

MARCOS PAROLIM CECCATTO

AVALIAÇÃO DA IDADE GESTACIONAL EM RECÉM-NASCIDOS
PELA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL.

Dissertação ao nível de Mestrado em Pediatria,
apresentado à Universidade Federal do Paraná.

— DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA —

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Leide Parolin Marinoni.

CURITIBA

Estado do Paraná - Brasil

- 1977 -

Dedico este trabalho

a meus pais Oswaldo e Esmeralda,
ã minha esposa Regina Célia
e filho Luiz Gustavo.

AGRADECIMENTOS

O autor recebeu contribuições de várias pessoas e instituições para a realização deste trabalho e expressa seu agradecimento a todos e principalmente:

ã Prof^ã Dr^ã Leide Parolin Marri noni, pela orientação, atenção e estímulos dedicados a este trabalho;

ao Prof. Dr. Izrail Cat, coordenador do Curso de Pós-graduação - Mestrado em Pediatria;

aos Profs. Drs. Eurípedes Ferreira e Nelson Egydio de Carvalho, pela valiosa colaboração;

ao Prof. Juarez Gabardo e ao Prof. Dr. Natal Antonio Vello, pela análise estatística;

ã Sr.^{ta} Suzana Guimarães Castilho e suas auxiliares, pela organização bibliográfica;

ã Bioquímica Cecilia Midori Kurokawa Tomizawa, pela orientação nas determinações laboratoriais;

aos Residentes do Departamento de Pediatria e à Sr.^a Terezinha Stocco Mondin, pela colaboração na colheita do material;

ao Arquit. Luiz Eduardo Perry, à Sr.^{ta} Tania Regina Moraes e ao Sr. Cláudio Franco de Macedo Filho, que se encarregaram das figuras e fotografias;

ao Dr. Ênio Rogacheski, pela colaboração na revisão do vernáculo;

à Disciplina de Hematologia e ao Departamento de Genética, pela atenção e facilidades proporcionadas à confecção deste trabalho.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| INTRODUÇÃO | 01 |
| OBJETIVO | 09 |
| HEMOGLOBINA FETAL - GENERALIDADES | 11 |
| CASUÍSTICA | 19 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 1. COLHEITA DO MATERIAL | 26 |
| 2. CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL | 26 |
| 3. ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA | 27 |
| 3.1- Instrumental | 27 |
| 3.2- Reativos | 27 |
| 3.3- Corante | 28 |
| 4. PREPARO DO MATERIAL | 28 |
| 4.1- Preparação do hemolisado | 28 |
| 4.2- Preparação do gel de amido | 29 |
| 5. TÉCNICA | 30 |
| 5.1- Determinação qualitativa das hemoglobinas | 30 |
| 6. TRATAMENTO ESTATÍSTICO | 31 |
| RESULTADOS | 38 |
| DISCUSSÃO | 46 |
| CONCLUSÕES | 53 |
| RESUMO | 55 |
| SUMMARY | 58 |
| ANEXO - DADOS ORIGINAIS | 61 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 63 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA | Página |
|---|--------|
| 1. Desenvolvimento das diferentes cadeias de globina das várias hemoglobinas durante os períodos prē e pōs-natais | 08 |
| 2. Distribuição do peso de nascimento e idade gestacional nos quatro grupos de recém-nascidos do sexo masculino. 0 - Recēm-nascidos prē-termo e a termo com peso adequado para a idade gestacional . 0 - Recēm-nascidos prē-termo e a termo com baixo peso para a idade gestacional | 23 |
| 3. Distribuição do peso de nascimento e idade gestacional nos quatro grupos de recém-nascidos do sexo feminino. 0 - Recēm-nascidos prē-termo e a termo com peso adequado para a idade gestacional . 0 - Recēm-nascidos prē-termo e a termo com baixo peso para a idade gestacional | 24 |
| 4. Foto nº 1 - Placa-suporte desmontada. Foto nº 2 - Placa-suporte montada | 35 |

| FIGURA | Página |
|--|--------|
| 5. Placa-suporte com o gel de amido brasileiro comercial | 36 |
| 6. Placa-suporte com o gel de amido brasileiro comercial sobre as cubas de P.V.C. e as pontes de pano "perfex". Embaixo, fonte geradora | 37 |
| 7. Concentração de Hb-F ao nascimento em relação com a idade gestacional, em dias e semanas, dos 75 recém-nascidos estudados. A linha cheia representa a reta de regressão . | 45 |
| 8. Eletroforese em amido brasileiro comercial, mostrando a nítida separação das bandas de vários tipos de hemoglobinas | 52 |

ÍNDICE DE TABELAS

| TABELA | Página |
|--|--------|
| 1. Dados referentes à percentagem de hemoglobina fetal nos quatro grupos estudados. | 42 |
| 2. Distribuição dos dados em função do intervalo de classe considerado, com a respectiva frequência observada (F.O.) e a frequência esperada (F.E.) para posterior cálculo do desvio (d) e conseqüente valor de χ^2 | 43 |
| 3. Análise da variância relativa à percentagem de hemoglobina fetal nas quatro amostras consideradas. | 44 |
| 4. Dados referentes à idade gestacional, considerando o método de Dubowitz, a data da última menstruação e a respectiva concentração de Hb-F no sangue do cordão umbilical dos quatro grupos de recém-nascidos estudados. | 62 |

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A precisa avaliação da idade gestacional é importante, porquanto o prognóstico, a incidência de óbitos, as alterações bioquímicas e mesmo as doenças que incidem no período neonatal são peculiares a cada categoria de recém-nascidos⁽⁷⁰⁾.

A determinação da idade gestacional baseada na história menstrual é a maneira mais precisa, porém alguns fatores como períodos menstruais irregulares, sangramentos no primeiro trimestre e o uso de anticoncepcionais, podem diminuir a sua autenticidade.

Os dados obstétricos determinados pelas mudanças que ocorrem na mãe durante a gestação são inadequados para a avaliação da idade gestacional.

Entre os parâmetros peso, estatura e circunferência craniana do feto, os dois primeiros sofrem influências de várias ocorrências intra-uterinas, principalmente da desnutrição. Assim, o perímetro do crânio do feto parece ser mais sensível na correlação com a idade ges-

tacional⁽⁴⁸⁾, podendo ser determinado "in utero" pelo método do ultra-som.

A determinação da idade gestacional tornou-se mais segura quando passou a ser baseada no próprio recém-nascido. Nos últimos anos surgiram vários métodos de avaliação, utilizando o exame físico do concepto. A avaliação é feita através das características externas do recém-nascido, que estão relacionadas cronologicamente com o seu desenvolvimento^(36,75). É de igual valor a avaliação da maturação neurológica do recém-nascido estabelecida por *Amiel-Tison*⁽⁵⁾, baseada nos estudos feitos em prematuros por um grupo de neurologistas franceses em 1955⁽⁶²⁾. Este método estabelece relação entre o tônus e os reflexos primitivos do recém-nascido e a idade gestacional.

Em 1970, *Dubowitz et alii*⁽³⁵⁾ agruparam dez critérios neurológicos e onze características externas do recém-nascido, em uma tabela, que atualmente é a mais usada na avaliação da idade gestacional.

A avaliação laboratorial, provavelmente, se tornará o meio mais útil na determinação da idade gestacional. As análises citológica, físico-química e bioquímica do líquido amniótico e do sangue do cordão umbilical são utilizadas para tal fim.

Vários constituintes do líquido amniótico modificam-se com a evolução da gestação, entre eles as células e a creatinina. Ficou demonstrado por

DroegemueLLer et alii⁽³⁴⁾ e *Pitkin e Zwirek*⁽⁵⁹⁾ que a concentração da creatinina é a que mais se correlaciona com a idade gestacional, porque a elevação de suas taxas é devida ao aumento da massa muscular e à melhor capacidade de concentração do rim, que ocorrem no final da gestação.

A ontogenia da eritropoese humana é caracterizada por uma série complexa de acontecimentos, durante os quais, o local de produção das células vermelhas varia do saco embrionário para o fígado, para o baço e finalmente para a medula óssea⁽²⁰⁾. Desta maneira, durante a vida intra-uterina, são produzidos no embrião e no feto, quatro principais tipos de hemoglobina - Gower 1, Gower 2, fetal e tipo adulto - e a presença de cada um destes tipos está relacionada às diferentes necessidades de oxigenação nos vários estágios do desenvolvimento⁽²⁶⁾.

A partir do 14º dia, quando as células sanguíneas são formadas no mesênquima do embrião, surgem os tipos primitivos da hemoglobina formados por quatro cadeias de polipeptídeos ϵ_4 (Gower 1), $\alpha_2\epsilon_2$ (Gower 2), que são chamadas embriônicas. Na 6ª semana de gestação, condicionada pela passagem da cadeia epsilon para a cadeia gama, inicia-se a síntese da hemoglobina fetal, $\alpha_2\gamma_2$ ⁽¹³⁾ e na 8ª semana o fígado se torna a principal fonte de eritropoese^(71,72,73), com maior produção de hemoglobina fetal.

Existem muitas divergências^(45,56,76,77) sobre a época do aparecimento da hemoglobina

tipo adulto, $\alpha_2\beta_2$, caracterizada pela presença da cadeia beta, mas *Basch*⁽¹³⁾, fazendo culturas de tecidos hematopoéticos de fetos e com hemoglobinas marcadas, detectou a presença da hemoglobina tipo adulto no fígado de fetos com sete semanas de vida.

A passagem sistemática de um tipo para outro de cadeia de polipeptídeos das diferentes hemoglobinas, ou seja, da epsilon, gama, alfa, beta e delta, é condicionada por genes. No homem existem sete a dez pares de genes estruturais para a hemoglobina: um ou dois pares de alfa, um de beta, um de delta, dois ou quatro de gama e um par simples de genes epsilon e zeta⁽⁶⁹⁾.

Cada estágio do desenvolvimento humano é caracterizado por um tipo particular de hemoglobina, demonstrando que os vários genes são ativos durante intervalos específicos da vida. Os genes da cadeia epsilon são ativos somente durante o estágio embrionário, os da cadeia gama normalmente durante o período fetal e pós-natal precoce e os da cadeia beta no estágio pós-natal, enquanto os da cadeia alfa têm atividade durante todos os períodos.

Esses estágios de desenvolvimento mostram que existe um meio preciso de regulação da síntese das várias cadeias de hemoglobinas. O mecanismo pelo qual se fazem as "mudanças" dos genes estruturais de hemoglobina nos estágios apropriados é desconhecido. Tem-se discutido se a ativação e repressão dos genes no tempo específico é

devida à ação de genes reguladores ou de influências de fatores humorais ou de influências do microambiente nos tecidos hematopoéticos⁽⁶⁹⁾.

Inicialmente, a hemoglobina tipo adulto (Hb-A) é sintetizada em pequena quantidade e existem evidências de que uma mesma célula produz ambas as hemoglobinas, fetal e tipo adulto, nos vários tecidos hematopoéticos, fígado, baço e medula óssea - período mielóide - que tem início no 4º mês de vida intra-uterina⁽⁴⁵⁾.

A eritropoese fetal apresenta respostas diferentes aos estímulos da eritropoetina, de acordo com as determinadas fases de produção das hemoglobinas⁽³⁷⁾, com resposta máxima entre a 6ª e 8ª semanas de gestação (13).

Entre a 8ª e 12ª semanas de gestação os quatro tipos principais de hemoglobinas do período intra-uterino - embriônicas, fetal e tipo adulto - podem ser encontrados no sangue fetal (Fig.1) e a partir da 10ª semana a hemoglobina fetal passa a constituir a maior fração das hemoglobinas, atingindo concentrações de 90 a 95 % por volta da 30ª semana^(44,45). Depois da 34ª semana, a concentração de Hb-F diminui gradativamente, atingindo ao nascimento valores entre 50 e 80%^(12,25,54,79), quando determinada pelo método da desnaturação alcalina de *Singer et alii*⁽⁶⁶⁾.

De acordo com *Brody e Nilsson*

(22), a menor concentração de Hb-F ao nascimento não é devida à diminuição de sua produção e sim à maior produção de Hb-A com correspondente aumento de hemoglobina total corpórea. Entretanto, para *Basch*⁽¹³⁾ existe uma diminuição tanto absoluta, como relativa, da síntese de Hb-F e portanto a substituição deste tipo de hemoglobina pela Hb-A não é um fenômeno "dilucional" causado pela expansão da massa de células vermelhas no rápido crescimento fetal.

Em 1926, pela primeira vez, *Bischoff e Schulte*⁽¹⁸⁾ chamaram a atenção para a importância da hemoglobina fetal do sangue do cordão na avaliação da idade gestacional. Outros autores têm confirmado esta assertiva (2,11,12,19,27,29,32,38,64), alguns têm verificado o seu comportamento nos recém-nascidos com baixo peso para a idade gestacional" dos grupos a termo e pré-termo⁽⁴¹⁾, assim como suas variações em determinadas doenças maternas^(11,23,38) e fetais^(9,42,78,79).

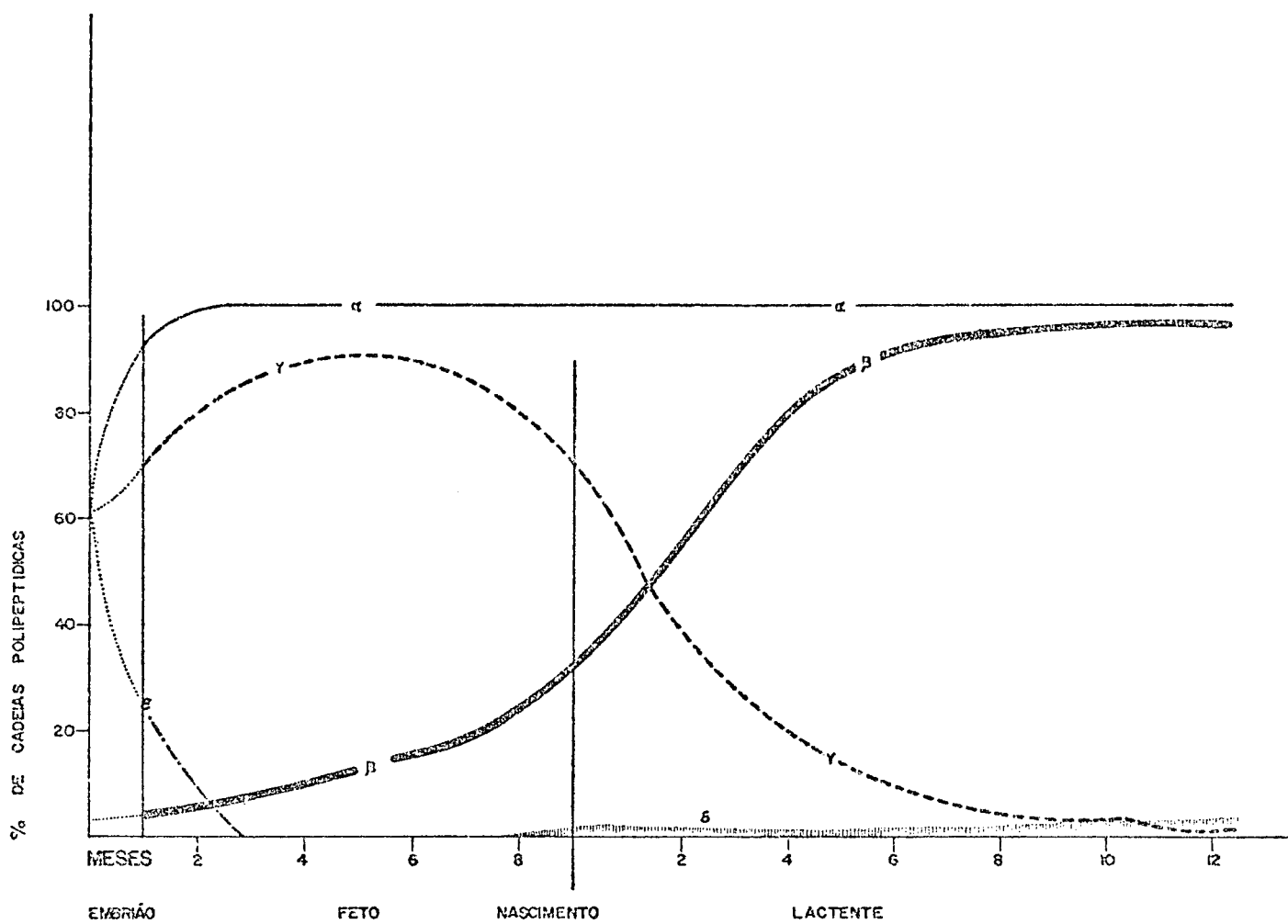


FIGURA 1 . Desenvolvimento das diferentes cadeias de globina das várias hemoglobinas durante os períodos pré e pós-natais. Segundo *Pearson*⁽⁶¹⁾.

OBJETIVO

OBJETIVO

Sabe-se que a presença da HEMOGLOBINA FETAL está relacionada com as necessidades biológicas do feto na vida intra-uterina.

Este trabalho propõe-se a correlacionar a idade gestacional, determinada pela data da última menstruação, com a concentração de hemoglobina fetal, no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo e a termo com peso adequado para a idade gestacional e baixo peso para a idade gestacional.

HEMOGLOBINA FETAL · GENERALIDADES

HEMOGLOBINA FETAL · GENERALIDADES

Foi *von Korber*⁽⁴⁶⁾, há mais de 100 anos, quem detectou uma fração alcali-resistente da hemoglobina no sangue do cordão umbilical e sua importância, desde então, tem sido salientada por bioquímicos, imunologistas, geneticistas, clínicos, pediatras e, entre estes, os neonatologistas.

Mais tarde, em 1887, *Krullger*⁽⁴⁷⁾ confirmou os achados de *von Korber* em sangue de animais e, em 1926, a fração alcali-resistente foi chamada de hemoglobina fetal por *Bischoff e Schulte*⁽¹⁸⁾.

A hemoglobina fetal, $\alpha_2\gamma_2$, é um tetrâmero constituído por quatro cadeias de polipeptídeos, duas cadeias alfa e duas gama, ligadas a quatro grupos heme.

A estrutura, a função da Hb-F, bem como suas características físicas, químicas, eletroforéticas, cromatográficas, imunológicas e genéticas, são determinadas pela porção globina da molécula, uma vez que o heme é idêntico ao dos grupos das demais hemoglobinas.

Após a descoberta da resistência à desnaturação alcalina, inúmeras diferenças foram detectadas entre a Hb-F e a Hb-A, todas devidas a propriedades inerentes à cadeia gama. Entre essas propriedades, destaca-se a composição de aminoácidos das cadeias da globina. A cadeia alfa é idêntica à da Hb-A, em seu número de aminoácidos - 141 - e na sua estrutura, ou seja, posição dos mesmos na cadeia. A cadeia gama, que confere a especificidade química e funcional à Hb-F, é composta por 146 aminoácidos com a isoleucina sendo específica dessa cadeia^(28,54).

Armstrong et alii⁽⁸⁾ consideram a cromatografia um método bastante sensível para a determinação dos componentes da hemoglobina do sangue do cordão (Hb-F, Hb-A e Hb-A₂). A molécula da Hb-F não é homogênea e pela cromatografia é separada em dois componentes: a Hb-F_I caracterizada pela presença da glicina e a Hb-F_{II} pela presença da alanina na posição 136 da cadeia⁽⁴⁾.

A hemoglobina fetal é mais solúvel que a do tipo adulto em solução-tampão fosfato forte e mais facilmente oxidada para meta-hemoglobina^(17,49). Esta última propriedade parece ser função da cadeia gama, uma vez que a Hb de BART - hemoglobina anormal do período neonatal - composta por quatro cadeias gama, apresenta acentuadas taxas de formação de meta-hemoglobina.

O espectro de absorção da Hb-F é caracterizado por apresentar a faixa do triptofano em com-

primento de onda menor que aquele da Hb-A, podendo constituir-se num método físico de determinação da Hb-F⁽¹⁴⁾.

A hemoglobina fetal é resistente à "eluição" ácida e quando amostras de sangue do cordão umbilical são submetidas à ação da solução-tampão citrato-fosfato ácido (pH=3,3 a 3,4) e em seguida coradas com o corante de Wright⁽⁵⁰⁾, os eritrócitos que contêm Hb-F retêm mais corante do que aqueles que apresentam maiores concentrações de Hb-A. Pelas várias intensidades de coloração dos eritrócitos no sangue do cordão umbilical, verifica-se que ambas as hemoglobinas, fetal e tipo adulto, são sintetizadas numa mesma célula⁽⁸⁰⁾, e, portanto, é inconsistente a teoria de que elas são formadas em órgãos diferentes⁽¹³⁾.

Essa propriedade específica da Hb-F não deve ser confundida com a resistência à desnaturação alcalina, que é a dissociação da molécula da globina em unidades de peso molecular menor.

A hemoglobina fetal, como as demais hemoglobinas, apresenta propriedades antigênicas e *Heller et alii*⁽³⁹⁾, fazendo estudos com os componentes isolados da hemoglobina e usando a técnica de imunoeletroforese, verificaram, no hemolisado de sangue de adulto, que os componentes menores - Hb-F e Hb-A₂ - são fortemente antigênicos, mas os componentes maiores - Hb-A, S e C não.

A razão dessa diferença é

desconhecida, mas poderia ser devida ao fato de as cadeias alfa e beta, que constituem a Hb-A, variarem pouco de espécie para espécie, não provocando assim formação de anticorpos⁽²⁸⁾.

Os aminoácidos que caracterizam as cadeias gama e delta da Hb-F e Hb-A₂, respectivamente, são diferentes daqueles da cadeia beta e, provavelmente, alteram alguns grupos antigênicos da molécula determinando diferenças imunológicas específicas entre Hb-F, Hb-A e Hb-A₂.

Schneider e Arat⁽⁶³⁾ em estudos com anti-soros obtidos pela injeção de hemolisados de sangue total de adultos normais e sangue de cordão umbilical em coelhos, mostraram que as hemoglobinas fetal, Hb-A e Hb-A₂ são imunologicamente heterogêneas, todas possuindo grupos antigênicos em comum, mas cada uma com grupos que lhe são próprios.

Os dados por eles obtidos sugerem ainda que os grupos antigênicos em comum estão nas cadeias beta, gama e delta e que são elas os elementos mais antigenicamente reativos da molécula.

A hemoglobina em solução, exposta a um campo elétrico sob condições especiais, é separada em frações de acordo com seus pontos isoelétricos e mobilidade de cada uma. A Hb-F desloca-se para o pólo positivo, mais lentamente que a Hb-A e somente em soluções com elevadas concentrações de Hb-F existe uma perfeita separação entre as bandas das duas hemoglobinas. A eletroforese pode, ainda, detectar ou

tros tipos de hemoglobinas anormais no sangue do cordão umbilical⁽⁶⁷⁾.

Nos últimos anos muitas informações foram acumuladas sobre as alterações da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em diferentes situações e sobre a capacidade da hemácia em regular essas mudanças.

Anselmino e Hoffman⁽⁷⁾ observaram pela primeira vez que o sangue fetal apresentava uma afinidade pelo oxigênio, maior que aquela apresentada pelo sangue materno, evidenciando uma das propriedades fisiológicas mais importantes da hemoglobina fetal. Essa maior afinidade do sangue fetal pelo oxigênio é uma vantagem para o feto durante a vida intra-uterina⁽⁵³⁾, facilitando a captação do oxigênio liberado pelo sangue materno ao nível das vilosidades placentárias⁽⁵⁵⁾.

Allen et alii⁽³⁾ mostraram que, apesar de o eritrócito fetal possuir maior afinidade pelo oxigênio, quando comparado com o do adulto, as soluções dialisadas das hemoglobinas fetal e tipo adulto mostram idênticas afinidades ao oxigênio.

Esse fato demonstra a existência de mais uma substância interferindo na relação hemoglobina-oxigênio e *Benesch e Benesch*⁽¹⁵⁾, em 1967, demonstraram que a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio era diminuída por sua interação com os fosfatos orgânicos, principalmente com o

2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e o adenosino-trifosfato (ATP). Verificaram ainda que essa interação era feita com a forma de desoxi-hemoglobina, em proporção equimolecular, sob condições fisiológicas de pH e osmolaridade.

O 2,3-DPG é um fosfato orgânico resultante da glicólise anaeróbica e cuja principal função parece ser a diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, controlando, assim, a liberação do mesmo para os tecidos em diferentes condições fisiológicas.

A explicação da diferença na interação entre a Hb-F e Hb-A com o 2,3-DPG foi facilitada pelo conhecimento dos possíveis locais de ligação desse fosfato na molécula da hemoglobina.

Benesch et alii⁽¹⁶⁾, testando isoladamente as cadeias da hemoglobina humana tipo adulto, constataram que o 2,3-DPG ligava-se na cadeia beta da desoxi-hemoglobina. *Perutz e Lehmann*⁽⁵⁷⁾ sugeriram que o local mais provável da ligação seria a cavidade central do eixo de simetria da molécula. Sendo o 2,3-DPG, um ânion forte, poderia formar pontes eletrostáticas com os aminoácidos carregados positivamente e situados naquela cavidade. O conhecimento de que a entrada da cavidade central da hemoglobina é maior na forma de desoxi-hemoglobina do que na forma oxi-hemoglobina explica o porquê da diferença entre as duas formas⁽⁵¹⁾.

Para *De Verdier e Garby*⁽³³⁾ a histidina beta-143 é o local mais provável da ligação da hemo

globina com o 2,3-DPG porque está localizada na entrada da cavidade central e, sendo carregada positivamente, poderia ligar-se eletrostaticamente com o ânion 2,3-DPG. Na Hb-F essa posição na cadeia gama é ocupada pela serina, um aminoácido neutro que se liga em menor proporção com os compostos carregados negativamente como o 2,3-DPG.

Outros investigadores (52,58) acham que os aminoácidos citados não são os únicos pontos de ligação com o 2,3-DPG, mas também grupos de amino N-terminais das cadeias gama que estão livres na fração Hb-F_{II}, principal componente da hemoglobina fetal.

O mecanismo pelo qual o 2,3-DPG altera a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio parece ser o seguinte: a molécula de 2,3-DPG, ligando-se à hemoglobina em sua cavidade central, força-a a adotar uma conformação semelhante à desoxi-hemoglobina, expulsando o oxigênio. Por outro lado, a elevação da pO_2 do sangue aumenta a oxigenação da molécula provocando a saída do 2,3-DPG⁽²¹⁾. A oxi-hemoglobina não se liga ao 2,3-DPG em quantidades consideradas fisiológicas, devido à conformação estereoquímica da cavidade central da molécula, que não permite a ligação.

CASUÍSTICA

CASUÍSTICA

A hemoglobina fetal foi determinada em recém-nascidos do Departamento de Pediatria do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná e da Casa de Saúde Paciornik.

A seleção dos casos obedeceu aos seguintes critérios:

A - recém-nascidos a termo e pré-termo

Foram estudados 75 recém-nascidos, 42 a termo, com idade gestacional compreendida entre 38 e 41 semanas e 6 dias e 33 pré-termo, com idade gestacional igual ou menor que 37 semanas e 6 dias, contados a partir do primeiro dia do último período menstrual⁽¹⁾.

A idade gestacional foi ainda determinada pela tabela das características externas e maturidade neurológica dos recém-nascidos⁽³⁵⁾, após 24 horas de vida, para verificar sua correlação com a idade gestacional determinada pela data da última menstruação.

Em relação ao estado nu-

tricional, os recém-nascidos dos grupos a termo e pré-termo foram classificados em: recém-nascidos de peso adequado para a idade gestacional, quando o peso estava entre o 10º e 90º percentil e recém-nascidos de baixo peso para a idade gestacional os de peso abaixo do 10º percentil, de acordo com as curvas de pesos isoladas para o sexo masculino e feminino em relação à idade gestacional, segundo *Davies et alii*⁽³¹⁾ (Fig. 2 e 3), devido à diferença de peso entre os sexos, evidenciada a partir da 33ª semana de gestação^(10,74).

B - foram excluídos os recém nascidos:

1. de mães que receberam anticoncepcionais até 6 meses antes da data da concepção, devido à dificuldade em avaliar a idade gestacional pelo critério da história menstrual⁽⁶⁸⁾;

2. de mães portadoras de "diabetes mellitus", por ter sido constatado que seus recém nascidos pré-termo apresentavam menor concentração de Hb-F, quando comparados com os recém-nascidos pré-termo em geral (38);

3. de mães portadoras de cardiopatias com insuficiência cardíaca, asma brônquica, anemia acentuada e outras doenças que determinam hipóxia intra-uterina crônica, ocasionando maiores concentrações de hemoglobina fetal^(23,71);

4. de parto gemelar, por

que, embora não tenha sido relatada diferença nas concentrações de hemoglobina fetal entre gêmeos mono ou dizigóticos⁽⁶⁾, existe a possibilidade de haver transfusão feto-fetal;

5. com alterações cromossômicas, por ter sido verificado que a concentração de hemoglobina fetal é mais baixa nos recém-nascidos portadores de Síndrome de Down (Trissomia G)⁽⁷⁹⁾ e mais elevadas em recém-nascidos com Trissomia D⁽⁷⁸⁾;

6. com incompatibilidade materno-fetal por Rh, por apresentarem níveis menores de Hb-F^(9,42) devido à regeneração rápida das células sanguíneas, com maior síntese de Hb-A, como resposta à hemólise acentuada no final da gestação⁽⁶⁵⁾;

7. com infecção intra-uterina crônica, pela presença de anemia.

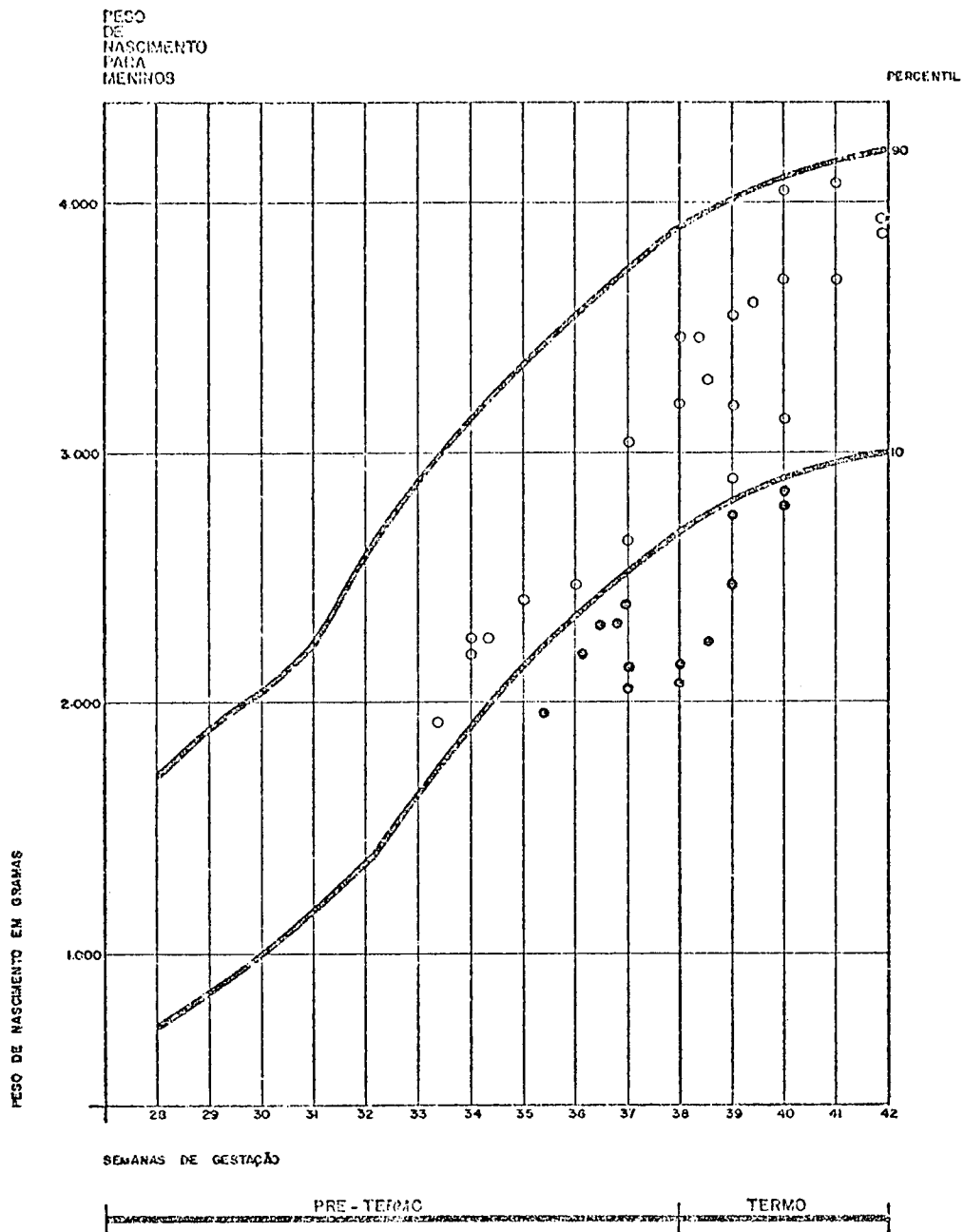


FIGURA 2 . Distribuição do peso de nascimento e idade gestacional nos quatro grupos de recém-nascidos do sexo masculino.

○ - 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*⁽³¹⁾.

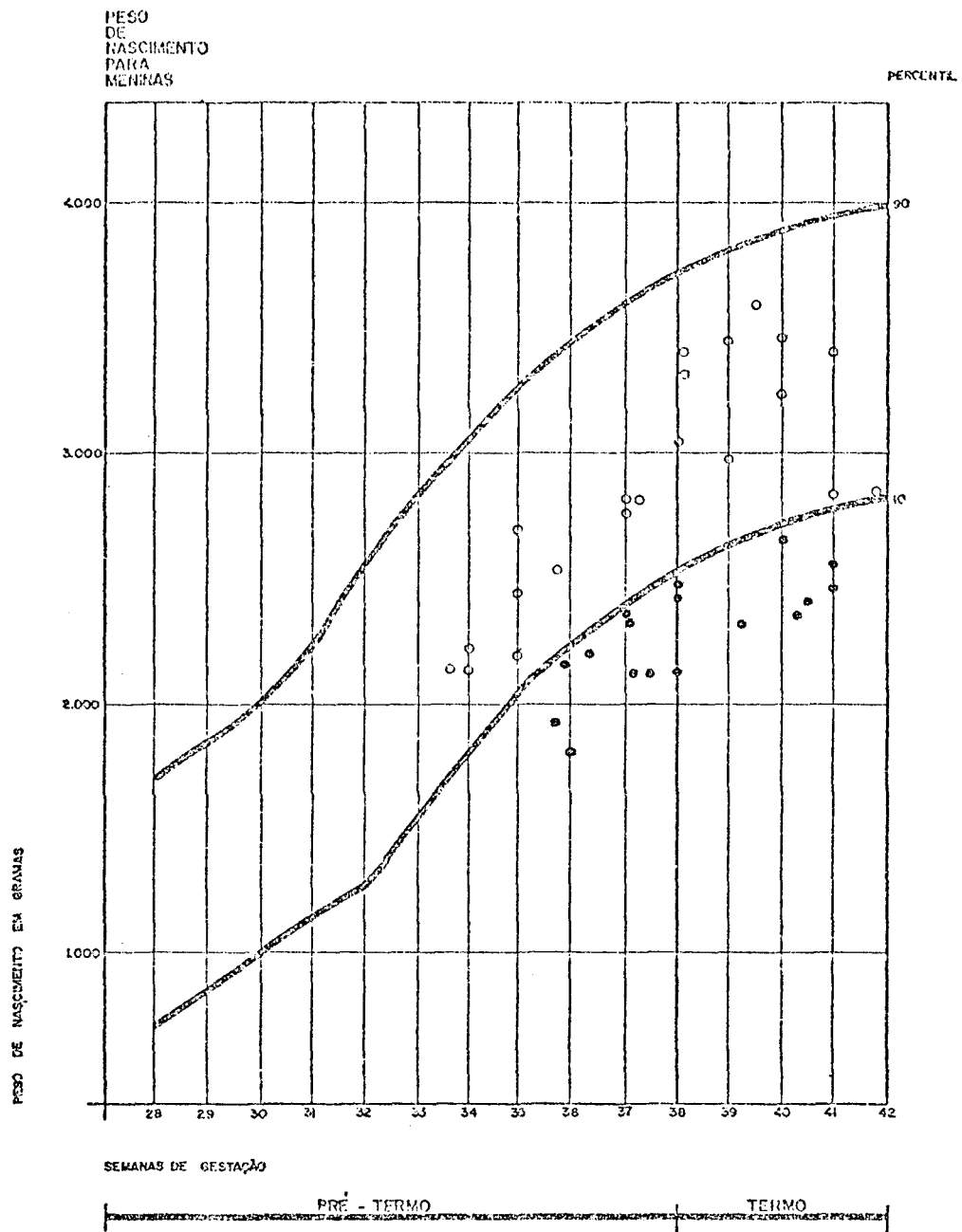


FIGURA 3 . Distribuição do peso de nascimento e idade gestacional nos quatro grupos de recém-nascidos do sexo feminino.

○ - 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*⁽³¹⁾.

MATERIAL E METODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1- COLHEITA DO MATERIAL

O sangue foi colhido diretamente da veia do cordão umbilical, logo após a laqueadura e antes da dequitação, utilizando-se seringa descartável de 10 ml e agulha de 27x8. Em seguida, 3 ml desse sangue foram colocados em frascos de vidro, contendo 0,3 ml de E.D.T.A. dipotássico a 1% como anticoagulante.

Foram feitas determinações quantitativas da hemoglobina fetal e qualitativa das hemoglobinas do sangue do cordão, esta para verificar a presença de hemoglobinas anômalas do período neonatal.

2- CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL

A concentração da hemoglobina fetal foi determinada pelo método da desnaturação alcalina de *Singer et alii*⁽⁶⁶⁾.

3- ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA

3.1- Instrumental

Foram utilizadas duas cubas de P.V.C. rígido com base de 24,5 cm de comprimento por 9,5cm de largura e 7,0 cm de altura; uma placa de vidro de 16x23 cm , duas barras de vidro de 1,5 cm de largura por 23 cm de comprimento e 6 cm de espessura, para a montagem da placa-suporte (Fig.4). Para a montagem da placa-suporte, as barras de vidros eram untadas com vaselina sólida.

3.2- Reativos

Solução-estoque: Tampão tris - E.D.T.A. - boro
to, pH=8,6

| | |
|----------------------------------|---------|
| Tris (Merck) | 109,00g |
| E.D.T.A. dissódico (Reagen)..... | 5,84g |
| Ácido bórico (Reagen) | 30,90g |
| Água destilada q.s.p. | 1.000ml |

O pH da solução foi determinado pelo pH-meter E. 520 (Metrohn Heirison).

A solução-estoque-tampão de tris-E.D.T.A. - borato foi diluída com água destilada na proporção de 1/20 para o preparo do gel e na proporção de 1/7 para ser usada nas cubas.

3.3- Corante

Benzidina (Merck) 0,2g
Nitroprussiato de sódio (Carlo Erba) . 0,2g
Solução aquosa de ácido acético 1% . 100ml

Todos os sais foram pesados na balança analítica (OWA Labor).

4- PREPARO DO MATERIAL

4.1- Preparação do hemolisado

O sangue foi centrifugado em tubos de vidro a 2.510 g durante 5 minutos e em seguida o plasma e a camada de glóbulos brancos foram separados com pipeta Pasteur. As hemácias foram lavadas 3 vezes com solução salina.

A hemólise foi realizada misturando-se igual volume de hemácias e água deionizada e 0,4 do volume total de tolueno num tubo de centrifugação aberto, o qual foi agitado manual e vigorosamente durante 2 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 2.510 g durante 20 minutos, após o que, o tolueno foi removido com pipeta Pasteur. A camada constituída pelo estroma de hemácias foi perfurada com pipeta Pasteur e foi aspirada a solução de hemoglobina.

Esta solução foi filtrada em papel-filtro Whatmann nº 1 e determinada sua concentração através do contador de hemácias (Coulter Electronics Inc. e Hemoglobínometer) com padrão interno.

Posteriormente, a solução de hemoglobina de concentração conhecida foi diluída com água deionizada para ajustar a solução em 10g/dl de hemoglobina.

4.2- Preparação do gel de amido

O gel de amido foi preparado de acordo com a técnica de *Carvalho et alii*⁽²⁴⁾ e modificado por *Petzel e Primo-Parro*⁽⁶⁰⁾, que utilizou somente amido de milho brasileiro industrializado (Maizena - Refinação de Milho Brasil Ltda.).

Esta preparação constou da mistura de 30g de maizena com 300 ml da solução-estoque do tampão tris -E. D.T.A. - borato, diluída a 1/20, num balão de Erlenmeyer de 500 ml. O balão foi colocado diretamente na chama do bico de Bunsen durante 15 minutos, sob agitação manual constante, sem haver preocupação com a formação de bolhas de ar⁽⁶⁰⁾, pois as mesmas desaparecem após resfriamento.

Imediatamente após cozida, a mistura foi colocada na placa-suporte de vidro, enchendo-a e ultrapassando 1 mm de sua altura, perfazendo deste modo uma espessura de 7 mm (Fig.5). Após o esfriamento, o gel foi recoberto por uma folha de plástico e colocado no refrigerador durante 12 a 24 horas.

5- TÉCNICA

5.1- Determinação qualitativa das hemoglobinas por eletroforese horizontal em gel de amido

No gel foi feito, com uma lâmina cortante, plana e de aço inoxidável, um corte de 1 mm de profundidade, paralelo ao seu maior eixo e a 4 cm de um dos seus bordos.

As amostras do hemolisado a 0,5 g/dl foram embebidas por pequenos retângulos de papel-filtro Whatmann nº 3, medindo 7x5 cm e inseridos no gel com o auxílio de uma pinça anatômica e uma pequena placa de alumínio, tomando-se como linha-base o corte feito no gel.

A placa-suporte de vidro com o gel foi colocada sobre as duas cubas de P.V.C. contendo a solução-estoque do tampão tris - E.D.T.A - borato diluída a 1/7. A seguir, com pano "Perfex" (Johnson & Johnson) dobrado em 8, foram feitas pontes entre o líquido de cada uma das cubas e as extremidades do bloco de gel (Fig. 6). O conjunto assim formado foi coberto com folha de plástico e com uma placa de vidro para evitar evaporação.

A corrida das amostras foi feita em refrigerador durante seis horas utilizando-se corrente de 2mA/cm e 300V na fonte geradora (Proteion Mod.300). Após a corrida, a placa-suporte foi desmontada e o bloco foi seccionado no ponto de aplicação das amostras e a 7 cm além deste ponto.

Em seguida colocou-se um papel-filtro sobre o gel e esse foi cortado em duas partes de igual espessura com fio de "nylon" fino no sentido longitudinal e paralelo à superfície.

Com o auxílio do papel-filtro, que foi aderido à superfície do gel, as duas partes foram separadas. A parte superior, com a superfície de corte voltada para cima, foi colocada em uma travessa "Pyrex" juntamente com o corante, acrescentando-se em seguida 3 ml de água oxigenada a 20 V., agitando-se levemente durante 5 a 10 minutos, tempo em que as bandas das hemoglobinas se evidenciavam.

Posteriormente, o gel foi lavado com água de torneira para a retirada do corante e depois fixado com solução aquosa de ácido acético a 7,5% para a leitura através de inspeção.

6- TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A normalidade dos dados referentes às concentrações de Hb-F foi testada pelo teste do χ^2 .

A análise da variância foi feita adotando o delineamento inteiramente casualizado, e foi considerada a presença de quatro tratamentos (grupos) com repetições (casuística) variando de 15 a 26.

O efeito do tratamento foi desdobrado fazendo com que cada causa de variação ficasse apenas com um grau de liberdade, dispensando desta maneira o uso de um teste de média.

Na análise de regressão simples foi utilizada a equação da reta :

" $y = a + bx$ " , considerando a idade gestacional como variável dependente (y) e a concentração da Hb-F como variável independente (x).

As estimativas de \underline{b} e \underline{a} foram obtidas pela fórmula:

$$\underline{b} = \frac{\sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{N}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}}$$

$$\underline{a} = \bar{y} - \underline{b}\bar{x}$$

De posse de tais estimativas e atribuindo diferentes valores a (x), foram calculados os valores correspondentes de (y) e obtida a reta de regressão.

O intervalo de confiança foi determinado pela seguinte fórmula:

$$y = \bar{y} \pm t \sqrt{(C_{11} + C_{22} \bar{x} + 2C_{12} \bar{x}) (Q.M. \text{ resíduo})}$$

onde:

y = limites superiores e inferiores da variável y (idade gestacional) a um determinado nível de probabilidade;

\hat{y} = valor da variável y determinada pela equação da regressão;

t = valor dado pela tabela, de acordo com o nível de probabilidade preestabelecido;

C_{11} = termo da matriz invertida cujo índice, abaixo, indica a linha e coluna, respectivamente;

\bar{x} = média da variante x ;

Q.M. = quadrado médio.

Foi determinado ainda o valor da correlação entre a determinação da idade gestacional pela data da última menstruação e a dosagem das concentrações de Hb-F, utilizando-se a fórmula abaixo:

$$r = \frac{\Sigma xy - \frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{N}}{\sqrt{\left[\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N} \right] \left[\Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{N} \right]}}$$

onde:

r = coeficiente de correlação ;

x = variável (% de hemoglobina);

y = variável (idade gestacional, em dias);

N = número de casos.

O valor da correlação foi testado da seguinte maneira:

$$t = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \cdot \sqrt{N - 2}$$

onde:

r = coeficiente de correlação;

N = número de casos.

O mesmo procedimento foi executado entre a idade gestacional determinada pela data da última menstruação e o método de avaliação de *Dubowitz et alii*⁽³⁵⁾ representado em dias.

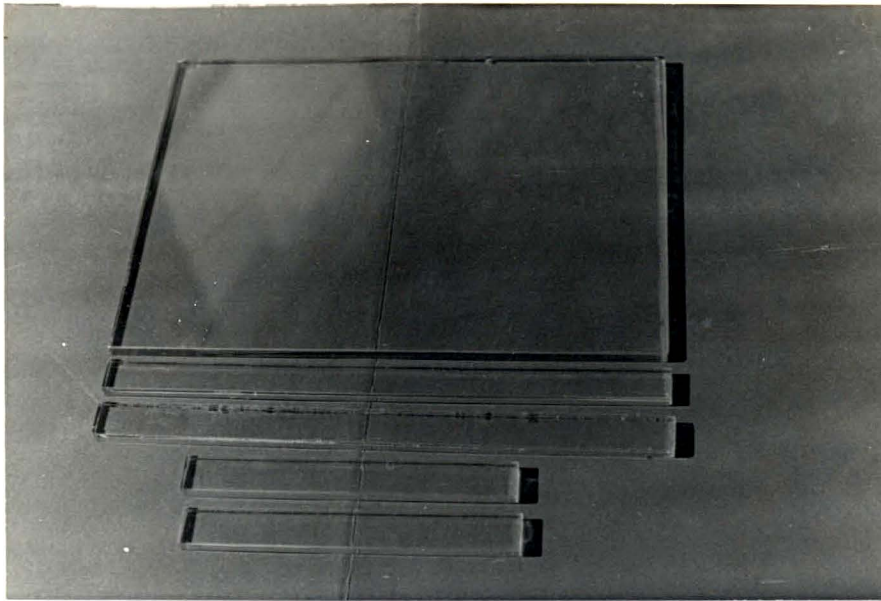


Foto
Nº1

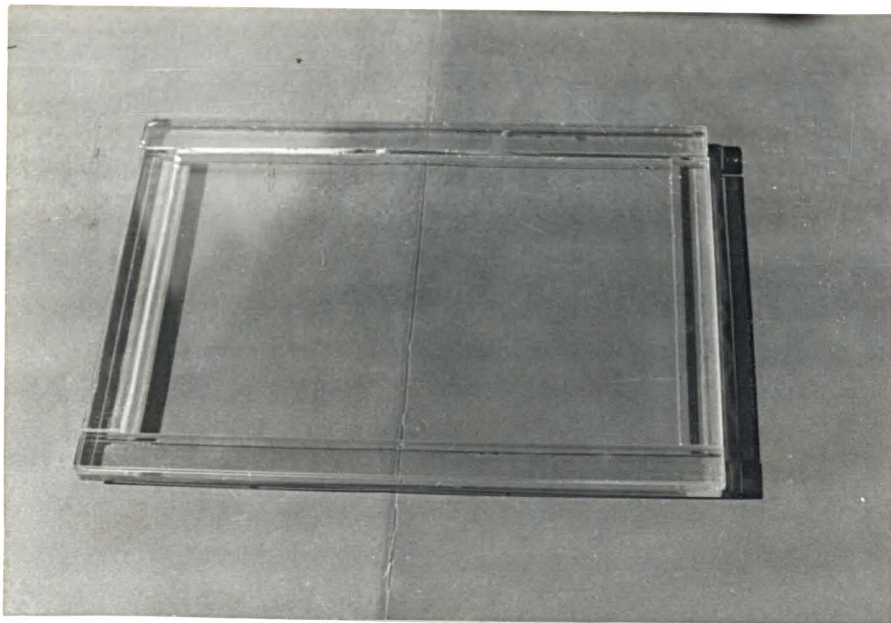


Foto
Nº2

FIGURA 4 . Foto Nº 1 - Placa-suporte desmontada.
Foto Nº 2 - Placa-suporte montada.

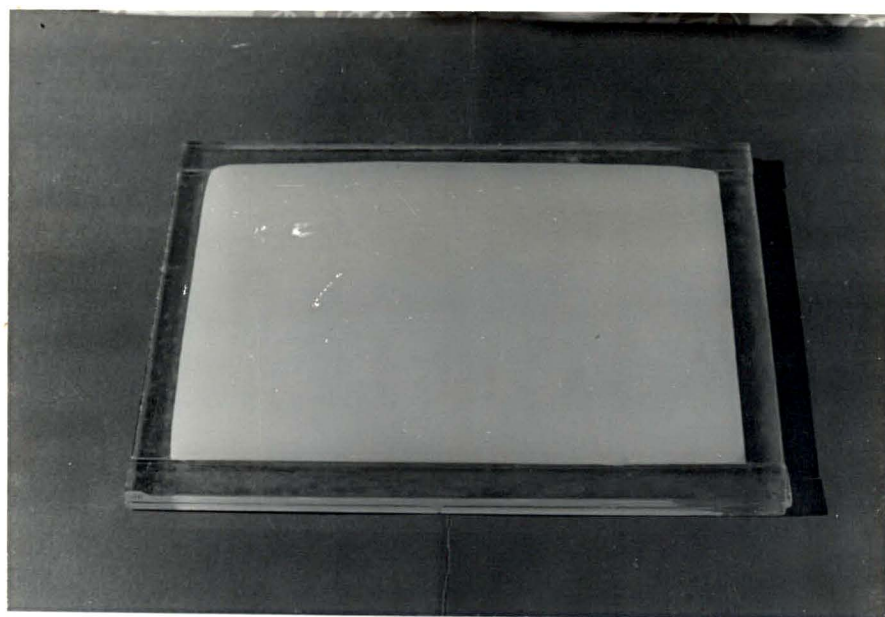


FIGURA 5 . Placa-suporte com o gel de amido brasileiro comercial.

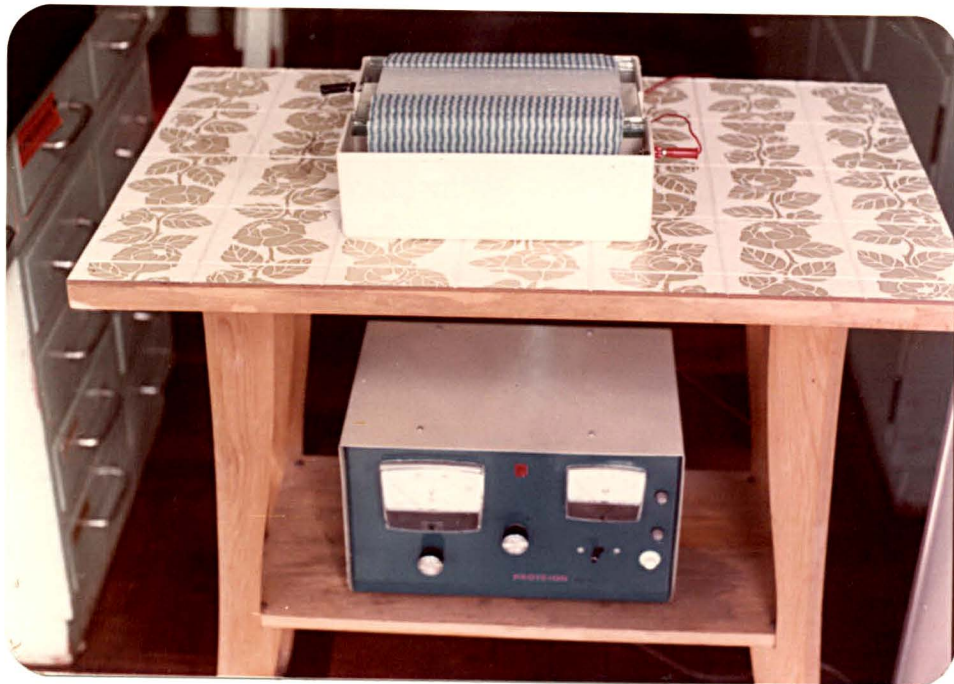


FIGURA 6 . Placa-suporte com o gel de amido brasileiro comercial sobre as cubas de P.V.C. e as pontes de pano "perfex". Embaixo, fonte geradora.

RESULTADOS

RESULTADOS

As concentrações de Hb-F obtidas entre os recém-nascidos dos quatro diferentes grupos, anteriormente classificados, estão expressas na Tab.1.

No grupo de recém-nascidos a termo, vinte e seis eram de peso adequado para a idade gestacional e apresentaram concentração média de Hb-F de $63,77\% \pm 2,67$ e dezesseis eram de baixo peso para a idade gestacional, com média de Hb-F de $65,12\% \pm 3,85$, enquanto que no grupo pré-termo dezoito eram recém-nascidos de peso adequado para a idade gestacional, com média de Hb-F de $74,28\% \pm 5,15$ e quinze eram de baixo peso para a idade gestacional, com média de Hb-F de $73,30\% \pm 4,32$.

Na Tab.2, referente aos dados de concentrações de Hb-F utilizados para testar a normalidade através de χ^2 , foi encontrado o valor de 6,22, estatisticamente não-significativo, dispensando, desta maneira, a correção dos dados.

A análise de variância representada na Tab.3 mostra que existe uma diferença significativa, ao nível de 1%, em relação às concentrações de Hb-F nos quatro grupos considerados. A diferença observada está relacionada à idade gestacional entre recém-nascidos dos grupos a termo e pré-termo, enquanto os recém-nascidos de baixo peso para a idade gestacional e de peso adequado para uma mesma idade gestacional não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Em função do interesse em estimar a idade gestacional através da concentração de Hb-F, foi feita a análise de regressão simples, com a utilização da equação da reta, encontrando-se os seguintes valores:

$$a = 411,69,$$

$$b = -2,13,$$

ficando a equação da reta assim representada:

$$y = 411,69 - 2,13x .$$

Dando valores a (x), é possível, através desta equação, calcular os valores correspondentes de (y) e obter a reta representada na Fig.7.

Utilizando-se a estimativa da variável (\hat{y}) a partir do valor médio da Hb-F, os intervalos de confiança encontrados foram:

ao nível de 1% de probabilidade: $y = 265,81 \pm 18,36$,
ao nível de 5% de probabilidade: $y = 265,81 \pm 13,82$,
demonstrando que a determinação da idade gestacional, através
do uso dessa equação, está sujeita a uma margem de erro de \pm
18 dias, ao nível de 1% de probabilidade e de \pm 13 dias ao ní
vel de 5% de probabilidade.

O valor da correlação entre a
idade gestacional determinada pela data da última menstruação
e as concentrações de Hb-F foi de 0,84 e, quando testado, mos-
trou valor de $t = 13,04$, altamente significativo.

A correlação feita entre a ida
de gestacional, avaliada pela data da última menstruação e pe
lo método de *Dubowitz et alii* mostrou valor de 0,79, que, quando tes
tado de maneira idêntica à anterior, resultou em um valor de
10,88, também altamente significativo.

Na eletroforese de hemoglobina
do sangue do cordão umbilical dos 75 recém-nascidos estudados,
não foi detectada nenhuma hemoglobina anormal do período neo-
natal.

TABELA 1 . Dados referentes à percentagem de hemoglobina fetal nos quatro grupos estudados.

| T.P.A. | T.B.P. | P.T.P.A. | P.T.B.P. |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|
| 67,00 | 65,36 | 70,00 | 68,82 |
| 64,15 | 64,80 | 65,24 | 71,90 |
| 63,00 | 62,30 | 73,08 | 66,99 |
| 62,30 | 72,26 | 82,06 | 70,23 |
| 63,11 | 60,90 | 78,15 | 69,83 |
| 68,13 | 60,90 | 67,29 | 75,11 |
| 63,50 | 65,36 | 75,11 | 83,11 |
| 64,20 | 62,32 | 74,56 | 80,69 |
| 68,60 | 67,75 | 67,00 | 74,70 |
| 63,20 | 61,91 | 71,25 | 73,48 |
| 68,28 | 65,16 | 85,26 | 71,05 |
| 63,80 | 63,94 | 78,00 | 76,53 |
| 61,96 | 67,82 | 78,00 | 73,48 |
| 61,89 | 73,89 | 74,50 | 72,47 |
| 60,30 | 66,17 | 72,06 | 71,05 |
| 66,99 | 61,12 | 74,70 | |
| 60,00 | | 77,14 | |
| 60,90 | | 73,68 | |
| 63,74 | | | |
| 67,82 | | | |
| 63,13 | | | |
| 65,77 | | | |
| 61,00 | | | |
| 61,55 | | | |
| 59,80 | | | |
| 63,94 | | | |
| TOTAIS:1.658,06 | 1.041,96 | 1.337,08 | 1.099,44 |
| \bar{x} : 63,77 ± 2,67 | 65,12 ± 3,85 | 74,28 ± 5,15 | 73,30 ± 4,32 |

\bar{x} Geral = 68,49

Onde: T.P.A. = termo peso adequado;

T.B.P. = termo baixo peso;

P.T.P.A. = pré-termo peso adequado;

P.T.B.P. = pré-termo baixo peso.

TABELA 2. Distribuição dos dados em função do intervalo de classe considerado, com a respectiva frequência observada (F.O.) e a frequência esperada (F.E.) para posterior cálculo do desvio (d) e conseqüente valor de χ^2 .

| INTERVALO DE CLASSE | PONTO MÉDIO | F.O. | F.E. | d | d ² | d ² /F.E. |
|---------------------|-------------|------|-------|-------|----------------|----------------------|
| (59,80-62,35) | 61,08 | 15 | 12,08 | 2,92 | 8,53 | 0,71 |
| (62,35-64,90) | 63,63 | 12 | 8,99 | 3,01 | 9,06 | 1,01 |
| (64,90-67,45) | 66,18 | 11 | 11,36 | -0,36 | 0,13 | 0,01 |
| (67,45-70,00) | 68,73 | 08 | 12,32 | -4,32 | 18,66 | 1,51 |
| (70,00-72,55) | 71,28 | 09 | 11,06 | -2,06 | 4,24 | 0,38 |
| (72,55-75,10) | 73,83 | 09 | 8,51 | 0,49 | 0,24 | 0,03 |
| (75,10-77,65) | 76,38 | 04 | 5,47 | -1,47 | 2,16 | 0,40 |
| (77,65-80,20) | 78,93 | 03 | 3,02 | -0,02 | 0,0004 | 0,000 |
| (80,20-82,75) | 81,64 | 02 | 1,40 | 0,60 | 0,36 | 0,26 |
| (82,75-85,30) | 84,03 | 02 | 0,78 | 1,22 | 1,49 | 1,91 |
| $\chi^2 = 6,22$ | | | | | | (n.s.) |

TABELA 3. Análise da variância relativa à percentagem de hemoglobina fetal nas quatro amostras consideradas.

| CAUSA DA VARIAÇÃO | G.L. | S.Q. | Q.M. | F |
|-----------------------|------|----------|----------|-----------|
| ENTRE GRUPOS | 3 | 1.710,66 | 570,22 | 36,41** |
| TERMO vs. PRÉ-TERMO | 1 | 1.684,63 | 1.684,63 | 107,58** |
| T.P.A. vs. T.B.P. | 1 | 18,08 | 18,08 | 1,15 n.s. |
| P.T.P.A. vs. P.T.B.P. | 1 | 7,95 | 7,95 | 0,51 n.s. |
| DENTRO DE GRUPOS | 71 | 1.111,87 | 15,66 | |
| T O T A L | 74 | 2.822,53 | | |

$$\bar{x} = 68,49$$

$$c.v. = 9,02\%$$

onde: G.L. = graus de liberdade;
S.Q. = soma de quadrados;
Q.M. = quadrado médio;
 \bar{F} = teste de significância;
 \bar{x} = média;
c.v. = coeficiente de variação;
T.P.A. = termo peso adequado;
T.B.P. = termo baixo peso;
P.T.P.A. = pré-termo peso adequado;
P.T.B.P. = pré-termo baixo peso;
** = significativo a 1% de probabilidade;
n.s. = não significativo;
vs. = "versus".

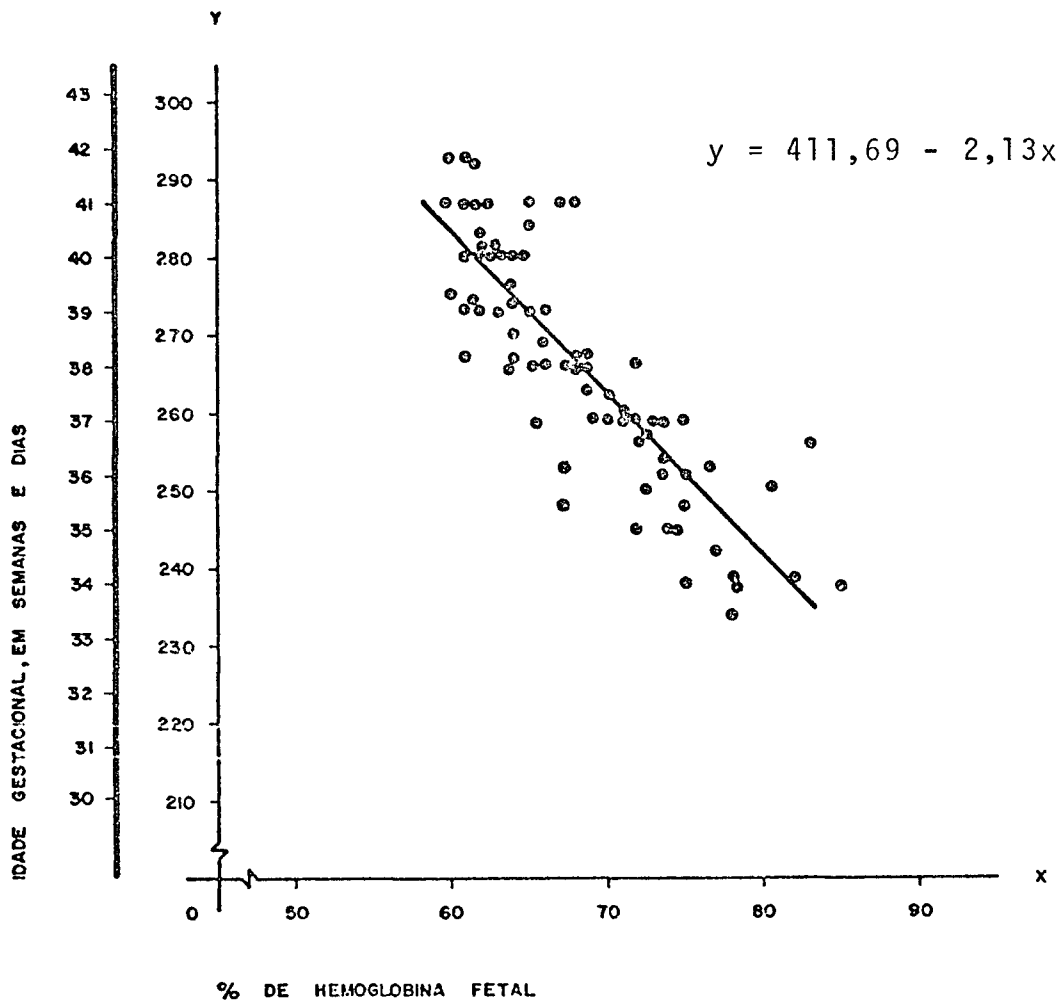


FIGURA 7 . Concentrações de Hb-F ao nascimento em relação com a idade gestacional, em dias e semanas, dos 75 recém-nascidos estudados. A linha cheia representa a reta de regressão.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A concentração da Hb-F no cordão umbilical tem sido determinada por diferentes métodos, utilizando-se as propriedades a ela inerentes.

O uso da espectrofotometria requer grande experiência no seu manejo para a obtenção de resultados precisos, pois, quando as concentrações de Hb-F são muito baixas, os erros são frequentes.

A Hb-F é determinada pelo método da "eluição" ácida, cuja técnica, de grande sensibilidade, é capaz de detectar quantidades mínimas deste tipo de hemoglobina, mas somente é utilizada para evidenciar o número de células sanguíneas fetais que a contém^(6,80).

O uso de radioisótopos, como a incorporação da isoleucina radioativa na cadeia globina, proporciona resultados mais sensíveis para a correlação com a idade gestacional, porém este método não pode ser usado como rotina pela complexidade e alto custo, enquanto o método baseado no comportamento imunológico da hemoglobina fetal é usado apenas

para determinar pequenas quantidades da mesma.

Pela eletroforese é possível obter-se uma nítida separação das faixas da Hb-F e Hb-A bem como dos demais tipos (Fig.8), mostrando que este método é bastante sensível para a determinação qualitativa das hemoglobinas e útil para a exclusão de possíveis hemoglobinas anormais do período neonatal.

O método da desnaturação alcalina foi escolhido pela sua sensibilidade na determinação de altas concentrações de Hb-F, pela facilidade e rapidez da técnica, tornando-o um meio prático para dosagens de rotina.

Conforme já foi relatado neste trabalho, a maior concentração de hemoglobina fetal encontrada no grupo de recém-nascidos pré-termo, em relação àquela do grupo a termo, foi também verificada por *Schulmann et alii*⁽⁶⁴⁾ em 1954 e por *Cottom*⁽³⁰⁾ em 1955.

Os dados verificados por *Della Torre e Meroni*⁽³²⁾, em revisão da literatura feita em 1969 e nos 184 recém-nascidos por eles estudados, e ainda os achados de *Gerbie et alii*⁽³⁸⁾ reforçam os resultados por nós encontrados.

Cook et alii⁽²⁷⁾, em 1959, concluíram que a concentração de Hb-F no recém-nascido normal estava relacionada com a idade gestacional e não era afetada por ocorrências intra-uterinas, entretanto, eles encon-

traram taxas de Hb-F acima de 90% em recém-nascidos com idade gestacional menor que 36 semanas, concentrações estas superiores às encontradas em nossas determinações, provavelmente devido à técnica empregada⁽⁴³⁾.

Cotter e Prystowsky⁽²⁹⁾, por terem verificado amplas variações nas concentrações de Hb-F nos recém-nascidos entre os grupos a termo e pré-termo, concluíram não haver correlação entre hemoglobina fetal e idade gestacional, o mesmo acontecendo nos estudos feitos por *Agliero*⁽²⁾.

Em nossa investigação, os recém-nascidos de baixo peso para a idade gestacional, dos grupos a termo e pré-termo oriundos de gestação sem intercorrências, não apresentaram diferenças nas concentrações de hemoglobina fetal, quando comparados com os de peso adequado para a idade gestacional.

As mesmas conclusões chegaram *Della Torre e Meroni*⁽³²⁾ e *Cook et alii*⁽²⁷⁾ em relação a grupos semelhantes de recém-nascidos; no entanto, *Humbert et alii*⁽⁴¹⁾, em 1969, utilizando o método de incorporação da leucina C₁₄, *Bard*⁽¹¹⁾ em 1970 e *Bard et alii*⁽¹²⁾ em 1974, encontraram concentrações mais elevadas nos recém-nascidos de baixo peso para a idade gestacional no grupo a termo.

Os resultados conflitantes observados na literatura e citados acima podem ser decorrentes das diferentes metodologias aplicadas e da falta de maiores

critérios na seleção dos casos e na definição dos diferentes grupos de recém-nascidos. As divergências verificadas, por exemplo, entre os achados de *Humbert e Bard*, em relação aos demais autores, inclusive o nosso, estão relacionadas à inclusão de recém-nascidos de mães com enfermidades capazes de levar à hipóxia intra-uterina crônica, determinando policitemia e conseqüente aumento das concentrações de Hb-F no concepto.

Nos casos em que a idade gestacional do recém-nascido não puder ser determinada pela história menstrual materna, o método de avaliação de *Dubowitz et alii*⁽³⁵⁾ pode determiná-la com uma margem de erro de aproximadamente 2 semanas.

Com os resultados obtidos neste nosso trabalho, ficou evidenciado que a determinação das concentrações de Hb-F em recém-nascidos permite avaliar a idade gestacional com uma aproximação de 18 dias, para uma probabilidade de 99%, e de 13 dias, para uma probabilidade de 95%, o que torna este método equivalente ao de *Dubowitz*, que apresenta, como já foi visto, uma margem de erro de 14 dias. Isto é reforçado pelo fato de que ambos os métodos, quando relacionados com a idade gestacional determinada pela data da última menstruação, através de correlação citada no capítulo dos Resultados, apresentam valores semelhantes.

Desta maneira, a determinação da concentração da Hb-F no sangue do cordão umbilical para a

avaliação da idade gestacional apresenta eficiência semelhante ao método de *Dubowitz* e, por não estar sujeita às variações inerentes a quem examina os recém-nascidos, bem como às condições do próprio recém-nascido, e pela sensibilidade e fácil execução, é dado complementar importante na determinação da idade gestacional.

Este método adquire maior importância, ainda, por poder ser utilizado mesmo naqueles recém-nascidos que, por determinadas circunstâncias, não podem ser avaliados neurologicamente.

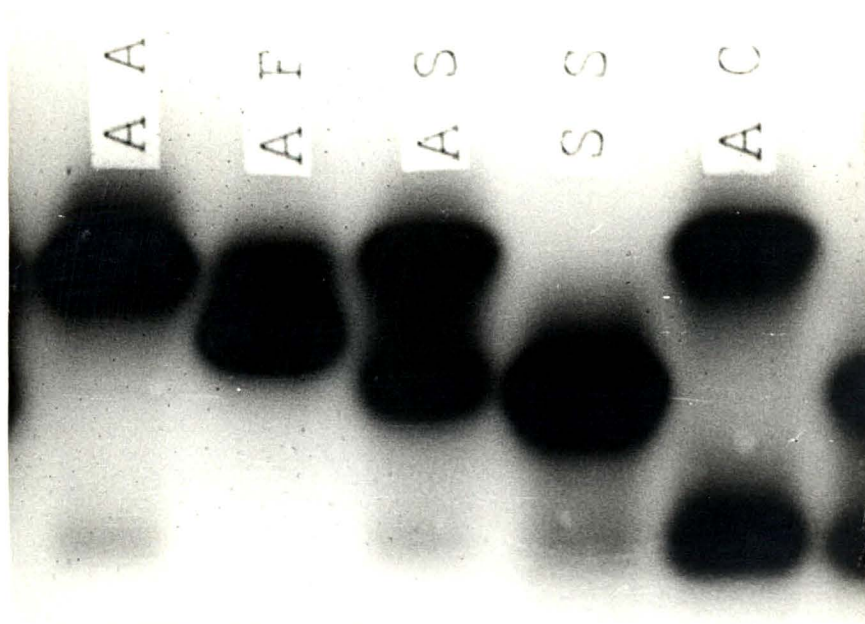


FIGURA 8 . Eletroforese em amido brasileiro comercial, mostrando a nítida separação das bandas de vários tipos de hemoglobinas.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1 - OS RECÊM-NASCIDOS DO GRUPO PRÉ-TERMO POSSUEM MAIORES CONCENTRAÇÕES DE HEMOGLOBINA FETAL QUE OS DO GRUPO A TERMO.

2 - A DESNUTRIÇÃO DO FETO, ORIUNDO DE GESTAÇÃO SEM INTERCORRÊNCIA NÃO ALTERA A CONCENTRAÇÃO DA HEMOGLOBINA FETAL NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL.

3 - A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL NO CORDÃO UMBILICAL É DADO COMPLEMENTAR DE VALOR NA AVALIAÇÃO DA IDADE GESTACIONAL.

4 - AS CONCENTRAÇÕES DE HEMOGLOBINA FETAL PODEM DETERMINAR A IDADE GESTACIONAL EM RECÊM NASCIDOS QUE NÃO TÊM CONDIÇÕES DE SEREM AVALIADOS NEUROLOGICAMENTE E CUJA HISTÓRIA MENSTRUAL MATERNA NÃO É PRECISA.

RESUMO

RESUMO

A importância do conhecimento da idade gestacional do recém-nascido fez com que, na falta de dados precisos de história menstrual materna, surgissem vários métodos para sua avaliação. Dentre estes métodos, a tabela das características externas e avaliação neurológica do recém-nascido tem sido um dos mais utilizados.

As idades gestacionais de setenta e cinco recém-nascidos foram determinadas pela data da última menstruação e a correlação dessas idades gestacionais com aquelas obtidas pelo método de *Dubowitz et alii* foi altamente significativa.

Vários métodos laboratoriais baseados nas alterações do líquido amniótico também têm sido usados na avaliação da idade gestacional.

O desenvolvimento do feto apresenta estágios em que as necessidades de oxigenação são diferentes e, como cada um deles é caracterizado pela presença de um tipo especial de hemoglobina, a determinação da con

centração da hemoglobina fetal tem sido correlacionada com a idade gestacional.

Baseado nos dados obtidos no estudo de setenta e cinco recém-nascidos dos grupos a termo e pré-termo, com peso adequado para a idade gestacional e de baixo peso para a idade gestacional, o autor julga que este método é dado complementar de valor na determinação da idade gestacional.

Com as aproximações de 18 dias para uma probabilidade de 99%, e 13 dias para uma probabilidade de 95%, encontradas na correlação entre a idade gestacional determinada pela data da última menstruação e concentrações de hemoglobina fetal ao nascimento, o autor considera este método de eficiência semelhante ao de *Dubowitz* e ressalta sua importância quando aplicado em recém-nascidos sem condições de serem avaliados neurologicamente.

SUMMARY

SUMMARY

The importance of the knowledge of the gestational age of the newborn infant, in the absence of precise data of the maternal menstrual history, led to various methods for its evaluation. Among these methods, the table of the external characteristics and neurologic evaluation of the neonate has been one of the most widely used.

The gestational ages of seventy five newborn babies were determined by the date of the last menstruation. The correlation of these gestational ages with those obtained by the *Dubowitz et alii* method was highly significant.

Various laboratorial methods based on the amniotic fluid alterations have also been used in the evaluation of the gestational age.

As the oxigen needs of the developing fetus varie according to its particular stages of development and there is a special kind of hemoglobin for each of these stages, the determination of the fetal hemoglobin

concentration has been correlated with the gestational age.

Based on the data obtained in the study of seventy-five newborn babies of the full term and pre-term groups, with adequate weight for the gestational age and small-for-dates, the author considers that this is a valuable complementary method in the determination of the gestational age.

With the approximations of 18 days for a probability of 99%, and 13 days for a probability of 95% found in the correlation between the gestational age determined by the date of the last menstruation and concentrations of fetal hemoglobin on the day of birth, the author considers this method of similar efficiency to the *Dubowitz* table and calls attention to its importance when applied to newborn babies under conditions that do not permit neurological evaluation.

ANEXO DADOS ORIGINAIS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICOS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICOS

- 01- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Fetus and Newborn. Nomenclature for duration of gestation, birth weight and intra-uterine growth. Pediatrics, 39:935-39, 1967.
- 02- AGÜERO, O. Fetal hemoglobin in premature, term, and post mature infants. Obstet. Gynecol., 19:257-60,1962.
- 03- ALLEN, D.W.; WYMAN , Jr.J.; SMITH, C.A. The oxygen equilibrium of fetal and adult human hemoglobin. J. Biol. Chem., 203:81-7,1953.
- 04- ALLER, D.W.; SCHOROEDER, W.A.; BALOG, J. Observations on chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin: a study of the effects of crystallisation and chromatography on heterogeneity and isoleucine content. J. Amer. Chem. Soc., 80:1.628-34, 1958.
- 05- AMIEL-TISON,C. Neurological evaluation of the maturity of newborn infants. Arch. Dis. Child., 43:89-93,1968.

- 06- ANDREWS, B.F. & FALKNER, F. Fetal hemoglobin synthesis in fraternal and identical twins. Biol. Neonat., 12:23-8, 1968.
- 07- ANSELMINNO, K.T. & HOFFMAN, F. Die ursachen des icterus neonatorum. Arch. Gynäk., 143:477-99, 1930.
- 08- ARMSTRONG, D.H.; SCHOROEDER, W.A; FENNINGER, W.D. A comparison of the percentage of fetal hemoglobin in human umbilical cord blood as determined by chromatography and by alkali denaturation. Blood, 22:554-65, 1963.
- 09- BAAR, H.S. Foetal haemoglobin and erythroblastosis. Nature, 162:190-91, 1948.
- 10- BABSON, S.G; BEHRMAN, R.E.; LESSEL, R. Fetal growth. Live-born birth weights for gestational age of white middle class infants. Pediatrics, 45:937-44, 1970.
- 11- BARD, H. The effect of placental insufficiency on fetal and adult hemoglobin synthesis. Amer. J. Obstet. Gynecol., 120:67-72, 1974.
- 12- BARD, H.; MAKOWSKI, E.L.; MESCHIA, G; BATTAGLIA, F.C. The relative rates of synthesis of hemoglobin A and F in immature red cell of newborn infants. Pediatrics, 45:766-72, 1970.
- 13- BASCH, R.S. Hemoglobin synthesis in short-term cultures of human fetal hematopoietic tissues. Blood, 39:530-41, 1972.

- 14- BEAVEN,G.H.; ELLIS,M.G.; WHITE,J.C. Studies on human foetal haemoglobin. I - Detection and estimation. Brit.J.Haematol.,6:1-22,1960.
- 15- BENESCH,R.& BENESCH,R.E. The effect of organic phosphate from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. Biochem.Biophys. Res. Commun., 26:162-67,1967.
- 16- BENESCH,R.; BENESCH,R.E.; YU,C.I. Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin.Proc. Nat. Acad. Sci.,59:526-32,1968.
- 17- BETKE,K. Vergleichende untersuchung der oxydation von fetalen und erwachsenen-oxyhämoglobin durch natriumnitrit. Naturwissenschaften.,40:60-65,1953.
- 18- BISCHOFF,H. & SCHULTE,H. Weiter studien zur hämoglobin resistenz im sauglingsalter. Jahrb. Kinderheilk.,112: 56-60,1926.
- 19- BOIANOWSKY,D.L.;VEIGA NETO,A.J.;LIEMERT,C.H.U. Relação entre hemoglobina fetal e idade gestacional. J.Pediatr., Rio de Janeiro,36:162-65,1971.
- 20- BRATTEBY,L.E. & GARBY,L. Development of erythropoiesis: Infant erythrokinetics. In: NATHAN,D.G. & OSKI, F.A. Hematology of infancy and childhood. Philadelphia, Saunders, 1974 Cap. p. 56-74.

- 21- BREWER,G.J. 2,3-DPG and erythrocyte oxygen affinity. Ann. Rev. Med.,25:29-38,1974.
- 22- BRODY,S. & NILSSON,B. Foetal and adult haemoglobin mass in relation of foetal development. J.Obstet.Gynaecol. Brit. Commonw., 67:827-31,1960.
- 23- BROMBERG,Y.M.; ABRAHAMOV,A.;SALZBERGER,M. The effect of maternal anoxemia on the foetal haemoglobin of the newborn. J. Obstet. Gynaecol. Brit. Emp., 63:875-77, 1956.
- 24- CARVALHO,R.E.S.; BYRNE,M.C.G.; AZEVEDO,E.S. Melhoria na separação eletroforética das hemoglobinas humanas com utilização de amido brasileiro comercial em mistura com amido da Sigma, E.U.A..In: SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA. REUNIÃO ANUAL, 28ª Brasília,1976. Resumos. p. 271,84-4-1.1/Suplemento de Ci. e Cult., 28(7) jul. 1976.
- 25- CHERNOFF,A.I. & SINGER,K. Studies on abnormal hemoglobin. IV - Persistence of fetal hemoglobin in the erythrocytes of normal children. Pediatrics,9:469-74,1952.
- 26- COLOMBO,B.;KIM,B.; PEREZ ATENCIO,R.; MOLINA,C.; TERRENATO,L. The pattern of fetal hemoglobin disappearance after birth. Brit. J. Haematol.,32:79-87,1976.

- 27- COOK,C.D.; BRODIE,H.R.; ALLEN,D.W. Measurement of fetal hemoglobin in newborn infants. Correlation with gestational age and intrauterine in hypoxia. Pediatrics, 20:272-78,1959.
- 28- COOPER,H.A. & HOAGLAND,H.C. Fetal hemoglobin. Mayo Clin. Proc.,47:402-14,1972.
- 29- COTTER,J. & PRYSTOWSKY,H. Adult and fetal hemoglobin levels of human fetal blood in term pregnancy and in prolonged pregnancy. Obstet. Gynecol.,22:745-50,1963.
- 30- COTTOM,D.G. Foetal hemoglobin and postmaturity.J.Obstet. Gynaecol. Brit. Emp.,62:945-48,1955.
- 31- 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).
- 32- DELLA TORRE,G.M. & MERONI,P. Studi sul sangue fetale nota. I - Livelli di emoglobina fetale e adulta nella gravidanza fisiologica: relazione con la maturita fetale. Ann. Obstet. Gynecol.,91:148-57,1969.
- 33- DE VERDIER,C.H. & GARBY,L. Low binding of 2,3-diphosphoglycerate to haemoglobin F : A contribution to the knowledge of the binding site and an explanation for the high oxygen affinity of foetal blood. Scand. J. Invest.,23:149-51,1969.

- 34- DROEGEMUELLER,W.;JACKSON,C.; MAKOWSKI,E.L.; BATTAGLIA,F.
C. Amniotic fluid examination as an aid in the
assessment of gestational age. Amer. J. Obstet. Gynecol.,104:424-28,1969.
- 35- DUBOWITZ,L.M.S.; DUBOWITZ,V.; GOLDBERG,C. Clinical assess-
ment of gestational age in the newborn infants. J. Pe-
diatr.,77:1-10,1970.
- 36- FARR,V.; MITCHELL,R.G.; NELIGAN,G.A.; PARKIN,J.M. The de-
finition of some external characteristics used in the
assessment of gestational age in the newborn infant.
Develop. Med. Child. Neurol.,8:507-11,1966.
- 37- FINNE,H.P. & HALVORSEN,S. Regulation of erythropoiesis
in the fetus and newborn. Arch. Dis. Child., 47:683-
87,1972.
- 38- GERBIE,A.B.; DECOSTA,E.J.; REIS,R.A. Fetal hemoglobin as
an index of maturity. Amer. J. Obstet. Gynecol., 78:
57-63,1959.
- 39- HELLER,P.; YAKULIS,V.J.; JOSEPHSON,A.M. Immunologic stu-
dies of human hemoglobins. J. Lab. Clin. Med. , 59:
401-11,1962.
- 40- HUENHNS,E.R. Haemoglobins.In: SMITH,I. Chromatografic and
electroforetic techniques. 2.ed. London,W. Heinemann,
1968. v.2 cap. 8 pt.4 p.291-324.

- 41- HUMBERT, J.R.; ABELSON, H.; HATHAWY, W.Z.; BATTAGLIA, F.C. Polycythemia in small for gestational age infants. J. Pediatr., 75:812-19, 1969.
- 42- JONXIS, J.H.P. Foetal haemoglobin and erythroblastosis. Nature, 161:850, 1948.
- 43- JONXIS, J.H.P. & HUISMAN, T.H.J. The detection and estimation of fetal hemoglobin by means of the alkali denaturation test. Blood, 11:1.009-18, 1956.
- 44- KAZAZIAN, Jr., H.H. Regulation of fetal hemoglobin production, Semin. Hematol., 11:525-48, 1974.
- 45- KAZAZIAN, Jr., H.H. & WOODHREA, A.P. Hemoglobin A synthesis in the developing fetus. N. Engl. J. Med., 289:58-62, 1973.
- 46- KORBER, E. Diss. Dorpat, 1866; Zentralbl. Med. Wiss., 5:117-20, 1867.
- 47- KRÜGER, F. Veber die tengleiche resistenz des blutfarbstoffs verschiedener thiere gegen zersetzende agentien. Z. Biol., 24:318-35, 1888.
- 48- LUBCHENCO, L.O.; HANSMAN, C.; BOYD, E. Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational age from 26 to 42 weeks. Pediatrics, 37:403-8, 1966.

- 49- MARTIN, H. & HUISMAN, T.H.J. Formation of ferrihaemoglobin of isolated human haemoglobin types by sodium nitrite. Nature, 200:898-99, 1963.
- 50- MIALE, J.B. Laboratory Medicine Hematology. 3.ed. St. Louis, C.V. Mosby, 1967 p.1.128.
51. MUIRHEAD, H. & PERUTZ, M.F. Structure of haemoglobin. Nature, 199:633-8, 1963.
- 52- MUIRHEAD, H.; COX, J.M.; MAZZARELLA, L.I.; PERUTZ, M.F. Structure and function of haemoglobin. III - A three-dimensional fourier synthesis of human deoxyhaemoglobin at 5,5 Å resolution. J. Molec. Biol., 28:117-56, 1967.
- 53- OSKI, F.A. Fetal hemoglobin, the neonatal red cell, and 2,3-diphosphoglycerate. Pediatr. Clin. N. Amer., 19:907-17, 1972.
- 54- OSKI, F.A. & NAIMAN, J.L. Disorders of hemoglobin synthesis and metabolism. In: _____. Hematologic Problems in the Newborn. 2.ed. Philadelphia, Saunders, 1972. Cap. 6, p.133-75.
- 55- OSKI, F. A. & PAPADOPOULOS, M.D. The red cell, 2,3-diphosphoglycerate, and tissue oxygen release. J. Pediatr., 77:941-56, 1970.

- 56- PATARYAS, H.A. & STAMATOYANNOPOULOS, G. Hemoglobins in human fetuses: Evidence for adult hemoglobin production after the 11th gestational week. Blood, 39:688-96, 1972.
- 57- PERUTZ, M.F. & LEHMANN, H. Molecular pathology of human haemoglobin. Nature, 219:902-9, 1968.
- 58- PERUTZ, M.F. Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. Nature, 228:726-39, 1970.
- 59- PITKIN, R.M. & ZWIREX, S.J. Amniotic fluid creatine. Amer. J. Obstet. Gynecol., 98:1.135-9, 1967.
- 60- PETZEL, L. & PRIMO-PARMO, S. Eletroforese em amido de milho brasileiro industrializado. /Comunicação pessoal/.
- 61- PEARSON, H.A. Recent Advances in hematology. J. Pediatr., 69:466-479, 1966.
- 62- SAINT-ANNE DARGASSIES, S. La maturation neurologique du prématuré. Rev. Neurol. 93:331-40, 1955.
- 63- SCHENEIDER, R.G. & ARAT, F. Immunological relationships of various types of haemoglobin. I.-Reactions of antisera A, F and Bart's to haemoglobin with various polypeptide chains. Brit. J. Haematol., 10:15-22, 1964.
- 64- SCHULMAN, I.; SMITH, C.H.; STERN, G.S. Studies on the anemia of prematurity. I. -Fetal and adult hemoglobin in premature infants. Amer. J. Dis. Child., 88:568-75, 1954.

- 65- SCHULMAN,I. & SMITH,C.H. Fetal and adult hemoglobin in hemolytic disease of the newborn. Amer. J. Dis. Child., 87:167-78,1954.
- 66- SINGER,K.; CHERNOFF,A.I.; SINGER,L. Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in Sickle-cell anemia and other hematologic disorder by means of alkali denaturation. Blood,6:413-28,1951.
- 67- SMITH,C.H. Origen y desarrollo de las celulas hematicas. In: . Hematologia Pediatrica. 2. ed. Barcelona, Salvat, 1969. p. 1-10.
- 68- SPEROFF,L.; GLASS,R.H.; KASE,N.G. Steroid contraception. In: . Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Baltimore, Willians & Wilkins Company,1975. cap.11 p. 166.
- 69- STAMATOYANNOPOULOS,G. & NUTE,P.E. Genetic control of haemoglobins. Clin. Haematol.,3:251-87,1974.
- 70- SWEET,A.Y. Classification of the low-birth-weight infant. In: KLAUS,M.A. & FANAROFF,A.A. Care of the high-risk neonate. Philadelphia, Saunders, 1973 cap. 3 p. 36-57.
- 71- THOMAS,E.D.; LOCHTE,Jr.H.L.; GREENOUGH,W.B.; WALES,M. In vitro synthesis of foetal and adult haemoglobin by foetal haematopoietic tissues. Nature,185:369-97,1960.

- 72- THOMAS, D.B. & YOFFEY, J.M. Human foetal haematopoiesis. I. The cellular composition of foetal blood. Brit. J. Haematol., 8:290-95, 1962.
- 73- _____. II - Hepatic haematopoiesis in the human foetus. Brit. J. Haematol., 10:193-97, 1964.
- 74- THOMSON, A.M.; BILLEWICKS, W.Z.; HYTTEN, F.E. The assessment of fetal growth. J. Obstet. Gynaecol. Brit. Cwlth., 75:903-16, 1968.
- 75- USHER, R.; MCLEAN, F.; SCOTT, K.E. Judgment of fetal age. II - Clinical significance of gestational age and an objective method its assessment. Pediatr. Clin. N.Amer., 13:835-48, 1966.
- 76- WEATHERAL, D.J.; PEMBREY, M.E.; PRITCHARD, J. Fetal hemoglobin. Clin. Haematol., 3:467-508, 1974.
- 77- WHITW, J.C. & BEAVEN, G.H. Foetal haemoglobin. Brit. Med. Bull., 15:33-39, 1959.
- 78- WILSON, M.G.; SCHOROEDER, W.A.; GRAVES, D.A.; KACH, V.D. Hemoglobin variations in D-trisomy syndrome. N. Engl. J. Med., 277:953-59, 1967.
- 79- _____. Postnatal change of hemoglobins F and A₂ in infants with Down's syndrome (G-trisomy). Pediatrics, 42:349-53, 1968.

80- ZIPURSKY,A.; NEELANDS,P.J.; POLLOK,J.; CHOWN,B.; ISRAELS,
L.G. The distribution of fetal hemoglobin in the blood
of normal children and adults. Pediatrics, 30:262-68,
1952.