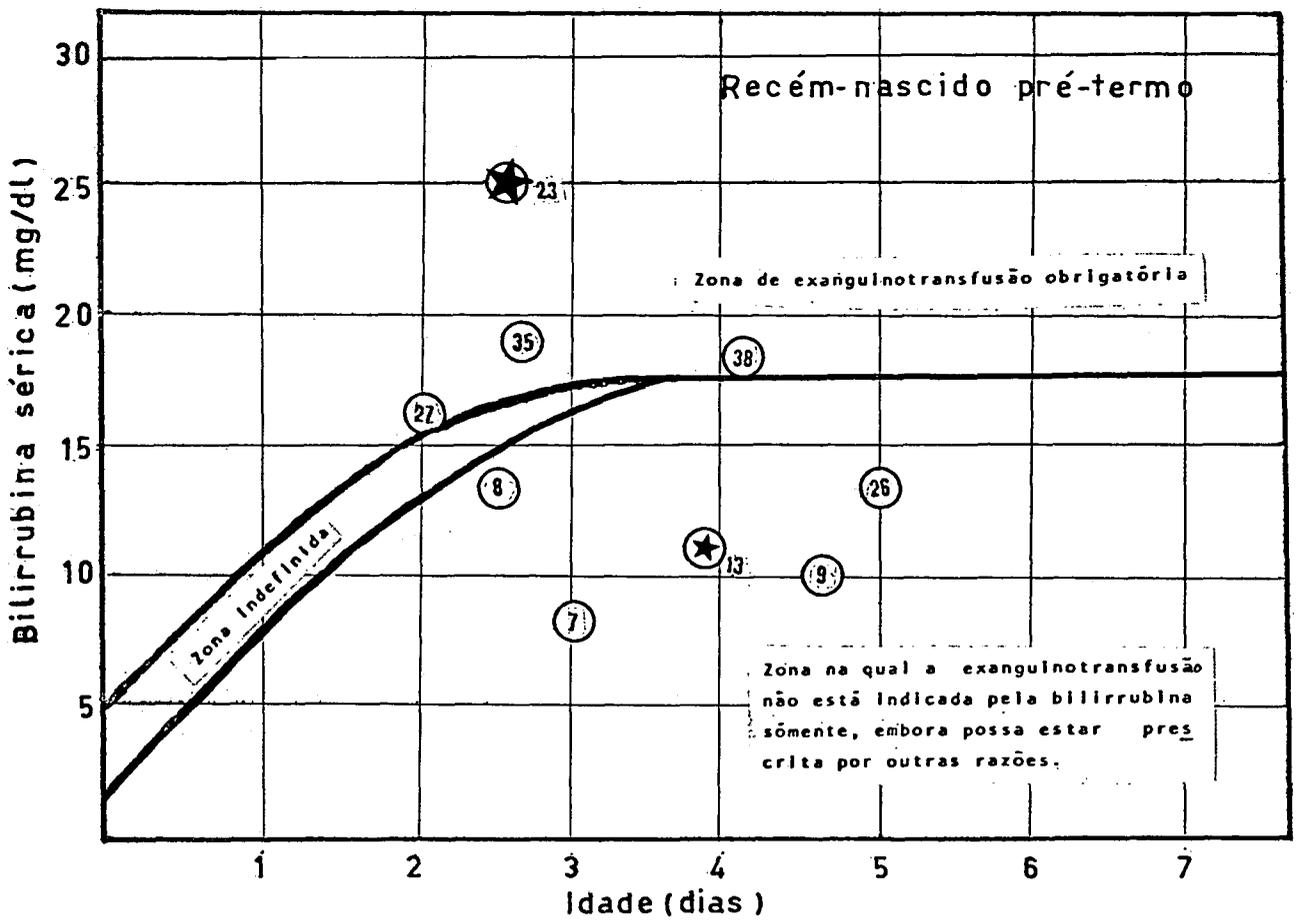
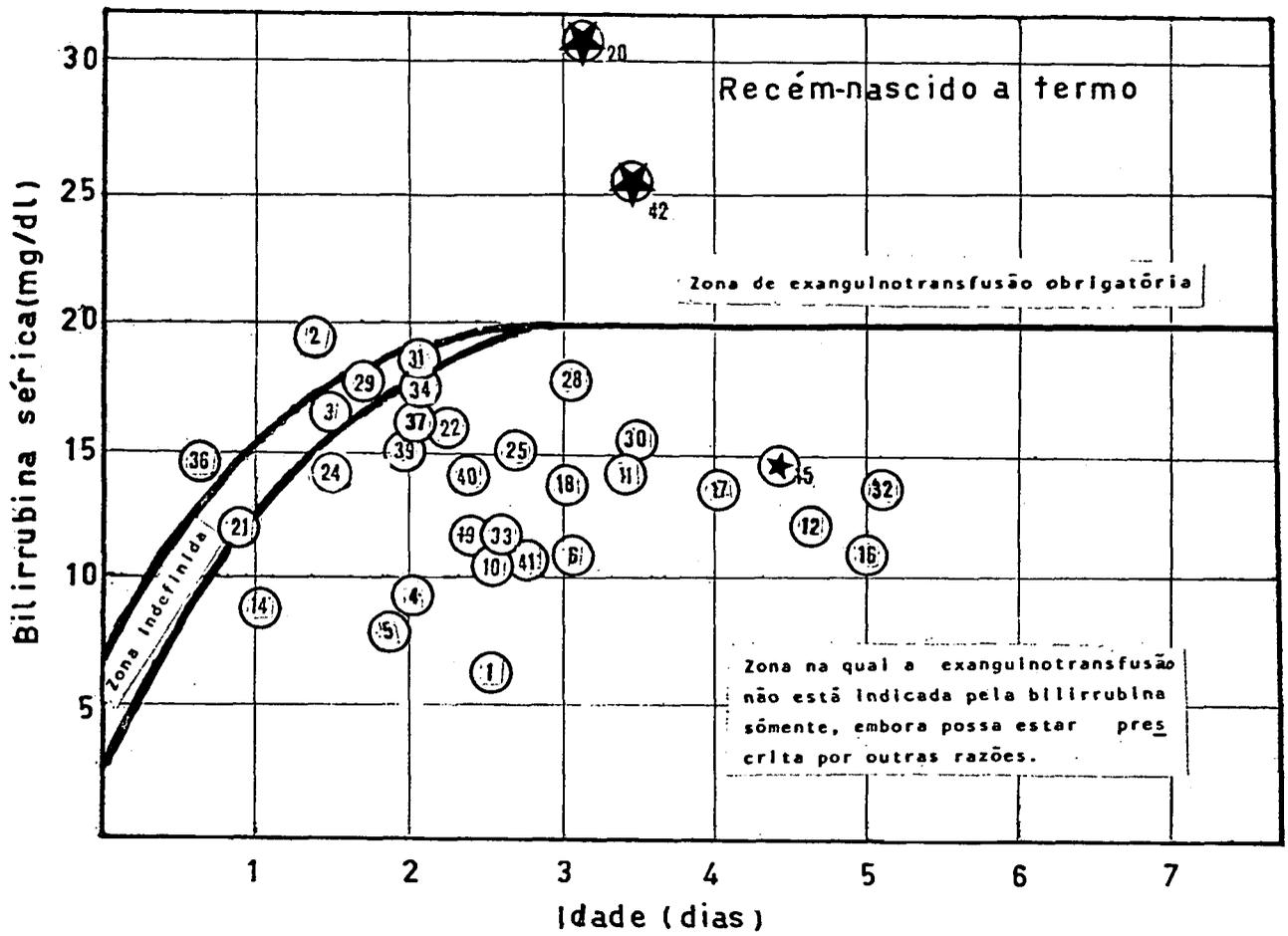
Pac	SITUAÇÃO INÍCIO		A P Ó S (5 mg)		A P Ó S (10 mg)	
	Bil.ind	KT	Bil.ind	KT	Bil.ind	KT
	mg/dl		mg/dl		mg/dl	
6	11.25	(-)	16.25	(+)		
8	13.53	(-)	18.53	(-)		
9	11.50	(-)	16.50	(-)		
10	11.07	(-)	16.07	(-)		
11	14.72	(-)	19.72	(-)		
12	12.30	(-)	17.30	(-)		
13	12.00	(+)	17.00	(+)		
15	14.77	(+)	19.77	(+)		
16	11.80	(-)	16.80	(-)		
17	12.30	(-)	17.30	(-)		
18	14.27	(-)	19.27	(-)	24.27	(-)
19	12.00	(-)	17.00	(-)		
22	15.76	(-)	20.76	(-)		
24	13.50	(-)	18.50	(-)		
25	14.80	(-)	19.80	(-)	24.80	(-)
26	13.35	(-)	18.35	(+)		
28	16.98	(-)	21.98	(-)		
30	15.60	(-)	20.60	(-)	25.60	(+)
32	13.60	(-)	18.60	(-)	23.60	(-)
33	11.50	(-)	16.50	(-)	21.50	(-)
34	17.85	(-)	22.85	(-)	27.05	(-)
37	16.30	(-)	21.30	(-)	26.30	(-)
39	15.10	(-)	20.10	(-)	25.10	(-)
40	14.65	(-)	19.65	(+)		
41	11.20	(-)	16.20	(+)		

(Grupo D). Dentre os 4 RN que ficaram em Obs., o KT revelou-se positivo no caso 5, após a adição de 5.0 mg de bilirrubina. Nos demais casos, o KT permaneceu negativo mesmo após as adições de 5.0 (casos 4 e 7) e 10.0 mg de bilirrubina (caso 1) Tabela XV

Tabela XV

RN QUE FICARAM EM OBSERVAÇÃO (quanto à Fot).

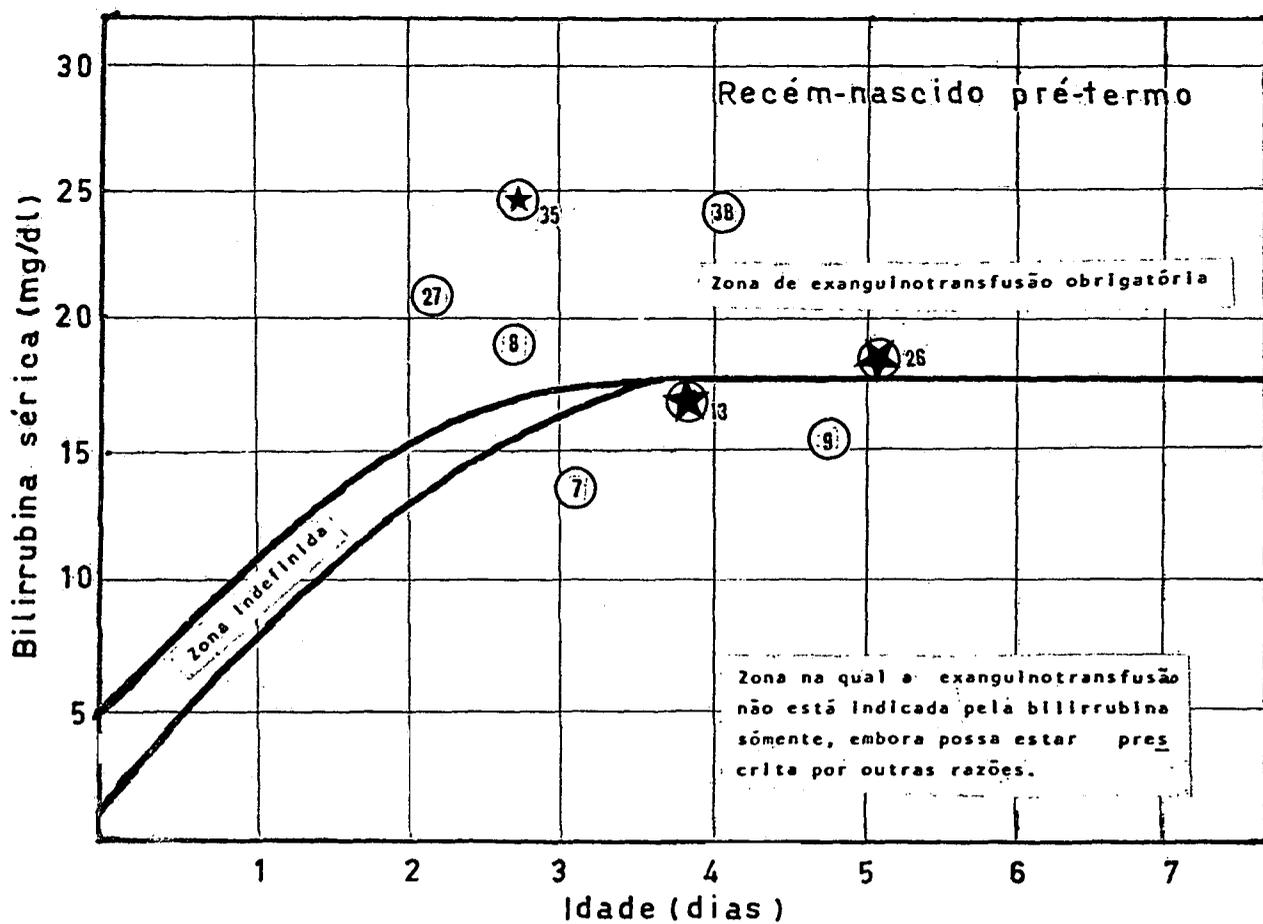
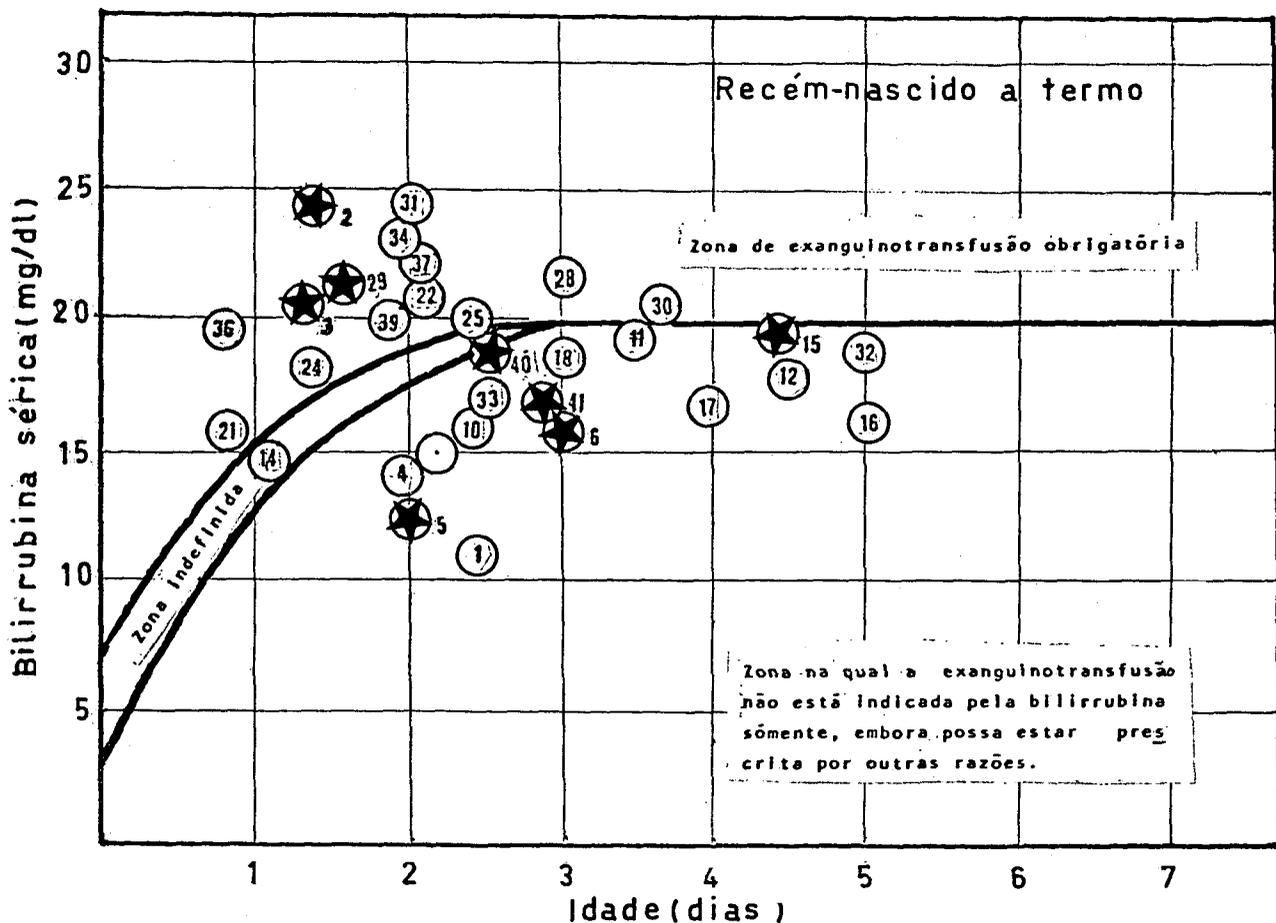
Pac	SITUAÇÃO INICIAL		A P Ó S (5 mg)		A P Ó S (10 mg)	
	<u>Bil.ind</u> mg/dl	KT	<u>Bil.ind</u> mg/dl	KT	<u>Bil.ind</u> mg/dl	KT
1	6.84	(-)	11.84	(-)	16.84	(-)
4	8.50	(-)	13.50	(-)		
5	8.67	(-)	13.67	(+)		
7	8.50	(-)	13.50	(-)		



Figs. 5 e 5a.

- ★ - KERNLUTE TEST POSITIVO
- - KERNLUTE TEST NEGATIVO
- ☆ - KERNLUTE TEST DUVIDOSO

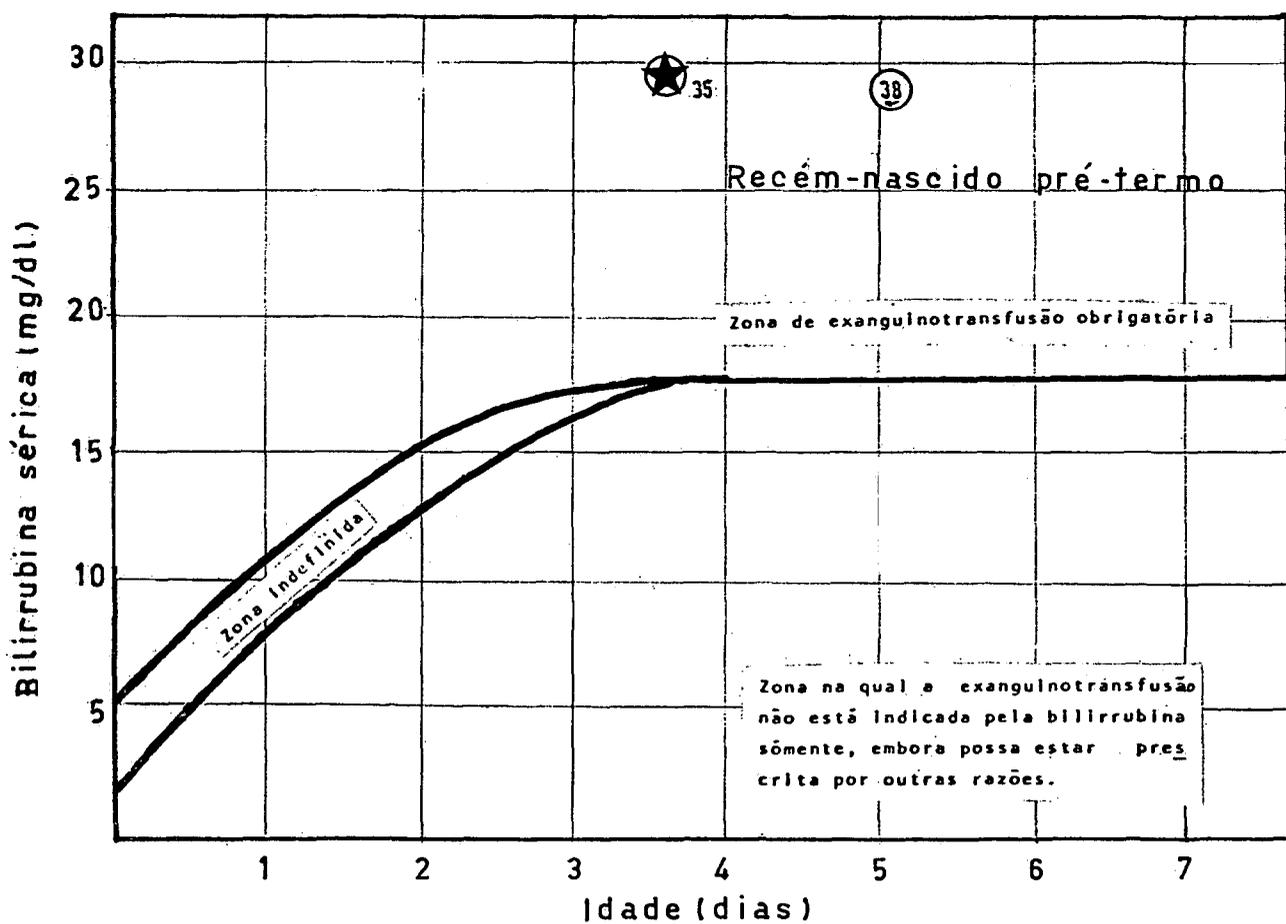
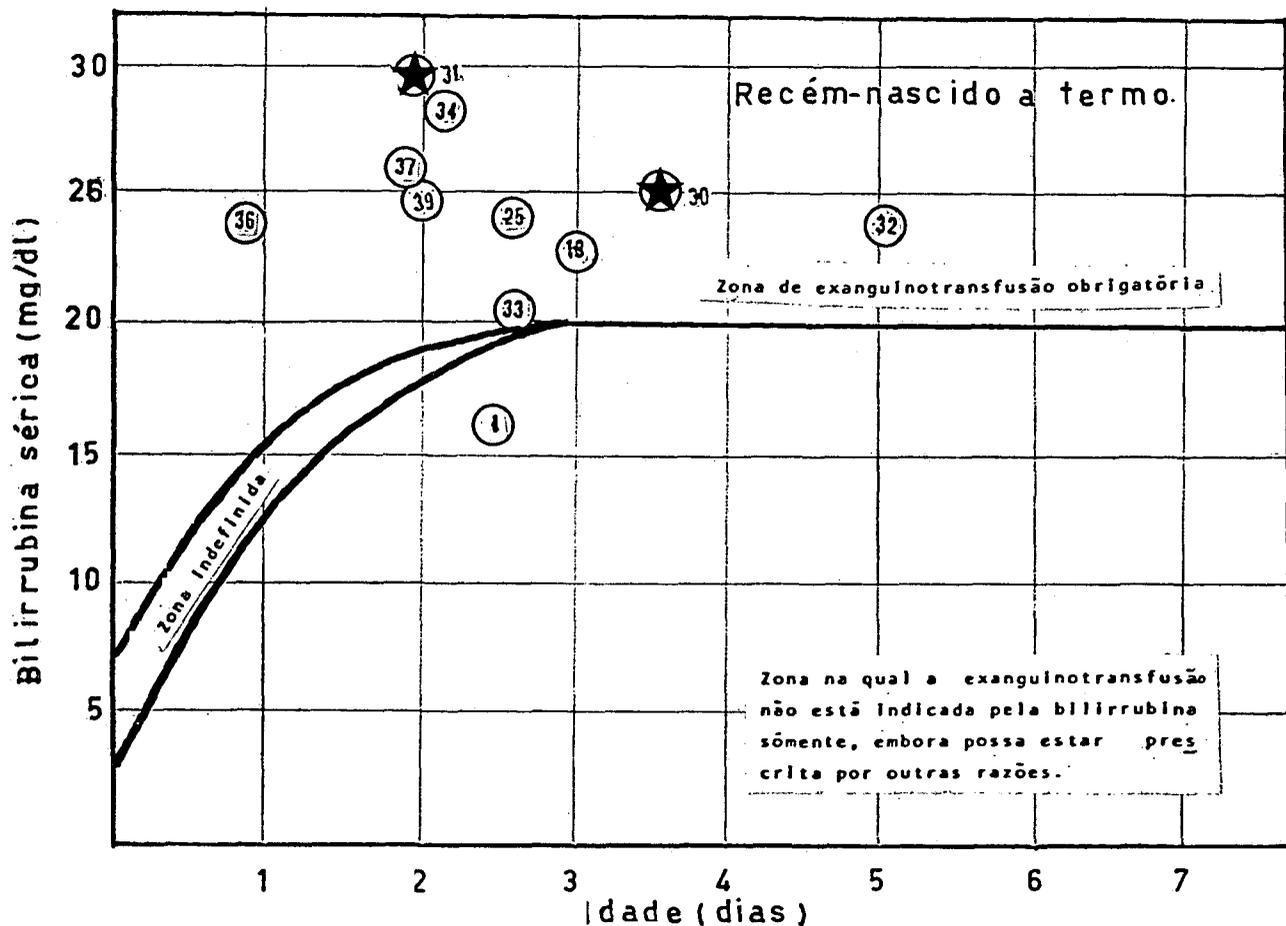
Demonstrativas dos resultados INICIAIS do KT e as correspondentes condutas aplicadas aos recém-nascidos a Termo e pré-Termo, pelo Berçário, segundo as curvas de bilirrubina. (ANEXO V).



Figs. 6 e 6a.

- ★ - KERNLUTE TEST POSITIVO
- - KERNLUTE TEST NEGATIVO
- ☆ - KERNLUTE TEST DUVIDOSO

Demonstrativas dos resultados do KT obtidos após a PRIMEIRA ADIÇÃO (5.0 mg de bilirrubina) e as correspondentes condutas que seriam aplicadas pelo Berçário, segundo as curvas de bilirrubina (ANEXO V).



Figs. 7 e 7a.

- ★ - KERNLUTE TEST POSITIVO
- - KERNLUTE TEST NEGATIVO

Demonstrativas dos resultados do KT obtidas após a SEGUNDA ADIÇÃO (10.0 mg de bilirrubina) e as correspondentes condutas que seriam aplicadas pelo Berçário, segundo as curvas de bilirrubina (ANEXO V).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Neste trabalho foi investigada a presença da BL em 42 RN ictericos, os quais tiveram seus soros a nalisados em duas ou três etapas, compreendendo: uma etapa ini cial, em que foi utilizado o soro "in natura", uma segunda etapa em que foram aplicadas adições "in vitro" de 5.0 mg de bilirrubi na e uma terceira etapa onde estas adições foram equivalentes a 10.0 mg de bilirrubina.

Usando o método de filtração e r etenção em gel de Sephadex G-25, foi possível verificar a presen ça da BL em 16 ocasiões, sendo que em 3 na etapa inicial e em 13, após as adições (em 10, após a adição de 5.0 mg e em 3, após a adição de 10.0 mg de bilirrubina).

As tentativas de comparação entre os resultados dos exames laboratoriais (antes e depois de haver a positividade do KT) nos diferentes grupos de RN (pré-termo e a termo, de baixo peso e de peso adequado), não revelaram diferen ças estatisticamente significativas (Tabelas VI e VII).

No referente às Rel.mol BI/Alb os seus valores foram semelhantes aos encontrados na literatura, tan to nos casos em que o KT foi negativo como positivo. Deve ser salientado, no entanto, que nos vários grupos de RN estudados não foi verificada uma diferença estatisticamente significativa. Desse modo, a utilização da Rel mol BI/Alb mostrou não ter v alor como critério na indicação de conduta em RN ictericos.

A ocorrência de KT positivos naqueles casos em que os níveis de bilirrubina indireta ainda fossem inferiores a 20.0 mg/dl (casos 5, 6, 13, 15, 40 e 41) poderia resultar da interferência de fatores circunstanciais, tais como: hipoalbuminemia (casos 5, 13, 15, e 40) e acidose (caso 41). No caso 6, onde tanto a albuminemia com o pH estavam normais, teríamos como explicações possíveis a presença de 9 alfa-isômeros da BL (10) ou a existência de uma albumina fetal com características estruturais diferentes (35 e 36).

A conclusões semelhantes chegaram ZAMET & CHUNG (79) quando verificaram as influências das alterações ácido-básicas na afinidade da albumina pela bilirrubina e a ação competitiva das lipoproteínas e outras substâncias sobre os "situs" de ligação da albumina. Estes autores chamaram a atenção ainda para os ácidos graxos livres, os quais poderiam atuar como substâncias competidoras, conforme observaram com infusões de lipídios para alimentação parenteral. NAKAMURA & LARDINOIS (46) também alertaram para a presença de fatores circunstanciais, principalmente hematina e alterações ácido-básicas.

Por outro lado, este trabalho evidenciou que em 13 casos, o KT foi negativo frente a valores de bilirrubina indireta superiores a 20.0 mg/dl. Em 07 destes casos (18, 27, 32, 34, 37, 38, e 39), tanto os níveis de albumina sérica como os de pH do sangue encontravam-se em limites normais. Entretanto, 5 casos (25, 28, 30, 31 e 33) estavam em acidose, e em 1 caso (22) havia hipoalbuminemia.

Os KT negativos naqueles casos em que os níveis de bilirrubina indireta estavam elevados, em alguns

dos quais, havendo também hipoalbuminemia e acidose, poderiam ser explicados pela existência de fatores protetores, seja pela presença de alfa 1, alfa 2 ou beta-globulinas (3, 39, e 76), seja pelo aumento da afinidade dos eritrócitos para com a bilirrubina (7), por um aumento da capacidade de ligação da albumina na vigência de alcalose (6) (casos 34, 37, e 38), pela presença de proteínas ligadoras - "ligandins" - no interior dos hepatócitos (34) ou mesmo, devido a variáveis individuais (10 e 47).

A conclusões semelhantes também chegaram ODELL et alii (50) quando, estudando RN com eritroblastose fetal não encontraram correlação entre os níveis de bilirrubina total e os de BL, muito embora já tivessem verificado anteriormente correlação linear entre estas bilirrubinas, ao estudarem RN com icterícia hemolítica. Este fato também foi confirmado por SINGH et alii (67).

A constatação de casos em que, apesar de existirem fatores favoráveis ao aparecimento da BL, esta não tenha sido detectada (KT negativo) e, ao contrário, a detecção da BL (KT positivo), na ausência de tais fatores, nos levaram a concordar com NAKAMURA et alii (46) e com WATERS et alii (74), quando afirmaram que nenhuma informação específica a respeito da ação tóxica da BL, poderia ser obtida determinando-se somente os níveis de bilirrubina indireta ou as relações molares BI/Alb.

De acordo com SCHRAM et alii (64), a BL pode estar presente mesmo antes de ter havido a saturação da albumina, isto é, antes de ter sido ultrapassada a capacidade de reserva da albumina.

Ainda a este respeito, consideram

MARAKINA & TABOLIN (44), que a ação tóxica da bilirrubina venha a depender não só do caráter de sua distribuição no organismo mas também de sua penetração ativa através da estrutura dos tecidos.

Como temos visto, um dos principais objetivos deste trabalho foi verificar se o KT poderia contribuir como mais um subsídio no conjunto de critérios utilizados pela Disciplina de Neonatologia, na decisão das condutas frente aos RN ictéricos. A este respeito o trabalho mostrou que, daqueles 28 casos em que o KT foi negativo, mesmo após a adição de 5.0 mg de bilirrubina (Tabela VIII), 14 já iriam à Exo pela utilização das curvas de bilirrubina.

Constatações semelhantes foram verificadas naqueles casos em que o KT permaneceu negativo, mesmo após a adição de 10.0 mg de bilirrubina (Tabela IX). Neste grupo de 10 RN, em 9 também seria indicada a Exo, pelas curvas de bilirrubina apesar do KT ter sido negativo.

Por outro lado, nos 10 RN em que o KT positivou após a adição de 5.0 mg de bilirrubina (Tabela X), observou-se que, aplicando-se as curvas de bilirrubina, 4 RN iriam à Exo, 2 ficariam na Ind e 4 permaneceriam em Fot, apesar do KT ter demonstrado que uma elevação de 5.0 mg nos níveis de bilirrubina indireta deste RN, já seria suficiente para coloca-los em risco quanto a EB.

Naqueles casos em que o KT somente tornou-se positivo após a adição de 10.0 mg de bilirrubina (Tabela XI), utilizando-se as curvas de bilirrubina a conduta seria a mesma, isto é, Exo.

Analisando-se as condutas toma

das pela Disciplina de Neonatologia quando, utilizando os níveis iniciais de bilirrubina indireta aplicou como critérios de decisão as curvas de bilirrubina, ANEXO V, constatou-se que dos 8 RN submetidos a Exo (Grupo A), o KT foi positivo em 3 e negativo em 5 portanto, não indicando a Exo nesses RN. Dos RN do (Grupo B), nos casos 3 e 29, o KT já tornou-se positivo após a adição de 5.0 mg de bilirrubina. Este fato chama a atenção de que, com a utilização do KT, já poderia ser antecipada a Exo, sem colocar em risco o RN, durante este período de espera necessário para que fossem atingidos os níveis de bilirrubina indireta, suficientes para indicar a Exo pelas curvas de bilirrubina. Gostaríamos de salientar que o caso 29 demonstra as acertivas acima comentadas, pois com 14 horas de evolução este RN teve que ser submetido à Exo, utilizando-se as curvas de bilirrubina.

No referente aos 25 casos que encontravam-se em Fot (Grupo C), o KT foi duvidoso em 2 (casos 13 e 15), antes de qualquer adição de bilirrubina, demonstrando que neles já deveria ter sido realizada a Exo uma vez que se trata de conduta profilática. Nesses dois casos, o KT tornou-se positivo após a adição de 5.0 mg de bilirrubina, o que já era esperado. Da mesma forma, em mais 4 casos (2, 26, 40 e 41), o KT também positivou após a adição de 5.0 mg de bilirrubina, demonstrando desse modo, a situação de alto risco em que se encontravam estes RN.

Dentre os 4 casos que se encontravam em Obs (Grupo D), o KT revelou-se positivo após a adição de 5.0 mg de bilirrubina no caso 5, sugerindo que neste RN, mesmo estando os seus níveis de bilirrubina indireta em 8.7 mg/dl, já havia necessidade de colocá-lo pelo menos em Ind, visando a indicação imediata de Exo.

Gostaríamos ainda de chamar a atenção para o caso 23 (Grupo A), o qual foi a êxito letal por uma intercorrência infecciosa e cuja necrópsia não evidenciou impregnação bilirrubínica no SNC. Como este caso havia apresentado o KT positivo (+) em vida, com nível de bilirrubina indireta de 26.05 mg/dl, a ausência de impregnação bilirrubínica à microscopia óptica confirmou o fato descrito na literatura de que, o KT quando positivo (+), é apenas sugestivo de risco quanto a EB e não, que a mesma já esteja estabelecida (36 e 38).

Considerando que a fração tóxica da bilirrubina (BL) resulte de um balanço entre os níveis de bilirrubina indireta e de albumina circulantes, dentro de um variável microambiente (79) e que a concentração total de bilirrubina circulante seja apenas um índice indireto das concentrações de BL nos tecidos (49), torna-se necessária a aplicação de técnicas que visem a detecção da BL no soro dos RN ictericos.

A preferência da maioria dos autores pelo método de filtração e adsorção em gel de Sephadex G-25, prende-se ao fato de sua facilidade de execução e da possibilidade de saturação da albumina "in vitro", naqueles soros em que os resultados iniciais tenham sido negativos, oferecendo deste modo, informações prognósticas das possibilidades de risco.

Outro aspecto fundamental relaciona-se a utilização do tampão fosfato, o qual tendo um pH de 7.4, mostra-se mais fisiológico, contribuindo desta forma para resultados mais confiáveis.

O uso do gel de Sephadex também apresenta as vantagens de requerer pequenas quantidades de soro (0.1 ml), poder ser realizado à beira do leito, apresentar corre

lação com a evolução clínica e fornecer resultados praticamente imediatos.

Como já foi cogitada a existência de "sítus" específicos para a bilirrubina na molécula de albumina (26 e 40), parecem não ter utilidade prática os métodos que empregam os salivatos (67), a bromosulfoneftaleína (54) ou outros ânions (10 e 54), para obter a saturação da albumina, visto que, nessas situações se estaria determinando a saturação da albumina por estes ânions e não, pela bilirrubina propriamente.

Além disso, existe uma grande semelhança em ordem de grandeza entre a afinidade do gel de Sephadex e a do tecido nervoso, para com a BL (36).

Como as variações da BL na circulação são muito dinâmicas, aconselha-se repetir o KT evolutivamente para a avaliação dos riscos quanto a EB.

CONCLUSÕES

1. A utilização das Curvas de Bilirrubina, propostas por Allen & Diamond, mostram-se de alto risco na orientação das condutas frente aos RN ictéricos.
2. A utilização das Curvas de Bilirrubina de Allen & Diamond, modificadas pelo Departamento of Child Health, King's College Hospital Medical School, London, também se mostraram de alto risco na orientação das condutas frente aos RN ictéricos.
3. O Kernlute Test é o único dos métodos de detecção atualmente existentes, que pode ser utilizado na decisão das condutas frente aos RN ictéricos.
4. Sugerimos a utilização do Kernlute Test a partir de Nível de bilirrubina indireta igual a 6.0 mg/dl.
5. As Relações molares BI/Alb não demonstraram qualquer correlação com os resultados do Kernlute Test.
6. A idade gestacional dos RN, aqui estudados, não demonstrou ter influência nos resultados do Kernlute Test.
7. O estado nutricional dos RN aqui estudados também não demonstrou ter influência nos resultados do Kernlute Test.
8. O Kernlute Test revelou ser um método simples, prático e que requer pouco material para a sua realização.

ANEXOS

ANEXO I

TABELA DEMONSTRATIVA DAS CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO DE RN.

Pac	Sex	Cor	Idade gest. sem.	Peso nascim. g.	Causa da icter.	Início icter. hs	Idade atual dias	Bilir.sérica mg/dl		Album. sérica g/dl	pH sang. arter	Rel.molar Bil/Alb.
								total	indir			
1	m		39	3.700	ABO	36	2.5	8.54	6.84	3.85	7.38	0.20
2	m		40	3.760	Rh	24	1.4	20.52	18.68	2.98	7.31	0.74
3	m		39	3.820	ABO	19	1.5	17.00	15.50	3.30	7.35	0.55
4	m		38	3.120	ABO	24	2.0	10.50	8.50	3.55	7.37	0.28
5	m		39.5	3.070	ABO	24	2.0	10.00	8.67	2.65	7.41	0.38
6	f		39.5	2.800	n̄ Determ.	72	3.0	11.80	11.25	3.50	7.44	0.38
7	m		36	2.820	ABO	60	3.0	10.00	8.50	2.70	7.47	0.37
8	f		34.5	2.120	ABO	28	2.5	14.70	13.53	3.56	7.41	0.44
9	m		34.5	2.200	n̄ Determ.	40	4.5	13.40	11.50	2.72	7.39	0.49
10	m		41	2.820	ABO	42	2.5	12.70	11.07	3.70	7.44	0.35
11	f		39	2.820	Rh	33	3.4	16.22	14.72	3.12	7.41	0.55
12	m	pda	39.5	3.080	Rh	7	4.5	14.20	12.30	3.03	7.43	0.47
13	m		36	2.720	ABO	72	3.7	13.10	12.00	3.05	7.43	0.46
14	f	pda	38.5	2.310	ABO	10	1.0	10.30	9.15	3.10	7.48	0.35
15	m	pda	40	2.810	n̄ Determ.	50	4.4	16.30	14.77	2.65	7.44	0.65
16	m		38	3.030	ABO	40	5.0	14.50	11.80	2.95	7.41	0.47
17	m		39.5	2.900	n̄ Determ.	80	4.0	14.00	12.30	3.23	7.39	0.45
18	m		40	3.370	Rh	67	3.0	16.00	14.27	3.25	7.41	0.52
19	m		41	3.120	ABO	12	2.4	13.70	12.00	3.57	7.41	0.39
20	m		38	2.900	ABO	24	3.0	33.80	31.50	3.03	7.31	1.22
21	f		39.5	2.520	ABO	6	0.7	12.50	11.05	3.36	7.37	0.39
22	m		40.5	2.450	Rh	12	2.0	18.60	15.76	2.98	7.41	0.62
23	f		37.5	3.230	n̄ Determ.	34	2.5	28.50	26.05	2.78	7.38	1.10
24	f		39.5	2.740	ABO	24	1.5	16.20	13.50	2.80	7.37	0.56
25	m		40	2.750	ABO	48	2.5	17.20	14.80	4.20	7.25	0.41
26	m	pda	36	1.650	ABO	30	5.0	15.20	13.35	4.10	7.20	0.38
27	m		37	2.880	Rh	24	2.0	18.00	16.48	4.10	7.42	0.47
28	m		39.5	2.460	ABO	45	3.0	18.50	16.98	3.00	7.30	0.51
29	f	pda	40	2.600	ABO	14	1.5	19.50	16.80	3.80	7.42	0.52
30	m	pda	39.5	3.000	ABO	40	3.5	17.60	15.60	3.55	7.36	0.52
31	f		38.5	2.430	ABO	12	2.0	20.05	18.05	4.20	7.28	0.51
32	f		39	2.420	Rh	40	5.0	16.00	13.60	3.85	7.43	0.42
33	f		41.5	3.380	Rh	50	2.5	13.50	11.50	3.85	7.34	0.36
34	f	pda	40	4.160	ABO	20	2.0	20.00	17.85	3.45	7.45	0.61
35	m		37	2.410	Rh	40	2.5	21.30	19.38	3.32	7.47	0.69
36	f		41	2.700	Rh	11	0.9	16.00	14.58	3.95	7.42	0.43
37	m		41	3.510	ABO	28	2.0	18.30	16.30	3.37	7.48	0.57
38	f		36	2.590	n̄ Determ.	90	4.0	21.00	18.70	3.60	7.42	0.61
39	f		38.5	3.220	ABO	2	2.0	16.40	15.10	3.60	7.45	0.49
40	m		39	3.000	Rh	24	2.4	16.37	14.65	3.23	7.42	0.53
41	m		40	3.620	ABO	20	2.5	12.40	11.20	3.62	7.31	0.36
42	m		39	3.000	ABO	24	3.4	27.70	25.00	2.90	7.35	1.01

ANEXO LI

TABELA DEMONSTRATIVA DOS RESULTADOS DO KT EM CADA CASO
EA CADA ETAPA DA METODOLOGIA (ANTES E APÓS AS ADIÇÕES)

Pac	SITUAÇÃO I N I C I A L			A P Ó S 1ª A D I Ç Ã O			A P Ó S 2ª A D I Ç Ã O			Album g/dl
	Bil.ind	Rel.mol	Teste	Bil.ind	Rel.mol	Teste	Bil.ind	Rel.mol	teste	
	mg/dl	BI/Alb		mg/dl	BI/Alb		mg/dl	BI/Alb		
1	6.84	0.20	(-)	11.84	0.36	(-)	16.84	0.50	(-)	3.85
2	18.68	0.74	(-)	23.68	0.93	(+)				2.98
3	15.50	0.55	(-)	20.50	0.73	(+)				3.30
4	8.50	0.28	(-)	13.50	0.44	(-)				3.55
5	8.67	0.38	(-)	13.67	0.60	(+)				2.65
6	11.25	0.38	(-)	16.25	0.55	(+)				3.50
7	8.50	0.37	(-)	13.50	0.59	(-)				2.70
8	13.53	0.44	(-)	18.53	0.61	(-)				3.56
9	11.50	0.49	(-)	16.50	0.71	(-)				2.72
10	11.07	0.35	(-)	16.07	0.51	(-)				3.70
11	14.72	0.55	(-)	19.72	0.74	(-)				3.12
12	12.30	0.47	(-)	17.30	0.67	(-)				3.03
13	12.00	0.46	(+)	17.00	0.65	(+)				3.05
14	9.15	0.35	(-)	14.15	0.54	(-)				3.10
15	14.77	0.65	(+)	19.77	0.88	(+)				2.65
16	11.80	0.47	(-)	16.80	0.67	(-)				2.95
17	12.30	0.45	(-)	17.30	0.63	(-)				3.23
18	14.27	0.52	(-)	19.27	0.70	(-)	24.27	0.88	(-)	3.25
19	12.00	0.39	(-)	17.00	0.56	(-)				3.57
20	31.50	1.22	(+)							3.03
21	11.05	0.39	(-)	16.05	0.53	(-)				3.36
22	15.76	0.62	(-)	20.76	0.82	(-)				2.98
23	26.05	1.10	(+)							2.78
24	13.50	0.56	(-)	18.50	0.78	(-)				2.80
25	14.80	0.41	(-)	19.80	0.55	(-)	24.80	0.69	(-)	4.20
26	13.35	0.38	(-)	18.35	0.53	(+)				4.10
27	16.48	0.47	(-)	21.48	0.62	(-)				4.10
28	16.98	0.51	(-)	21.98	0.66	(-)				3.90
29	16.80	0.52	(-)	21.80	0.67	(+)				3.80
30	15.60	0.52	(-)	20.60	0.68	(-)	25.60	0.85	(+)	3.55
31	18.05	0.51	(-)	23.05	0.65	(-)	28.05	0.79	(+)	4.20
32	13.60	0.42	(-)	18.60	0.57	(-)	23.60	0.72	(-)	3.85
33	11.50	0.36	(-)	16.50	0.50	(-)	21.50	0.66	(-)	3.85
34	17.85	0.61	(-)	22.85	0.78	(-)	27.85	0.95	(-)	3.45
35	19.38	0.69	(-)	24.38	0.86	(±)	29.38	1.04	(+)	3.32
36	14.58	0.43	(-)	19.58	0.46	(-)	24.58	0.73	(-)	3.95
37	16.30	0.57	(-)	21.30	0.40	(-)	26.30	0.92	(-)	3.37
38	18.70	0.61	(-)	23.70	0.77	(-)	28.70	0.94	(-)	3.60
39	15.10	0.49	(-)	20.10	0.66	(-)	25.10	0.82	(-)	3.60
40	14.65	0.53	(-)	19.65	0.71	(+)				3.23
41	11.20	0.36	(-)	16.20	0.53	(+)				3.62
42	25.00	1.01	(±)							2.90

(±) resultado fortemente positivo
 (+) resultado positivo
 (±) resultado duvidoso
 (-) resultado negativo

ANEXO III

COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DO KT E EXAMES COMPLEMENTARES EM RELAÇÃO AOS DIVERSOS PARÂMETROS, NOS DOIS GRUPOS DE RN (PRÉ-TERMO E A TERMO).

PARÂMETROS	VARIÁVEIS	RN PRÉ-TERMO		RN A TERMO	
		KT (-)	KT (+)	KT (-)	KT (+)
Bil. Indir. > 20.00 mg/dl	<u>Albumina</u>	3.60 - 4.10 (3.85 ± 0.35)	2.78 - 3.38 (3.05 ± 0.38)	2.98 - 4.20 (3.54 ± 0.44)	2.90 - 4.20 * (3.39 ± 0.48)**
	<u>Rel.mol.BI/Alb</u>	0.62 - 0.94 (0.81 ± 0.18)	1.04 - 1.10 (1.07 ± 0.04)	0.66 - 0.95 (0.78 ± 0.11)	0.67 - 1.22 (0.88 ± 0.18)
	<u>pH</u>	7,42	7.38 - 7.47 (7.42 ± 0.05)	7.25 - 7.48 (7.38 ± 0.07)	7.28 - 7.42 (7.29 ± 0.07)
Bil. Indir. < 20.00 mg/dl	<u>Albumina</u>	2.70 - 3.56 (2.99 ± 0.47)	3.05 - 4.10 (3.56 ± 0.76)	2.80 - 3.85 (3.29 ± 0.33)	2.65 - 3.62 (3.13 ± 0.46)
	<u>Rel.mol.BI/Alb</u>	0.59 - 0.71 (0.63 ± 0.06)	0.53 - 0.65 (0.59 ± 0.08)	0.44 - 0.78 (0.60 ± 0.10)	0.53 - 0.88 (0.65 ± 0.14)
	<u>pH</u>	7.39 - 7.47 (7.42 ± 0.04)	7.20 - 7.43 (7.31 ± 0.16)	7.37 - 7.48 (7.40 ± 0.03)	7.31 - 7.44 (7.40 ± 0.05)
Albumina < 3.00 g/dl	<u>Bil. Indir.</u>	13.50 - 16.50 (15.00 ± 2.34)	26,00	16.80 - 20.76 (18.68 ± 1.98)	13.67 - 25.00 (20.53 ± 5.08)
	<u>Rel.mol.BI/Alb</u>	0.59 - 0.71 (0.65 ± 0.08)	1,10	0.67 - 0.82 (0.75 ± 0.07)	0.60 - 1.01 (0.83 ± 0.17)
	<u>pH</u>	7.39 - 7.47 (7.43 ± 0.05)	7,38	7.37 - 7.41 (7.39 ± 0.02)	7.31 - 7.44 (7.37 ± 0.05)
Rel.mol.BI/Alb > 0.60	<u>Bil. Indir.</u>	18.53 - 28.70 (21.30 ± 5.33)	17.00 - 29.38 (24.14 ± 6.40)	16.80 - 27.85 (21.35 ± 3.60)	13.67 - 28.05 (22.86 ± 4.88)
	<u>Albumina</u>	2.72 - 3.60 (3.49 ± 0.37)	2.78 - 3.32 (3.05 ± 0.27)	2.80 - 4.20 (3.43 ± 0.46)	2.65 - 4.20 (3.21 ± 0.38)
	<u>pH</u>	7.39 - 7.42 (7.41 ± 0.01)	7.38 - 7.47 (7.42 ± 0.05)	7.25 - 7.48 (7.39 ± 0.06)	7.28 - 7.44 (7.35 ± 0.05)
Rel.mol.BI/Alb < 0.60	<u>Bil. Indir.</u>	3,50	18,53	13.50 - 17.00 (15.59 ± 1.44)	16.20 - 16.25 (16.22 ± 0.03)
	<u>Albumina</u>	2,70	4,10	3.10 - 3.85 (3.52 ± 0.26)	3.50 - 3.62 (3.56 ± 0.08)
	<u>pH</u>	7,47	7,20	7.37 - 7.48 (7.40 ± 0.05)	7.31 - 7.44 (7.39 ± 0.07)

* Valores limites encontrados

** média e desvio padrão.

ANEXO IV

TABELA DEMONSTRATIVA DAS CONDUTAS APLICADAS OU APLICÁVEIS SEGUNDO AS CURVAS DE BILIRRUBINA.

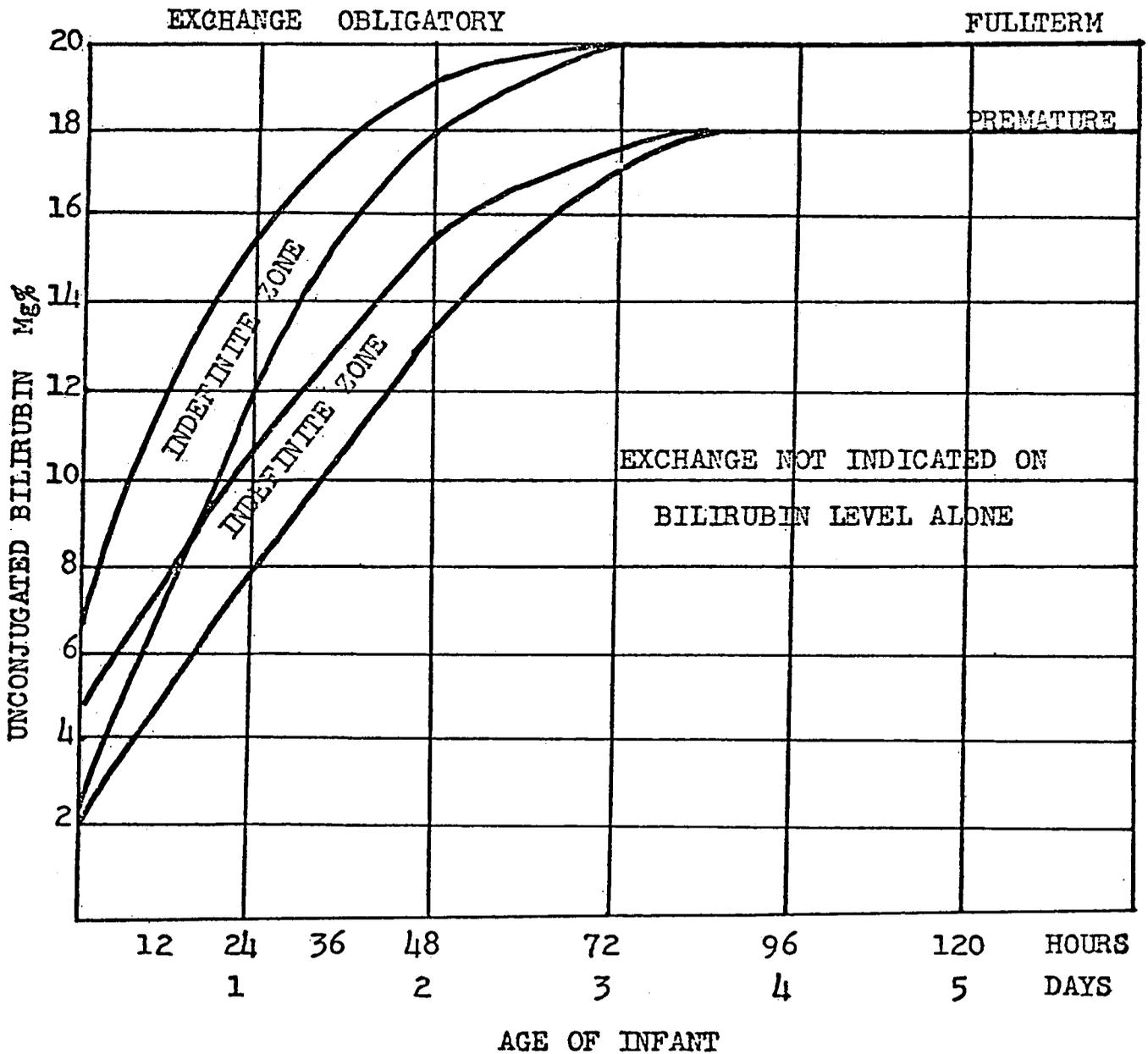
Pac	Idade gest. sem.	Idade atual dias	SITUAÇÃO															
			Bil.ind mg/dl	I N I C I A L				Bil.ind mg/dl	A P Ó S A 1ª A D I Ç Ã O				Bil.ind mg/dl	A P Ó S A 2ª A D I Ç Ã O				
				obs	fot	ind	exo		fot	ind	exo	fot		ind	exo			
1	39	2.5	6.84	+				11.84	+				16.84	+				
2	40	1.4	18.68				+	23.68										
3	39	1.5	15.50				+	20.50				+						
4	38	2.0	8.50	+				13.50	+									
5	39.5	2.0	8.67	+				13.67	+									
6	39.5	3.0	11.25		+			16.25	+									
7	36	3.0	8.50	+				13.50	+									
8	34.5	2.5	13.53		+			18.53				+						
9	34.5	4.5	11.50		+			16.50	+									
10	41	2.5	11.07	+	+			16.07	+									
11	39	3.4	14.72	+	+			19.72	+									
12	39.5	4.5	12.30	+	+			17.30	+									
13	36	3.7	12.00		+			17.00	+									
14	38.5	1.0	9.15			+		14.15				+						
15	40	4.4	14.77		+			19.77			+							
16	38	5.0	11.80		+			16.80	+									
17	39.5	4.0	12.30		+			17.30	+									
18	40	3.0	14.27		+			19.27	+			24.27					+	
19	41	2.4	12.00		+			17.00	+									
20	38	3.0	31.50				+											
21	39.5	0.7	11.05			+		16.05				+						
22	40.5	2.0	15.76		+			20.76				+						
23	37.5	2.5	26.05				+											
24	39.5	1.5	13.50		+			18.50				+						
25	40	2.5	14.80		+			19.80			+	24.80					+	
26	36	5.0	13.35		+			18.35				+						
27	37	2.0	16.48				+	21.40										
28	39.5	3.0	16.98		+			21.98				+						
29	40	1.5	16.80			+		21.80				+						
30	39.5	3.5	15.60		+			20.60				+	25.60					
31	38.5	2.0	18.05				+	23.05				+	28.05					
32	39	5.0	13.60		+			18.60	+				23.60				+	
33	41.1	2.5	11.50		+			16.50	+				21.50				+	
34	40	2.0	17.85		+			22.85				+	27.85					
35	37	2.5	19.38				+	24.38					29.38					
36	41	0.9	14.58				+	19.58					24.50					
37	41	2.0	16.30		+			21.30				+	26.30					
38	36	4.0	18.70				+	23.70					28.70					
39	38.5	2.0	15.10		+			20.10				+	25.10					
40	39	2.4	14.65		+			19.65			+							
41	40	2.5	11.20		+			16.20	+									
42	39	3.4	25.00				+											

obs = em observação quanto a necessidade de fot
fot = em fototerapia
ind = na zona indefinida
exo = com indicação de exanguino Transfusão.

ANEXO V

CURVAS DE BILIRRUBINAS DE
ALLEN & DIAMOND MODIFICADAS

DEPARTMENT OF CHILD HEALTH, KING'S COLLEGE
HOSPITAL MEDICAL SCHOOL, LONDON.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKERMAN, B.D.; DYER, G.Y.; LEY DORF, M.M. Hiperbilirubinemia and Kernicterus in Small Premature infants. Pediatrics, 45: 918-25, 1970.
2. ASTRUP, P.; JORGENSEN, K.; ANDERSEN, S.; ENGEL, K. The acid-base metabolism a new approach. Lancet, 14:1036-39, 1960.
3. ATHANASSIADI S, S.; CHOPRA, D.R.; FISHER, M.A.; MCKENNA, J. An electrophoretic method for detection of unbound bilirubin and reserve bilirubin binding capacity in serum of newborns. J. Lab. Clin. Med. 81:968-76, 1974.
4. BAER, D. Why have some people reported false low total bilirubin values when using methods similar to that of Jendrassik and Grof ? In: GAMBINO, S.R. & DI RE, J. Bilirubin assay revised. Chicago, American Society of Clinical Pathologists: Commission on Continuing Education, 27-37, 1968.
5. BOGGS, T.R.; HARDY, J.B.; FRAZIER, T.M. Correlation of neonatal serum total bilirubin concentrations and developmental status at age eight months. J. Pediatr, 71: 553-60, 1967.
6. BRATLID, D. & FOG, J. The binding capacity of human albumin for bilirubin and its significance in the pathogenesis of Kernicterus. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 25: 257-61, 1970.
7. BRATLID, D. The effect of pH on bilirubin binding by human erythrocytes. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29: 453-59, 1972.
8. BRODERSEN, R. Supersaturation with bilirubin followed by colloid formation and disposition, with a hypothesis on the etiology of Kernicterus. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29: 447-52, 1972.
9. CASHORE, W.J.; HORWICH, A.; KAROTKIN, E.H.; OH, W. Influence of Gestational Age and Clinical Status on Bilirubin-Binding Capacity in Newborn Infants. Amer. J Dis Child. 131: 898-901, 1977.

10. CASHORE, W. J.; GARTNER, L.M.; OH, W.; STERN, L. Clinical Application of neonatal bilirubin - binding determinations: Current status. J. Pediatr., 93: 827-833, 1978.
11. CATZ, C. The yellow Baby. N.Y. State J. Med. 74: 804-7, 1974.
12. CENTA, A.; CAMERA, G.; PICCININI, P.; DI PIETRO, P.; TOMATIS, C. Impiego di 5 - butil - 1 - cidoesil - 2,4,6 - trioxoperidropirimidina (BCP) nella profilassi e nella terapia dell'iperbilirubinemia neonatale. Minerva Pediatr. 28: 911-21, 1976.
13. CHUNGA, F. & LARDINOIS, R. Separation by Gel Filtration and microdetermination of unbound bilirubin. Acta Paediat.Scand. 60: 27-32, 1971.
14. COWGER, M.L.; IGO, R.P.; LABBE, R.F. The mechanism of bilirubin toxicity studied with purified respiratory enzyme and tissue culture systems. Biochemistry, 4: 2763-70, 1965.
15. DAVIES, P.A.; ROBINSON, R.J.; SCOPES, J.W.; TIZARD, J. P. M.; WIGGLESWORTH, J.S. Birthweight/gestational age charts. In: Medical care of newborn babies. London, W. Heinemann, 1972. p. 323 - 5 (Clinics in developmental medicine, 44 / 5).
16. DIAMOND, I. & SCHMID, R. Bilirubin Encephalopathy: Experimental models in newborn and adult animals. J. Clin. Invest. 44: 1040, 1965.
17. DIAMOND, I. & SCHMID, R. Experimental bilirubin encephalopathy. The mode of entry bilirubin - 14 C into the central nervous system. J. Clin. Invest. 45: 678-89, 1966.
18. DUPONT, C. & SARKOZY, E. A simplified for assay of reserve bilirubin binding capacity. J. Lab. Clin. Med. 89: 439-45, 1977.
19. FOLLOT, A.; HOUSSET, E.; PLOUSSARD, J. P.; PETITE, J.P.; INFANTE R. Study of Y and Z, two cytoplasmic bilirubin binding proteins. Their development in the liver of foetal and newborn wistar and Gunn rats. Biomedicine. 19: 488-91, 1973.

20. GARTNER, L.M.; SNYDER, R.N.; CHABON, R.S.; BERNSTEIN, J. Kernicterus: High incidence in premature infants with low serum bilirubin concentrations. Pediatrics, 45: 906-17, 1970.
21. GAVINELLI, R.; GALLENCA, M.; GRASSO, G.P. L'acido 1 - cicloesil - 5 - butil barbiturico nel trattamento delle iperbilirubinemia neonatali. Minerva Pediatr. 25: 922-31, 1976.
22. GUTIERREZ, L. J. & VIEYRA, J.A.S. Kernicterus. Correlacion anatomoclínica en sesenta y cuatro neonatos. Bol. Med. Hosp. Inf. 5: 1133-41, 1976.
23. HARRIS, R.C.; LUCEY, J.F.; MacLEAN, J.R. Kernicterus in premature infants associated with low concentrations of bilirubin in the plasma. Pediatrics, 21: 875-84, 1958.
24. HYMAN, C.B.; KEASER, J.; HANSEN, V.; HARRIS, I.; SEDGWICK, R.; WURSTEN, H. WRIGHT, A.R. CNS Abnormalities after neonatal hemolytic disease or hyperbilirubinemia. Amer. J. Dis. Child. 117: 395-405, 1969.
25. HOWORTH, P.J.N. Determination of serum albumin in neonatal jaundice the albumin saturation index. Clin. Chim. Acta, 32: 271-78, 1971.
26. JACOBSEN, C. Chemical modification on the high-affinity bilirubin binding site of human serum albumin. Eur. J. Biochem. 27: 513-19, 1972.
27. JACOBSEN, J. Binding of bilirubin to human serum albumin-determination of the dissociation constants. F.E.B.S. Letters, 5: 112-14, 1969.
28. JACOBSEN, J. & FEDDERS, O. Determination of non - albumin bound bilirubin in human serum. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 26: 237-41, 1970.
29. JACOBSEN, J. & WENBERG, R.O. Determination of unbound - bilirubin in the serum of newborns. Clin. Chem. 20: 783-89, 1974.

30. JENDRASSIK, L. & GROF, O. Vereinfachte photometrische methoden zur bestimmung des blutbilirubins. Biochem. Z. 297:81,9, 1938.
31. JIRSOVÁ, V.; KIRSA, M.; HERINGOVÁ, A.; KOLDOVSKI, O., WEIRICHOVÁ, J. The use and possible diagnostic of Sephadex Gel Filtration of serum from icteric newborn. Biol. Neonat. 11: 209-15, 1967.
32. JOSEPHSON, B. & FURST, P. - Sulfonamides competing With bilirubin for conjugation to albumin. Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 18: 51-63, 1966.
33. JUNQUEIRA, P.C. Doença hemolítica perinatal, In: LAGES NETTO Neonatologia. Rio de Janeiro, Ed. Monterrey, 1973 p.186-92.
34. KAMISAKA, K.; GATMAITAN, Z., MOORE, C.L.; ARIAS, I.M. Ligandin reverses bilirubin inhibition of liver mitochondrial respiration in vitro. Pediatr. Res. 9: 903-905, 1975.
35. KAPITULNIK, J., BLONDHEIM, S.M.; KAUFMANN, N.A. Sephadex adsorption of bilirubin from neonatal and adult serum. Clin. Chem. 18: 43-7, 1972.
36. KAPITULNIK, J.; VALAES, T., KAUFMANN, N.A., BLONDHEIM, S. H. Clinical evaluation of sephadex gel filtration in estimation of bilirubin binding in serum in neonatal jaundice. Arch. Dis. Child. 49: 886-94, 1974.
37. KAUFMANN, N.A., KAPITULNIK, J.; BLONDHEIM, S. H. The adsorption of bilirubin by sephadex and its relationship to the criteria for exchange transfusion. Pediatrics, 44: 453-48, 1969
38. KAUFMANN, N.A.; KAPITULNIK, J.; BLONDHEIM, S.H. Bilirubin binding affinity of serum: Comparison of qualitative and quantitative sephadex gel filtration methods. Clin. Chem. 19: 1276-79, 1973.
39. KLATSKIN, G. & BUNGARDS, L. Bilirubin - protein linkages in serum and their relationship to the Van Den Bergh reaction. J. Clin. Invest. 35: 537-51, 1956

40. LEVINE, R.L. Fluorescence-quenching studies of the binding of bilirubin to albumin. Clin. Chem. 23: 2292-301, 1977.
41. LIE, S.O. & BRATLID, D. The protective effect of albumin on bilirubin toxicity on human fibroblasts. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 26: 37-41, 1970.
42. LUBCHENCO, L.O. Assessment of Gestational Age and Development at Birth. Pediatr. Clin. North. Amer. 24: 125-45, 1970.
43. MALAKA-ZAFIRIU, K. & STRATES, B.S. The effect of antimicrobial agents on the binding of bilirubin by albumin Acta Pediatr. Scand. 58: 281-86, 1969.
44. MARAKINA, S.P. & TABOLIN, B.A. Reserve binding capacity in premature with hyperbilirubinemia. Pediatr. Scand. 5: 39-41, 1977.
45. MARTIN, N.H. Preparation and properties of serum and plasma proteins. XX. Interactions with bilirubin. J. Amer. Chem. Soc. 71: 1230-32, 1949.
46. NAKAMURA, H. & LARDINOIS, R. Unbound bilirubin in icteric newborns. Biol. Neonate, 21: 400-17, 1972.
47. NAKAMURA, H. & LEE, Y. Microdetermination of Unbound bilirubin in icteric newborn sera: An enzymatic method employing peroxidase and glucose oxidase. Clin. Chim. Acta, 79: 411-17, 1977.
48. NELSON, T.; JACOBSEN, J.; WENNBERG, R.P. Effect of pH on the interaction of bilirubin with albumin and tissue culture cells. Pediatr. Res. 8: 963-67, 1974.
49. ODELL, G.B. The dissociation of bilirubin from albumin and its clinical implications. J. Pediatr. 55: 268-79, 1959.
50. ODELL, G.B.; STOREY, G.N.B.; ROSENBERG, L.A. Studies in kernicterus the saturation of serum proteins with bilirubin during neonatal life and its relationship to brain damage at five years. J. Pediatr. 76: 12-21, 1970.

51. ODELL, G.B., CUKIER, J.O., OSTREA, E.M. MAGLALANG. A.C.POLAND, R.L. The influence of fatty acids on the binding of bilirubin to albumin. J. Lab. Clin. Med. 89: 295-307, 1977.
52. OSKI, F.A. & NAIMAN, J. L. Red Cell binding of bilirubin J. Pediatr 63: 1034-37, 1963.
53. PARKIN, J. M., HEY, E.N., CLOWES, J.S. Rapid assessment of gestational age at birth. Arch. Dis Child, 151: 259-63, 1976.
54. PAYS, M. & BELJEAN. M. Microdetermination of unbound bilirubin in sera. Application to the prevention of Kernicterus by estimating the bilirubin-binding capacity of serum albumin. Clin. Chim. Acta, 59: 121-28, 1975.
55. PRIOLISI, A. La misura della capacità bilirubino-legante del siero di neonati itterisi. Minerva Pediatr. 28: 2117-27, 1976.
56. PRIOLISI, A. & ZIINO, L. Comparative analysis between the reserve albumin-binding capacity (HABA method), and the saturation index of hyperbilirubinemic sera. Biol. Neonate, 19: 258-71, 1971.
57. PRIOLISI, A. & LIOTTA, A. Formaci e bilirubina. Azione competitiva sulla capacità albumina-legante del siero. Minerva Pediatr. 26: 1228-32, 1974.
58. PRIOLISI, A.; ZIINO, L.; MANCUSO, G. Il Kernlute-test per la individuazione del neonato a rischio di encefalopatia bilirubinica. Minerva Pediatr. 28: 149, 1976.
59. RUTKOWSKI, R. B. The determination of maximum bilirubin binding capacity of human albumin and serum by a calcium carbonate adsorption technique. Clin. Chim. Acta. 17: 31-38, 1967.
60. SAWITSKY, A.; CHEUNG, W.H.; SEIFTER, E. The effect of pH on distribution of bilirubin in peripheral blood, cerebrospinal fluid, and fat tissues. J. Pediatr. 72: 700-7, 1968.

61. SCHIFF, D.; CHAN, G.; STERN, L. Fixed drug combinations and the displacement of bilirubin from albumin. Pediatrics, 48: 139-41, 1970.
62. SCHIFF, D.; CHAN, G.; STERN, L. Sephadex G-25 quantitative estimation of free bilirubin potential in jaundiced newborn infant's sera: A guide prevention of Kernicterus. J. Lab. Clin. Med. 80: 455-62, 1972.
63. SCHMID, R.; DIAMOND, I.; HAMMAKER, L.; GUNDERSEN, C.B. Interaction of bilirubin with albumin. Nature, 206: 1041-43, 1965.
64. SCHRAMM, V. D.; FRENZEL, J.; SANDER, I. Der einfluss von bilirubinbelastungen auf die Konzentration des nicht albumin-gebundenen bilirubins in ikterischen serum neugeborener. Dtsch. Gesundheits. Wis. 29: 2233-36, 1974.
65. SEGNI, G.; POLIDORI, G.; ROMAGNOLI, C. Bucolome in prevention of hyperbilirubinaemia in preterm infant. Arch. Dis. Child. 52: 549-50, 1977.
66. SELIGMAN, J.W. Recent and changing concepts of hyperbilirubinemia and its management in the newborns. Pediatr. Clin. North. Amer. 24: 509-27, 1977.
67. SINGH, M.; WASUKI, K.; SETH, V.; CHAI, O.P. Evolution of additional criteria for exchange transfusion in the newborn. Indian Pediatr. 11: 261-65, 1974.
68. STERN, L. Drug interactions - Part II: Drugs, the newborn infant, and the binding of bilirubin to albumin. Pediatrics, 49: 916-17, 1972.
69. STERN, L.; DORAY, B.; CHAN, G.; SCHIFF, D. Bilirubin metabolism in the newborn. Excerpta Med. ICS, 380: 255-63, 1976.
70. TOWERS, S. & Mc MULLIN, G. Controlled Trial of antenatal barbiturate in rhesus haemolytic disease. Arch. Dis Child. 52: 324-34, 1977.

71. TRIVIN, F. & ODIEVRE, M. Metabolism de la bilirrubine chez le nouveau - ne - Progres Recents. Arch. Franç. Pédiatr. 33: 293-304, 1976.
72. VAUGHAN, V.C.; ALLEN, F.H.; DIAMOND, L.K. Erythroblastosis Fetalis IV. Further observations on kernicterus. Pediatrics, 6: 706-16, 1950.
73. WALKER, W.; HUGHES, M.I.; BARTON, M. Barbiturate and hyperbilirubinaemia of prematurity. Lancet, 1: 538-51, 1969.
74. WATERS, W.J. - The reserve albumin binding capacity as a criterion for exchange transfusion. J. Pediatr. 70: 185-92, 1967.
75. WENBERG, R.P.; DEPP, R.; HEINRICHS, W.L. Indications for early exchange transfusion in patients with erythroplastosis fetalis. J. Pediatr. 92: 789-92, 1978.
76. WESTPHAL, U.; OTT, H.; GEDIGK, P. An welche komponenten der serum proteine ist das bilirubin gebunden. Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem. 285: 200-7, 1950.
77. WONG, Y.K. & WOOD, B.S.B. Relative roles of phototherapy and phenobarbitone in treatment of nonhemolytic neonatal Jaundice. Arch. Dis. Child. 48: 704-8, 1973.
78. YAFFE, S.J.; PHARM, G.L.; MATSUZAWA, T.; BALIAH, T. Enhancement of glucuronide-conjugating capacity in a hyperbilirubinemia infant due to apparent enzyme induction by phenobarbital. New. Eng. J. Med. 275: 1461-66, 1966.
79. ZAMET, P. & CHUNGA, F. Separation by gel filtration and microdetermination of unbound bilirubin. Acta Pediatr. Scand. 60: 33-8, 1971.
80. ZETTERSTROM, R & ERNSTEEL, L. Bilirubin an uncoupler of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria. Nature. 4546: 1335-37, 1956.