

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PEDIATRIA

**COLESTASE CRÔNICA EM CRIANÇAS E EM
ADOLESCENTES: AVALIAÇÃO NUTRICIONAL,
NEUROLÓGICA E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE
VITAMINAS D E E**

Marília Dornelles Bastos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil

2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PEDIATRIA

**COLESTASE CRÔNICA EM CRIANÇAS E EM
ADOLESCENTES: AVALIAÇÃO NUTRICIONAL,
NEUROLÓGICA E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE
VITAMINAS D E E**

Marília Dornelles Bastos

Orientadora: Themis Reverbel da Silveira

*A apresentação desta dissertação é exigência do
Programa de Pós Graduação em Ciências Médi-
cas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.*

Porto Alegre, Brasil

2002

CIP - Catalogação na Publicação

B327c Bastos, Marília Dornelles
Colestase crônica em crianças e em adolescentes : avaliação
nutricional, neurológica e níveis plasmáticos de vitaminas D e E
/ Marília Dornelles Bastos; orientação de Themis Reverbel da
Silveira - Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Medicina, 2002.

159 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Gran-
de do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação
em Ciências Médicas: Pediatria. Porto Alegre, RS, 2002

CDU: 616.36-008.5-053.2/.8
613.22:616-008.841.5:577.161.2/.3

DESCRITORES

Colestase crônica : Crianças e adolescentes
616.36-008.5-053.2/.8
Avaliação nutricional : Plasma sanguíneo : Vitaminas D e E
613.22:616-008.841.5:577.161.2/.3

Bibliotecária responsável:

Iara Ferreira de Macedo, CRB- 10/ 430

Ao **Silvio**, meu marido.

Aos nossos filhos, **Beatriz e Daniel**.

Aos meus pais **Carlos e Anna**.

Agradecimento Especial

À Professora e Doutora **Themis Reverbel da Silveira** que sempre me acolheu com carinho e sabedoria, tornando este aprendizado uma experiência fascinante.

Agradecimentos

- À minha secretária, **Isabel Cristina W. da Silva** que, além de digitar grande parte desta dissertação, compartilhou as angústias vividas durante este período.
- Às colegas, **Dras. Sandra Maria Gonçalves Vieira, Cristina Helena Targa Ferreira e Helena Goldani** que foram decisivas para minha formação em Gastroenterologia Pediátrica com seus ensinamentos e grande amizade.
- À nutricionista, **Carla Rosane Silveira**, pela realização da avaliação nutricional e a análise do inquérito alimentar.
- Às Dras. **Newra Telechea Rotta e Josiane Ranzan** que proporcionaram uma avaliação neurológica adequada aos pacientes do estudo.
- Ao **Laboratório Weinmann**, na pessoa do **Dr. Olivir Schenkel** que, gentilmente, realizou os exames de lipídios totais, colesterol e triglicérides, sem ônus para a pesquisa.
- Ao chefe do laboratório de Radioimunoensaio do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, **Dr. José Romildo de Jesus**, e à Bioquímica do mesmo laboratório, **Dra. Lígia Crossetti**, pelo apoio técnico na realização das dosagens plasmáticas de vitamina D.
- Ao **Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira**, pelas orientações e o apoio durante a realização e a interpretação das dosagens plasmáticas de vitamina E.
- Ao Bioquímico, **Nélson Silva**, pelos ensinamentos da técnica de HPLC e das etapas de validação de um exame laboratorial.

- Ao **Laboratório de Pesquisa do HCPA**, nas pessoas do **Dr. Afonso Barth** e secretária **Jaqueline Silveira Nilton**, que disponibilizaram o espaço físico, os materiais e o suporte técnico para o armazenamento dos plasmas e a realização das dosagens por HPLC.
- À **equipe do grupo de Pesquisa e de Pós-Graduação**, que foi muito prestativa, colaborando na elaboração dos projetos de pesquisa e orientando na solicitação dos materiais necessários, em especial à secretária **Marta Dotto**.
- À **Dra. Carmem Regla Vargas** do Departamento de Genética do HCPA, que colaborou na realização de umas das etapas da dosagem de vitamina E.
- À coletadora **Eloisa Elena Oliveira da Rosa**, que realizou as coletas de sangue dos pacientes e dos controles.
- À **equipe de Cirurgia Pediátrica do HCPA** que permitiu que durante as consultas realizássemos o contato com os pais das crianças e adolescentes que foram os controles da pesquisa.
- A **todas as crianças** e os **adolescentes** que participaram do estudo.
- Ao **Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA** que financiou os materiais utilizados na pesquisa.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 - INTRODUÇÃO	2
1.1 - Colestase: Conceito e Aspectos Fisiopatológicos	2
1.2 - Avaliação Nutricional da Criança e do Adolescente e suas Peculiaridades na Colestase Crônica	5
<i>1.2.1 - Técnicas mais Utilizadas na Prática Clínica</i>	5
<i>1.2.2 - Avaliação Nutricional na Colestase Crônica</i>	7
1.3 - Vitaminas na Colestase	10
<i>1.3.1 - Vitamina E</i>	13
1.3.1.1- Considerações Gerais	13
1.3.1.2 - Diagnóstico de Deficiência de Vitamina E	17
1.3.1.3 - Alterações Neurológicas e Hipovitaminose E	21
<i>1.3.2 - Vitamina D</i>	24
1.3.2.1 - Considerações Gerais	24
1.3.2.2 - Diagnóstico da Hipovitaminose D	27
1.3.2.3 - Alterações Ósseas e Hipovitaminose D	28
2 - JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	32
3 - OBJETIVOS	34
3.1 - Objetivo Principal	34
3.2 - Objetivos Secundários	34

4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS	36
4.1 - Considerações Iniciais e Delineamento	36
4.2 - Amostra Estudada	38
4.2.1 - <i>Critérios de Inclusão</i>	38
4.2.1.1 – Pacientes.....	38
4.2.1.2 – Controles.....	38
4.2.2 - <i>Critérios de Exclusão</i>	39
4.2.2.1 – Pacientes.....	39
4.2.2.2 – Controles.....	39
4.2.3 - <i>Cálculo do Tamanho da Amostra</i>	39
4.3 - Variáveis em Estudo	40
4.3.1 - <i>Avaliação Nutricional</i>	40
4.3.2 - <i>Avaliação Neurológica</i>	41
4.3.3 - <i>Tempo de Colestase</i>	41
4.3.4 - <i>Suplementação Oral de Vitaminas Lipossolúveis</i>	41
4.3.5 - <i>Exames Laboratoriais</i>	42
4.4 - Estudo 1 – Dosagem de Vitamina E	44
4.4.1 - <i>Primeira Fase da Dosagem de Vitamina E</i>	44
4.4.1.1 - Método.....	44
4.4.1.2 - Preparação do Padrão e Extração do Plasma.....	45
4.4.1.3 - Validação do Método.....	45
4.4.2 - <i>Segunda Fase da Dosagem de Vitamina E</i>	46
4.4.2.1 - Método.....	47
4.4.2.2 - Preparação do Padrão e Extração do Plasma.....	47
4.4.2.3 - Validação do Método.....	48
4.4.3 - <i>Terceira Fase da Dosagem de Vitamina E</i>	49
4.4.3.1 - Método.....	49
4.4.3.2 - Preparação do Padrão e Extração das Amostras.....	50
4.4.3.3 - Validação do Método.....	51
4.4.3.4 - Dosagens das Amostras.....	52
4.5 - Estudo 2 – Dosagem da Vitamina D	52
4.5.1 - <i>Método</i>	53
4.5.2 - <i>Validação do Método</i>	53

5 - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	56
6 - CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	58
7 - RESULTADOS	60
7.1 - Características dos Pacientes Estudados	60
7.2 - Dosagem de Vitamina E – 1ª Fase	72
7.2.1 - <i>Validação do Método</i>	72
7.3 - Dosagem de Vitamina E – 2ª Fase	74
7.3.1 - <i>Validação do Método</i>	75
7.4 – Dosagem de Vitamina E – 3ª Fase	76
7.4.1 - <i>Validação do Método</i>	77
7.4.2 – <i>Dosagens das Amostras</i>	79
7.5 – Dosagem de Vitamina D	81
7.5.1 - <i>Validação do Método</i>	81
7.5.2 - <i>Valores Obtidos</i>	82
8 - DISCUSSÃO	86
8.1 - Características da Amostra com Relação às Variáveis Estudadas	86
8.1.1 - <i>Características Demográficas e Delineamento</i>	86
8.1.2 - <i>Diagnósticos Prevalentes</i>	90
8.1.3 - <i>Estado Nutricional</i>	93
8.1.4 - <i>Exame Neurológico</i>	97
8.1.5 - <i>Avaliação Laboratorial</i>	98
8.2 - Dosagem de Vitamina E – Considerações Metodológicas	101
8.3 - Valores de Vitamina D e suas Relações com as Variáveis Estudadas	106
9 - CONCLUSÕES	112
10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
ANEXOS	

Lista de Abreviaturas

γGT	Gama glutamiltransferase
1,25(OH)2D3	1,25-dihidroxivitamina D3
25OHD3	25-hidroxivitamina D3
ACT	Acetonitrila
ALB	Albumina
ALT	Alaninoaminotransferase
AMB	Área muscular do braço
AST	Aspartatoaminotransferase
AT	Antitripsina
AUFS	<i>Absorbance units of full scale</i>
AVBEH	Atresia de vias biliares extra hepática
BD	Bilirrubina direta
BT	Bilirrubina total
Ca	Cálcio
CA	Concentração da amostra
CB	Circunferência braquial
CF	Concentração da substância de referencia + amostra
CIF	Colestase intra-hepática familiar
CIS – EPM	Centro de Informática em Saúde – Escola Paulista de Medicina
CMB	Circunferência muscular do braço
CMV	Citomegalovírus
COL	Colesterol
CP	Concentração da substância adicional
CPBA	<i>Competitive Protein Binding Assay</i>
CV	Coefficiente de variação
Def. α1^A	Deficiência de α 1 antitripsina
EDTA	Sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético
FA	Fosfatase alcalina

Fe	Ferro
FHC	Fibrose hepática congênita
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HCAI	Hepatite crônica autoimune
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HCPT	Hepatite viral C pós-transplante
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
Hep Neo	Hepatite neonatal
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IGF-1	<i>Insulin Like growth factor-1</i>
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
Mg	Magnésio
NCHS	<i>National Center for Health Statistics</i>
NPT	Nutrição parenteral total
NSB	Tampão de fosfato
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Fosfato
PCT	Prega cutânea tricriptal
PO₄	Fosfato
PTH	Paratormônio
R%	Percentual de recuperação
RDA	<i>Recommended dietary allowances</i>
Rej Cron	Rejeição crônica
RIE	Radioimunoensaio
S. Alagille	Síndrome de Alagille
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
THF	Tetrahidrofurano
TPGS	<i>d-α-Tocopheryl Polyethylene Glycol 1.000 Succinate</i>
TRI	Triglicerídeos
VET	Volume energético total (calorias totais ingeridas)
WHO	<i>World Health Organization</i>
Zn	Zinco

Lista de Figuras

Figura 1	Tipos de colestase com os locais de acometimento	3
Figura 2	Fórmulas para calcular a circunferência muscular do braço e da área muscular do braço	5
Figura 3	Efeitos a longo prazo ocasionados pela ausência de bile no intestino	11
Figura 4	Etapas da absorção de gorduras e de vitaminas lipossolúveis da dieta	16
Figura 5	Valores referenciais para α tocoferol nas diferentes faixas etárias baseados nos estudos de Sokol e colaboradores (1990)	20
Figura 6	Locais de envolvimento neuromuscular na deficiência de vitamina E com as manifestações clínicas correspondentes	22
Figura 7	Achados clínicos de deficiência de vitamina E em diferentes patologias	23
Figura 8	Etapas do metabolismo e funções da vitamina D	25
Figura 9	Alterações ósseas relacionadas à colestase crônica	29
Figura 10	Etapas de realização das dosagens plasmáticas de vitamina D e E	37
Figura 11	Preparação da curva de calibração da vitamina E – 1ª fase	46
Figura 12	Preparação da curva de calibração da vitamina E – 2ª fase	48
Figura 13	Preparação da curva de concentrações da vitamina E para recuperação	51
Figura 14	Demonstração esquemática das etapas de extração e imunoensaio da 25OHD	54
Figura 15	Distribuição dos pacientes por etiologia da colestase	61
Figura 16	Distribuição dos pacientes quanto ao escore Z	63

Figura 17	Prevalência de alterações ao exame neurológico dos pacientes estudados	65
Figura 18	Descrição das alterações neurológicas observadas nos pacientes colestáticos	65
Figura 19	Bilirrubinas dos pacientes estudados	69
Figura 20	Aminotransferases e Gama glutamiltransferases dos pacientes estudados	69
Figura 21	Fosfatase alcalina dos pacientes estudados	70
Figura 22	Valores absolutos de lipídios totais, de colesterol e de triglicéridos dos pacientes colestáticos e controles	71
Figura 23	Curva de calibração da vitamina E – 1ª fase	72
Figura 24	Representação cromatográfica do doseamento de vitamina E com padrão diluído e no plasma – 1ª fase	73
Figura 25	Representação cromatográfica do doseamento de vitamina E com padrão diluído e no plasma – 2ª fase	74
Figura 26	Curva de calibração da vitamina E – 2ª fase	75
Figura 27	Representação cromatográfica do doseamento de vitamina E com padrão diluído e no plasma – 3ª fase	77
Figura 28	Curva de calibração da vitamina E – 3ª fase	78
Figura 29	Curva de calibração da vitamina D	81
Figura 30	Níveis plasmáticos de vitamina D (ng/ml) em colestáticos e controles (teste T paramétrico)	82
Figura 31	Medianas dos níveis plasmáticos de vitamina D (ng/ml) entre pacientes eutróficos e desnutridos (Mann-Whitney U)	83
Figura 32	Comparação das medianas dos níveis plasmáticos de vitamina D (ng/ml) entre pacientes que utilizam ou não suplemento oral (Mann-Whitney U)	84
Figura 33	Demonstração dos cromatogramas de dosagem do α tocoferol no plasma	102
Figura 34	Demonstração dos cromatogramas de dosagem do α tocoferol	103
Figura 35	Curvas de calibração da vitamina D	106

Lista de Tabelas

Tabela 1	Colestase na criança: principais causas	4
Tabela 2	Principais fatores que contribuem para a desnutrição em crianças portadoras de colestase crônica.....	8
Tabela 3	Proporção de macronutrientes recomendada para pacientes pediátricos com colestase crônica.....	9
Tabela 4	Conteúdo de vitamina E de alimentos selecionados.....	14
Tabela 5	Métodos de dosagens plasmáticas de vitamina E por HPLC descritos na literatura.....	19
Tabela 6	Conteúdo de vitamina D de alimentos selecionados.....	26
Tabela 7	Suplementação de vitaminas prescritas aos pacientes colestáticos.....	42
Tabela 8	Avaliações laboratoriais realizadas no estudo.....	43
Tabela 9	Condições cromatográficas para adequação do método por HPLC utilizada na determinação de α tocoferol no plasma humano - 1 ^a fase.....	44
Tabela 10	Condições cromatográficas para adequação do método por HPLC utilizada na determinação de α tocoferol no plasma humano - 2 ^a fase.....	47
Tabela 11	Condições cromatográficas para adequação do método por HPLC utilizada na determinação de α tocoferol no plasma humano 3 ^a fase.....	50
Tabela 12	Distribuição dos pacientes e dos controles quanto ao gênero (teste de Qui-quadrado).....	60
Tabela 13	Distribuição dos pacientes e dos controles quanto à idade (teste T paramétrico).....	61
Tabela 14	Distribuição dos pacientes quanto ao estado nutricional em percentis a partir das tabelas de NCHS e Frisancho.....	62
Tabela 15	Ingestão dos macronutrientes em relação às calorias totais ingeridas.....	64

Tabela 16	Mediana dos percentuais de micronutrientes ingeridos em relação ao recomendado para a idade e gênero	64
Tabela 17	Características dos pacientes com exame neurológico alterado	66
Tabela 18	Mediana do tempo de colestase dos pacientes estudados	67
Tabela 19	Perfil bioquímico dos pacientes estudados	67
Tabela 20	Correlação entre tempo de colestase e valores bioquímicos	68
Tabela 21	Nível sérico de lipídios totais, de colesterol e de triglicerídeos dos pacientes colestáticos e controles	70
Tabela 22	Relação entre escore Z (A/I) e valores bioquímicos e lipídicos (teste de Mann-Whitney)	72
Tabela 23	Demonstração das leituras e cálculos de precisão e de recuperação – 2 ^a fase	76
Tabela 24	Demonstração das leituras e cálculos de precisão – 3 ^a fase	78
Tabela 25	Demonstração das leituras e cálculos da recuperação – 3 ^a fase	79
Tabela 26	Níveis plasmáticos de vitamina E obtidos	80
Tabela 27	Características de estudos realizados sobre níveis plasmáticos de vitamina E em pacientes colestáticos e avaliação neurológica	87
Tabela 28	Características de estudos realizados sobre avaliação nutricional e perfil lipídico de crianças e de adolescentes com hepatopatia crônica	88
Tabela 29	Características de estudos realizados sobre níveis plasmáticos de vitamina D e/ou osteopenia em crianças com colestase	89
Tabela 30	Frequência relativa dos tipos de colestase na infância em centros de referência com mais de 500 casos relatados	91
Tabela 31	Diagnósticos prevalentes em estudos envolvendo crianças e adolescentes com hepatopatia crônica	92
Tabela 32	Comparação entre os valores percentuais observados e esperados da ingestão de calorias, de macronutrientes e de micronutrientes em crianças e adolescentes com colestase crônica	96
Tabela 33	Técnicas de dosagem de α tocoferol utilizadas como referência da literatura e as 3 fases de realização das dosagens no presente estudo	104
Tabela 34	Níveis plasmáticos de vitamina D considerados normais na literatura	108

RESUMO

RESUMO

A colestase crônica na infância e na adolescência interfere diretamente no crescimento e no desenvolvimento do indivíduo e produz conseqüências clínicas relacionadas com a má absorção das vitaminas lipossolúveis da dieta. A vitamina E exerce um importante papel na estrutura e na função dos sistemas nervoso e musculoesquelético. A vitamina D tem reconhecida influência sobre a fisiopatologia da osteopenia colestática que se manifesta como osteoporose, raquitismo ou osteomalácia. A realização de dosagens plasmáticas dessas vitaminas é essencial para detectar precocemente suas deficiências, bem como para monitorizar uma adequada suplementação. Essas dosagens não são realizadas de rotina no nosso meio.

Os objetivos do presente estudo foram verificar os níveis plasmáticos de vitaminas D e E em uma amostra de crianças e adolescentes com colestase crônica; verificar o estado nutricional e a ingestão de macro e micronutrientes desses pacientes; verificar o uso de suplemento de vitaminas, o tempo de colestase; e realizar avaliação neurológica para estabelecer eventual relação com os níveis plasmáticos de vitamina E.

A amostra constou de 22 crianças e adolescentes com colestase crônica que consultavam no ambulatório ou estiveram internadas na Unidade de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de dezembro de 2000 a abril de 2002. Como controles, participaram 17 crianças eutróficas e normais do ponto de vista gastroenterológico com faixa etária correspondente. Foram realizadas avaliação nutricional e avaliação neurológica. Foi pesquisado o tempo de colestase e o uso de suplemento de vitaminas liposso-

lúveis. A técnica utilizada para as dosagens da vitamina E foi a cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) e as dosagens plasmáticas de vitamina D pela técnica de radioimunoensaio.

A prevalência de desnutrição variou entre 23,8% a 63,0% considerando as diferentes medidas e padrões utilizados. O inquérito alimentar realizado demonstrou uma ingestão calórica média de $89,33 \pm 27,4\%$ em relação ao recomendado para idade com uma distribuição dos macronutrientes em relação às calorias ingeridas dentro dos valores de referência para o grupo em questão, havendo, porém, uma pobre ingestão de micronutrientes como ferro e zinco. O exame neurológico foi alterado em 43% dos pacientes colestáticos, em que foram constatadas vinte alterações neurológicas em nove pacientes. Não obtivemos resultados confiáveis para os níveis plasmáticos de vitamina E, apesar de realizar 3 etapas para validação. O valor médio de vitamina D entre os pacientes foi de $13,7 \pm 8,39$ ng/ml, enquanto que no grupo controle foi de $25,58 \pm 16,73$ ng/ml ($P = 0,007$), havendo uma prevalência de hipovitaminose D entre esses pacientes de 36%. Não foi observada relação entre estado nutricional, tempo de colestase ou uso de suplemento oral de vitaminas lipossolúveis e os níveis plasmáticos referidos.

Concluimos que a média de níveis plasmáticos de vitamina D nas crianças e nos adolescentes colestáticos do estudo foi significativamente menor do que nos controles normais sem relação significativa com estado nutricional, tempo de colestase ou uso de suplemento de vitaminas. As alterações neurológicas foram freqüentes e a prevalência de desnutrição nos pacientes foi semelhante à encontrada na literatura. A ingesta calórica foi deficiente havendo porém, um equilíbrio dos macronutrientes e ingestão insuficiente de ferro e zinco.

SUMMARY

SUMMARY

Chronic cholestasis in childhood and adolescence directly affects growth and development of the individual, and has clinical consequences associated with malabsorption of dietary fat-soluble vitamins. Vitamin E plays an important role in the structure and function of the nervous and musculoskeletal systems, and neurologic symptoms have been described in patients with vitamin E deficiency. Vitamin D is known to play a role in the physiopathology of cholestatic osteopenia seen in osteoporosis, rickets and osteomalacia. Plasma concentration measurements of these vitamins are essential to detect deficiencies at an early stage and to monitor adequate supplementation. These measurements are not routinely carried out in our practice.

The purposes of this study were to measure plasma concentrations of vitamins D and E in a sample of children and adolescents with chronic cholestasis; to study their nutritional status and macro – and micronutrient intake; to check the use of vitamin supplements; to check cholestasis duration; and to conduct neurologic evaluations to establish a possible association with vitamin E plasma concentrations.

The sample was composed of 22 children and adolescents with chronic cholestasis seen in the outpatient service or hospitalized in the Pediatric Gastroenterology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, from December 2000 to April 2002. The control

group was composed of 17 eutrophic, gastroenterologically normal children matched by age. We conducted nutritional and neurologic evaluations. Data about cholestasis duration and the use of fat-soluble vitamin supplements were collected. Vitamin E concentrations were measured by means of high performance liquid chromatography (HPLC), and vitamin D plasma concentrations, by means of a radioimmunoassay.

Malnutrition rates ranged from 23.8% to 63.0% according to the different measurement techniques and standards used. Dietary survey data revealed a mean caloric intake of $89.33 \pm 27.4\%$ of the amount recommended for the age; distribution of macronutrients in relation to caloric intake was within the reference values for the group under study; however, micronutrient intake, such as iron and zinc intake, was poor. Neurologic symptoms were found in 43% of the patients with cholestasis; twenty neurologic symptoms were found in nine patients. We did not obtain reliable results for vitamin E plasma concentrations although we conducted three validation tests. Mean vitamin D plasma concentration was 13.7 ± 839 ng/ml in patients and 25.58 ± 16.73 ng/ml in control subjects; prevalence rate of D hypovitaminosis was 36% in control subjects. No association was found between nutritional status, cholestasis duration or oral fat-soluble vitamin supplementation and plasma concentrations.

We concluded that mean vitamin D plasma concentrations in children and adolescents with cholestasis in our study was significantly lower than in normal control subjects, without any significant association with nutritional status, cholestasis duration or vitamin supplementation. Neurologic symptoms were frequent, and the prevalence rate of malnutrition was similar to rates in the literature. Caloric intake was deficient, but macronutrient intake was balanced; iron and zinc intake was insufficient.

1 - INTRODUÇÃO

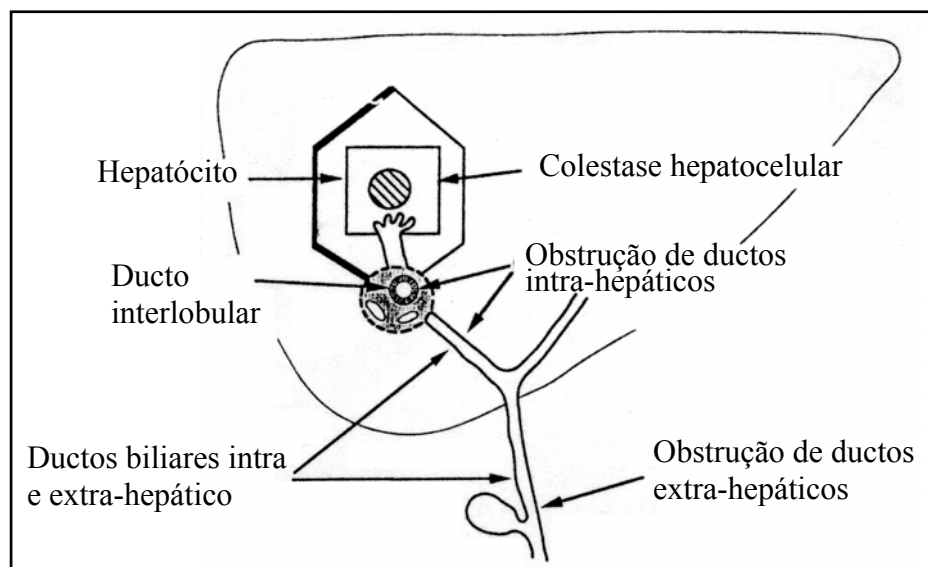
1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Colestase: Conceito e Aspectos Fisiopatológicos

Colestase é a redução ou a ausência de fluxo biliar no duodeno que pode resultar de falha do hepatócito em secretar bile, ausência de ductos biliares intra-hepáticos ou obstrução dos ductos extra-hepáticos (Erlinger, 1999). Dependendo da perspectiva do examinador, pode ser definida fisiologicamente como uma redução do fluxo biliar, histopatologicamente como presença de pigmento biliar no hepatócito e nos ductos biliares e clinicamente pelo acúmulo no sangue de substâncias normalmente excretadas na bile: bilirrubinas, ácidos biliares e colesterol e suas respectivas manifestações.

A figura 1 ilustra os tipos de colestase. A colestase hepatocelular resulta da alteração da secreção da bile pelo hepatócito. Colestase hepatocelular e de obstrução dos ductos intra-hepáticos são denominadas "colestase intra-hepática" e a obstrução dos ductos extra-hepáticos é denominada "colestase extra-hepática" respectivamente. Em relação à obstrução mecânica, acredita-se que a colestase é devida à regurgitação de constituintes da bile, provavelmente entre os complexos juncionais e os hepatócitos. Ocorre modificação da polaridade da membrana plasmática com retorno ao sangue da secreção que iria para a bile após penetrar no hepatócito. Existem diferentes possibilidades para a explicação da colestase de origem hepatocelular e observa-se que um mesmo agente pode afetar os vários mecanismos que contribuem para a formação da bile. O impacto da colestase crônica na função hepática parece estar rela-

cionado à retenção hepática de diferentes compostos com capacidade de induzir lesão na membrana celular, necrose e degeneração gordurosa, resultando, eventualmente, na cirrose (Reinchen *et al.*, 1993).



Fonte: Modificado de Erlinger S. Cholestasis. In: Schiff E, Sorrel MF, Mandrey WC ed. Schiff's Diseases of the Liver. 8ª ed. Philadelphia Lippincott - Raven Publishers, 1999: 611-629.

Fig. 1 - Tipos de colestase com os locais de acometimento.

Do ponto de vista clínico, a colestase se expressa por icterícia com colúria, acolia ou hipocolia e/ou prurido, causados por acúmulo de ácidos biliares no sangue com ausência de bile no intestino (Erlinger, 1999; Kaplan *et al.*, 1998).

Os achados bioquímicos usualmente incluem elevação dos ácidos biliares, da bilirrubina direta no sangue ($\geq 20\%$ da bilirrubina total) e bilirrubinúria. A evidência de dano hepatocelular é demonstrada pela elevação de aspartato aminotransferase (AST) e alanino aminotransferase (ALT). A elevação da fosfatase alcalina, 5'nucleotidase e, mais especificamente em crianças, da gamma glutamiltransferase (γ GT) pode denotar as alterações na permeabilidade hepatobiliar e, por isso, são consideradas como marcadores da colestase (Roquette, 2000; Maller, 1998; Rosenblum *et al.*, 1981).

Os fatores determinantes da colestase na infância podem ser enquadrados em duas categorias principais: aquela que se apresenta no período neonatal e a observada nas crianças mais velhas, com idade superior a 2 ou 3 anos (Silveira, 2001). De acordo com o local de obstrução, podemos dividir as causas de colestase na criança em intra-hepática e extra-hepática, conforme está demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 - Colestase na criança: principais causas

A) Intra-hepática
A1) Obstrução dos ductos biliares intra-hepáticos:
• Ductopenia
• Colangite esclerosante
• Fibrose cística
• Doença de Hodgkin
• Cirrose biliar primária
A2) Hepatocelular:
• Congênita
– Deficiência de α 1 antitripsina
– Colestase intra-hepática benigna recorrente
– Síndrome dos Byler
– Distúrbios metabólicos (Ex.: Galactosemia, Tirosinemia, D.Wilson)
– Distúrbios endócrinos (Ex.: Hipotireoidismo)
– Porfirias
• Adquirida
– Drogas (Ex.: Etil-estradiol, Clorpromazina)
– Vírus (hepatite)
– Infecções bacterianas (Sépsis)
– Nutrição parenteral
B) Extra-hepática:
• Atresia de vias biliares
• Hipoplasia de vias biliares
• Dilatação cística de colédoco
• Compressão extrínseca (tumor, anomalias congênicas, gânglios)
• Parasitas
• Litíase biliar

Fontes: Silveira, TR; Pires ALG. Icterícia colestática neonatal. In: Pena, F.J.; Wehba, J; Fagundes Neto, V. Gastroenterologia Pediátrica, 2^a ed. Rio de Janeiro, Medsi. 1991, p. 465-487.
Erlinger S. Cholestasis. In: Schiff, ER; Sorrel MF; Maddrey WC ed. Schiff's Diseases of the Liver. 8^a ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers 1999, p. 611-629.

1.2 - Avaliação Nutricional da Criança e do Adolescente e suas Peculiaridades na Colestase Crônica

1.2.1 - Técnicas mais Utilizadas na Prática Clínica

Os parâmetros antropométricos usualmente utilizados para avaliar a condição nutricional de crianças são o peso e a estatura (altura e comprimento) que são analisados em função do sexo e da idade da criança. Os índices mais freqüentemente empregados são: peso/idade, estatura/idade e peso/estatura. O peso exprime o crescimento corporal como um todo, sendo indicador pouco sensível, uma vez que pode apresentar variações em curto intervalo de tempo. O comprometimento do índice estatura/idade indica que a criança tem o crescimento afetado por um processo de longa duração. Estudos realizados no Brasil, em 1989, demonstraram que 31% das crianças brasileiras menores de 5 anos apresentavam alguma forma de desnutrição, sendo o déficit estatura/idade o mais freqüente (Sigulem *et al.*, 2000).

A prega cutânea tricipital é útil para avaliar os estoques de gordura, enquanto a circunferência do braço estima as reservas de proteína (Nomplegi e Bonkovsky, 1994; Feranchak *et al.*, 2001). A circunferência muscular do braço (CMB) e a área muscular do braço (AMB) podem ser calculadas através das fórmulas da figura 2.

$$\begin{aligned} \mathbf{CMB} &= \mathbf{CB} - \pi \times \mathbf{PCT} \text{ (mm)} \\ &e \\ \mathbf{AMB} &= \frac{(\mathbf{CB} - \pi \times \mathbf{PCT})^2}{4 \pi} \text{ (mm}^2\text{)} \end{aligned}$$

Onde: CMB = Circunferência muscular do braço
AMB = Área muscular do braço
CB = Circunferência do braço
PCT = Prega cutânea tricipital
 $\pi = 3,1416$

Fig. 2 - Fórmulas para calcular a circunferência muscular do braço e da área muscular do braço.

A CMB e a PCT são consideradas bons indicadores das condições nutricionais e recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) quando o peso e a estatura não são disponíveis (WHO Technical Report Series, 1995).

O adolescente é definido pela OMS (1995) como o indivíduo entre 10 e 19 anos. A adolescência é um período marcado por profundas mudanças fisiológicas de peso, estatura e composição corporal. Cerca de 50% do peso e 20–25% da estatura de um indivíduo são adquiridos na adolescência, e a nutrição serve como determinante altamente significativo desse processo (Sigulem *et al.*, 2000). As medidas como peso, altura, circunferência e pregas cutâneas, para serem bem utilizadas, devem considerar as modificações decorrentes da maturação sexual próprias da faixa etária.

A classificação da OMS que pode ser utilizada para crianças, independente da faixa etária, é o escore Z. Por definição, para qualquer dos indicadores, o escore Z médio de referência é zero. Escore Z negativo indica que a criança e/ou a população estudada está abaixo do padrão nutricional desejável. Se o escore Z é inferior a – 2 desvios padrão abaixo da média de referência, a criança e/ou a população avaliada é considerada desnutrida. São considerados desnutridos graves crianças abaixo de – 3 desvios padrão abaixo da média ou aquelas que apresentam edema comprovadamente nutricional. Em uma população sadia, encontra-se menos de 1% de défices graves e cerca de 2,3% de défices moderados (Ministério da Saúde, 1996).

Outra forma de classificação do estado nutricional é a comparação com percentis. Os percentis são derivados da distribuição em ordem crescente dos valores de um parâmetro, observados para idade e sexo. A classificação de uma criança em um determinado percentil permite estimar quantas crianças da mesma idade e do mesmo sexo são maiores ou menores em relação ao parâmetro avaliado.

O padrão de referência internacional adotado pela OMS desde 1978 são dados do *National Center for Health Statistics* (NCHS). Esse padrão tem sido questionado por que é considerado inadequado para adolescentes e porque todos os lactentes a partir dos quais foi determinado o padrão eram alimentados com fórmulas. Diversos valores de percentil têm sido propostos para funcionar como ponto de corte. Almeida e colaboradores (1999) avaliaram o uso do percentil 10 para detecção de risco nutricional, concluindo que, ao comparar com o escore Z , mostrava-se adequado para triagem de crianças com déficit de peso/idade e de peso/altura, porém inadequado para altura/idade.

1.2.2 - Avaliação Nutricional na Colestase Crônica

O estado nutricional de uma criança com doença hepática crônica é um dos fatores que interferem na sobrevida tanto dos pacientes que aguardam um transplante como daqueles que já o fizeram. As causas para esse comprometimento são múltiplas e estão listadas no tabela 2

Tabela 2 - Principais fatores que contribuem para desnutrição em crianças portadoras de colestase crônica

Fatores	Comentários
Diminuição da ingestão alimentar	Anorexia, dietas impalatáveis pelas restrições alimentares, náuseas, aumento do volume abdominal que levam a saciedade precoce ^{2, 3, 4 e 5} .
Aumento do consumo energético	O consumo energético de crianças com hepatopatia crônica é 30% maior do que de uma criança normal ² .
Diminuição da síntese de carboidrato	A diminuição da síntese de glicogênio e da metabolização de insulina pelo fígado, gera uma resistência periférica à insulina e uma diminuição da tolerância à glicose ² .
Aumento da oxidação de proteínas e diminuição da síntese de novas proteínas	Um balanço nitrogenado positivo requer quantidade maior de proteínas do que a indicada para a faixa etária. A possibilidade de encefalopatia hepática muitas vezes impede que essa oferta seja possível ² .
Alteração do metabolismo lipídico	Os ácidos graxos essenciais são deficientes e o colesterol elevado ² .
Má absorção de gorduras	A deficiência de ácidos biliares intraluminais produz esteatorréia com perda energética em torno de 60% e, conseqüente má absorção de vitaminas lipossolúveis e de minerais ² .
Complicações clínicas que comprometem o estado nutricional	Sangramento do trato gastrointestinal; peritonite bacteriana espontânea; internações prolongadas com maior exposição a infecções ^{1, 5} .
Deficiência <i>Insulin Like growth factor</i> – 1 (IGF-1) produzido pelo fígado	IGF-1 são hormônios anabólicos produzidos no fígado necessários ao crescimento normal. Em crianças com doença crônica do fígado, esse hormônio não se eleva, apesar do estímulo do hormônio de crescimento ¹ .

Fontes: 1 - Bucuvalas JC; Horn JA; Slusher J; Alfaro MP; Chernausk SD. Growth hormone insensitivity in children biliary atresia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1996;23:135-140.

2 - Cabêdo MTC. Terapia nutricional em situações especiais: Insuficiência Hepática. In: Falcão MC; Carazza FR. *Manual Básico de Apoio Nutricional em Pediatria*. Editora Atheneu, São Paulo, 1999.

3 - Cardoso AI; Porta G; Vieira MA; Carazza FR. Caracterização nutricional de crianças com colestase crônica. *Jornal de Pediatria* 1997;73(1):43-50.

4 - Ferachank AP; Ramirez RO; Sokol RJ. Medical and nutritional management of cholestasis. In: Suchy FJ; S okol RJ; Balistreri WF. *Liver Disease in Children*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2nd ed, 2001.

5 - Müller MJ. Malnutrition in cirrhosis. *Journal of Hepatology* 1995;23(1):31-35.

O comprometimento nutricional da criança com hepatopatia crônica, principalmente daquelas com envolvimento desde os primeiros meses de vida, pode resultar em déficit cognitivo e comprometimento imunológico (Feranchak *et al.*, 2001). Apesar de haver melhora

após o transplante hepático, algumas inabilidades podem ser irreversíveis (Cywes e Millar, 1990). Todos esses fatores justificam uma avaliação de maneira seriada que possa dirigir e julgar os efeitos da terapêutica nutricional instituída.

A desnutrição está presente em cerca de 70% dos pacientes com hepatopatia crônica (Cabêdo, 1999; Müller, 1995), mas o seu diagnóstico pode ser prejudicado devido à própria disfunção hepática. Como o peso pode ser superestimado devido à ocorrência de ascite, edema e hepatoesplenomegalia, e as proteínas séricas (ex.: albumina) podem estar diminuídas em decorrência da menor síntese hepática, mesmo em pacientes eutróficos, as medidas de altura são mais fidedignas para identificar desnutrição crônica. Uma redução na estatura em relação a idade pode indicar a duração da desnutrição. As medidas do braço são menos sujeitas ao acúmulo de líquido pela própria ação da gravidade.

A proporção adequada na ingestão dos nutrientes é essencial para manter um equilíbrio energético e promover um eficiente uso das reservas de proteínas e de lipídios, além de promover uma melhor absorção dos micronutrientes (Nomplegi e Bonkovsky, 1994). A tabela 3 demonstra as recomendações de suporte nutricional ao hepatopata com relação à proporção de macronutrientes preconizada pela equipe de hepatologia pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (Ferreira *et al.*, 2000).

Tabela 3 - Proporção de macronutrientes recomendada para pacientes pediátricos com colestase crônica

Calorias	150% das recomendações diárias (RDA)
Proteínas	15% das calorias
Lipídios	30% das calorias
Glicídios	55% das calorias

A ingesta de calorias recomendada visa suprir a grande demanda por isso o valor calórico deve ser aumentado se o paciente estiver com peso baixo. É recomendada a utilização de triglicérides de cadeia média (TCM) e não os de cadeia longa que necessitam sais biliares para sua solubilização. A ingestão de proteínas em crianças colestáticas não deve ultrapassar 3 g/kg/dia enquanto o paciente recebe uma dieta rica em calorias. É recomendada a utilização predominante de aminoácidos de cadeia ramificada. Se ocorrer encefalopatia hepática, a ingestão protéica deverá ser limitada a 0,5 a 1 g/kg/dia (Feranchak *et al.*, 2001).

A deficiência dos micronutrientes pode colaborar com alguns sinais clínicos inespecíficos como anorexia e fraqueza muscular (Müller, 1995). Deficiências de zinco, cálcio, fosfato, magnésio e ferro são comuns nos pacientes pediátricos e devem ser tratadas prontamente (Gazal, 1995). O acúmulo de cobre, manganês e alumínio pode ocorrer na colestase crônica e causar dano devido ao seu efeito oxidante no parênquima hepático, agravado pelo fato de haver deficiência de agentes antioxidantes como a vitamina E (Feranchack *et al.*, 2001).

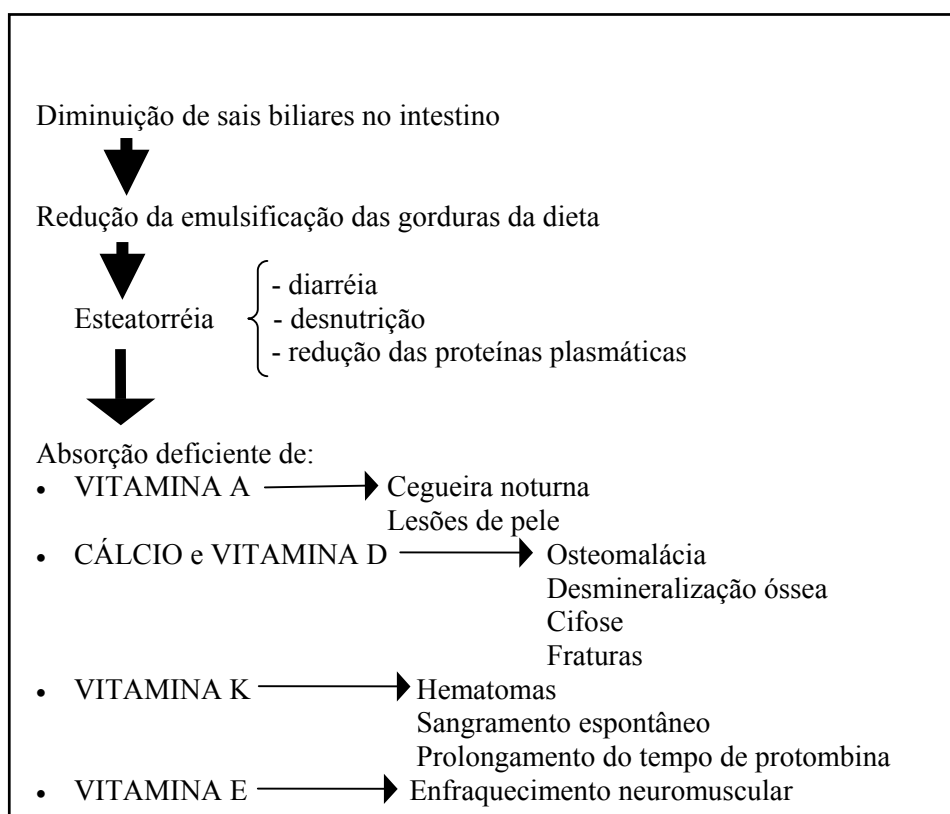
1.3 - Vitaminas na Colestase

A maioria das vitaminas hidrossolúveis são componentes de sistemas enzimáticos essenciais e, várias delas estão envolvidas em reações do metabolismo energético. Como essas vitaminas não são armazenadas no organismo em quantidades apreciáveis, é necessário um consumo diário para evitar a depleção e a interrupção das funções fisiológicas intermediadas por elas. Fazem parte desse grupo as vitaminas do complexo B e o ácido ascórbico (vitamina C) (Mahan e Stump, 1998).

Apesar de a menor aceitação da dieta e de a má absorção de nutrientes serem fatores de risco para a deficiência das vitaminas hidrosolúveis, não há relatos sobre a deficiência

dessas vitaminas em crianças com doença hepática crônica. Como recomendação nutricional, Feranchak e colaboradores (2001) orientam sua suplementação vitamínica em uma a duas vezes o recomendado para idade. Os suplementos, geralmente, contêm valores adicionais de vitaminas A e D que devem ser considerados para evitar os riscos de toxicidade desses.

As vitaminas lipossolúveis compreendem as vitaminas A, D, E e K. São absorvidas no trato gastrointestinal juntamente com as gorduras da dieta. O organismo não é capaz de sintetizá-las ou as sintetiza em quantidades insuficientes, sendo necessário fornecê-las através dos alimentos. A ausência de bile no intestino causa esteatorréia com os sinais e os sintomas decorrentes de má absorção descritos na figura 3. A esteatorréia é proporcional à duração da colestase e pode ser responsável por diarréia crônica e desnutrição.



Fonte: Sherlock S, Dooley. J. eds. Cholestasis. In: Diseases of the liver and biliary System. 10 ed. Oxford: Blackwell Science, 1997: 217-237.

Fig. 3 - Efeitos a longo prazo ocasionados pela ausência de bile no intestino.

Mello e Silveira (1995) padronizaram no HCPA a técnica de dosagem de gordura nas fezes através do esteatócrito em nosso meio. Gazal (1995) utilizou esse exame para avaliar a perda de gordura nas fezes de crianças cirróticas, e constatou uma diferença significativa quando comparado ao de crianças normais. Essa perda foi ainda maior em crianças com colestase crônica devido a Atresia de Vias Biliares (AVBEH) e Síndrome de Alagille.

Quando a colestase inicia na infância, as reservas corporais de vitaminas se desgastam rapidamente e as alterações clínicas provocadas pelas deficiências podem aparecer precocemente se não houver suplementação adequada (Feranchak *et al.*, 2001).

Vitamina A é o termo genérico para descrever todos os retinóides. É um álcool amarelo-claro cristalino, que foi chamado de retinol por sua ação específica no olho. Desempenha um papel essencial na visão, na integridade das células epiteliais e no processo imunológico. É encontrada em alta quantidade no fígado de boi, no óleo de fígado de peixes, na gema de ovos, no leite e derivados e nos vegetais verdes e amarelos a partir do caroteno que é uma pró-vitamina A (Ferachank *et al.*, 2001). A deficiência crônica da vitamina A secundária à má absorção e à esteatorréia pode levar à cegueira noturna ou a alterações de pele, principalmente em crianças devido à maior demanda pelo crescimento associada a menores reservas (Tershakovec, 1998). Ferranchak e colaboradores (2001) descrevem uma prevalência de deficiência de vitamina A entre 35 a 69% das crianças com colestase crônica. Os mesmos autores recomendam o uso de vitamina A na apresentação hidrossolúvel (5.000 a 25.000 U/dia) ou 100.000 UI intramuscular a cada 2 meses. A primeira apresentação não é disponível em nosso meio e ambas exigem uma monitorização cuidadosa dos níveis plasmáticos, visto que apresentam efeitos tóxicos com o uso a longo prazo como: hepatotoxicidade, aumento da pressão intracraniana, dores ósseas, crescimento ósseo precoce e dermatite descamativa (Erlinger, 1999). O esquema recomendado para os pacientes hepatopatas crônicos com colestase do HCPA em recuperação nutricional é de 5.000 a 20.000 UI/dia (Ferreira *et al.*, 2000).

A vitamina K é constituída por um grupo de substâncias com propriedades anti-hemorrágicas. Existem 3 formas de vitamina K: a K1 (encontrada nas plantas verdes), a K2 (formada pela ação bacteriana do intestino) e a K3 (sintética, considerada de pouca importância em nutrição humana e chamada de menadiona). Essa vitamina é essencial na síntese de protrombina e está presente em vegetais folhosos de cor escura, e em menores concentrações, no fígado de boi e de porco, sendo resistente a cocção (Bricarello e Goulart, 1999). Na deficiência de vitamina K ocorre o aumento do tempo necessário para a formação do coágulo o que pode tornar-se um risco de sangramento iminente, principalmente se estiverem associadas alterações hepáticas na síntese dos demais fatores de coagulação (I, V, VII, IX, e X) bem como trombocitopenia causada pelo hiperesplenismo (Murray e Jonas, 1998). É recomendado aos pacientes colestáticos a suplementação de vitamina K intramuscular de 3 a 5 mg a cada 4 semanas (Feranchank *et al.*, 2001). A equipe de hepatologia pediátrica do HCPA indica o uso de 2,5 a 10 mg por mês (Ferreira *et al.*, 2000).

A descrição das vitaminas D e E, bem como suas repercussões clínicas na má absorção, serão revisadas a seguir.

1.3.1 - Vitamina E

1.3.1.1 - Considerações Gerais

A vitamina E foi descoberta em 1922, quando se observou que anormalidades reprodutivas em ratos criados eram corrigidas por uma substância isolada de óleos vegetais. Em 1938 foi identificada uma fração quimicamente pura chamada de tocoferol, derivada da palavra grega *Tokos*, que significa parto, e *Phero*, que significa dar a luz (Mahan e Stump, 1998).

Está presente nas membranas celulares e promove uma ação antioxidante protegendo de dano as membranas das organelas intracelulares (Alpers *et al.*, 1995).

O termo vitamina E refere-se a uma classe de compostos: os tocoferóis e os toco-trienóis. Os tocoferóis são subdivididos em alfa, beta, gama e delta. O alfa tocoferol é o mais ativo biologicamente (Fomon e Bell, 1993; Alpers, *et al.*, 1995; Mahan e Stump, 1998). As fontes da vitamina E são basicamente óleos de sementes e, em menores quantidades, frutas, vegetais e gorduras animais conforme, demonstra na tabela 4.

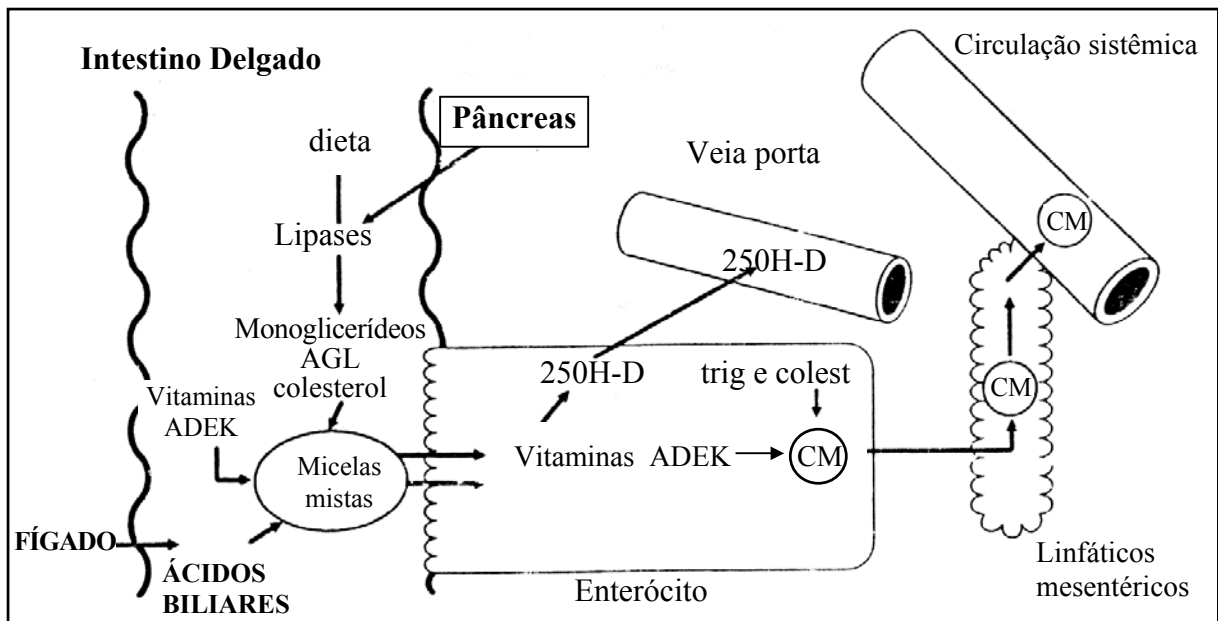
Tabela 4 - Conteúdo de vitamina E de alimentos selecionados

Alimentos	Total de vitamina E (mg)
Óleo de germe de trigo, 1 colher de sopa	34,6
Amêndoas recobertas por chocolate, ½ xícara	14,3
Óleo de milho, 1 colher de sopa	11 - 14
Óleo de soja, 1 colher de sopa	8,8 - 14
Óleo de girassol, 1 colher de sopa	8,5 - 8,8
Leite (sem gordura ou integral), 1 xícara	7,6
Abacate (Flórida), 1	4,0
Macarrão e queijo, 1 xícara	3,5
Ervilhas cozidas, 1 xícara	3,4
Damascos secos, 10	2,2
Azeite, 1 colher de sopa	1,8
Margarina, 1 colher de sopa	1,6
Feijão enlatado cozido com carne de porco, 1 xícara	1,5
Achocolatado (simples), 30 gr	1,5
Salmão (cozido ou assado) 85 gr	1,3
Maionese, 1 colher de sopa	1,0
Frango assado, 140 gr	0,8
Manteiga, 1 colher de sopa	0,2

Fonte: Adaptado de Hands ES: Food Finder. Salen, Oregon, ESHA Research, 1990. Citado em: Mahan, LK; Stump SE. Vitamina E. In: Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 9ª ed. - São Paulo. ROCA 1998. P. 88-121.

Nos seres humanos, sob o ponto de vista clínico, a vitamina E não parece exercer um fator relevante na reprodução. Vários sinais e sintomas observados quando de sua deficiência em animais assemelham-se, de modo superficial, com os estados patológicos no homem (Franco, 1999). Alguns autores comentam sobre o papel da vitamina E na resposta imunológica e na agregação plaquetária (Delvin *et al.*, 2000; Ihara *et al.*, 2000). A deficiência é geralmente associada a grupos especiais como: recém-nascidos, prematuros, pacientes com má-absorção ou obstrução biliar. Como a vitamina E atravessa com dificuldade a barreira placentária, e as reservas em tecido adiposo são pequenas em bebês, esses estão mais propensos a apresentar deficiência dessa vitamina, porém os níveis aumentam rapidamente com o início da alimentação (Alpers *et al.*, 1995; Phelps, 1987). Biervlut e colaboradores (2001) realizaram um estudo com 524 crianças normais de 0 a 14 anos e observaram que as concentrações de α tocoferol em lactentes (0 a 1 ano) eram significativamente maiores do que em crianças de 4 a 14 anos. Atribuíram esse fato ao uso de fórmulas infantis enriquecidas de vitamina E. Esse mesmo grupo de lactentes apresentou uma maior proteção ao estresse oxidativo avaliado pelas concentrações séricas de malondialdeído. Ainda há controvérsias quanto ao uso de α tocoferol em doses fisiológicas para bebês expostos ao *stress* e à hemorragia cerebral (Phelps, 1987; Sokol, 1990).

A vitamina E é absorvida no intestino e penetra na circulação via sistema linfático em conjunto com os lipídios conforme é demonstrado na figura 4. Na circulação sanguínea, é transportada junto com as lipoproteínas de baixa e alta densidade (LDL e HDL). A liberação da vitamina E para os tecidos envolve a ação das lipases que hidrolizam os quilomicrons e a ligação com lipoproteínas de baixa densidade. Como a vitamina E é a mais hidrofóbica das vitaminas lipossolúveis necessita maior concentração de ácidos biliares intraluminais para sua absorção intestinal (Brigelius – Flohé e Traber, 1999).



Onde: Trig = Triglicerídeos
 Colest = Colesterol
 CM = Quilomícrom
 25OHD = 25-Hidroxivitamina D

Fonte: Modificado de Feranchak AP, Ramires RO, Sokol RJ. In: Suchy FJ, Sokol RJ, Balistreri F eds. Liver Disease in children. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2001:195-237.

Fig. 4 - Etapas da absorção de gordura e de vitaminas lipossolúveis da dieta.

A frequência de deficiência de vitamina E em crianças com colestase crônica é de 49% a 77% apesar da suplementação oral de rotina (Feranchak *et al.*, 2001). A deficiência de antioxidantes como a vitamina E pode agravar a lesão hepática já estabelecida pela colestase e pelo acúmulo de cobre que ocorrem nestes pacientes (Munõz, 1991).

A determinação das reservas corporais de vitamina E pode ser realizada por dosagens plasmáticas ou marcadores funcionais que serão melhor especificados a seguir. A correção dos estados de deficiência pode necessitar altas doses de solução oral de α tocoferol e pode ser prejudicada pela má absorção das vitaminas lipossolúveis. O uso de vitamina E parenteral periodicamente (uma vez ao mês) tem sido questionado devido aos valores flutuantes que produz (Socha *et al.*, 1997). Mais recentemente surgiu uma vitamina oral solúvel em água, *d* - α - Tocopheryl Polyethylene Glycol 1.000 Succinate (TPGS) que apresenta uma óti-

ma absorção, especialmente em pacientes com dificuldades na absorção intestinal (Alpers *et al.*, 1995; Sokol *et al.*, 1993).

Apesar de a vitamina E parecer ser segura quando utilizada em altas doses, sua toxicidade pode levar à coagulopatia por interferir na absorção das demais vitaminas lipossolúveis (Tershakovec, 1998). Outros possíveis efeitos colaterais por altas doses incluem fadiga, elevação dos lipídios plasmáticos, má resposta à reposição do ferro e disfunção de leucócitos (Alpers *et al.*, 1995).

1.3.1.2 - Diagnóstico de Deficiência de Vitamina E

São quatro as formas que podemos utilizar como métodos diagnósticos da deficiência de vitamina E.

- **Dosagens Plasmáticas**

As dosagens plasmáticas podem ser realizadas por diferentes métodos: fluorimetria, espectrofotometria e cromatografia (gasosa e líquida de alta precisão) (Bieri *et al.*, 1979; Sokol, 1990).

A realização de fluorimetria verificada em estudos de Sokol e colaboradores é baseada no método de Hansen e Warwick (1969) que descrevem um micrométodo de dosagens simultâneas de vitaminas A e E a partir de extração do soro com hexano, após precipitação das proteínas com etanol. A partir daí, a fluorescência é verificada com leituras de 480 nm para vitamina A e 340 nm para vitamina E.

A espectrofotometria baseia-se na extração das proteínas do plasma ou do soro e na adição de reagentes que produzem cor que será quantificada pelo espectrofotômetro (Hashim e

Schuttringer, 1966). Essa técnica foi recentemente usada por Kalra e colaboradores (2001) em estudo envolvendo crianças desnutridas.

As dosagens por cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) utilizada em vários trabalhos científicos (Willett *et al.*, 1983; Kaplan *et al.*, 1988; Sokol *et al.*, 1993; Weimann *et al.*, 1999) baseiam-se na técnica descrita por Bieri e colaboradores (1979). Consideram ser um método com vantagens sobre os demais (fluorimetria, espectrofotometria e cromatografia gasosa) por ser rápida, relativamente simples, utilizável com amostras pequenas e não sofrer influência de substâncias interferentes. A técnica utiliza uma coluna e duas pré-colunas que são adaptadas ao equipamento para se proceder a separação da substância que desejamos dosar. Os diferentes solventes que circulam pela coluna durante tal separação são chamados de fase móvel. A detecção das substâncias a serem dosadas pode ser feita por um detector fluorimétrico ou de luz ultravioleta que fazem parte do equipamento e que as identificam em diferentes comprimentos de onda previamente estabelecidos. Nestas condições, visualiza-se em um cromatograma o pico de detecção em um determinado tempo. Esse pico poderá ser quantificado ou pela área ou pela altura. Para injetar no equipamento as amostras de plasma, elas devem sofrer uma extração com diferentes reagentes conforme o método utilizado. A tabela 5 resume algumas técnicas descritas na literatura.

Um estudo brasileiro realizado por Weinmann e colaboradores (1999) com recém-nascidos prematuros, dosando retinol e α tocoferol utilizou a forma de extração baseada no trabalho de Bieri e colaboradores (1979), apresentando bons resultados com precisão e recuperação, descritos na tabela 5.

Outro método de extração do plasma foi utilizado por Julianto e colaboradores (1999) que o descrevem como um método factível na determinação de rotina de α tocoferol devido a facilidade, especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade. Os detalhes também estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Métodos de dosagem plasmática de vitamina e por HPLC descritos na literatura

	De Leenher (1978)	Nilsson <i>et al.</i> (1978)	Bieri <i>et al.</i> (1979)	Arnaud <i>et al.</i> (1991)	Julianto <i>et al.</i> (1999)	Weinmann <i>et al.</i> (1999)	Ihara <i>et al.</i> (2000)
Fase móvel	Metanol	N hexano 96% Diisopropyl-ether 4%	Metanol 95% Água 5%	Acetonitrila 70% Metanol 10% Diclorometanio 20%	Metanol 94% Tetrahydrofurano 6%	Metanol 95% Água 5%	Hexano 99,1% 2 propanol 0,9%
Coluna	0,25 x 4,6 mm	<i>stainless-stell</i> 60 cm x 2 mm	Bondapak C18 3,9 mm x 30 cm	ODS 5 µm 5 cm x 0,46 cm	Crestpak C18 5 µm, 250 mm x 4,6	Novapak C18 3,9 mm x 150 mm	Shimpok FLC - SIL 3 µm – 50 x 4,6 mm
Pré-coluna	RP-18 10 µm	Corasil I	Bondapark C18 (3 x 22 mm)	RP-18 (3 cm x 0,46 cm)	RP-18 30 – 40 µm	Bondapak C18 (37 x 50 µm)	
Detector	Luz ultravioleta λ = 292 nm	Fluorescência λ = 280 nm	Luz ultravioleta λ = 280 nm	Luz ultravioleta λ = 292 nm	Luz ultravioleta λ = 292 nm	Luz ultravioleta λ = 280 nm	Luz ultravioleta λ = 295 nm
Tempo de detecção	5 minutos	6 minutos	6 minutos	7 minutos	7,5 minutos	8 minutos	1,5 minutos
Reagentes	Etanol N.hexano	Etanol N.hexano	Etanol Heptano Hexano	Etanol N.hexano	Acetronitrila tetrahydrofurano	Etanol N.hexano	Água Etanol Hexano
Precisão		6%					
CV% intraensaio	2,3%		5,6%	3,5 – 7,5%	1,4 – 2,9 %	3,6 – 5,6 %	7,7%
CV% enterensaio	3,2%		2%	5 – 9%	1,5 – 6,3 %	6,7 – 8,1 %	9,0%
Recuperação	89 – 100%	100%	98,3 a 108,7%	82 a 118%	80,7 – 97,9%	94 a 116%	97%
População estudada	Pool de plasma	Adultos normais	Adultos doadores de sangue	Doadores de sangue	Plasma liofilizado e adicionado de padrão	Recém-nascidos prematuros	Voluntários normais (crianças e adultos)
Valores obtidos	10,8 mg/l	17,0 – 39,9 nmol/l	839 ± 90,2 µg/dl	30,5 ± 6,8 µM	Não relata	Não relata	6,8 – 15,8 mg/L ou 1,42-2,42 mg/g lipídios

Onde: CV = Coeficiente de variação

Os níveis plasmáticos da vitamina E, independente do método utilizado são altamente correlacionados com os lipídios totais. Sendo uma vitamina lipossolúvel, os lipídios plasmáticos carregam uma grande proporção do tocoferol e a deficiência a nível tecidual pode estar presente apesar de o nível plasmático estar normal (Sokol *et al.*, 1984). Portanto, é necessária a dosagem simultânea dos lipídios totais e, a partir daí, a quantificação dos valores de vitamina E em miligramas de tocoferol/miligramas de lipídios totais. Para quantificar os lipídios totais podemos realizar medidas por colorimetria ou pela soma de colesterol, triglicéridos e fosfolipídios (Sokol, 1990).

Os níveis plasmáticos considerados normais sofrem uma grande variabilidade dependendo da técnica e dos padrões de medidas utilizados. Sokol (1990) em uma revisão sobre vitamina E alterações neurológicas considera como padrão os valores descritos na figura 5.

Menores de 12 anos \Rightarrow 3,9 a 5,5 $\mu\text{g/ml}$ ou > 0,6 mg/grama de lipídio
Maiores de 12 anos \Rightarrow 4,7 a 20,3 $\mu\text{g/ml}$ ou > 0,8 mg/grama de lipídio

Fig. 5 - Valores referenciais para α tocoferol nas diferentes faixas etárias baseados nos estudos de Sokol e colaboradores (1990).

- **Avaliação Funcional**

Outra forma de diagnosticar a deficiência de vitamina E é a avaliação funcional. A hipovitaminose E resulta na desestabilização das membranas celulares quando expostas a um estresse oxidante. O teste do peróxido de hidrogênio nos eritrócitos poderá quantificar

essa debilidade funcional a partir da ocorrência de hemólise após exposição dos eritrócitos a referida substância (Alpers *et al.*, 1995).

Há relatos de outros testes funcionais que envolvem medidas de lipídios séricos com peróxido e gás pentano expirado para quantificar a deficiência do antioxidante porém são testes trabalhosos e caros o que limita sua utilização (Sokol, 1990).

- **Avaliação Clínica**

O exame neurológico para a pesquisa de sinais clínicos de deficiência de vitamina E é amplamente descrito na literatura. Sokol (1990) descreve alterações neurológicas que são distintas conforme a causa subjacente da deficiência que serão descritas posteriormente.

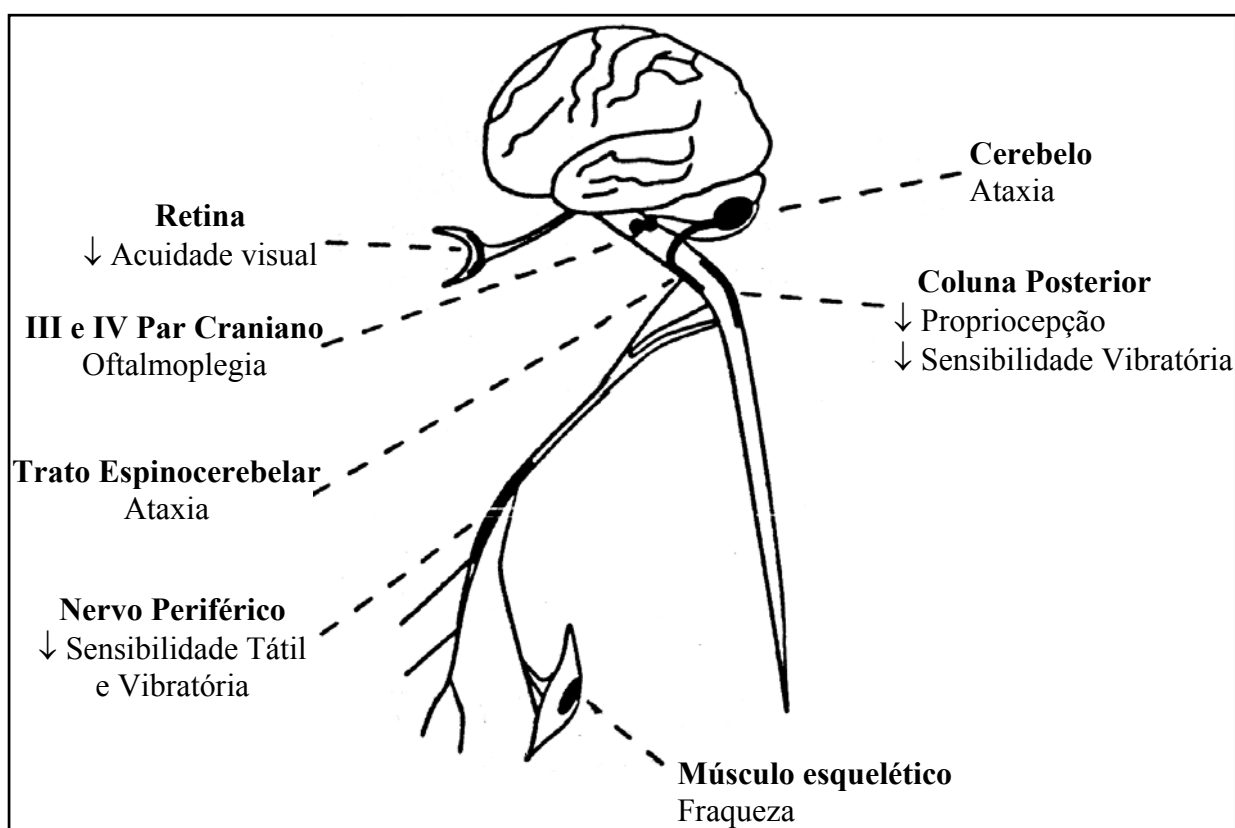
- **Documentação Histológica**

A realização de biópsia deve ser restrita a estudos específicos ou para diagnóstico diferencial de outras afecções neurológicas. São realizadas biópsias de nervos e músculos da panturrilha para a definição de achados patológicos típicos bem como para dosagens teciduais de vitamina E (Sokol 1983).

1.3.1.3 - Alterações Neurológicas e Hipovitaminose E

O papel da vitamina E na manutenção da estrutura e da função dos sistema nervoso e músculo-esquelético foi reconhecido a partir da descoberta de uma doença degenerativa neuromuscular associada à deficiência de vitamina E durante a colestase e outros estados de má-absorção (Elias *et al.*, 1981; Roseblum *et al.*, 1981; Guggenheim *et al.*, 1982; Sokol

1983). As regiões do sistema nervoso central envolvidas incluem o trato espinocerebelar, 3º e 4º pares cranianos; nervos periféricos; porção posterior da medula espinhal; sistema músculo esquelético e retina. A figura 6 ilustra os locais de envolvimento neuromuscular relacionando com a deficiência de vitamina E com as manifestações clínicas correspondentes. As alterações neurológicas são distintas conforme a causa subjacente da deficiência dessa vitamina demonstradas na figura 7.



Fonte: Feranchak AP; Ramires RO, Sokol RJ. Medical na nutritional management of cholestasis. In Suchy FJ; Sokol RJ; Balistreri WF. Liver Disease in Children. Lippincott William & Wilkins, Philadelphia 2nd ed. 2001.

Fig. 6 - Locais de envolvimento neuromuscular na deficiência de vitamina E com as manifestações clínicas correspondentes.

	Abetalipo proteínenina	Colestase crônica da Infância	Outras patologias com má absorção	Deficiência isolada de vit. E
Hiporreflexia ou Arreflexia	++	++	++	±
Ataxia Cerebelar	++	++	++	++
Perda do senso de posição	++	++	+	±
Perda da sensibilidade vi- bratória	++	++	++	++
Perda do tato ou sensibi- lidade dolorosa	+	±	+	-
Ptose	+	+	+	-
Oftalmoplegia	+	+	+	-
Fraqueza muscular	+	+	+	+
Retinopatia pigmentada	++	±	+	-
Disartria	+	±	+	±

++ = sempre presente; + = comumente presente; ± = presente eventualmente; - = ausente

Fonte: Sokol RJ. Vitamin E. and Neurological Deficients. Adv pediatr. 1990; 37: 119 - 148.

Fig. 7 - Achados clínicos de deficiência de vitamina E em diferentes patologias.

As complicações neurológicas decorrentes da perda do efeito protetor que a vitamina E (exerce) sobre diversos agentes neurotóxicos são progressivas e podem ser facilmente confundidas com outras síndromes neurológicas. A reposição adequada da vitamina interrompe a progressão dessas complicações e pode reverter alguns sintomas delas decorrentes (Aparício *et al.*, 2000; Sokol *et al.*, 1993).

1.3.2 - Vitamina D

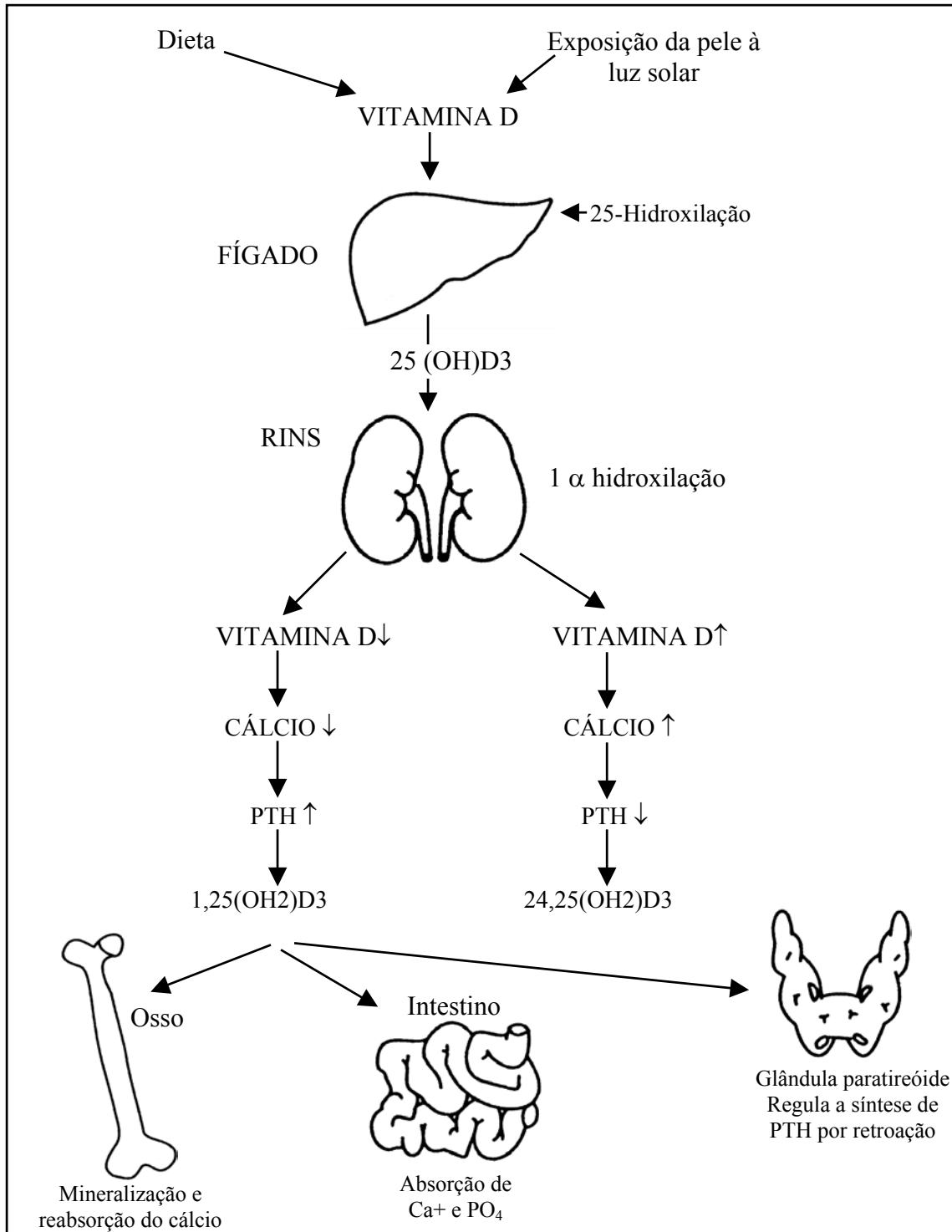
1.3.2.1 - Considerações Gerais

Considerando a sua disponibilidade, metabolismo e mecanismo de ação é mais correto considerar a vitamina D um hormônio esteróide do que uma vitamina no sentido clássico (Norman e Henri, 1993). Os precursores da vitamina D estão presentes na fração esterol dos tecidos de animais e plantas como 7-deidrocolesterol e ergosterol, respectivamente. A radiação ultravioleta é que converte esses precursores em pró-vitaminas colecalciferol (D3) e ergocalciferol (D2) respectivamente (Mahan e Stump, 1998).

As concentrações plasmáticas adequadas existem na dependência da ingestão da vitamina D2 e D3 e da biossíntese cutânea da vitamina D3 após exposição à luz ultravioleta. A absorção depende do fluxo biliar adequado e ocorre a nível do jejuno e do íleo. A vitamina é transportada como quilomícrons até o fígado. Nesse órgão, é submetida a 25-hidroilação transformando-se em 25 (OH)D3. Após, a 25(OH)D3 retorna à circulação e será transportada até o rim onde será submetida a 1α hidroilação para formar 1,25 dihidroxivitamina D3 [1,25 (OH)₂ D3] ou 24,25 dihidroxivitamina D3 [24,25 (OH)₂D3] na dependência do estado de suficiência de vitamina D (Norman e Henri 1993). A secreção do Paratormônio (PTH) irá estimular a síntese de 1,25 (OH)₂D3 no rim, que promoverá a mobilização de cálcio do osso e do intestino, além de regular a síntese de PTH por retroação negativa (Hollick 1998). A figura 8 ilustra as etapas de metabolismo e as funções da vitamina D.

A 25(OH)D3 é a forma da vitamina D que se encontra circulante em maior quantidade enquanto que a 1,25 (OH)₂ D3 é a forma ativa da vitamina. Esse hormônio apresenta um efeito complexo sobre a formação óssea que está relacionado com a inibição da síntese do co-

lâgeno e com as ligações do IGF-1 a seus receptores e proteínas ligadoras, o que o torna necessário para o crescimento normal e para a mineralização óssea (Canalis, 1993).



Onde: PTH = Paratormônio
Ca = Cálcio
PO₄ = Fosfato

25(OH)D3 = 25 hidroxivitamina D
1,25(OH)2D3 = 1,25 dihidroxivitamina D

Fig. 8 - Etapas do metabolismo e funções da vitamina D.

A principal função do eixo vitamina D/Paratormônio é manter o fluxo extracelular com concentrações apropriadas de cálcio e fosfato e assim permitir a mineralização óssea (Chesney, 1996).

A vitamina D ocorre naturalmente em alimentos de origem animal na forma de colecalciferol. É encontrada em quantidades pequenas e altamente variáveis na manteiga, na nata, na gema de ovo e no fígado. O óleo de fígado de peixes é considerado a melhor fonte de vitamina D e foi reconhecido historicamente como a forma de cura para o raquitismo (Mahan e Stump, 1998). A tabela 6 demonstra o conteúdo de vitamina D de alimentos selecionados.

Tabela 6 - Conteúdo de vitamina D de alimentos selecionados*

Alimentos	UI
Arenque fresco e cru, 30 gr	269
Salmão, 30 gr	150
Leite de vaca reforçado, 1 xícara	100
Sardinha enlatada, 30 g	90
Fígado de frango, cozido, 85 gr	45
Camarão enlatado, 30 gr	32
Gema de ovo	25
Leite materno, 1 xícara	1 – 24
Fígado de bezerro cozido, 85 gr	12
Nata, creme, 1 colher de sopa	8
Queijo Cheddar, 30 gr	3
Ostras, 4	3
Manteiga, 1 colher de chá	1,4

Fonte: * Adaptado de USDA: Composition of Foods, Handbook No.8 Series. Washington, DC, ARS, USDA, 1976 – 1986. Citado em: Mahan, LK; Stump SE. Vitamina E. In: Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 9ª ed. – São Paulo. ROCA 1998 P.88 A 121.

As manifestações primárias da deficiência de vitamina D são hipocalcemia, hipofosfatemia, tetania, osteomalácia e raquitismo (Feranchak *et al.*, 2001).

Os pacientes com colestase crônica apresentam má absorção da vitamina D da dieta associada à menor exposição solar decorrentes do seu estado clínico. A avaliação clínica da deficiência de vitamina D em crianças com colestase é feita preferencialmente pelos níveis plasmáticos de 25 OHD3. Feranchak e colaboradores (2001) recomendam a utilização de suplemento oral dessa vitamina em doses maciças em casos de deficiência comprovada por níveis plasmáticos.

A hipervitaminose D pode causar alterações clínicas em consequência da hipercalcemia que são: calcificação óssea excessiva e calcificação em tecidos moles (Ex.: cálculo renal). Em lactentes o excesso de vitamina D causa distúrbios gastrintestinais, fragilidade óssea, crescimento insuficiente e até retardo mental. São descritos também sintomas inespecíficos como cefaléia e náuseas.

1.3.2.2 - Diagnóstico da Hipovitaminose D

A habilidade de medir com precisão os metabólitos da vitamina D no soro ou no plasma humano tem sido aperfeiçoada nas últimas décadas, mas, apesar deste progresso, somente as medidas de 25 OHD3 e 1,25 (OH)₂ D3 têm sido clinicamente úteis (Clemens e Adams 1993).

Como já foi citado anteriormente, a dosagem de 25 OHD3 é a forma mais apropriada de se verificar a real situação dos níveis plasmáticos de vitamina D, uma vez que os níveis de 1,25 e (OH)₂ D3 são mais indicativos da situação do cálcio e não seriam essenciais para a monitorização dessa vitamina (Feranchak *et al.*, 2001).

As formas de dosar 25 OHD descritas na literatura são: *Competitive Protein Binding Assay* (CPBA), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e radioimunoensaio (RIE). As técnicas por CBPA e HPLC necessitam de desprotenização ou extração assim como a preparação cromatográfica que necessita de um volume grande da amostra (1 a 5 ml). São técnicas consideradas trabalhosas e de alto custo (Hollis, 1993).

Até alguns anos, os autores não priorizavam o uso da técnica por radioimunoensaio porque era considerada pouco específica e necessitava de purificação cromatográfica prévia (Clemens e Adams, 1993). Estudos mais recentes utilizam anti-soros que permitam realizar dosagens com maior especificidade e simplicidade na execução sem necessitar maior volume de plasma ou de soro (Hollis, 2000).

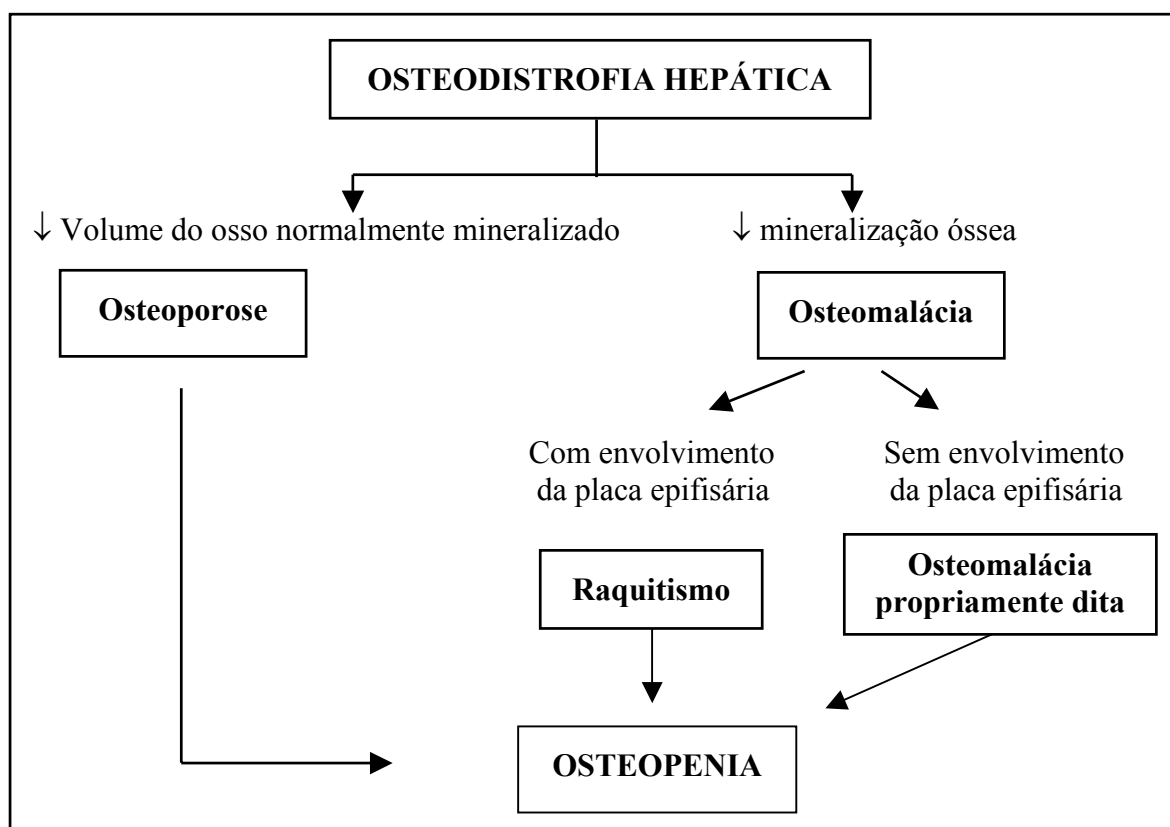
A prevalência de deficiência de vitamina D em crianças com doença hepática crônica é pouco descrita na literatura. Chin e colaboradores (1992) realizaram um estudo com 27 crianças com insuficiência hepática crônica que aguardavam transplante e observaram uma prevalência de 25% de hipovitaminose D.

1.3.2.3 - Alterações Ósseas e Hipovitaminose D

As alterações clínicas que estão associadas a desarranjos no metabolismo ósseo causando diminuição da massa óssea total são chamadas de osteopenia, que pode ser dividida em osteoporose, osteomalácia e raquitismo. A definição de cada uma dessas condições auxilia a compreensão dos possíveis mecanismos relacionados à osteopenia colestática e estão ilustrados na figura 9:

- osteoporose é a diminuição do volume total do osso que já foi normalmente mineralizado tornando-o mais frágil e com risco aumentado de fraturas patológicas.

- osteomalácia é o processo de submineralização do osso sem envolvimento da placa epifisária porque ocorre após ter cessado o crescimento.
- raquitismo também é o processo de submineralização do osso porém com envolvimento da placa epifisária porque ocorre no osso em crescimento.



Fonte: Vieira SMG. Densitometria óssea e fosfatase alcalina esquelética em crianças e adolescentes com colestase crônica. Porto Alegre, 1995. [Dissertação – Mestrado Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

Fig. 9 - Alterações ósseas relacionadas à colestase crônica.

Estudo com densitometria óssea realizado no HCPA verificou que a doença óssea constitui uma complicação comum em crianças com colestase crônica (Vieira, 1995). Sua causa está relacionada à deficiência de vitamina D pela má absorção de vitaminas liposo-

lúveis; falha do fígado em hidroxilar os precursores da vitamina D; desnutrição crônica ou má absorção de minerais em consequência da esteatorréia (Argao *et al.*, 1993).

O raquitismo por hipovitaminose D é a doença do organismo em crescimento e pode ser dividida conforme o quadro clínico (Hollick, 1998):

a) Manifestações precoces encontradas nos recém nascidos como: tetania hipocalcêmica, fontanela alargada, deformação craniana (craniotabes).

b) Manifestações osteomusculoesqueléticas que se exteriorizam de forma mais exuberante nos locais onde existe maior atividade osteoblástica que são: rosário costal; espessamento no local de transição osso/cartilagem no nível das costelas, alargamento das extremidades dos ossos longos (punho e cotovelo); *genu varum/genu valgum*; hipotonia muscular; hipersensibilidade articular, hiperexcitabilidade muscular e atraso na erupção dentária.

c) Manifestações gerais: irritabilidade, sudorese, humor alterado, palidez e retardo do crescimento.

Do ponto de vista radiológico, há alargamento das junções epifisiometafisárias, osteoporose acentuada, fraturas, retardo na ossificação e perda da definição das epífises.

A deficiência de vitamina D, segundo estudos de Heubi e colaboradores (1989), não parece ser a causa principal de osteopenia, mas admitem que a combinação de alterações na absorção mineral e de vitamina D associada a alterações na matriz protéica deve contribuir para a doença óssea metabólica em crianças com colestase crônica. Tem-se observado que pacientes com colestase crônica que normalizam seu *status* de vitamina D podem continuar com evidência de doença óssea metabólica e isso reforça a idéia de haver outros fatores que contribuem para a osteopenia nesses pacientes (Feranchak *et al.*, 2001).

2 - JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

2 - JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A avaliação do estado nutricional de crianças colestáticas tem se tornado assunto de interesse crescente uma vez que o sucesso do transplante depende das condições clínicas e nutricionais em que o paciente se encontra. Além disso, o melhor desenvolvimento nutricional diminui a morbidade inclusive para os que não têm indicação de transplante.

A deficiência de vitaminas lipossolúveis em pacientes colestáticos é bem estabelecida e as repercussões clínicas da deficiência dessas vitaminas são bem conhecidas e podem ser abrandadas ou resolvidas com uma adequada suplementação vitamínica. A realização de dosagens plasmáticas de vitaminas é importante para detectar deficiências assim como para monitorizar uma suplementação adequada, mas tais dosagens plasmáticas não são realizadas de rotina impedindo que se estabeleça um confronto com as alterações neurológicas e deficiência de mineralização óssea nos pacientes atendidos no HCPA.

3 - OBJETIVOS

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Principal

Verificar os níveis plasmáticos de vitaminas D e E de uma amostra de crianças e de adolescentes com colestase crônica.

3.2 - Objetivos Secundários

- Verificar o estado nutricional, a ingestão de macro e micronutrientes, tempo de colestase bem como o uso de suplemento vitamínico dos pacientes colestáticos para estabelecer uma eventual relação com os níveis plasmáticos das vitaminas.
- Realizar avaliação neurológica dos pacientes colestáticos para estabelecer eventual relação com os níveis plasmáticos de vitamina E.

4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 - Considerações Iniciais e Delineamento

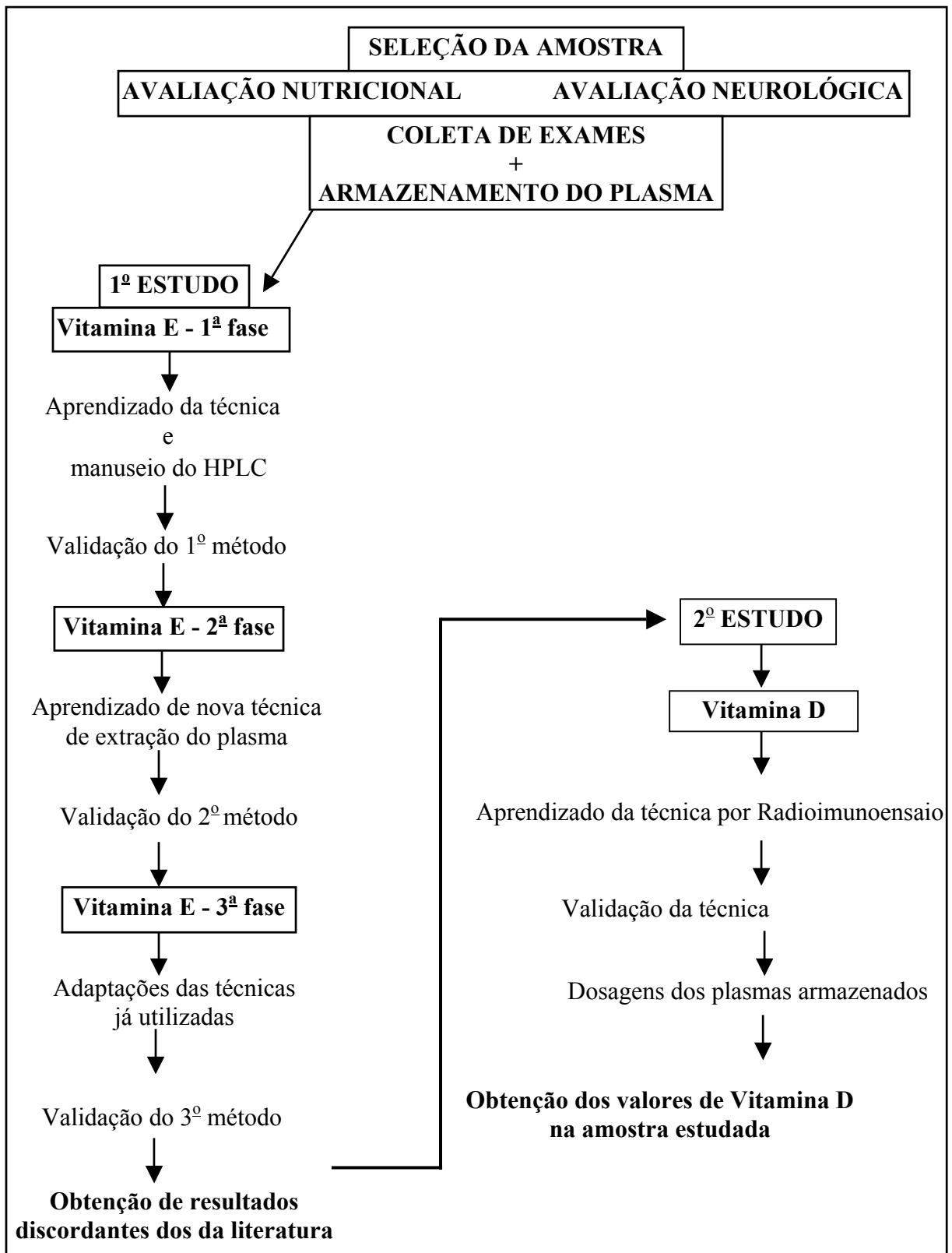
O planejamento da pesquisa foi baseado na determinação dos níveis plasmáticos de α tocoferol (vitamina E) em crianças e em adolescentes com colestase crônica. Foram realizadas avaliações nutricionais e neurológicas, assim como as seguintes dosagens séricas: bilirrubina total, bilirrubina direta, aspartatoaminotransferase (AST), alaninoaminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (γ GT), albumina, fosfatase alcalina, lipídios totais, colesterol e triglicerídeos.

Diante das dificuldades encontradas na dosagem de vitamina E, optamos por realizar um segundo estudo com a determinação de 25-hidroxivitamina D (vitamina D). Portanto, discutiremos as etapas desde a coleta dos dados, as dificuldades técnicas na dosagem da vitamina E até a obtenção dos resultados, conforme está resumido na figura 10.

Os delineamentos realizados para os estudos foram:

Primeiro estudo: Estudo transversal controlado em que o fator em estudo é a colestase crônica e o desfecho é o nível sérico de vitamina E.

Segundo estudo: Estudo transversal controlado em que fator em estudo é a colestase crônica e o desfecho é o nível sérico de vitamina D.



Onde: HPLC = *High performance liquid chromatography*

Fig. 10 - Etapas de realização das de dosagens plasmáticas de vitaminas D e E.

4.2 - Amostra Estudada

Crianças e adolescentes colestáticos que consultaram no ambulatório ou estiveram internados na Unidade de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de dezembro de 2000 a abril de 2002.

Participaram como controles, crianças e adolescentes eutróficos e normais do ponto de vista gastroenterológico que consultaram no ambulatório de Cirurgia Pediátrica do HCPA para realização de cirurgia eletiva.

4.2.1 - Critérios de Inclusão

4.2.1.1 - Pacientes

Faixa etária de 4 meses a 18 anos.

Evidência de colestase por período igual ou superior a 3 meses diagnosticada através de: icterícia, colúria, acolia ou prurido devido à hiperbilirrubinemia de reação direta superior a 30% da bilirrubina total.

4.2.1.2 - Controles

- Faixa etária de 4 meses a 18 anos.
- Estado nutricional adequado para idade e gênero (NCHS).
- Ausência de doença hepática ou gastrointestinal.
- Indicação de coleta de sangue para exames pré-operatórios.

4.2.2 - Critério de Exclusão

4.2.2.1 - Pacientes

- Hepatopatia crônica sem evidência de colestase.
- Uso de vitamina D ou E injetável nos últimos 30 dias.
- Uso de nutrição parenteral total (NPT) nos últimos 3 meses.
- Doença neurológica de base.
- Não assinatura do termo de consentimento informado (Anexo I).

4.2.2.2 - Controles

- Doença hepática ou gastrointestinal.
- Desnutrição identificada pelo gráfico de crescimento (NCHS).
- Não assinatura ao Termo de Consentimento Informado (Anexo VI).

4.2.3 - Cálculo do Tamanho da Amostra

O tamanho da amostra foi calculado para um poder estatístico de 80%, considerando um $\alpha = 0,05$ e um tamanho de efeito de aproximadamente um desvio padrão. Para isso foi necessária a inclusão de, no mínimo, 34 indivíduos entre casos e controles.

4.3 - Variáveis em Estudo

A partir da assinatura do consentimento informado, os pais dos pacientes selecionados, eram informados de que, na coleta dos exames de rotina, seriam realizados os exames do estudo, e era preenchido um protocolo de avaliação com dados clínicos, avaliação neurológica e nutricional (Anexo II).

Era orientado jejum de 4 horas para menores de 1 ano e de 8 horas para maiores de 1 ano. Era solicitado, também, o preenchimento de um inquérito alimentar nos 3 dias que antecediam a coleta dos exames (Anexo III).

4.3.1 - Avaliação Nutricional

Foi realizada a avaliação nutricional em colaboração com a nutricionista Carla Silveira. A análise dos resultados antropométricos foi feita a partir das tabelas do *National Center of Health Statistics* (NCHS 1997), para os Percentis e Escore Z (WHO Technical Report Series, 1995). Foram realizadas medidas de Circunferência braquial (CB), circunferência muscular do braço (CMB) e Prega cutânea tricipital (PCT) com padrões normais estabelecidos por Frisancho (1981). Foram considerados desnutridos os indivíduos com medidas de peso e de estatura com 2 ou mais desvios padrão abaixo da média pelo escore Z ou percentil menor que 5 nos padrões de NCHS e Frisancho.

O inquérito nutricional foi realizado nos três dias prévios à coleta da amostra de sangue e da avaliação nutricional antropométrica. Foram quantificados: ingestão calórica, proteica, lipídica, glicídica e de minerais. Esses valores foram comparados com o recomendado para idade de acordo com as revisões da Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS/UNU -

revisão 1985) e RDA (1989). A análise dos nutrientes foi feita com o auxílio do programa de computador Sistema de apoio à decisão em nutrição, versão 2.5 (Anção *et al.*, 1995), desenvolvido pelo Centro de Informática em Saúde da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

4.3.2 - Avaliação Neurológica

A avaliação neurológica foi realizada pela médica residente da Unidade de Neurologia Pediátrica do HCPA Josiane Ranzan. Foi realizado exame neurológico de acordo com a faixa etária conforme protocolos anexos (Anexo IV e V) baseado nos estudos de Lefrève (1971).

4.3.3 - Tempo de Colestase

No preenchimento do protocolo (Anexo II) era especificada a data do diagnóstico da colestase, identificada pela história clínica e pela revisão do prontuário do paciente.

4.3.4 - Suplementação Oral de Vitaminas Lipossolúveis

O uso regular de vitaminas, como é descrito na tabela 7, foi verificado durante o preenchimento do protocolo de avaliação.

Tabela 7 - Suplementação de vitaminas prescritas aos pacientes coleostáticos

	Dose	Apresentação Recomendada
Vitamina A	6.600 UI/dl	Aderogil D3 [®] 12 gotas 2 x dia
Vitamina D	2.600 UI/dl	Aderogil D3 [®] 12 gotas 2 x dia
Vitamina E	100 mg/dia	Ephynal [®] 400 mg/cada 4 dias
Vitamina K	5 mg/mês	Kanakion [®]

4.3.5 - Exames Laboratoriais

Para a realização dos exames detalhados na tabela 8 foi coletado sangue e distribuído em 3 frascos:

- Um frasco com EDTA (sal dissódico do ácido etilendiaminotetracético), protegido da luz com papel laminado que, logo após, era centrifugado. O plasma era armazenado em microtubos envoltos em papel laminado em alíquotas de 300 µL e congelado no freezer a - 80° C para posterior dosagem de vitaminas.

- Um frasco sem EDTA que era encaminhado do Serviço de Bioquímica do HCPA para realização dos exames que constam no protocolo e outros de que houvesse necessidade clínica particular.

- Um frasco sem EDTA, com gel separador, que, após centrifugação, era encaminhado para dosagens de lipídios totais, colesterol e triglicerídeos no laboratório Weinmann, sob a supervisão do Dr. Olivir Schenkel.

Para os controles, além dos exames pré-operatórios que deveriam realizar, era solicitada a autorização dos pais (Anexo VI) para coletar amostras de sangue para as dosagens

de vitaminas. O sangue coletado era distribuído em 2 frascos: um com EDTA que se armazenava no freezer a -80°C , da mesma forma que os dos casos, e um sem EDTA, com gel separador para ser encaminhado ao laboratório Weinmann para as dosagens de lipídios totais, colesterol e triglicérides.

Tabela 8 - Avaliações laboratoriais realizadas no estudo

Exame	Método	Valores normais
Bilirrubina Total	Colorimetria	0,3 - 1,2 mg/dL
Bilirrubina Direta	Colorimetria	até 0,2 mg/dL
Aspartatoaminotransferase (AST)	Método enzimático cinético em ultravioleta	até 20 U/l
Alaninoaminotransferase (ALT)	Método enzimático cinético em ultravioleta	até 25 U/l
Gama Glutamiltransferase (γ GT)	Colorimetria	até 28 U/l
Albumina	Colorimetria	3,4 - 4,8 g/dL
Fosfatase Alcalina (FA)	Colorimetria	até 15 a - 680 U/l 15 - 17 a - 480 U/l Homem - 80 - 300 Mulher - 64 - 300
Lipídios totais	Turbidimetria	400 - 700 mg%
Colesterol	Colorimetria	até 200 mg%
Triglicéridos	Colorimetria	até 200 mg%
α Tocoferol (vitamina E)	HPLC	< 12 anos - acima de 3 μmL^* > 12 anos - acima de 5 $\mu\text{g/mL}$
Vitamina E/gr de lipídios	HPLC/Turbidimetria	< 12 anos - > 0,6 mg/gr lipídio* > 12 anos - > 0,8 mg/gr lipídio
Vitamina D	Radioimunoensaio	9-52 ng/mL**

* Valores referências de Sokol e colaboradores (1990).

** Referência de estudo em crianças (Phillips, 2001).

4.4 - Estudo 1 - Dosagem de Vitamina E

4.4.1 - Primeira Fase da Dosagem de Vitamina E

A técnica de dosagem para a tocoferol foi o método descrito por Julianto e colaboradores (1999).

4.4.1.1 - Método

Para o desenvolvimento do método foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta precisão (*High Precision Liquid Chromatografia* - HPLC) - SHIMADZU SSCL - 10 A, equipado com duas bombas de fluxo LC - 10 AD. Detector de Absorvância UV - VIS SPD - 10 A e integrador C - R6A Chromatopac, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão.

Os acessórios e as condições utilizados para o desenvolvimento da técnica por HPLC encontram-se na tabela 9.

Tabela 9 - Condições cromatográficas para adequação do método por HPLC utilizada na determinação de α tocoferol no plasma humano - 1ª fase

Fase móvel	Tetrahydrofurano 6% em metanol
Coluna	Coluna Spherisorb ODS - 2 UM (250 x 4 MM)
Pré-coluna	Lichrospher® 100 RP-18 (5 μ m)/Lichrocart® 4 - 4 Acoplador Manu - CART® 4 mm
Detector	Luz ultravioleta ($\lambda = 292$ nm)
Sensibilidade de detecção	0,005 AUFS
Fluxo	1,5 mL/min
Volume de injeção (<i>loop</i>)	50 μ L
Quantificação	altura do pico

4.4.1.2 - Preparação do Padrão e Extração do Plasma

É preparada uma solução a partir do padrão de α tocoferol Sigma (St. Louis, MO, USA) diluída na mesma solução que será utilizada para a extração do plasma: Acetonitrila e Tetrahydrofurano [3:2] (ACT / THF).

A extração do plasma é realizada a partir dos seguintes procedimentos:

- 100 ml plasma + 200 mL de ACT/THF.
- Vortex por 2 minutos.
- Centrifugar a 12.800 gr por 20 minutos.
- Retirar o sobrenadante e injetar na coluna.
- Proceder à leitura.

4.4.1.3 - Validação do Método

Para a validação do método, é necessário seguir as seguintes etapas: curva de calibração, precisão e recuperação.

Na curva de calibração utilizamos a solução padrão já descrita e preparamos a curva conforme demonstra a figura 11.

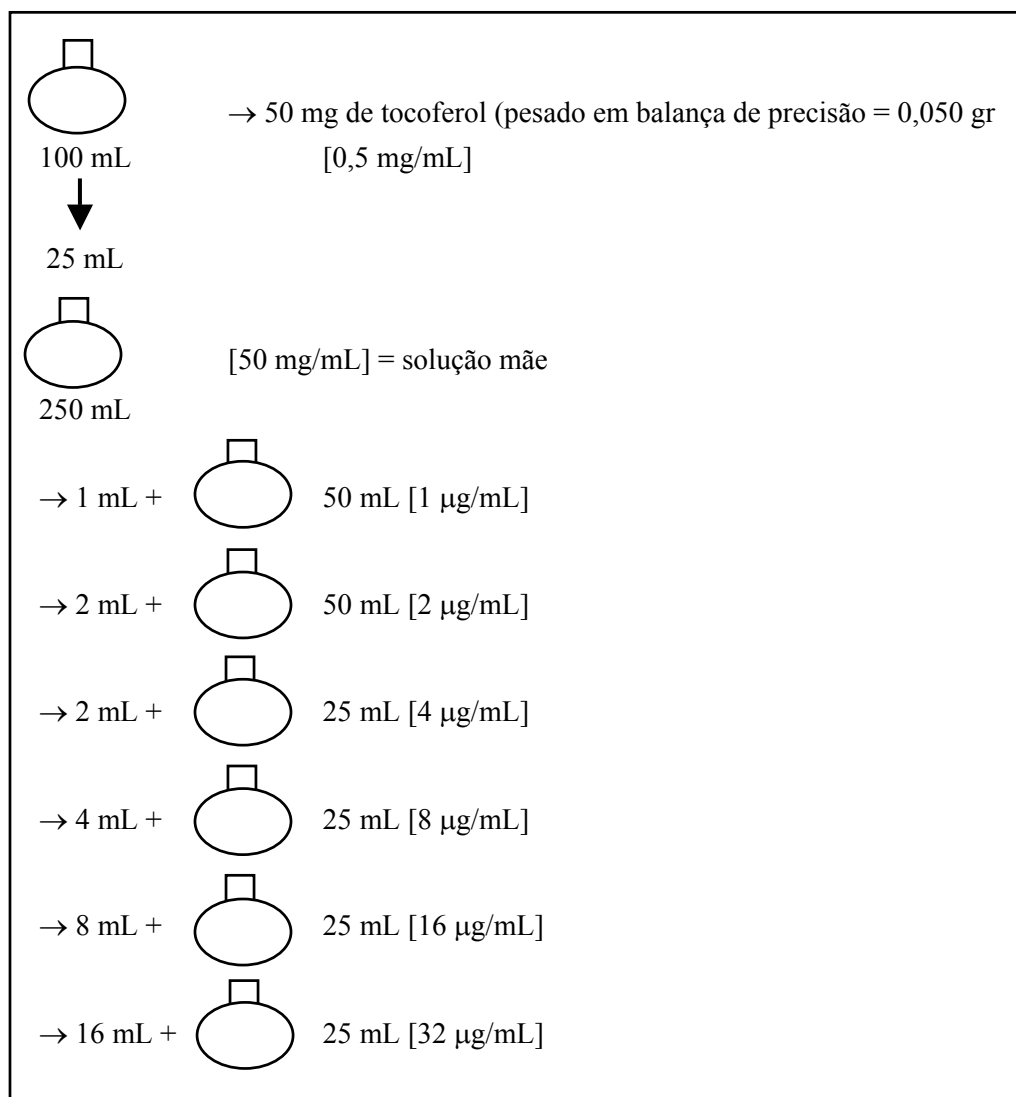


Fig. 11 - Preparação da curva de calibração da vitamina E - 1ª fase.

Para testar a precisão, é necessário realizar o doseamento do mesmo plasma por 10 vezes, utilizando-se a mesma extração, comparando-o com os valores obtidos pelo padrão.

4.4.2 - Segunda Fase da Dosagem de Vitamina E

Revisando novamente a literatura, optamos por utilizar a técnica de extração descrita por Weinmann e colaboradores (1999).

4.4.2.1 - Método

Foi utilizado o mesmo equipamento de HPLC com as condições descritas na tabela 10.

Tabela 10 - Condições cromatográficas para adequação do método por HPLC utilizada na determinação de α tocoferol no plasma humano - 2^a fase

Fase móvel	Metanol 95% em água
Coluna	Coluna Spherisorb ODS - 2 e 5 UM (250 x 4 MM)
Pré-coluna	Lichrospher [®] 100 RP-18 (5 μ m)/Lichrocart [®] 4 - 4 Acoplador Manu - CART 4 mm
Detector	Luz ultravioleta ($\lambda = 292$ nm)
Sensibilidade de detecção	0,005 AUFS
Fluxo	1,5 mL/min
Volume de injeção (<i>loop</i>)	100 μ L
Quantificação	Área do pico

Onde: AUFS = *Absorbance units of full scale*

4.4.2.2 - Preparação do Padrão e Extração do Plasma

A solução padrão é preparada a partir do mesmo padrão de α tocoferol utilizado na 1^a fase porém diluído em Metanol.

A extração é realizada a partir das seguintes etapas:

- 100 μ L de soro com 100 μ L de fase móvel.
- Vortex por 1 minuto.
- Adicionar 100 μ L de Hexano.
- Vortex 2 minutos e centrifugar 4.500 RPM x 10 minutos.

- Retirar o sobrenadante ($\pm 50 \mu\text{L}$).
- Colocar em frasco âmbar (Viels) e evaporar com Nitrogênio.
- Ressuspender em fase móvel (130 mL)
- Injetar no HPLC.

4.4.2.3 – Validação do Método

Novamente é realizada a validação do método a partir das etapas: curva de calibração, precisão e recuperação.

Com a solução padrão diluída em metanol preparou-se a curva de calibração conforme é descrito na figura 12.

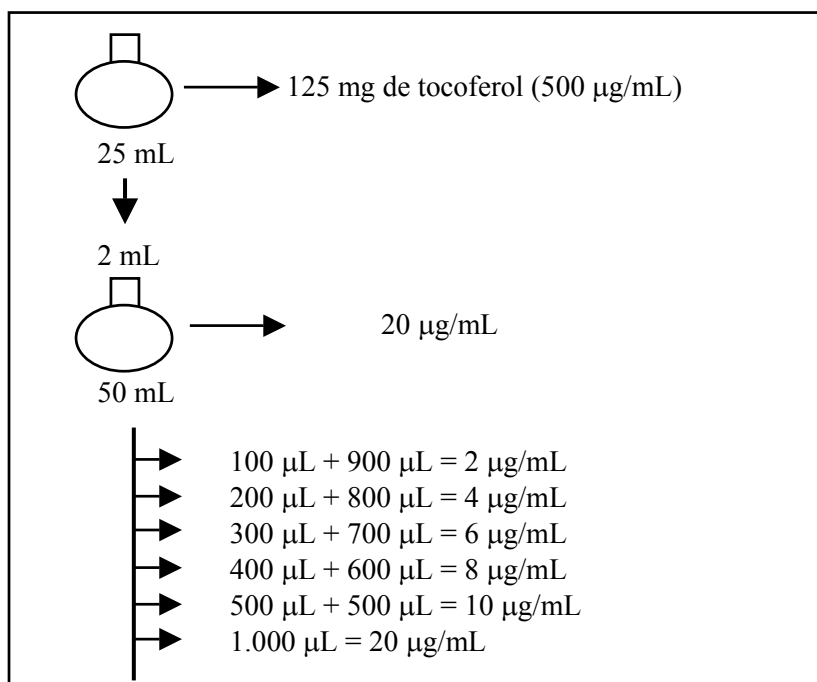


Fig. 12 - Preparação da curva de calibração da vitamina E - 2ª fase.

Para realizar a precisão e a recuperação foi utilizado um pool de plasma oriundo de adultos doadores de sangue, supostamente normais, que realizaram exames sorológicos. Esse sangue não permaneceu sob os cuidados de proteção a luz durante a realização da coleta e armazenamento até a realização do pool. Por isso, após obter estes plasmas e realizar algumas extrações e algumas dosagens, obtiveram-se valores muito baixos. Por obter valores muito baixos de vitamina E nesse pool de plasma, foi adicionada a ele a referida vitamina, realizando-se novas dosagens para verificar a precisão do método

Juntamente com as dosagens do padrão e pool de plasma, realizamos a recuperação de um ponto que consideramos como um piloto para definir se prosseguiríamos a validação deste método.

4.4.3 - Terceira Fase da Dosagem de Vitamina E

Após encontrar dificuldades na validação dos métodos descritos, optamos por adaptar as duas técnicas utilizando basicamente a extração do primeiro método com a fase móvel do segundo método.

4.4.3.1 - Método

Novamente utilizamos o HPLC com algumas modificações nas condições cromatográficas descritas na tabela 11.

Tabela 11 - Condições cromatográficas para a adequação do método por HPLC utilizada na determinação de α tocoferol no plasma humano - 3^a fase

Fase móvel	Metanol/água 95:5
Coluna	Coluna Spherisorb ODS - 2 e 5 UM (250 x 4 MM)
Pré-coluna	Lichrospher [®] 100 RP-18 (5 μ m)/Lichrocart [®] 4 - 4 Acoplador Manu - CART 4 mm
Detector	Luz ultravioleta ($\lambda = 292$ nm)
Sensibilidade de detecção	0,005 AUFS
Fluxo	1,5 mL/min
Volume de injeção (<i>loop</i>)	100 μ L
Quantificação	Área de pico

Onde: AUFS = *Absorbance units of full scale*

4.4.3.2 - Preparação do Padrão e Extração das Amostras

A solução padrão foi a mesma utilizada na segunda fase, ou seja, α tocoferol diluído em metanol, enquanto a extração foi idêntica à da primeira fase, ou seja:

- 100 μ L plasma + 200 μ L de ACT/THF.
- Vortex por 2 minutos.
- Centrifugar a 12.800 gr por 20 minutos.
- Retirar o sobrenadante e injetar na coluna.
- Proceder a leitura.

4.4.3.3 – Validação do Método

Repetimos as etapas da validação para o novo método. Utilizando-se a solução padrão de tocoferol diluída em metanol, preparou-se nova curva de calibração com seis pontos (1 $\mu\text{g/mL}$; 2 $\mu\text{g/mL}$; 4 $\mu\text{g/mL}$; 8 $\mu\text{g/mL}$; 16 $\mu\text{g/mL}$; 32 $\mu\text{g/mL}$) da mesma forma que como foi descrita no item 3.5.2.1.

Após extrair o mesmo plasma por 10 vezes, foi verificada a precisão do método.

A recuperação foi realizada a partir de uma curva de concentrações descritas na figura 13.

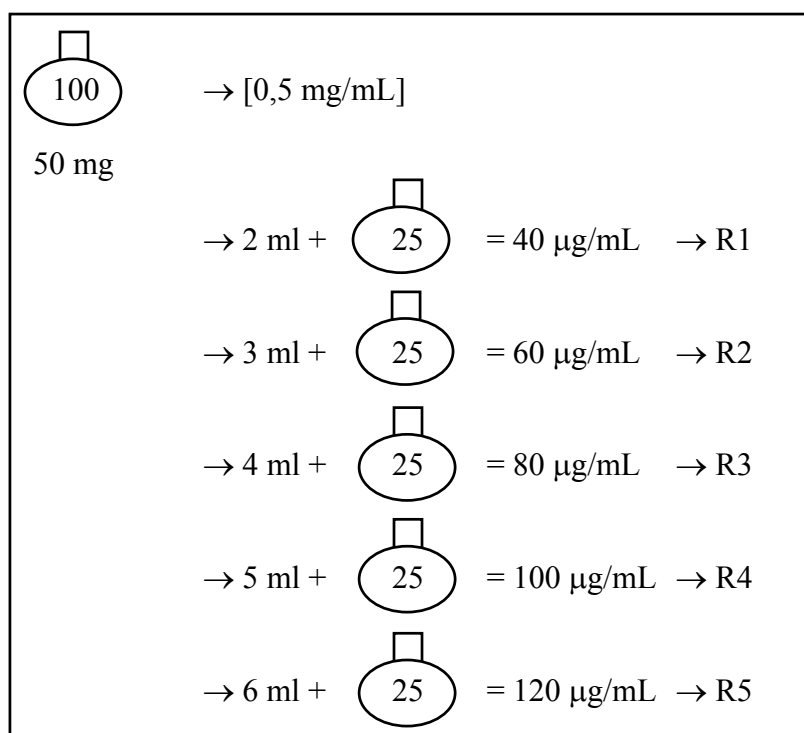


Fig. 13 - Preparação da curva de concentrações da vitamina E para recuperação.

Para extração do plasma puro, utilizou-se a diluição apenas com 200 µL de ACT/THF. Para a extração do plasma adicionado, foi utilizado 100 µL do padrão e 200 µL de ACT/THF. Por isso, antes de calcularmos a recuperação, fez-se um ajuste matemático para padronizar as diluições em 1:3 para o plasma puro e 1:4 para o plasma adicionado. Após tal ajuste, calculou-se a recuperação com a seguinte fórmula:

$$R\% = [CF - CA/CP] \cdot 100$$

Onde: R% = Percentual de recuperação
CF = Concentração da substância de referência + amostra
CA = Concentração da amostra
CP = Concentração da substância adicional

4.4.3.4 - Dosagens das Amostras

A realização das dosagens foi iniciada, utilizando-se os soros armazenados de casos e controles, com a seguinte sistemática:

- Dosagem do padrão.
- Dosagem do pool de plasma previamente preparado.
- Dosagem das amostras.

4.5 - Estudo 2 - Dosagem da Vitamina D

A técnica utilizada foi por radiomunoensaio, com um kit *25-hydroxyvitamin D (25-OH-D)* - Nichols Institute Diagnostics - Paris. Foi desenvolvida no laboratório de Radioi-

munoenensaio do HCPA juntamente com a Dra. Lígia Beatriz Crosseti e sob a supervisão do Dr. José Romildo de Jesus.

4.5.1 - Método

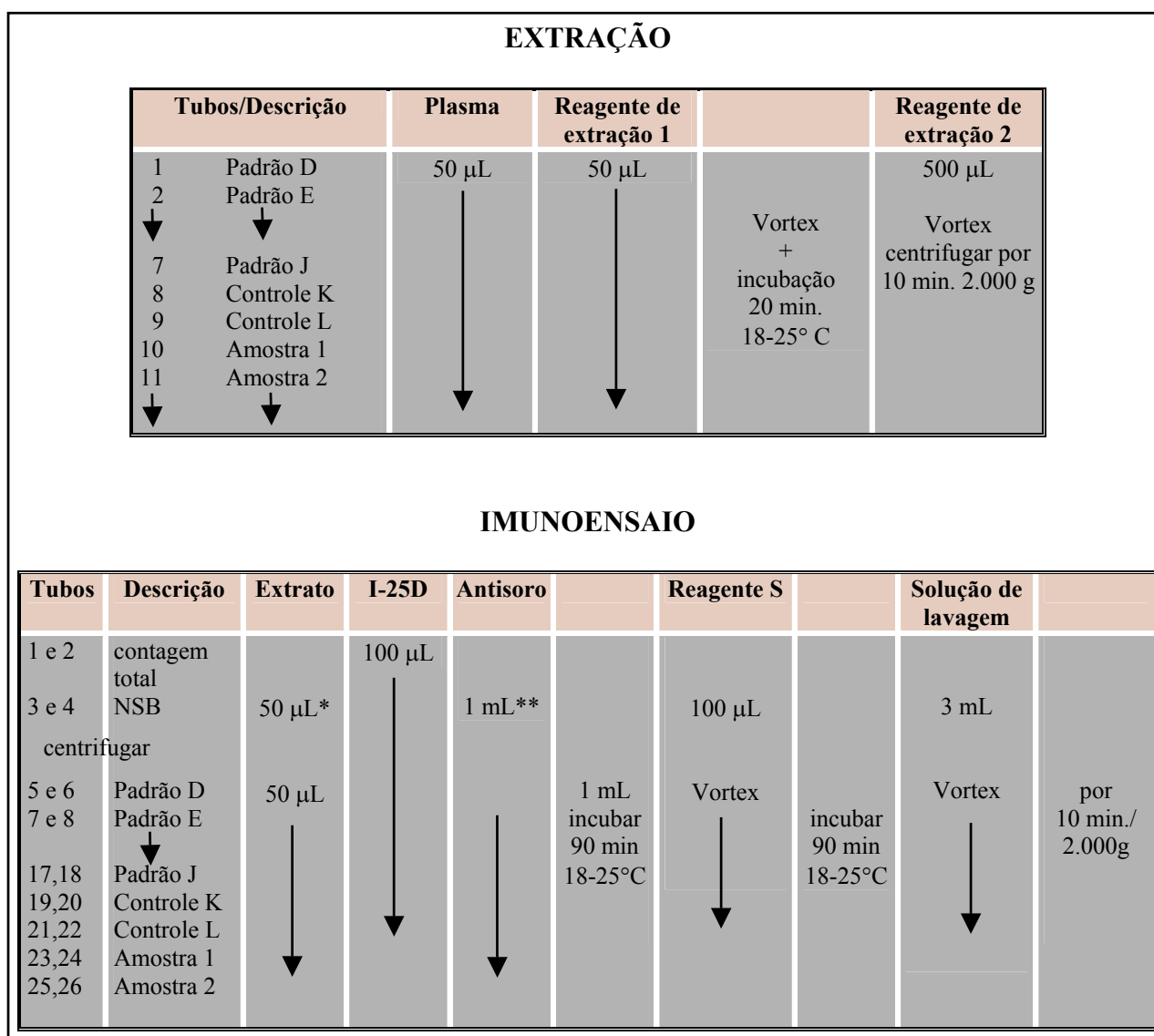
O método baseia-se na extração com hidróxido de sódio e acetonitrila que causa precipitação das proteínas séricas e extração de 25-OHD. Após centrifugação, porções do sobrenadante são incubadas com um traçador de iodo marcado (25-OHD¹²⁵ I) e com um anticorpo policlonal de ovelha anti-25-OHD altamente específico. A separação do traçador ligado ao anticorpo do traçador livre é obtida por uma curta incubação com sac-gel[®] (IgG celulose anti-soro de ovelha) seguido por centrifugação e decantação. Após decantar o sobrenadante, exceto nos tubos da contagem total, invertem-se os tubos em um papel absorvente para remover a fase líquida. Colocam-se todos os tubos com o precipitado na gama-câmara por 1 minuto (Contador de radiação gama Packard Auto-gama[®] COBRA).

4.5.2 - Validação do Método

Para validação do método, o kit já descrito conta com a utilização de padrões e controles conforme é demonstrado na figura 14. A partir desses padrões é realizada uma curva de calibração com valores em nmol/L ou ng/mL.

Para avaliar a precisão do método, os fornecedores descrevem um coeficiente de variações entre 5,3% a 6,1% nas dosagens intraensaio e um coeficiente de variação entre 7,3% a 8,1% nas dosagens interensaio.

Para avaliar a recuperação foram utilizados 4 pontos de concentração em que foram adicionados 20 e 40 nmol/L em cada ponto. A recuperação média descrita foi de 101,9%.



* Extrato padrão.

** NSB = Tampão de fosfato.

Fig. 14 - Demonstração esquemática das etapas de extração e de imunoenensaio da 25OHD.

5 - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

5 - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

O programa estatístico utilizado para análise dos resultados foi o SPSS (*Statistical Package for Social Science*). A população estudada foi descrita através de percentual, média, mediana, desvio padrão e percentis. O teste T paramétrico foi utilizado para avaliar os resultados com comportamento normal entre os dois grupos (colestáticos e controles): idade, lipídios totais, colesterol, triglicerídeos e vitamina D. Os demais testes estatísticos foram não paramétricos por não haver uma distribuição normal das variáveis de interesse. O teste de qui-quadrado foi utilizado para as comparações entre variáveis qualitativas (gênero, grupo, estado nutricional, e uso de suplementação oral) enquanto que o teste U de Mann-Whitney para as variáveis quantitativas (idade, níveis plasmáticos, tempo de colestase). As correlações entre níveis plasmáticos com o tempo de colestase foram analisadas pelo coeficiente de Spearman. Em todos os testes citados foram considerados como significativos um valor $P < 0,05$.

6 - CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

6 - CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa “Níveis séricos de α tocoferol em crianças e em adolescentes com colestase crônica” foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), registrado no Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) com o número 00-352.

O segundo projeto de pesquisa “Níveis séricos de vitamina D em crianças e adolescentes com colestase crônica” foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do HCPA, registrado no GPPG com o número 02-075.

Os consentimentos informados foram assinados pelos pais ou responsáveis das crianças e dos adolescentes, conforme os Anexos I e VI já relatados.

7 - RESULTADOS

7 - RESULTADOS

7.1 - Características dos Pacientes Estudados

Participaram do estudo 22 crianças e adolescentes com colestase crônica, sendo 13 do sexo feminino (59,1%) e 9 do sexo masculino (40,9%). A mediana de idade foi 3,6 anos com variações entre 4 meses e 18 anos.

Para os níveis séricos de lipídios totais, colesterol e triglicerídeos, assim como para os níveis plasmáticos das vitaminas D e E, participaram como controles 17 crianças normais, sendo 13 do sexo masculino (76,5%) e 4 do sexo feminino (23,5%). A mediana de idade foi 4,3 anos com variações entre 5 meses e 13 anos.

Os valores de gênero e de idade dos pacientes colestatícos e controles são demonstrados nas tabelas 12 e 13, não havendo diferença estatística entre os dois grupos.

Tabela 12 - Distribuição dos pacientes e dos controles quanto ao gênero (teste de Qui-quadrado)

	Colestáticos	Controles
Masculino	13 (59,1%)	13 (76,5%)
Feminino	9 (40,9%)	4 (23,5%)

P = 0,42

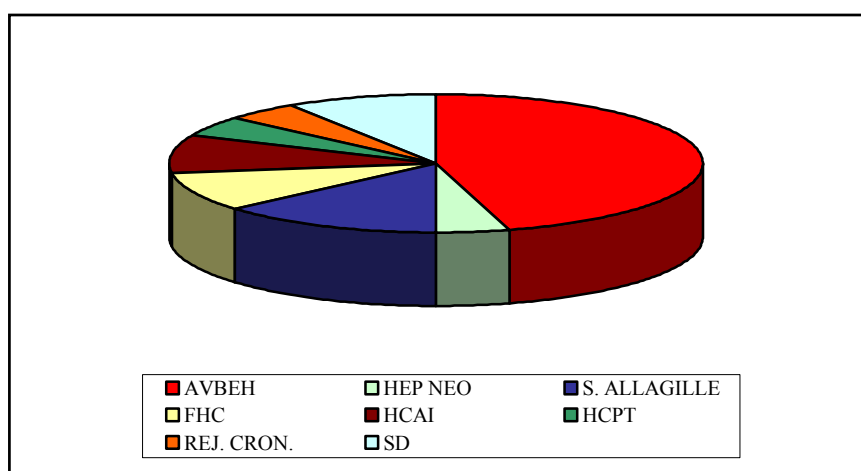
Tabela 13 - Distribuição dos pacientes e dos controles quanto a idade (teste T paramétrico)

	Média	Desvio-padrão	Mediana	P25	P75	Mínimo	Máximo
Colestáticos	6,1 anos	5,9 anos	3,6 anos	10 meses	13 anos	4 meses	18 anos
Controles	6,3 anos	4,6 anos	4,3 anos	2 meses	10,8 anos	5 meses	13 anos

P = 0,235

Os diagnósticos etiológicos da colestase crônica foram: atresia de vias biliares (AVBEH) em 10 crianças (45,5%); hepatite neonatal (HepNeo) em 1 criança (4,5%); síndrome de Alagille (S. Alagille) em 3 crianças (13,6%); fibrose hepática congênita-forma colestática (FHC) em 2 crianças (9,1%); hepatite Crônica Autoimune (HCAI) em 2 crianças (9,1%); Hepatite viral C pós-transplante (HCPT) em 1 criança (4,5%) e rejeição crônica (RejCron) em 1 criança (4,5%). Não foi possível definir o diagnóstico em 2 crianças (9,1%).

A figura 15 demonstra a freqüência dos diferentes diagnósticos.

**Fig. 15** - Distribuição dos pacientes por etiologia da colestase.

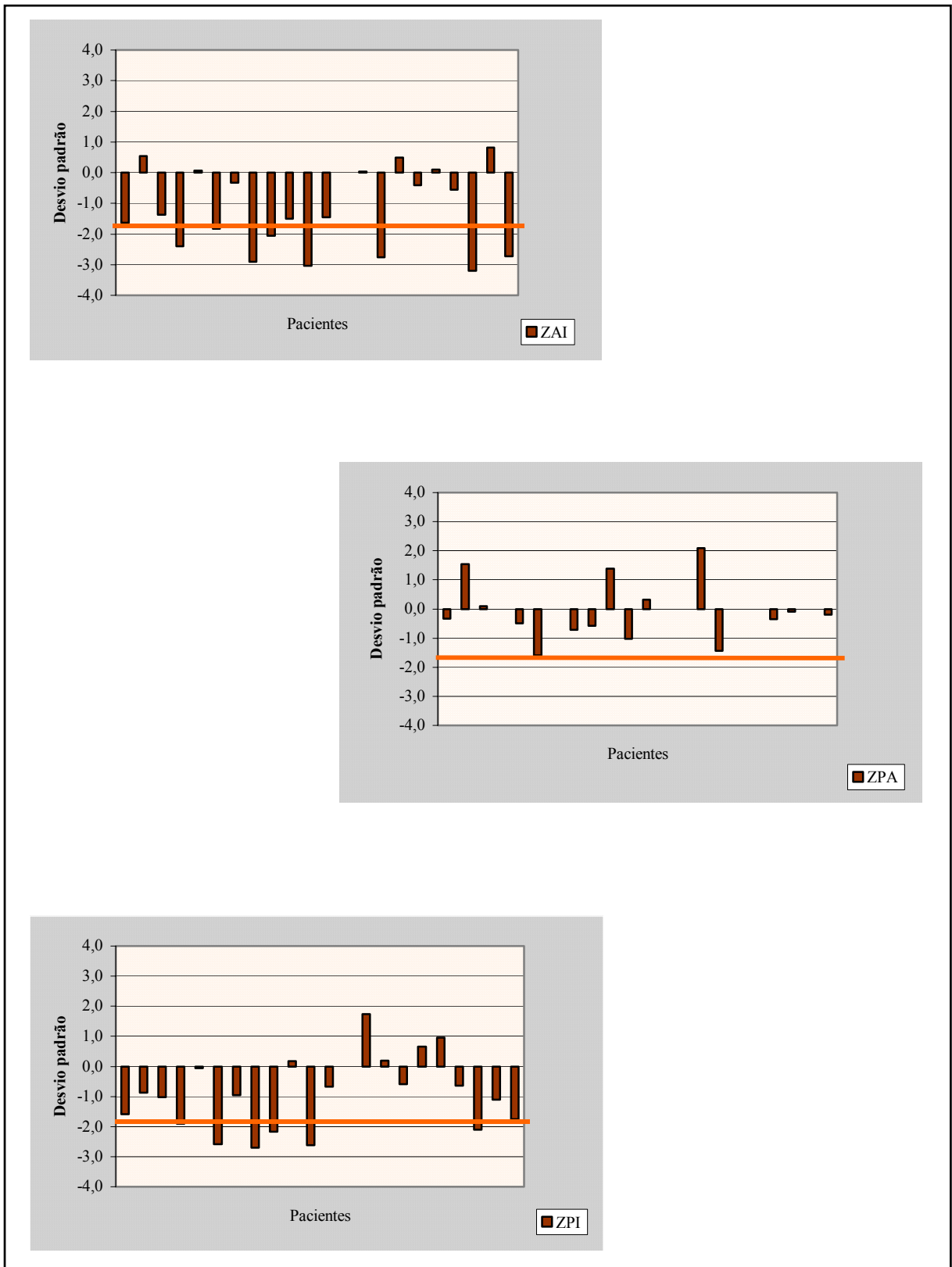
Na avaliação antropométrica pelas tabelas do NCHS, observamos uma prevalência de 36% de desnutrição para peso e 41% para estatura em relação à idade e ao sexo. Nas medidas de circunferência braquial, circunferência muscular do braço e prega cutânea tricipital constatamos uma prevalência de desnutrição em 63%, 59% e 50%, respectivamente. Os valores em percentis para as referidas medidas podem ser vistos na tabela 14.

Tabela 14 - Distribuição dos pacientes quanto ao estado nutricional em percentis a partir das tabelas de NCHS e Frisncho

Percentil	Peso (%)	Altura (%)	CB (%)	CMB (%)	PCT (%)
< 5	36,4	40,9	63,6	59,1	50
< 10	4,5	22,7	18,2	13,6	9,1
< 50	27,3	13,6	13,6	22,7	31,8
< 75	18,2	13,6	4,5	4,5	4,5
< 95	9,1	9,1	0	0	4,5
≥ 95	4,5	0	0	0	0

Onde: CB - Circunferência do braço
 CMB - Circunferência muscular do braço
 PCT - Prega cutânea tricipital

Na avaliação antropométrica pelo Escore Z, obtivemos uma prevalência de desnutridos para os critérios altura/idade e peso/idade de 33,3% e 23,8%, respectivamente. Quando avaliado o peso em relação à altura, não observamos valores abaixo de 2 desvio padrão. Estes valores são demonstrados na figura 16.



Onde: ZAI = Escore Z para altura/idade
 ZPA = Escore Z para peso/altura
 ZPI = Escore z para peso/idade

Fig. 16 - Distribuição dos pacientes quanto ao escore Z.

O inquérito alimentar dos pacientes demonstrou uma ingestão média de $89,33 \pm 27,4\%$ em relação a RDA de acordo com sexo e idade. Os valores de proteínas, lipídios e glicídios são demonstrados em percentuais em relação às calorias totais ingeridas (VET) na tabela 15. A ingestão de cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), ferro (Fe) e zinco (Zn) em relação a RDA são demonstrados na tabela 16.

Tabela 15 - Ingestão dos macronutrientes em relação às calorias totais ingeridas

	% Médio	% Desvio-padrão
Proteínas	13,19	$\pm 3,04$
Lipídios	30,38	$\pm 3,98$
Glicídios	57,0	$\pm 5,5$

Tabela 16 - Mediana dos percentuais dos micronutrientes ingeridos em relação ao recomendado para a idade e gênero

	Mediana (%)	P25 (%)	P75 (%)
Ca	90	57	107
P	92	66	123
Mg	108	51	134
Fe	44	33	100
Zn	40	29	59

O exame neurológico realizado nos 21 pacientes colestáticos foi normal em 12 (57%), alterado em 9 (43%) como é visto na figura 17. Foi constatada a ocorrência de 20 alterações neurológicas em 9 pacientes como demonstra a figura 18, e as características dos pacientes com alterações neurológicas estão demonstradas na tabela 17.

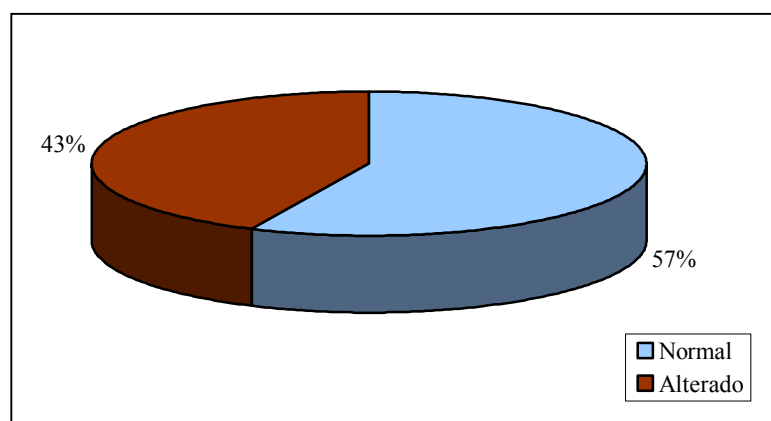


Fig. 17 - Prevalência de alterações ao exame neurológico dos pacientes estudados.

Achado Neurológico	Pacientes								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Reflexos profundos diminuídos	X						X		
2. Trofismo diminuído globalmente		X	X						X
3. Tônus muscular diminuído globalmente	X			X	X		X		X
4. Paresia em membro inferior direito					X				
5. Tremor de extremidades						X			
6. Aumento do polígono de sustentação na marcha	X						X		
7. Reflexo cutâneo-plantar extensor à D e flexor à E							X		
8. Hipertonia dos membros inferiores								X	
9. Hiper-reflexia nos membros inferiores						X			X
10. Diminuição de força no MSD (Grau IV - V)								X	
11. Incoordenação motora (prova index nariz)						X			

Fig. 18 - Descrição das alterações neurológicas observadas nos pacientes colestáticos.

Tabela 17 - Características dos pacientes com exame neurológico alterado

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Idade	3 anos	1 ano e 13 meses	7 anos e 9 meses	7 m	5 m	3 anos e 5 meses	3 anos e 11 meses	10 meses	11 anos e 5 meses
Gênero	M	F	M	M	M	M	M	F	M
Diagnóstico	Rejeição crônica*	S. de Alagille	S. de Alagille	AVBEH	AVBEH	AVBEH	S. de Alagille	AVBEH	AVBEH
Uso de suplementação oral de vitamina	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

* O diagnóstico prévio ao transplante era AVBEH
 AVBEH = Atresia de vias biliares extra-hepática
 S. de Alagille – Síndrome de Alagille

O uso regular de suplemento oral de vitaminas lipossolúveis, foi observado em 14 pacientes (63%). Os 8 pacientes restantes (36,4%) não faziam uso de medicação ou usavam de modo irregular a medicação prescrita.

Entre os nove pacientes com alterações neurológicas, apenas um não usava regularmente o suplemento oral de vitaminas lipossolúveis conforme é ressaltado na tabela 17. A mediana do tempo de colestase foi de 1 ano com variações entre 3 meses e 16 anos. Esses valores são demonstrados na tabela 18.

Tabela 18 - Mediana do tempo de colestase dos pacientes estudados

Média	Desvio-padrão	Mediana	P25	P75	Mínimo	Máximo
3 anos	4,2 anos	1 ano	6 meses	3,6 anos	3 meses	16 meses

O perfil bioquímico dos pacientes estudados é demonstrado na tabela 19.

Confrontando o tempo de colestase com os valores bioquímicos e lipídicos obtivemos correlação significativa apenas com lipídios totais e triglicerídeos, como demonstra a tabela 20.

Tabela 19 - Perfil bioquímico dos pacientes estudados

	Mediana	P25	P75	Variacão	Valor de Referência
ALT	153	125	212	83 a 675	até 25U/I
AST	139	72	190	30 - 417	até 20U/I
BT	6,35	3,20	14,30	1,6 - 38	0,3 - 1,2 mg/dl
BD	3,70	1,60	7,30	0,7 - 22,6	até 0,2 mg/dl
γ GT	155,5	80	322	33 - 850	até 28 U/I
FA	1029	737	1500	359 - 3562	480 -680 U/I
ALB	3,10	2,6	3,90	2,1 - 4,5	3,4 - 4,8 g/dl

Onde: AST - Aspartatoaminotransferase
 ALT - Alaninoaminotransferase
 BT - Bilirrubina total
 BD - Bilirrubina direta
 γ GT - Gama glutamiltransferase
 FA - Fosfatase alcalina
 ALB - Albumina

Tabela 20 - Correlação entre tempo de colestase e valores bioquímicos

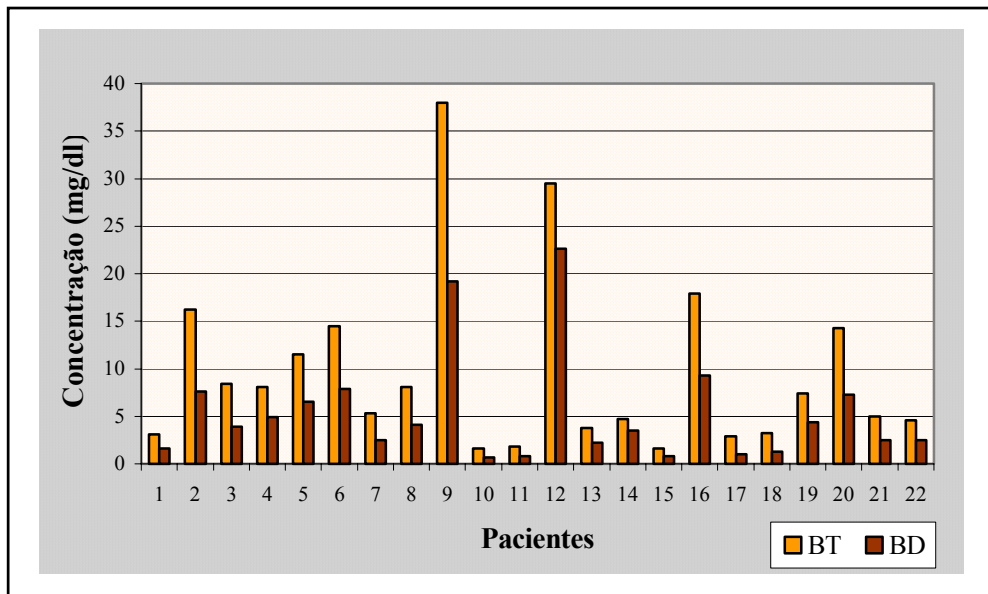
Variável estudada	Coefficiente de correlação Spearman	Nível de significância
AST	- 0,17	0,43
ALT	- 0,01	0,96
BT	- 0,13	0,54
BD	- 0,19	0,37
GGT	- 0,37	0,08
FA	- 0,21	0,34
ALB	- 0,04	0,85
LT	- 0,43	0,04
COL	- 0,28	0,20
TRI	- 0,43	0,04

Onde: AST - Aspartatoaminotransferase
 BT - Bilirrubina total
 γ GT - Gama glutamiltransferase
 ALB - Albumina

ALT - Alaninoaminotransferase
 BD - Bilirrubina direta
 FA - Fosfatase alcalina

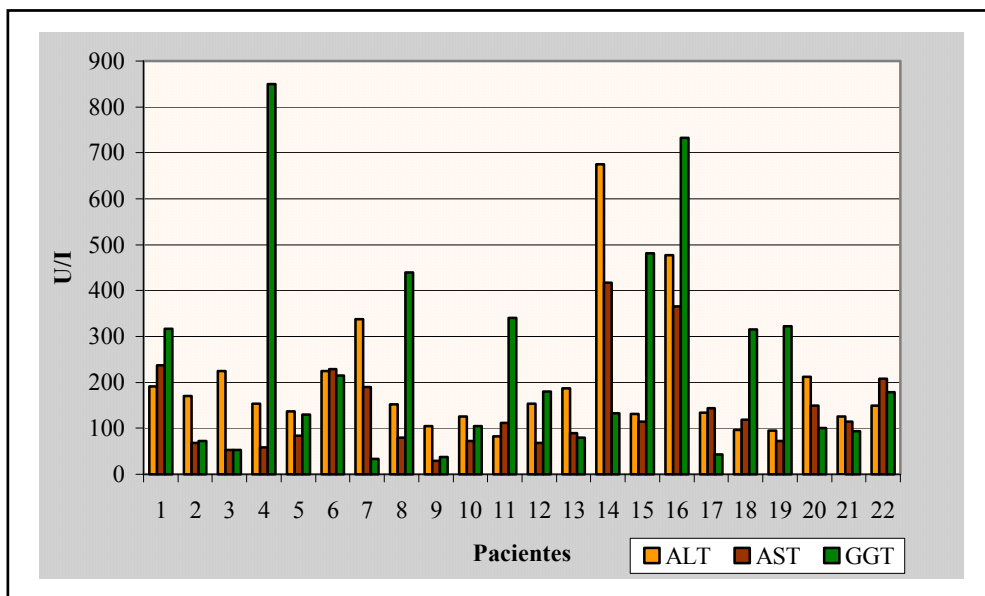
LT - Lipídios totais
 Col - Colesterol
 TRI - Triglicerídeos

As concentrações de bilirrubina direta variaram entre 0,7 a 22,6 mg/dl (figura 19). Todos os pacientes apresentavam valores de Aminotransferases, Gamaglutamiltransferase superiores aos valores de referência (figura 20). Os valores de fosfatase alcalina variaram entre 359 a 3.562 U/L com uma mediana de 1.020 U/L (figura 21). Os valores de Albumina oscilaram entre 2,1 a 4,5 g/dl com uma média de $3,10 \pm 0,72$ g/dl.



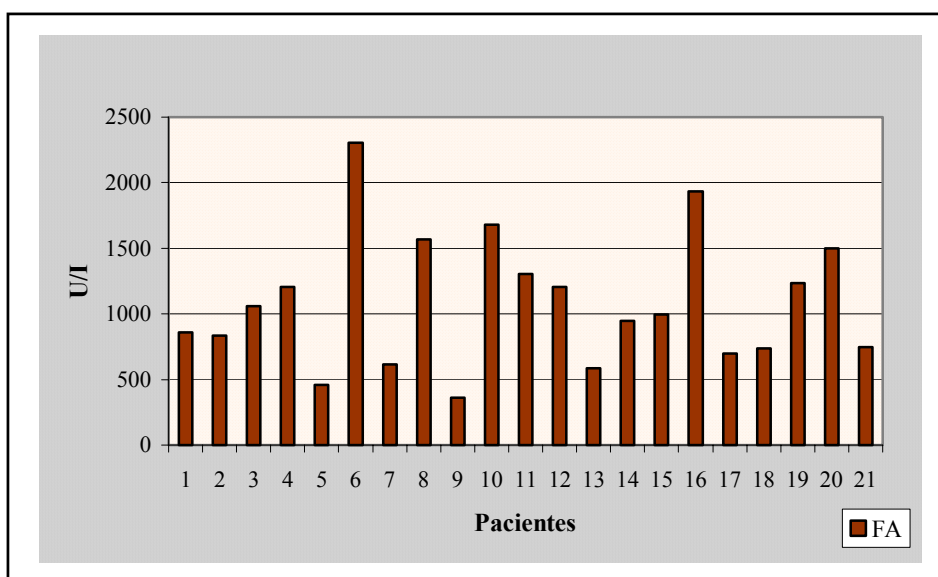
Valores normais:
 Bilirrubina Total (BT) = 0,3 a 1,2 mg/dl
 Bilirrubina Direta (BD) = até 0,2 mg/dl

Fig. 19 - Bilirrubina dos pacientes estudados.



Valores normais:
 Aspartatoaminotransferase (AST) = até 20 U/I
 Alaninoaminotransferase (ALT) = até 25 U/I

Fig. 20 - Aminotransferases (ALT e AST) e Gama glutamiltransferases (GGT) dos pacientes estudados.



Valores normais:

Fosfatase Alcalina (FA) {
 Até 15 anos = até 680 U/I
 15 a 17 anos = até 480 U/I
 Adultos = até 300 U/I

Fig. 21 - Fosfatase Alcalina (FA) dos pacientes estudados.

A tabela 21 demonstra o nível sérico de lipídios totais, colesterol e triglicerídeos que foi avaliado entre colestáticos e controles. Os valores médios entre os dois grupos não tiveram diferença estatisticamente significativa. A figura 22 demonstra os valores absolutos observados entre os 2 grupos.

Tabela 21 - Nível sérico de lipídios totais, de colesterol e de triglicerídeos dos pacientes colestáticos e controles (teste T paramétrico)

		Média (mg%)	Desvio-padrão	Nível de significância (p)
Lipídios Totais	Colestáticos	617	194	p = 0,43
	Controles	542	102	
Colesterol	Colestáticos	171	80	p = 0,10
	Controles	143	23	
Triglicerídeos	Colestáticos	144	87	p = 0,183
	Controles	106	51	

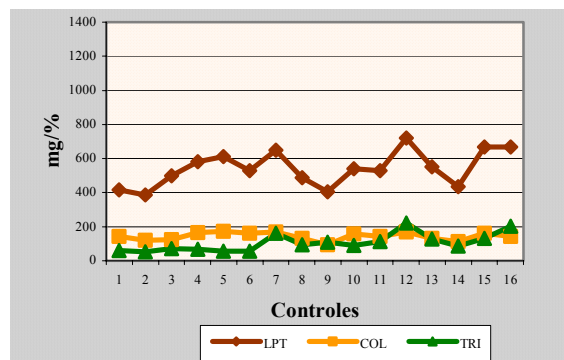


Fig. 22 - Valores absolutos de lipídios totais, de colesterol e de triglicerídeos dos pacientes colestáticos e controles.

Entre os pacientes desnutridos, definidos a partir do escore Z (A/I), obtivemos 64,3% com avaliação neurológica normal e 35,7% com exame alterado. Já entre os eutróficos 33,3% foram normais e 66,7% foram neurologicamente alterados, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p = 0,20$).

Ao relacionar o tempo de colestase com o estado nutricional a partir do escore Z (A/I) observamos que os pacientes eutróficos têm um período de colestase que varia de 3 meses a 7,7 anos, com uma mediana de 6 meses, já os desnutridos têm um período de colestase que varia de 4 meses a 16 anos com uma mediana de 12 meses. Essas diferenças não são estatisticamente significativas ($p = 0,17$).

Utilizando o escore Z para altura/idade para comparar com perfil bioquímico, não obtivemos correlação significativa como demonstra a tabela 22. Para os valores de lipídios totais, a mediana entre eutróficos foi de 792 mg% e para desnutridos foi de 535 mg%, enquanto o colesterol entre eutróficos foi de 218 mg% entre desnutridos foi de 136 mg%.

Tabela 22 - Relação entre escore Z (A/I) e valores bioquímicos (teste de Mann-Whitney)

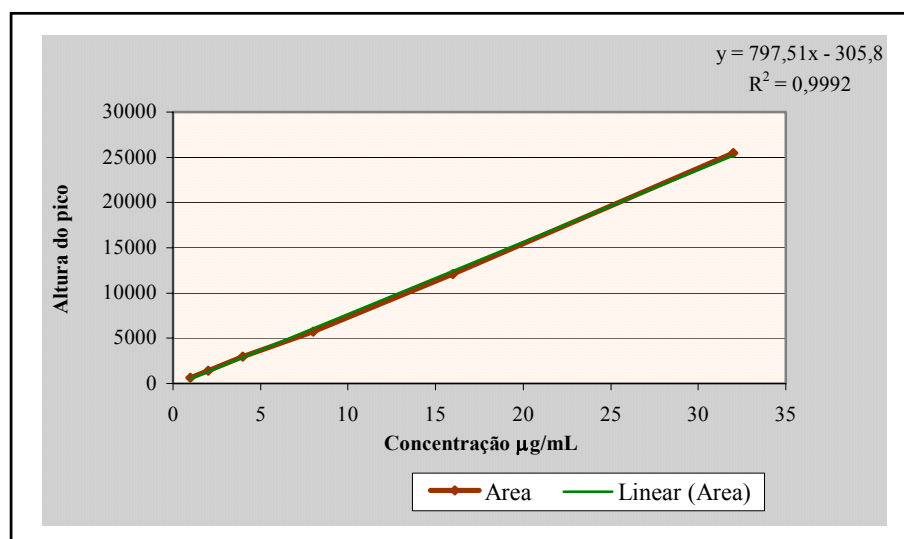
Variável a correlacionar	Eutrófico mediana	Desnutrido mediana	Significância (p)
AST	150 U/l	162 U/l	0,24
ALT	111 U/l	117 U/l	0,39
BT	8,10 mg/dL	6,35 mg/dL	0,79
BD	4,10 mg/dL	3,70 mg/dL	0,88
γ GT	341 U/l	131 U/l	0,17
FA	1303 U/l	902 U/l	0,26
ALB	3,80 g/dL	2,95 mg%	0,10
LT	792 mg%	535 mg%	0,052
COL	218 mg%	136 mg%	0,048
TRI	162 mg%	108 mg%	0,10

Onde: AST- Aspartatoaminotransferase ALT- Alaninoaminotransferase LT - Lipídios totais
 BT - Bilirrubina total BD - Bilirrubina direta COL - Colesterol
 γ GT - Gama glutamiltransferase FA - Fosfatase alcalina TRI - Triglicerídeos
 ALB - Albumina

7.2 - Dosagem de Vitamina E - 1ª Fase

7.2.1 - Validação do Método

No processo de validação do método realizou-se uma curva de calibração com seis pontos, em triplicata, demonstrada na figura 23.

**Fig. 23** - Curva de calibração de vitamina E -1ª fase.

Ao realizar a extração do plasma para o doseamento, não foi possível detectar, no cromatograma, o pico referente à vitamina E que surgiu juntamente com os demais componentes do plasma, por isso não foi possível prosseguir a validação do presente método. A figura 24 demonstra esse fato.

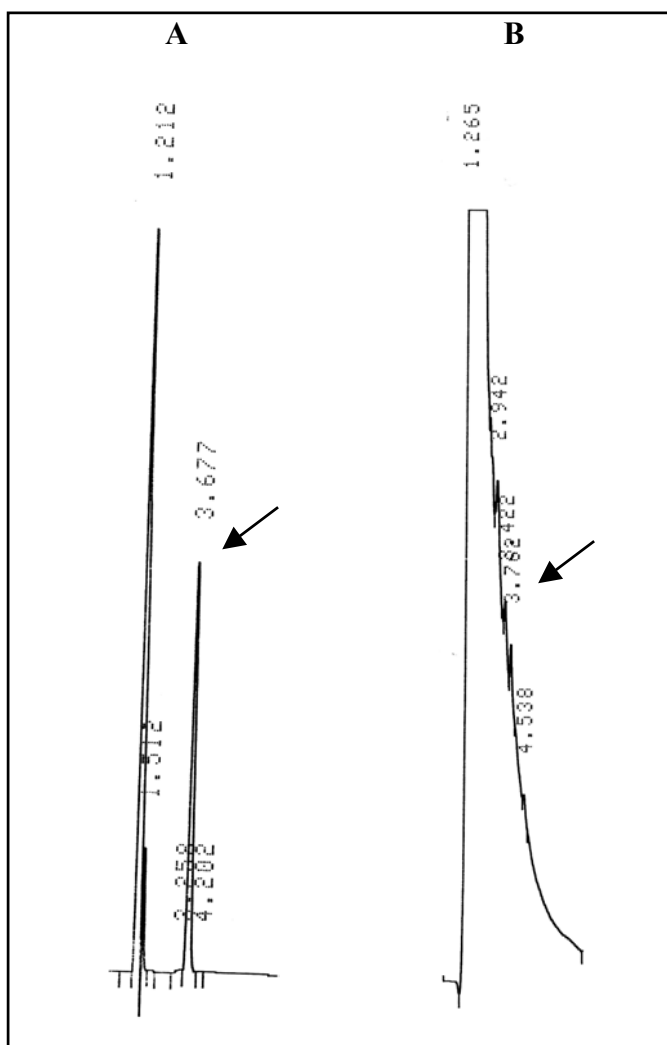


Fig. 24 - Representação cromatográfica do doseamento de vitamina E com padrão diluído e no plasma - 1ª fase:

A - Padrão diluído em acetonitrila + tetrahydrofurano.

B - Plasma extraído com acetonitrila + tetrahydrofurano.

7.3 - Dosagem de Vitamina E - 2ª Fase

O cromatograma obtido a partir do padrão diluído e do plasma extraído é demonstrado na figura 25.

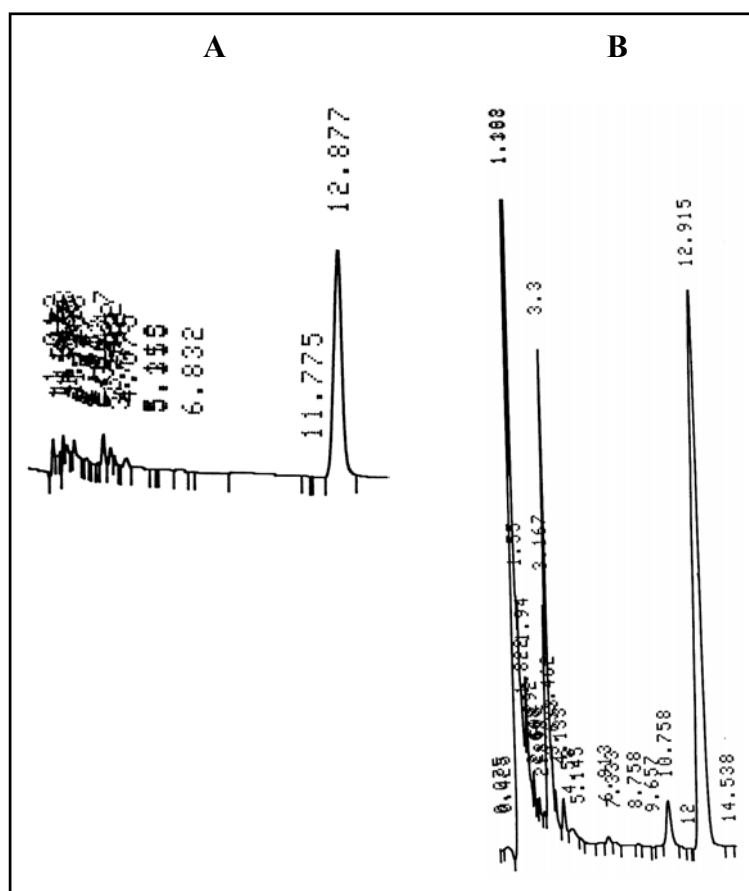


Fig. 25 - Representação cromatográfica do doseamento de vitamina E – 2ª fase:

A - Padrão diluído em metanol.

B - Plasma extraído com hexano.

7.3.1 – Validação do Método

Foram realizadas curvas de calibração com seis pontos, em triplicata. Os valores médios são demonstrados na figura 26.

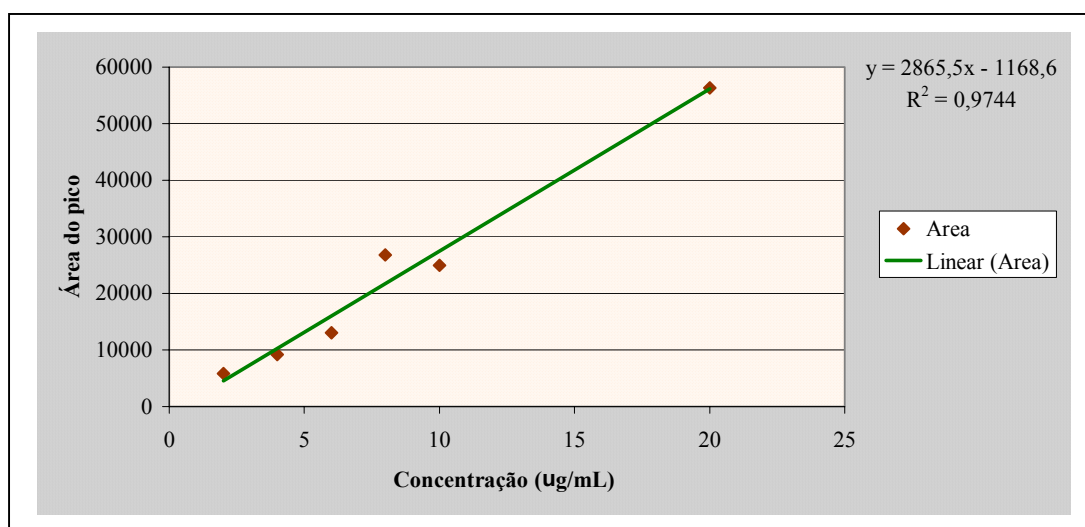


Fig. 26 - Curva de calibração da vitamina E - 2ª Fase.

Os valores para o cálculo de precisão e de recuperação estão demonstrados na tabela 23.

Tabela 23 - Demonstração das leituras e dos cálculos de precisão e de recuperação - 2ª fase

	Leitura	
Padrão de 8 µg / mL	24.229	} $\bar{X} = 29229$ $\delta = 10194$ CV = 20%
	36.511	
	25.378	
	18.586	
	43.741	
Pool de plasma	82.462	} $\bar{X} = 97562$ $\delta = 34380$ CV = 35,34%
	75.725	
	63.124	
	75.045	
	140.754	
	160.316	
	91.723	
	91.352	
Pool de plasma + 8 µg/mL	180.223	} $\bar{X} = 155899$ $\delta = 18919$ CV = 20%
	161.560	
	140.814	
	133.128	
	163.773	
Cálculo de recuperação	129,8%	

Onde: \bar{X} = Média
 δ = Desvio padrão
 CV = Coeficiente de variação

Considerando as dificuldades técnicas de extração associadas a resultados com baixa precisão, optamos por testar a 3ª técnica.

7.4 - Dosagem de Vitamina E - 3ª Fase

O cromatograma obtido a partir do padrão diluído do plasma extraído é demonstrado na figura 27.

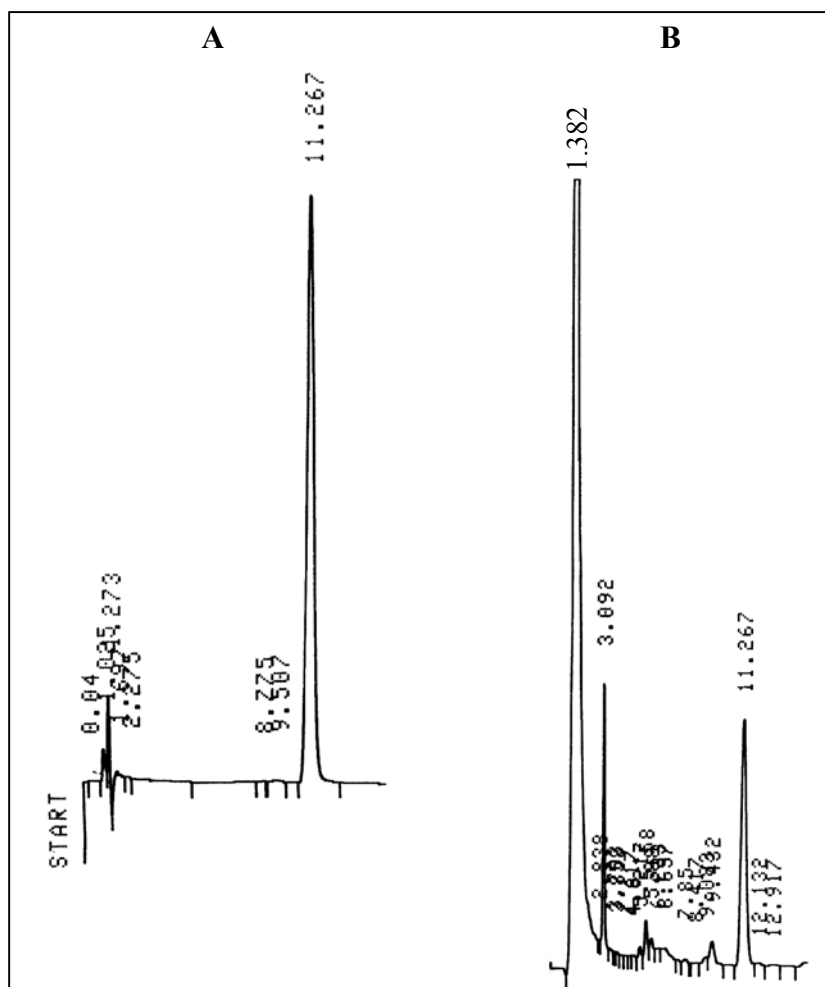


Fig. 27 - Representação cromatográfica do doseamento de vitamina E – 3^a fase:

A - Padrão diluído em metanol.

B - Plasma extraído com acetonitrila + tetrahydrofurano.

7.4.1 – Validação do Método

Foram realizadas curvas de calibração com seis pontos em triplicata. Os valores médios são demonstrados na figura 28.

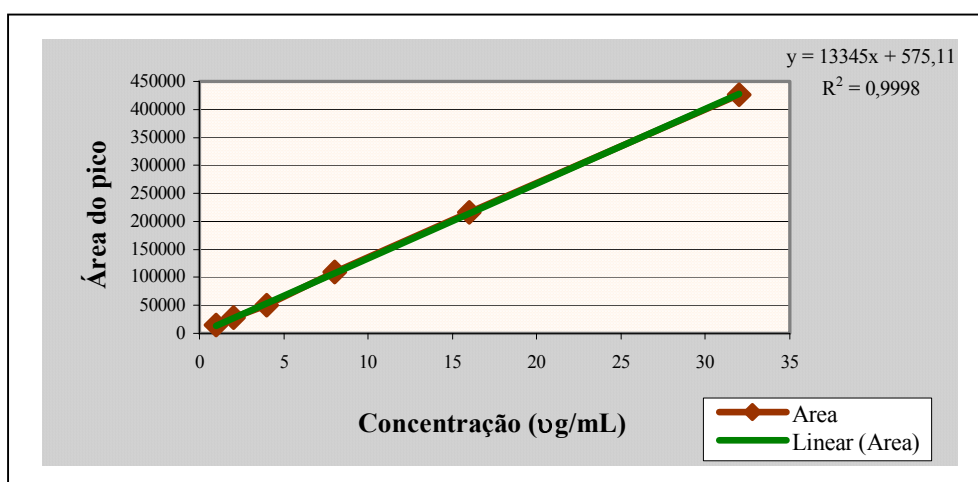


Fig. 28 - Curva de calibração da vitamina E - 3ª fase.

Os valores obtidos do mesmo plasma para o cálculo da precisão estão demonstrados na tabela 24.

Tabela 24 - Demonstração das leituras e dos cálculos de precisão - 3ª fase

Padrão (8 µg/mL) → 42.843	
Plasma	
1º	= 38.614
2º	= 37.745
3º	= 38.044
4º	= 36.660
5º	= 36.388
6º	= 37.481
7º	= 37.736
8º	= 38.974
9º	= 38.636
10º	= 37.843
$\bar{X} = 37.812$ $\delta = 830,12$ CV = 2,20% Valor médio do plasma - 7,06 µg/mL	

Onde: \bar{X} = Média δ = Desvio-padrão CV = Coeficiente de variação

A recuperação foi obtida a partir de uma curva de concentrações e foi realizado um ajuste matemático para as diferentes diluições conforme já foi descrito. Os valores de recuperação são demonstrados na tabela 25.

Tabela 25 - Demonstração das leituras e cálculos da recuperação - 3ª fase

Plasma puro		R1	R2	R3	R4	R5
Diluição (µL)	Plasma 100 ACT/THF200 1:3	Plasma 100 40 µg/mL 100 ACT/THF200 1:4	Plasma 100 60 µg/mL 100 ACT/THF200 1:4	Plasma 100 80 µg/mL 100 ACT/THF200 1:4	Plasma 100 100 µg/mL 100 ACT/THF200 1:4	Plasma 100 120 µg/mL 100 ACT/THF100 1:4
Valores obtidos (µg/mL)	7,06	22,3	43,5	53,8	84,1	101,47
Ajuste Matemático 1:4	2,34	5,57	10,87	13,45	21,02	25,36
%R		32,3%	56,8%	55,5%	74,4%	76,7%

Onde: ACT/THF = Acetonitrila + tetrahydrofurano
%R = Percentual de recuperação

7.4.2 - Dosagens das Amostras

Mesmo observando-se uma recuperação baixa, resolveu-se dosar o nível plasmático de vitamina E em 22 amostras para testar o método. Os valores descritos na tabela 26 são considerados muito baixos, tanto para caso como controle. Esse fato confirma uma baixa sensibilidade do método utilizado que nos impede de emitir conclusões.

Tabela 26 - Níveis plasmáticos de vitamina E obtidos

Indivíduos	Colestáticos N = 15 ($\mu\text{g/mL}$)	Controles N = 7 ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,53	
2		2,73
3	0,46	
4	2,84	
5		0,34
6	2,38	
7	29,82	
8	0,75	
9		0,08
10	0,79	
11		0,65
12	0,13	
13	1,36	
14	0,15	
15		Não detectou pico
16		0,014
17		0,116
18	0,48	
19	0,29	
20	0,65	
21	2,05	
22	0,09	
Média	2,85	0,56

7.5 - Dosagem de Vitamina D

7.5.1 – Validação do Método

O kit utilizado já consta de etapas de validação como foi descrito anteriormente. A curva de concentrações obtidas, através de padrões, antes de analisar as amostras, é demonstrada na figura 29.

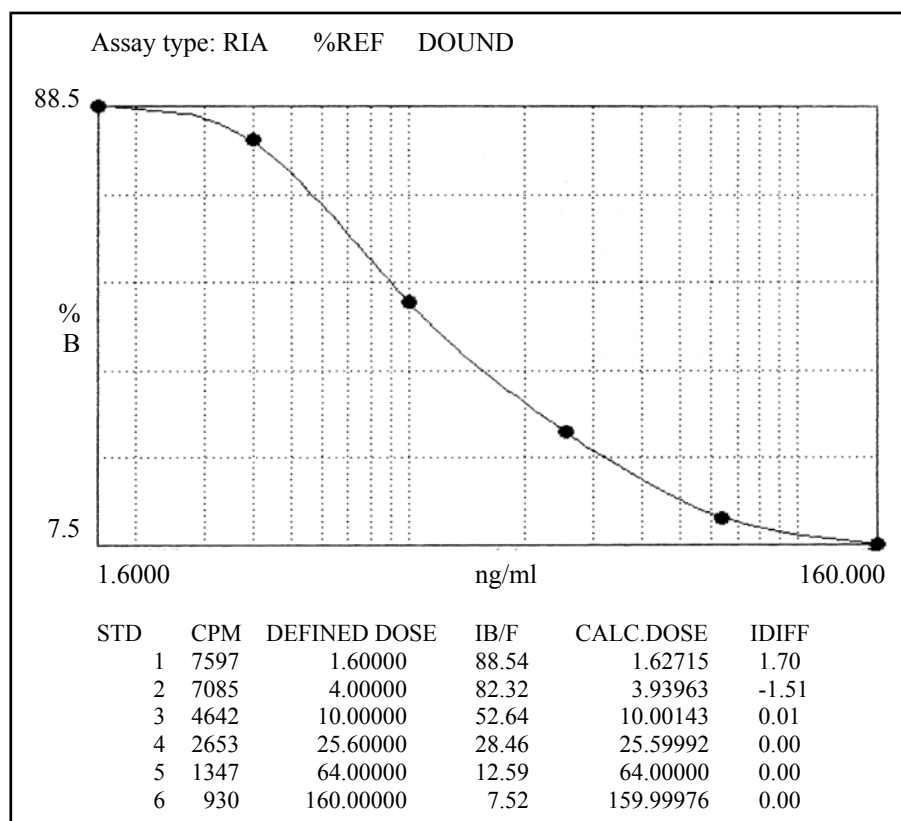


Fig. 29 - Curva de calibração da vitamina D.

7.5.2 - Valores Obtidos

O valor médio de vitamina D entre os pacientes colestáticos foi de $13,07 \pm 8,39$ ng/mL, enquanto no grupo controle foi de $25,58 \pm 16,73$ ng/mL. Esses valores apresentam uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,007$), como demonstra a figura 30. Entre os indivíduos colestáticos, observamos uma prevalência de 36% de déficit de vitamina D (valores menores de 9 ng/mL). Já no grupo controle não foi constatada deficiência de vitamina D, porém uma criança apresentava valores superiores aos referenciais (valores até 52 ng/mL).

Onde: Linha azul = 52 ng/mL
Linha verde = 9 ng/mL

Fig. 30 - Níveis plasmáticos de vitamina D (ng/ml) em colestáticos e em controles (Teste T paramétrico).

Relacionando as medianas da vitamina D entre eutróficos e desnutridos, a partir do escore Z para altura e idade não observamos diferença estatística, como demonstra a figura 31 ($P = 0,55$).

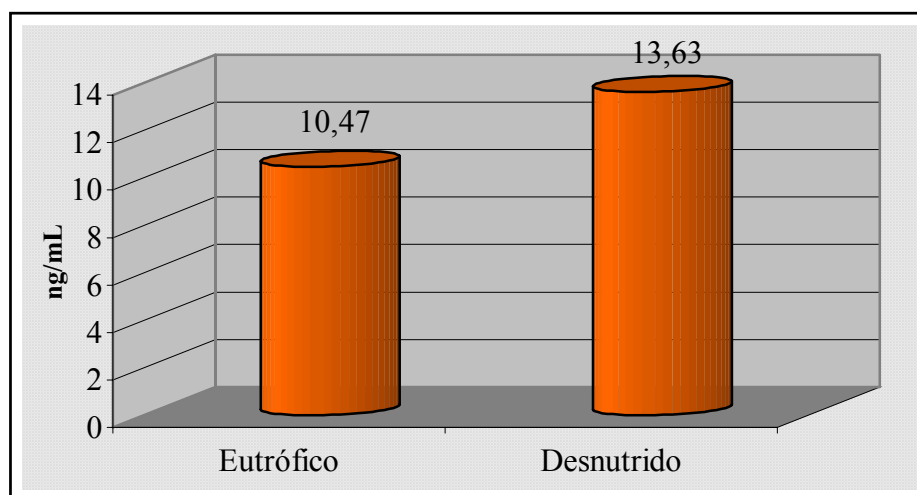


Fig. 31 - Medianas dos níveis plasmáticos de vitamina D (ng/mL) entre pacientes eutróficos e desnutridos (Mann-Whitney U).

A correlação entre o tempo de colestase e os níveis plasmáticos de vitamina D também não foi significativa, pois observamos um coeficiente de correlação de Spearman de $-0,09$ com valor $p = 0,67$.

Ao compararmos os níveis plasmáticos de vitamina D entre os pacientes que utilizam regularmente a suplementação oral e os que não a utilizam, verificamos que não há diferença estatisticamente significativas ($p = 1$), como demonstra a figura 32.

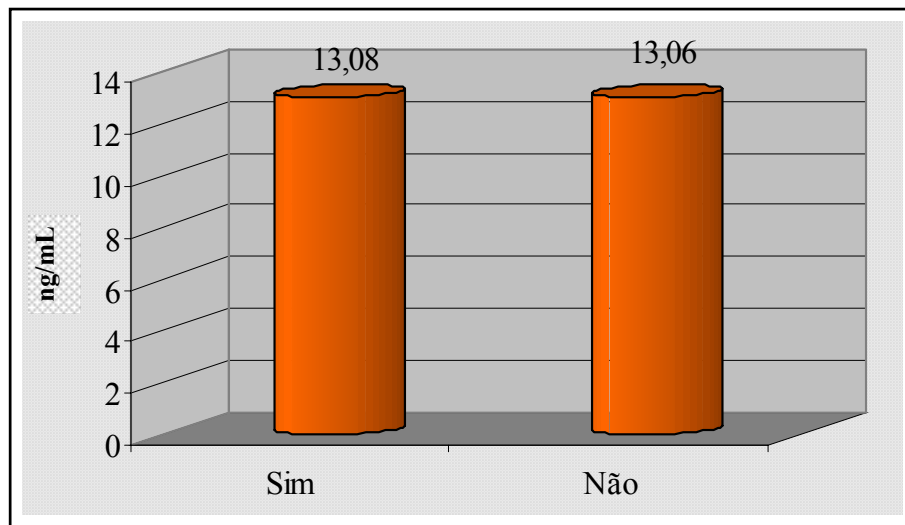


Fig. 32 - Comparação das medianas dos níveis plasmáticos de vitamina D (ng/mL) entre pacientes que utilizam ou não suplemento oral (Mann-Whitney U).

8 - DISCUSSÃO

8 - DISCUSSÃO

8.1 - Características da Amostra com Relação às Variáveis Estudadas

Serão realizadas considerações sobre as características demográficas e delineamento, os diagnósticos prevalentes, o estado nutricional, o exame neurológico e os exames laboratoriais dos indivíduos estudados.

8.1.1 - Características Demográficas e Delineamento

Os pacientes estudados apresentam uma variação de idade bem ampla, atingindo desde lactentes de 4 meses a adolescentes de 18 anos. Utilizamos um grupo controle com distribuição de gênero e de idade semelhantes como demonstram respectivamente as tabelas 12 e 13. Revisando diferentes estudos com objetivos similares, observamos distribuição de faixa etária tão variável e ampla como a nossa demonstrada nas tabelas 27, 28 e 29.

Tabela 27 - Características de estudos realizados sobre níveis plasmáticos de vitamina E em pacientes colestáticos e avaliação neurológica

Autor (ano)	Faixa etária	Amostra estudada (n)	Delineamento
Roseblum <i>et al.</i> (1981)	5 m a 15 anos	Hepatopatas crônicos com colestase e alterações neurológicas (7)	Estudo longitudinal
Guggenheim <i>et al.</i> (1982)	3 m a 7 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (19)	Transversal para os colestáticos e longitudinal para os portadores de doença neuromuscular e def. de vit.E
Sokol <i>et al.</i> (1983)	4,5 m a 12 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (4) Controles normais (18)	Estudo transversal controlado
Sokol <i>et al.</i> (1983)	6 m a 38 anos	Hepatopatas crônicos com colestase e deficiência de vitamina E (6) Hepatopatas crônicos com colestase sem deficiência de vitamina E (10) Controles sem colestase (22)	Estudo longitudinal controlado com intervenção
Sokol <i>et al.</i> (1984)	6 m a 34 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (15) Controles sem colestase (25)	Estudo transversal controlado com intervenção
Tazawa <i>et al.</i> (1984)	9m a 17 anos	Portadores de AVBEH (37)	Estudo transversal
Sokol <i>et al.</i> (1985)	1 m a 17 anos	Hepatopata crônico com: colestase intra-hepática (46) Colestase extra hepática (47)	Estudo transversal com seguimento longitudinal
Sokol <i>et al.</i> (1985)	19 m a 17,5 anos	Hepatopata crônico com colestase e deficiência de vitamina E (14)	Estudo longitudinal não controlado
Sokol (1993)	6 m a 20 anos	Hepatopata crônico com colestase e deficiência de vitamina E (60)	Estudo longitudinal, controlado com intervenção
Benitez (1996)	1 m a 15 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (60)	Estudo longitudinal com intervenção
Socha (1997)	9 m a 3,4 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (15) Controles normais (18)	Estudo longitudinal controlado
Presente estudo (2002)	4 m a 18 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (22) Controles normais (17)	Estudo transversal controlado

Tabela 28 - Características de estudos realizados sobre avaliação nutricional e perfil lipídico de crianças e de adolescentes com hepatopatia crônica

Autor (ano)	Faixa etária	Amostra estudada (n)	Delineamento
Cedán <i>et al.</i> (1987)	1 a 14 anos	Hepatopatas agudos ou crônicos (35) Controles normais (40)	Transversal controlado
Cywes e Miller (1990)	1,5 m a 7 anos	Portadores de AVBEH (18)	Transversal
Sokol e Stall (1990)	1 m a 10 anos	Hepatopatas crônicos (56)	Transversal
Chin <i>et al.</i> (1992)	6 m a 6 anos	Hepatopatas crônicos (27)	Transversal
Gazal (1995)	9 m a 18 anos	Cirróticos (26)	Transversal
Cardoso <i>et al.</i> (1997)	5 m a 8 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (11)	Transversal
Mattar (1999)	6,5 m a 12 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (14) e sem colestase (11)	Transversal
Presente estudo (2002)	4 m a 18 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (22) controles normais (17)	Transversal controlado

Tabela 29 - Características de estudos realizados sobre níveis plasmáticos de vitamina D e/ou osteopenia em crianças com colestase

Autor (ano)	Faixa etária	População estudada (n)	Delineamento
Heubi <i>et al.</i> (1989)	1 a 19 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (6) Controles com outras doenças sem hepatopatia (6)	Transversal controlado com intervenção
Bucuvalas <i>et al.</i> (1990)	4 m a 16 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (9) Controles normais (5)	Transversal controlado
Argao <i>et al.</i> (1993)	2 m a 20 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (56)	Transversal
Vieira (1995)	6 m a 18 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (32)	Transversal
Chongsrisawat (2001)	6 m a 10 anos	Portadores de AVBEH (42)	Transversal
Presente estudo (2002)	4 m a 18 anos	Hepatopatas crônicos com colestase (22) Controles normais (17)	Transversal controlado

O estudo mais recente observado na literatura sobre vitamina E e suas repercussões neurológicas é descrito por Socha (1997) com 28 indivíduos (15 colestáticos e 13 controles) que avaliou uma faixa etária restrita de 9 meses a 3,4 anos (tabela 27). Percebemos aí uma carência de estudos atuais que avaliem a prevalência de vitamina E entre pacientes colestáticos com suas repercussões neurológicas.

Trabalhos realizados com hepatopatas sem estabelecer diferenciação entre colestáticos e não colestáticos, como observamos em estudos sobre avaliação nutricional e perfil lipídico (tabela 28), devem ser vistos com cautela quando confrontados com o presente estudo. A fisiopatologia da desnutrição do colestático relacionada com a deficiência dos ácidos bi-

liares no lúmen intestinal são associadas com as causas da desnutrição inerentes à hepatopatia crônica. Mattar (1999) realizou avaliação de 14 colestáticos e comparou com 11 pacientes hepatopatas não colestáticos e observou diferenças significativas com maior prevalência e gravidade de desnutrição entre os colestáticos.

Na avaliação de vitamina D do presente estudo foi realizado um delineamento transversal controlado. Os estudos controlados para as características similares (tabela 29) são realizados por Heubi *et al.* (1989) e Bucuvalas *et al.* (1990) com uma amostra de 12 e 9 indivíduos respectivamente. O estudo atual consta de 39 indivíduos que nos permite valorizar melhor os resultados.

8.1.2 - Diagnósticos Prevalentes

Os pacientes do presente estudo não seguem as características apenas da colestase neonatal, porém a maioria das patologias foram identificadas no período neonatal.

A tabela 30 ilustra a frequência relativa dos tipos de colestase na infância em centros de referência com mais de 500 casos relatados descritos por Balistreri (1999).

Tabela 30 - Frequência relativa dos tipos de colestase na infância em centros de referência com mais de 500 casos relatados

Forma clínica	Percentual cumulativo	Frequência estimada (por 10.000 nascidos vivos)
“Hepatite neonatal idiopática”	35 – 40	1,25
Atresia biliar extra-hepática	25 – 30	0,70
Deficiência de alfa-1-AT	7 – 10	0,25
Colestase intra-hepática (c/ ou s/ ductopenia)	5 – 6	0,14
Hepatite por CMV	3 – 5	< 0,1
Erro inato da síntese de ácidos biliares	2	< 0,1
Sepse bacteriana	2	< 0,1
Hepatite por herpes, rubéola	1	< 0,1
Distúrbios endócrinos	1	< 0,1

AT = Antitripsina

CMV = Citomegalovírus

Fonte: Silveira TR. Icterícia na infância. In: Mattos AA, Dantas W. Compêndio de Hepatologia. 2ª ed. São Paulo. Fundação Editorial BYK, 2001: 207-236.

No nosso meio, Silveira (1995) descreve estudo prospectivo de 287 lactentes com icterícia colestática acompanhados em Porto Alegre e observa que 33% apresentavam hepatite neonatal e 22% eram portadores de AVBEH.

O aprimoramento dos diagnósticos das doenças genético – metabólicas fez com que a prevalência de causas idiopáticas fossem então identificadas. Stormonn *et al.* (2001) revisaram o diagnóstico de crianças menores de 6 meses atendidas em um hospital terciário da Austrália e observaram que 50% dos casos eram devidos a causas genéticas e metabólicas ou secundárias a nutrição parenteral. As causas obstrutivas constituam 20% dos casos e não foi possível identificar o(s) fator(es) de determinante(s) em 25% dos casos.

Os estudos relatados até o momento referem-se a colestase neonatal. Devemos lembrar que a frequência das nosologias da colestase neonatal é diferente da colestase crônica

da infância e da adolescência, podendo, ainda, ter uma variação, dependendo da população estudada e do local de atendimento dos pacientes.

A maior prevalência de AVBEH é observada nos estudos envolvendo crianças e adolescentes com hepatopatia crônica descritos na tabela 31. Sokol e Stall (1990), em um estudo sobre avaliação antropométrica de crianças e adolescentes com hepatopatia crônica, avaliaram 56 crianças de 1 mês a 10 anos e encontraram 57% delas com AVBEH e os demais com outros diagnósticos. Vieira (1995) avaliou 32 crianças e adolescentes com colestase crônica no HCPA e encontrou 43,8% de AVBEH. O percentual de pacientes com AVBEH encontrado por Benitez *et al.* (1996), quando avaliaram 60 pacientes de 6 meses a 15 anos, foi similar. Mattar (1999) encontrou 68% da mesma patologia quando avaliou 25 crianças de 6 meses a 12 anos. No presente estudo, a prevalência de AVBEH foi 45% e, em apenas 2 pacientes, não foi possível definir o diagnóstico, como podemos verificar na figura 15. O fato de estudarmos pacientes cuja colestase crônica se estendeu até a adolescência nos permitiu maior tempo para estabelecer os diagnósticos.

Tabela 31 - Diagnósticos prevalentes em estudos envolvendo crianças e adolescentes com hepatopatia crônica

	AVBEH (%)	S. Alagille (%)	Hep Neo (%)	Def α 1A (%)	HCAI (%)	Outros (%)
Sokol e Stall (1990)	32 (57)	5 (9)	8 (14)	4 (7)		7 (13)
Vieira (1995)	14 (43,8)	3 (9,4)		2 (6,3)	1 (3,1)	12 (37,5)
Benitez <i>et al.</i> (1996)	24 (45,3)		8 (15,1)	3 (5,7)	2 (3,8)	6 (11,4)
Mattar (1999)	17 (68)			1 (4)		7 (28)
Presente Estudo (2002)	10 (45,5)	3 (13,6)	1 (4,5)		2 (9,1)	6 (27,3)

Onde: AVBEH = Atresia de vias biliares extra-hepática
 Def α 1A = Deficiência de alfa 1-antitripsina
 Hep Neo = Hepatite neonatal
 S. Alagille = Síndrome de Alagille
 HCAI = Hepatite crônica autoimune

8.1.3 - Estado Nutricional

As causas de desnutrição em crianças e em adolescentes com doença hepática crônica bem como as particularidades observadas na avaliação nutricional desses pacientes, já foram mencionadas previamente (tabela 2).

A prevalência de desnutrição observada no presente estudo tanto pelos percentis a partir do NCHS como pelo Escore Z (tabela 14 e figura 16) foi em torno de 30 – 40%, sendo semelhante à observada em estudos realizados em Porto Alegre (Gazal, 1995; Vieira, 1995). Porém, há relatos na literatura em que a prevalência de desnutrição em hepatopatas pode chegar a 70% (Cabêdo, 1999). Segundo Monte (2000), em uma população sadia se encontra menos de 1% de déficits graves e cerca de 2,3% de déficits moderados.

Estudo realizado em Porto Alegre (Aerts, 1996), avaliou o estado nutricional de uma amostra representativa da população de Porto Alegre (3389 crianças de 0 a 59 meses) e observou uma prevalência de retardo de crescimento de 6,5%. Foram considerados como retardo de crescimento os mesmos índices de altura/idade com menos de 2 desvios padrão em relação à população de referência (NCHS). Issler e Giugliani (1997) também realizaram um estudo na cidade de Porto Alegre entre os moradores de bolsões de pobreza da Vila Grande Cruzeiro e encontraram uma prevalência de desnutrição para o mesmo índice (altura/idade) entre 12,2% a 19,3%, dependendo da faixa etária. Portanto, mesmo considerando amostragens menos favorecidas da população, os índices de desnutrição dos pacientes colestáticos são bastante superiores.

A detecção de maior prevalência de desnutrição quando se avalia a altura em relação à idade e a subestimação da desnutrição quando se avalia o peso em relação à estatura é reforçada pelos achados de Sokol e Stall (1990). Em nosso estudo, quando consideramos a altura/idade abaixo do percentil 5% pelo padrão NCHS, a prevalência de desnutrição foi

40,9%, enquanto que pelo escore Z foi de 33%. Essa diferença é explicada pelo fato de o escore Z ser considerado muito exigente, classificando como desnutridas somente formas moderadas e graves de desnutrição, rotulando os casos mais leves como normais (Victora *et al.*, 1988).

Ao avaliar as reservas de gorduras (PCT) e as reservas de proteínas (CMB), observamos uma prevalência de valores abaixo do percentil 5 ainda mais elevada: 50% para a PCT e 59,1% para a CMB. Vale ressaltar que essas medidas são consideradas confiáveis nesse grupo de pacientes uma vez que são menos influenciados por edema, pela própria ação da gravidade (Cabêdo, 1999). Sokol e Stall (1990) realizaram um estudo com 56 crianças de 1 mês a 10 anos com doença hepática crônica para caracterizar o estado nutricional e determinar a utilidade dos índices antropométricos para esse grupo de pacientes. Concluíram que, apesar da possibilidade de edema, as medidas de PCT e CMB dão uma estimativa do estado nutricional desses pacientes.

As calorias, os macronutrientes e os micronutrientes ingeridos pelos pacientes do estudo e o esperado para crianças e adolescentes com colestase está descrito na tabela 32. A ingestão calórica de valores inferiores a 100% para uma população que deveria receber pelo menos 150% das recomendações diárias para idade (RDA) é justificada pelos motivos já descritos previamente na tabela 2. Já os percentuais de proteínas, lipídios e glicídios em relação ao total de calorias ingerido são concordantes com o preconizado pela equipe de transplante hepático infantil do HCPA (Ferreira *et al.*, 2000).

Para os valores de micronutrientes ingeridos pelos nossos pacientes, chama a atenção os baixos percentuais de ferro e zinco em relação a RDA. O percentual de ferro ingerido é semelhante ao observado por outros estudos (Cardoso *et al.*, 1997; Mattar, 1999) que identificaram ingestão de apenas 57% em relação à RDA. Gazal (1995), ao analisar o inquérito nutricional de 25 crianças com cirrose, observou que 92% e 96% das crianças ingeriam quanti-

dades de ferro e zinco inferiores às recomendadas para crianças normais, respectivamente. A deficiência de ferro já foi observada em crianças com AVBEH (Kaufman *et al.*, 1987) em que foi constatado que, em muitas delas, a deficiência resultou de uma ingestão inadequada seguida por hemorragias, agudas ou crônicas, ocasionadas por coagulopatia ou por sangramento de varizes esofágicas. Mattar (1999) realizou avaliação de ferro corporal e absorção de ferro intestinal de crianças hepatopatas crônicas com e sem colestase. Observou que, além da pobre ingestão de ferro, os pacientes colestáticos apresentavam sinais de anemia secundária à doença crônica em si e menor absorção do ferro ingerido.

A deficiência de ingestão de zinco, associada à possibilidade de haver má absorção, justifica os achados de Chin e colaboradores (1992) que observaram uma prevalência de baixos níveis plasmáticos em 10 dos 24 pacientes hepatopatas crônicos estudados (42%). Mattar (1999), no mesmo estudo que avaliou o ferro corporal, observou que 58,33% dos pacientes com colestase apresentavam diminuição dos níveis séricos de zinco. Como se sabe, a deficiência do zinco pode levar a déficit de crescimento, anorexia e disfunção imunológica. Os efeitos da deficiência de zinco associados à colestase ainda necessitam maiores investigações (Feranchak *et al.*, 2001).

As doenças hepáticas que iniciam no período neonatal e mantêm-se ao longo do tempo tendem a evoluir para um quadro de desnutrição crônica. Para avaliar a relação do estado nutricional com as demais variáveis estudadas, utilizou-se o escore Z altura/idade. A relação dos pacientes eutróficos e desnutridos com o tempo de colestase, a avaliação neurológica e os exames laboratoriais não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas. Observamos apenas discreta relação entre a medida dos lipídios totais e do colesterol que foi maior entre os eutróficos como está demonstrado na tabela 22. O fato de não obtermos diferenças significativas pode estar relacionado com o número de pacientes ser insuficiente para expressar significância estatística. Chin e colaboradores (1992) avaliaram 27 crianças com

doença hepática crônica e também não observaram correlação significativa entre o estado nutricional e a função sintética do fígado, o grau de colestase ou intensidade da disfunção hepática.

Tabela 32 - Comparação entre os valores percentuais observados e esperados da ingestão de calorias, de macronutrientes e de micronutrientes em crianças e adolescentes com colestase crônica

Nutrientes ingeridos	Observado	Esperado
Calorias (média)	89,33 ± 27,4% da RDA	≥ 150% da RDA**
Proteínas (média)	13,19 ± 3,04% do VET	15% do VET**
Lipídios (média)	30,38 ± 3,98% do VET	30% do VET**
Glicídios (média)	57,0 ± 5,5% do VET	55% do VET**
Cálcio (mediana)	90% da RDA	100% da RDA*
Fósforo (mediana)	92% da RDA	100% da RDA*
Magnésio (mediana)	108% da RDA	100% da RDA*
Ferro (mediana)	44% da RDA	100% da RDA*
Zinco (mediana)	40% da RDA	100% da RDA*

* RDA - Subcommittee on the Tenth Edition of RDAs - Recommended dietary allowances. Washington, D.C. Food and nutrition board commission on Life Sciences- National Research Council, 1989.

** Ferreira CT, Veira SM, Silveira TR. Transplante Hepático. *Jornal de Pediatria* 2000, 76(2):198-208.

8.1.4 - Exame Neurológico

O espectro de achados neurológicos da deficiência de vitamina E descrito na literatura é de caráter progressivo, parte de alterações tais como hiporreflexia e fraqueza muscular e atinge alterações tão graves como arreflexia, cegueira, demência e arritmias cardíacas por comprometimento muscular (Aparício *et al.*, 2001). As alterações descritas no presente estudo podem ser consideradas leves, uma vez que nenhum paciente apresentava queixa ou alteração neurológica evidente antes da realização do exame.

A prevalência de alterações neurológicas verificada no presente estudo foi de 43,1% (figura 17), superior à verificada por Guggeheim e colaboradores (1982). Esses autores constataram exame neurológico alterado em 21% dos pacientes estudados que apresentavam, também, hipovitaminose E.

Os achados clínicos observados no estudo atual, descrito na figura 18, (hiporreflexia, aumento do polígono de sustentação e hipotonia muscular) são semelhantes aos descritos por Sokol (1990) que foi demonstrado previamente na figura 7. As demais alterações observadas também são relevantes e merecem acompanhamento neurológico. Apesar dos déficits de coluna posterior e dos distúrbios da marcha serem achados constantes na deficiência de vitamina E, há relatos de alterações mais variadas e, inclusive, relacionadas a alterações nos exames de potencial evocado somato-sensorial (Satya-Murti *et al.*, 1986). Nora e colaboradores (2000) realizaram um estudo no HCPA com potencial evocado visual e auditivo em 15 pacientes pediátricos candidatos a transplante sem sinais clínicos de encefalopatia hepática e compararam com 16 controles normais. Concluíram que o referido exame foi útil para detectar alterações de encefalopatia hepática em crianças. Os autores, porém, não avaliaram os níveis plasmáticos de vitamina E desses pacientes.

Quanto à idade em que se detectaram alterações neurológicas, observamos grande variabilidade. Satya-Murti e colaboradores (1986) detectaram alterações neurológicas precoces em pacientes de 2 meses com diagnóstico de Síndrome de Alagille. Já Sokol e colaboradores (1985) avaliaram 93 crianças entre 1 mês e 17 anos com colestase crônica e observaram alterações neurológicas somente após 1 ano de idade. No presente estudo, observamos achados neurológicos desde os 5 meses de idade e, apesar de avaliarmos pacientes até 18 anos, o paciente com maior idade que apresentou comprometimento neurológico tinha 11 anos e 5 meses.

Sokol e colaboradores (1985) avaliaram 93 crianças com colestase cujos diagnósticos principais eram Síndrome de Alagille e AVBEH. Na tabela 17, estão demonstradas as características dos pacientes com alterações neurológicas do presente estudo em que observamos que todos os 3 portadores de Síndrome de Alagille apresentavam alterações neurológicas (paciente 2, 3, 7) e os demais pacientes eram portadores de AVBEH.

Pretendíamos estabelecer a relação entre os pacientes com hipovitaminose E, uso de suplementação vitamínica e as alterações neurológicas observadas. Apesar das várias tentativas de dosar o nível plasmático de vitamina E nos pacientes, pelos motivos já descritos, os resultados obtidos não foram confiáveis.

8.1.5 - Avaliação Laboratorial

A retenção no fígado de substâncias normalmente excretadas na bile (ácidos biliares, bilirrubina e colesterol) pode levar à hepatotoxicidade (Feranchak *et al.*, 2001). Os valores de aminotransferases superiores aos valores de referência observados em todos os pa-

cientes (tabela 19) comprovaram a presença de lesão hepática provavelmente ocasionado pela colestase.

A fosfatase alcalina apresentou uma variabilidade grande com valores entre 359 a 3.562 (figura 21). Sabemos que a fosfatase alcalina total para avaliação de colestase não é um método fidedigno porque, em crianças, os valores de referência relacionam-se fortemente com a faixa etária, sendo proporcionais ao crescimento ósseo. A maioria da fosfatase alcalina presente no soro de crianças é de origem óssea enquanto que em adultos saudáveis predomina a fração hepática (Risteli e Risteli, 1993). A elevação da fosfatase alcalina esquelética foi observada em 97% das crianças colestáticas avaliadas em nosso meio no mesmo estudo que encontrou diminuição da densidade óssea mineral em todos os pacientes estudados (Vieira, 1995). O estudo atual não realizou avaliação de fração óssea da fosfatase alcalina, cálcio e fósforo séricos devido ao fato de que no momento da coleta dos dados, a dosagem de vitamina D não fazia parte do objetivo do trabalho e o material armazenado encontrava-se com EDTA, o que inviabiliza a realização desses exames.

Os valores elevados de bilirrubina fizeram parte dos critérios de inclusão no estudo, estando, assim, todas acima dos valores referenciais com concentração de bilirrubina direta superior a 30% da bilirrubina total. Os valores de gama glutamiltransferase (γ GT) também estavam acima dos valores referenciais, o que comprova a sua relação com a colestase. Recém-nascidos podem ter níveis mais elevados de γ GT, porém, até os 6 a 9 meses, esses níveis são semelhantes aos dos adultos. A γ GT, ao contrário da fosfatase alcalina total, é mais específica para o diagnóstico de colestase em crianças do que em adultos. Nestes últimos, podemos ter elevação da γ GT em casos de alcoolismo, doença pancreática, infarto do miocárdio, diabetes entre outros (Batres e Maller, 2001).

As principais funções da albumina são manter a pressão coloidosmótica do plasma e carrear compostos do soro como bilirrubinas, íons inorgânicos ou drogas. É sintetizada no hepatócito, tem uma meia vida de 20 dias, sendo considerada a principal proteína sérica (Maller, 1998). A mediana dos valores de albumina obtidos entre os pacientes foi inferior aos valores de referência, como está demonstrado na tabela 19. Sua deficiência nos pacientes estudados pode ser explicada tanto pela deficiência de síntese hepática como pela desnutrição já verificada. Estudo francês sobre suplementação enteral noturna em crianças colestáticas (Moreno *et al.*, 1991) constatou melhora dos índices nutricionais, porém a albumina sérica não apresentou elevação significativa.

O fígado exerce um efeito central no metabolismo dos ácidos graxos, sintetizando os ácidos graxos poliinsaturados, convertendo-os em ácidos graxos essenciais (ácido linoléico, ácido aracdômico, etc.). Socha e colaboradores (1997) avaliaram crianças com colestase e controles quanto aos níveis de ácidos graxos essenciais e observaram menores valores desses ácidos em colestáticos. Esses valores eram inversamente proporcionais aos níveis séricos de ácidos biliares e bilirrubinas séricas.

Os valores de lipídios totais em crianças normais apresentam-se menores se comparados com os dos adultos. Farrel e colaboradores (1978) avaliaram 39 crianças normais com valores de lipídios totais de 484 ± 12 mg/dl e 22 adultos com valores de 549 ± 14 mg/dl sendo considerada uma diferença estatisticamente significativa. No presente estudo, os valores médios de lipídios totais, colesterol e triglicerídeos não demonstraram diferenças significativas quando foram comparados com controles normais (tabela 21). Porém, ao observarmos a figura 22, verificamos entre os colestáticos maiores oscilações entre os lipídios totais com valores próximos ou superiores a 1.000 mg% quando o referencial é de 700 mg%. Cedán e colaboradores (1987) realizaram um estudo sobre lipídios em crianças com doença hepática demonstrando que os valores de lipídios totais entre os hepatopatas e controles não apresentavam di-

ferença estatisticamente significativa. Já os valores de triglicerídeos estiveram mais baixos entre os hepatopatas crônicos em relação aos controles ($P = 0,05$).

8.2 - Dosagem de Vitamina E – Considerações Metodológicas

As técnicas de dosagem de vitamina E não são empregadas de rotina em Porto Alegre. Por isso, foi necessário realizar uma revisão da literatura e optar pelo método que mais se adaptasse às condições locais. Além de conhecer a técnica, foi preciso aprender a manusear o equipamento e nos familiarizarmos com conceitos técnicos relacionados à validação de um método laboratorial. Algumas técnicas de dosagem da vitamina E por HPLC, descritas na literatura, estão demonstradas na tabela 5.

A primeira técnica utilizada no presente estudo foi a descrita por Julianto e colaboradores (1999), por se tratar de um método com formas de extração do plasma mais simples (não necessitavam de evaporação com nitrogênio) e os reagentes já haviam sido utilizados em outras técnicas realizadas pelos bioquímicos que fizeram o suporte técnico da pesquisa. Porém, a coluna descrita pelos referidos autores não estava disponível e utilizamos uma dimensão similar. A fase inicial do experimento que constou de uma curva de calibração de α tocoferol diluído em solução foi animadora uma vez que o coeficiente de correlação (R^2) foi 0,9992 enquanto que o do autor foi 0,9998. A linearidade da curva de calibração realizada no presente estudo já foi demonstrada na figura 23.

O cromatograma descrito por Julianto e colaboradores permitiu visualizar um pico de α tocoferol independente dos demais componentes do plasma enquanto que o obtido pela técnica do presente estudo foi em 3 minutos, o que não permitiu identificar uma área de pico independente, inviabilizando sua quantificação como podemos verificar na figura 33.

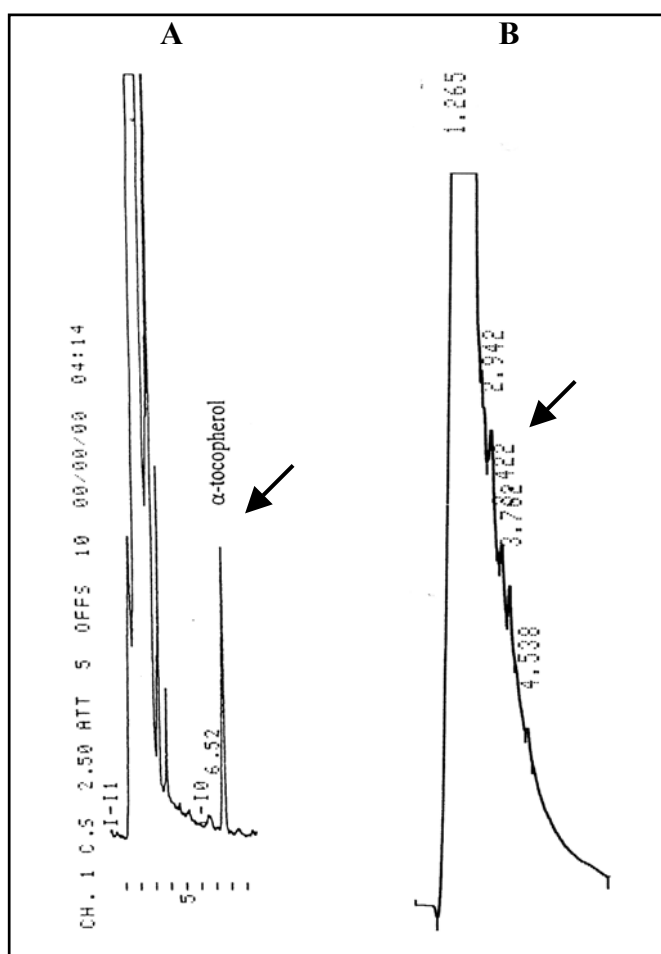


Fig. 33 - Demonstração dos cromatogramas de dosagem do α tocoferol no plasma:

A – Cromatograma obtido por Julianto e colaboradores (1999).

B – Cromatograma obtido no presente estudo.

Diante das dificuldades encontradas, optamos por reproduzir uma técnica adaptada de Bieri *et al.* (1979) que foi realizada no Brasil por Weinmann e colaboradores (1999). Essa técnica já apresentava etapas um pouco mais complexas porque necessitava de extração do sobrenadante para posterior evaporação com nitrogênio como já foi descrito com detalhes no item 4.4.2.2. Na tabela 33, faz-se um paralelo entre as técnicas utilizadas no estudo e a descrita pelos autores.

Nos cromatogramas demonstrados na figura 34, estão assinalados os picos de α tocoferol obtidos aos 11 minutos do presente estudo em comparação com o obtido por Weinmann *et al.* aos 8 minutos.

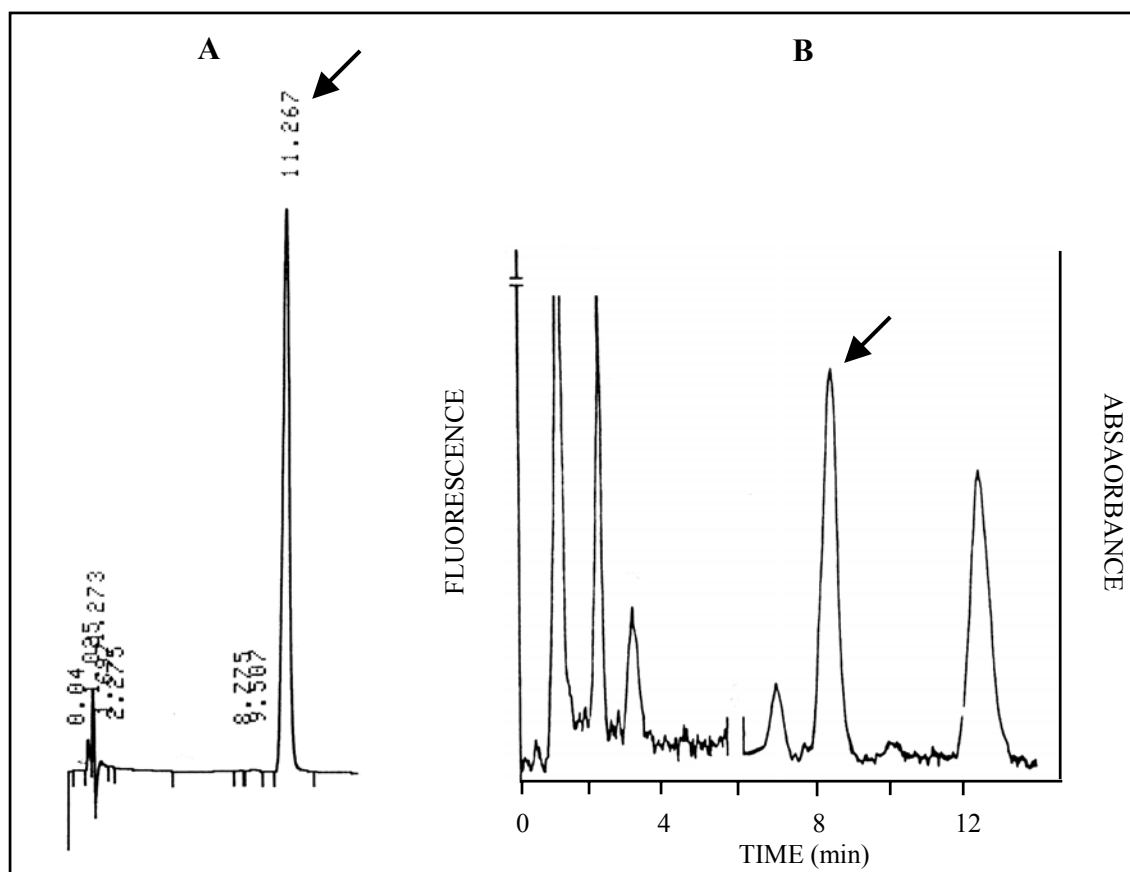


Fig. 34 - Demonstração dos cromatogramas de dosagens de α tocoferol:

A – Cromatograma obtido no presente estudo.

B – Cromatograma obtido por Weinmann e colaboradores (1999).

Os resultados da validação no presente trabalho não foram tão lineares quanto os anteriores ($R^2 = 0,9744$), enquanto que a descrição dos autores era de um coeficiente de correlação de 0,9972. Para verificar a possibilidade de prosseguir com a técnica, foram realizadas as etapas de precisão e recuperação para comparar com as descrições dos autores. Os coeficientes de variação intraensaio tanto do padrão diluído em solução quanto do pool de plasma foram muito elevados (20% a 35%), enquanto que os descritos pelos autores foi de 3,6% a

5,6% (tabela 33). A recuperação obtida foi acima de 100% o que também nos fez questionar sobre a confiabilidade do método.

Apesar de utilizarmos uma técnica praticamente igual à utilizada por Weinmann e colaboradores, não conseguimos reproduzi-la. Julgamos que algumas adaptações no momento da extração do plasma e evaporação do sobrenadante são necessárias para tornar o método mais preciso.

Já com alguns conhecimentos obtidos a partir de todos os obstáculos até o momento, optamos por montar uma técnica em que se adaptou a forma de extração mais simplificada do primeiro método com a fase móvel utilizada no segundo método.

Tabela 33 - Técnicas de dosagem α tocoferol utilizadas como referência da literatura e as 3 fases de realização das dosagens no presente estudo

	Julianto <i>et al.</i>	Weinman <i>et al.</i>	1ª fase	2ª fase	3ª fase
Fase móvel	Metanol 94% Tetrahidrofurano 6%	Metanol 95% Água 5%	Metanol 94% Te- trahidrofurano 6%	Metanol 95% Água 5%	Metanol 95% Água 5%
Coluna	Crest pac 18 5 μ m, 4,6 mm x 250 mm	Novapak 18 3,9 mm x 150 mm	Spherisorb ODS – 2 μ m (250 x 4 mm)	Spherisorb ODS – 2 μ m (250 x 4 mm)	Spherisorb ODS – 2 μ m (250 x 4 mm)
Pré-coluna	RP – 18 30 – 40 μ m	Bondapak C18 (37 x 50 μ m)	Lichrospher® 100 RP-18 (5 μ m)/ Lichrocart® 4–4 Acoplador Manu - CART® 4 mm	Lichrospher® 100 RP-18 (5 μ m) / Lichrocart® 4–4 Acoplador Manu - CART® 4 mm	Lichrospher® 100 RP-18 (5 μ m)/ Lichrocart® 4–4 Acoplador Manu CART® 4 mm
Detector	Luz ultravioleta $\lambda = 292$ nm	Luz ultravioleta $\lambda = 280$ nm	Luz ultravioleta $\lambda = 292$ nm	Luz ultravioleta $\lambda = 292$ nm	Luz ultravioleta $\lambda = 292$ nm
Reagentes de Extração	Acetonitrila + Te- trahidrofurano	Etanol + N-hexano	Acetonitrila + Tetrahidrofurano	Metanol + Hexano	Acetonitrila + Tetrahidrofurano
Evaporação com Nitrogênio	Não	Sim	Não	Sim	Não
Precisão CV% intra CV% inter	1,4 – 2,9% 1,5 – 6,3%	3,6 – 5,6% 6,7 – 8,1%		20% - 35%	2,20%
Recuperação	80,7 – 97,9%	94 a 116%		129%	32,3 – 76,7%

Onde: CV% intra = Coeficiente de variação intraensaio
CV% inter = Coeficiente de variação interensaio

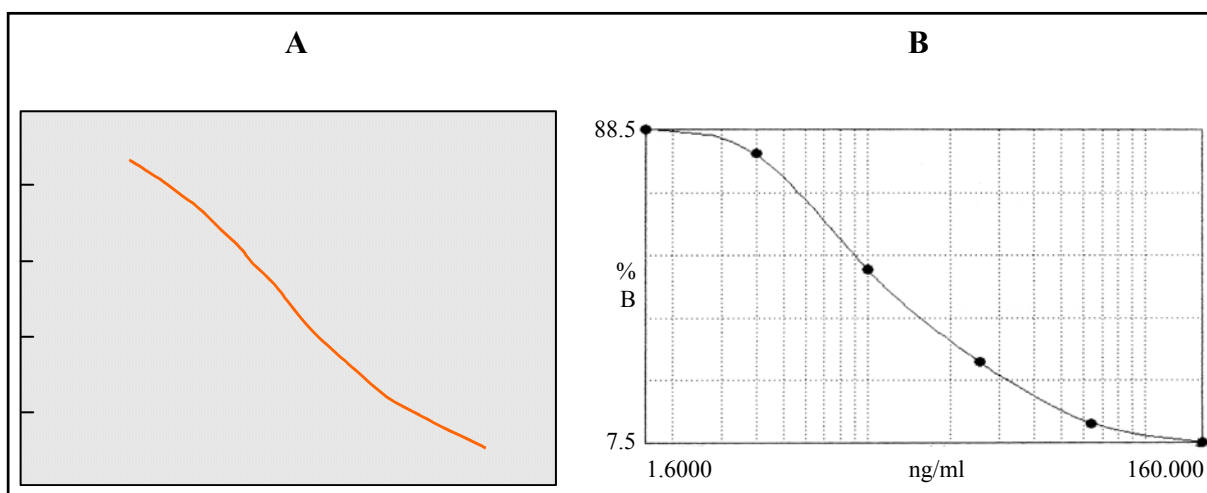
Logo na primeira fase da validação, os resultados foram animadores porque o pico de α tocoferol permaneceu aos 11 minutos, além do tempo de detecção obtido pelos estudos de Julianto *et al.* (6 min) e Weinmann *et al.* (8 min). A curva de calibração foi a melhor obtida até então com um coeficiente de correlação de 0,9998 como é demonstrado na figura 26. Lembramos que a linearidade descrita nos estudos anteriores foram 0,9998 no primeiro e 0,9972 no segundo.

Quando testamos a precisão do método, os resultados foram ainda mais animadores, uma vez que o coeficiente da variação obtido intra-ensaio foi similar ou inferior aos obtidos nos estudos que são descritos na tabela 33. Porém, ao testar a recuperação do método, não obtivemos os resultados esperados, uma vez que o máximo de recuperação obtida foi 76,7% com uma adição de maior concentração de tocoferol (tabela 23). Ao comparar com os estudos demonstrados na tabela 34, a recuperação mínima obtida foi de 80,7%. Apesar dos valores de recuperação descritos, optamos por realizar alguns doseamentos dos plasmas e, se obtivéssemos resultados semelhantes aos da literatura, retomariamos a recuperação. Porém, os valores encontrados nos plasmas de controles e colestáticos foram muito baixos (tabela 26), discordantes dos relatados na literatura. Não foi possível até mesmo realizar a relação com gramas de lipídios totais.

Lembramos que cada etapa, desde aprendizado, curvas de calibração, precisão, recuperação e doseamento demandam muito tempo e grande gasto de reagentes. Quando iniciamos o projeto de pesquisa foi estabelecido um orçamento e um cronograma e, após as diversas modificações por que o método passou, foram esgotados os reagentes e, principalmente, o tempo hábil para obter resultados.

8.3 - Valores de Vitamina D e suas Relações com as Variáveis Estudadas

Considerando que foi utilizado um kit cuja técnica já foi validada, procedeu-se à curva de calibração e se fez um paralelo com a descrição do fornecedor. A figura 35 demonstra uma curva de calibração típica fornecida na bula do Kit em comparação com a curva obtida no presente estudo.



Poucos autores fazem a relação de níveis plasmáticos entre colestáticos e controles (tabela 30). Heubi e colaboradores (1989) dosaram os níveis plasmáticos de vitamina D após dose teste da vitamina em crianças com colestase e compararam com crianças sem colestase, observando significativa má absorção no primeiro grupo. Bucuvalas e colaboradores (1990), avaliando a absorção de cálcio e níveis plasmáticos de vitamina D em crianças com hepatopatia crônica, concluem que outros fatores devem contribuir para a redução de massa óssea

nesses pacientes, já que os níveis de vitamina D e de cálcio encontravam-se normais na maioria dos pacientes colestáticos estudados. Lembramos que foi estudada uma amostra de apenas 9 indivíduos. Estudo tailandês sobre densidade óssea e 25OHD em atresia de vias biliares (Chongsrisawat *et al.*, 2000) avaliou 42 crianças e observou que os níveis de 25OHD eram significativamente menores no grupo com colestase do que no grupo sem colestase. No presente estudo, observamos valores de vitamina D significativamente menores entre os colestáticos quando comparados a crianças normais (figura 27). Grüdtner e colaboradores (1997) reforçam a afirmação de que a absorção de vitamina D está prejudicada nas doenças que apresentam alterações do fluxo biliar. Já nas doenças hepáticas crônicas sem associação com colestase os níveis plasmáticos devem estar normais, porém esses autores lembram que em casos de doença hepática acentuada pode haver diminuição desses níveis devido à menor atividade da enzima 25(OH) hidroxilase e/ou à diminuição da proteína ligadora de 25 (OH)D3.

Chin e colaboradores (1992) avaliaram 27 crianças com hepatopatia crônica e encontraram hipovitaminose D em 25%. Vale ressaltar que nesse grupo havia também pacientes sem colestase. Argao e colaboradores (1993) verificaram uma prevalência de 29% de hipovitaminose D entre 34 crianças com colestase crônica. O presente estudo encontrou deficiência de vitamina D em 36% dos pacientes com colestase.

O valor de corte utilizado para considerar hipovitaminose D foi 9 ng/ml, baseando-se no estudo de Pugliesi *et al.* (1998) que utilizou a mesma técnica de radioimunoensaio na avaliação de crianças. A tabela 34 demonstra os valores considerados normais pelos diversos autores.

Tabela 34 - Níveis plasmáticos de vitamina D considerados normais na literatura

Autores (ano)	Técnica	Valores considerados normais
Bucuvalas <i>et al.</i> (1990)	CPBA	15 a 10 ng/mL
Clemens e Adams (1993)	ND	10 a 50 ng/mL
Argao <i>et al.</i> (1994)	HPLC	15 a 50 ng/mL
Pugliese <i>et al.</i> (1998)	RIE	9 – 52 ng/mL
Jones <i>et al.</i> (1999)	RIE	30 a 50 nmol/L
Fitzpatrick <i>et al.</i> (2000)	ND	14 a 24 nh/mL
Trautwein <i>et al.</i> (2000)	CPBA	10 a 120 ng/mL
Ferachak <i>et al.</i> (2001)	ND	≥ 14 ng/mL
Chongsrisawat <i>et al.</i> (2001)	RIE	9 a 37 ng/mL
Phillips <i>et al.</i> (2001)	HPLC	> 14 ng/mL

CPBA - *Competitive Protein Binding Assay*
HPLC - *High-Pressure Liquid Chromatography*
RIE - Radioimunoensaio
ND - Não é descrita a técnica que utilizou

Para relacionar o estado nutricional às demais variáveis estudadas, utilizou-se o escore Z altura/idade. A relação entre desnutrição e níveis plasmáticos de vitamina D não ficou estabelecida no presente estudo, assim como no estudo realizado por Argao e colaboradores (1993) que avaliaram 56 pacientes de 2 m a 20 anos (tabela 29). Chin e colaboradores (1992), em estudo citado recentemente que avaliou diversos aspectos da desnutrição em crianças com hepatopatia crônica (tabela 28), também não observaram relação significativa entre o estado nutricional com a função sintética do fígado, com o grau de colestase, com a intensidade da disfunção hepática ou com a deficiência de vitaminas.

Observamos que a hipovitaminose D ocorreu independente do uso do suplemento oral prescrito. Ao compararmos a mediana dos níveis plasmáticos de vitamina D entre os pacientes que usavam suplemento oral e os que não usavam não obtivemos diferenças, como

demonstra a figura 30. Nos estudos relatados na tabela 29, a referência ao uso de suplemento oral de vitamina D é feita apenas por Heubi *et al.* (1989) e Bucuvalas *et al.* (1990) com doses de 2.500 a 50.000 UI/dia utilizadas, respectivamente, por 6 e 9 pacientes estudados. Dornaus e Walaczak (1991) em uma revisão sobre suplementação vitamínica em hepatopatas relatam que, nos Estados Unidos, a 25 OHD é administrada na dose de 20 – 50 µg ao dia ou 5 a 7 µg/kg/dia, com controle de nível plasmático após 2 a 3 semanas de uso e, após, a cada 3 meses. Na mesma revisão, descrevem como utilizam em seu serviço (Hospital de Clínicas de São Paulo): Rocaltrol[®] na dose inicial de 0,01 a 0,02 µg/kg/dia por via oral ou então sob a forma de precursor D2 ou D3 por via intramuscular. Preconizam, também, o uso profilático de vitamina D3 (Aderogyl D3[®]) 400 a 800 U/I/dia. No nosso meio, como já foi descrito na tabela 4, utilizamos a apresentação comercial Aderogyl D3[®] 12 gotas 2x dia que equivale a aproximadamente 26.000 UI/dia de colecalciferol e 66.000 UI/dia de acetato de retinol. A recomendação mais recente (Feranchak *et al.*, 2001) é de monitorização periódica dos níveis plasmáticos de 25 – OH – D associado à adequada exposição solar e uma dieta normal em quantidades de cálcio e fósforo. Se houver deficiência de vitamina D, utilizar vitamina D3 oral 3 a 10 vezes a recomendação para a idade, 25OHD (Calderol[®]) 3 a 5mg/kg/dia ou 1,25 (OH)2D (Rocaltrol[®]) 0,05 a 0,2 µg/kg/dia. Durante o uso dessas vitaminas, deve haver monitorização cuidadosa dos níveis de 25 (OH)D, cálcio e fósforo.

A limitação encontrada no nosso meio foi a monitorização laboratorial porque as dosagens dos níveis plasmáticos de vitaminas não fazem parte dos exames de rotina. O uso de doses maiores de vitamina D3 ou o uso de 1,25(OH)2D (Rocaltrol[®]) é viável, porém apresenta riscos de intoxicação que obrigam a uma monitorização cuidadosa.

A prevalência de Osteopenia não fez parte do nosso estudo, mas sabemos que está relacionada com a deficiência de vitamina D. A falha no processo de mineralização é descrita

por Mechica (1999) como sendo causada, principalmente, por inadequada concentração de íon cálcio e fósforo associado ou não à falta de vitamina D. Vieira (1995) realizou densitometria óssea em 20 pacientes com colestase crônica, atendidos no HCPA com idades entre 3 a 18 anos e observou que todos apresentavam diminuição da massa óssea total. Estudos em adultos sugerem que a osteoporose é a principal anormalidade óssea relacionada à osteopenia (Diamond *et al.*, 1989; Waldum *et al.*, 1992; Sherlock e Dooley, 1997). Apesar de a osteoporose estar reconhecidamente relacionada com colestase crônica em crianças, sua patogênese não está claramente definida. Alguns autores não conseguiram relacionar os níveis plasmáticos de vitamina D com a densidade óssea (Argao *et al.*, 1993; Bucuvulas *et al.*, 1990). Já Chongrisawat e colaboradores (2001) compararam a densidade óssea mineral com níveis plasmáticos de 25OHD em crianças colestáticas e constataram que pacientes com osteoporose apresentavam menores valores da vitamina. Portanto, a deficiência de vitamina D não é única determinante da doença metabólica óssea em crianças e adultos colestáticos, mas sua deficiência pode ser corrigida e assim prevenir um dos fatores que contribuem para essa morbidade.

9 - CONCLUSÕES

9 - CONCLUSÕES

A média dos níveis plasmáticos de vitamina D das crianças e dos adolescentes com colestase crônica do estudo foi significativamente menor quando comparada com a de crianças e de adolescentes normais, havendo uma prevalência de hipovitaminose D entre esses pacientes de 36%.

A prevalência de desnutrição variou entre 23,8% e 63%, dependendo da medida utilizada. Quando consideramos como padrão o escore Z da altura em relação à idade, observamos uma prevalência de 33,3%. A ingesta calórica foi deficiente, havendo, porém, um equilíbrio em relação aos macronutrientes e uma deficiência mais acentuada na ingestão de ferro e zinco.

A prevalência de alterações ao exame neurológico das crianças e dos adolescentes com colestase foi de 43%, mas não foi possível verificar os níveis plasmáticos de vitamina E para estabelecer uma eventual relação por dificuldades na validação das técnicas desenvolvidas.

Não observamos relação estatisticamente significativa entre estado nutricional, tempo de colestase ou uso regular de suplemento de vitaminas e os níveis plasmáticos de vitamina D.

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aertes DRGC. O Retardo no crescimento e seus determinantes: o caso de Porto Alegre. Porto Alegre, 1996. [Tese – Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

Alpers DH, Stenson WF, Bier DM. eds. Vitamin E. In: Manual of Nutritional Therapeutics. 3^o ed. Boston. Lihle, Brown and Company 1995:176-85.

Anção MS, Cupparly L, Ludisco E, Draibe AS, Sigulen D. Centro de Informática da UIFESP – EPM. Sistema de apoio à decisão em nutrição, versão 2.5, 1995.

Aparício JM, Bélanger-Quintana A, Suárez L, Mayo D, Benítez J, Diaz M, Escobar H. Ataxia whit Isolated Vitamin E Deficiency: Case Report and Review of the Literature. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 2001;33:206-10.

Argao EA, Balistreri WF, Hollis BW, Ryckman FC, Heubi JE. Effect of orthotopic liver transplantation on bone mineral content and serum vitamin D metabolites in infants and children with chronic cholestasis. Hepatology 1994;20:598-603.

Argao EA, Specker BL, Heubi JE. Bone mineral content in infants and children with chronic cholestatic liver disease. Pediatrics 1993;91(6):1151-4.

Balistreri W. Liver disease in infancy and childhood. In: Schiffer, Sorell MF, Maddrey WC. Schiff's Diseases of the Liver. 8^a ed Lippincott – Raven, Philadelphia 1999:1357-512.

Batres LA, Maller ES. Laboratory assessment of liver function and injury in children. In Suchy FJ, Balistreri F eds. Liver Disease in Children. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2001:155-69.

Benitez CAV, Garza SDR, Aranda JAG. Suplementación de DL – α -Tocoferol Acetato Oral en niños com colestasis crónica y déficit de vitamina E. Rev Gastroenterol Méx 1996; 61(1):14-8.

Bieri JG, Tolliver TJ, Catignani GL. Simultaneous determination of α -tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. Am. J Clin Nutr 1979;32: 2143-9.

Biervliet SV, Biervliet JPV, Bernard D, Matthys M, Vercaemst R, Blanton V. Serum α -tocopherol and selenium in belgian infants and children. *Biological Trace Element Research* 2001;79:115-9.

Bricarello LP, Goulart RMM. O papel das vitaminas em lactentes e crianças. *Pediatria Moderna* 1999;25(10):797-807.

Brigelus – Flohé R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 1999;13:1145-55.

Bucualas JC, Heubi JE, Specker BL, Gregg DJ, Yergey AL, Vieira NE. Calcium absorption in bone disease associated with chronic cholestasis during childhood. *Hepatology* 1990;12:1200-5

Bucualas JC, Horn JA, Slusher J, Alfaro MP, Chernausk SD. Growth hormone insensitivity in children with biliary atresia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1996;23:135-40.

Cabêdo MTC. Terapia nutricional em situações especiais: insuficiência hepática. In: Falcão MC, Carazza FR. *Manual Básico de Apoio Nutricional em Pediatria*. Editora Atheneu. São Paulo 1999:99-106.

Canalis E. Regulation of bone remodeling. In: Favus MJ. ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2^o ed. New York, Raven 1993:33-7.

Carazza FR, Kimura HK. Avaliação nutricional. In: Júnior MT, Tahhuri U. *Suporte Nutricional em Pediatria*. Editora Atheneu. São Paulo. 1999:39-50.

Cardoso AL, Porta G, Vieira MA, Carazza FR. Caracterização nutricional de crianças com colestase crônica. *J. Pediatr* 1997;73(1):43-50.

Cedán A, Quintana D, Castañeda C, Frago T, Rivero M. Valor del estudio de los lípidios em niños com enfermedades del hígado. *Rev Cubana Pediatr* 1987;59(5):797-806.

Chesney RW. Bone and vitamin D Metabolism. In: Nelson WE, Behrman RE, Vaughan VC. *Textbook of Pediatrics* 15^o ed. Philadelphia Sauders 1996:1984-90.

Chin SE, Shepherd RW, Thomas BJ, Cleghorn GJ, Patrick MK, Wilcox JA, Ong TH, Lynch SV, Strong R. The nature of malnutrition in children with end-stage liver disease awaiting orthotopic liver transplantation. *Am J Clin Nutr* 1992;56:164-8.

Chongsrisawat V, Rottanamongkol P, Chaiwatanarat T, Chandrakamol B, Poovorawan Y. Bone density and 25-hydroxyvitamin D level in extrahepatic biliary atresic. *Pediatr Surg Int* 2001;17:604-8.

Clemens TL, Adams JS. Vitamin D and metabolites. In: Favus MJ. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2^a ed. New York, Raven 1993:103-12.

Cywes C, Millar AJW. Assessment of the nutritional status of infants and children with biliary atresia. *S Afr Med J* 1990;77:131-5.

De Leenher AP, De Bevere VO, Cruyl AA, Claeys AE. Determination of serum α -tocopherol (vitamin E) by High – performance liquid chromatography. *Clin. Chem* 1978;24(4):545-90.

Delgado AF. Avaliação nutricional e metabólica da criança. In: Falcão MC, Carazza FR. Manual Básico de Apoio Nutricional em Pediatria. Editora Atheneu, São Paulo. 1999:17-22.

Delvin EE, Salle BL, Reygrobellet B, Melier G, Claris O. Vitamin A and E supplementation in breast-fed newborns. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2000;31:562-5.

Diamond TH, Stiel D, Lunzer M *et al.* Hepatic osteodystrophy: Static and dynamic bone histomorphometry and serum bone Gla-protein in 80 patients with chronic liver disease. *Gastroenterology* 1989;96:213-21.

Dornaus, Walazak SZ. Suplementação Vitamínica em Hepatopatias. Artigo de Revisão. *Jornal de Pediatria* 1991;67(3/4):122-5.

Elias E, Muller DPR, Scott J. Association of spinocerebellar disorders with cystic fibrosis or chronic childhood cholestasis and very low serum vitamin E. *The Lancet* 1981;12:1319-21.

Erlinger S. Medical management of chronic cholestasis. In: Schiff E, Sorrel MM, Mandrey WC ed. Schiff's Diseases of the liver. 8^o ed. Philadelphia Lippincott – Raven Publishers 1999:611-29.

FAO/OMS/UNU DE EXPERTOS ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD- Necesidades de energia y proteínas: informe de una reunion consultiva conjunta, Ginebra, OMS, 1985.

Farrel PM, Levine SL, Murphy D, Adams AJ. Plasma tocopherol levels and tocopherol-Lipid relationships in a normal population of children as compared to healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1978;31:1720-6.

Feranchak AP, Ramires RO, Sokol RJ. Medical and nutritional management of cholestasis. In: Suchy FJ, Sokol RJ, Balistreri F eds. *Liver Disease in children*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2001:195-237.

Ferreira CT, Vieira SM, Silveira TR. Transplante Hepático. *Jornal de Pediatria*, 2000;76(2): 198-208.

Fitzpatrick S, Sheard NF, Clark NG, Rilter ML. Vitamin D – deficient Rickets: A multifactorial disease, *Nutrition Reviews* 2000;58(7):218-22.

Fomon SJ, Bell EF. In: Fomon SJ. *Nutrition of Normal Infants*. Mosby. Philadelphia. 1993. p. 339-47.

Frisancho, AR. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr* 1981;34:2540-5.

Garcia RB, Lozano JM, Lopez EN, Salmeron JLG, Font JAM. Vitamina E sérica en lactentes eutróficos y mal nutridos. *An Esp Pediatr* 1987;21(1):17-9.

Gazal CHA. O inquérito nutricional, antropometria e avaliação da absorção intestinal de proteínas e gorduras pela dosagem de alfa-1-antitripsina fecal e do esteatócrito na avaliação nutricional de crianças com cirrose. Porto Alegre, 1995. [Dissertação-Mestrado-Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

Grüdtner VS, Weingrill P, Fernandes AL. Aspectos da absorção e metabolismo do cálcio e vitamina D. *Rev Bras Reumatol* 1997;37(3):143-51.

Guggenheim MA, Ringel SP, Silverman A, Graber BE. Progressive neuromuscular disease in children with chronic cholestasis and vitamin E deficiency: Diagnosis and treatment with alpha toperol. *The Journal of Pediatrics* 1982;100(1):51-8.

Hansen LG; Warwick WJ. A fluorimetria micromethod for serum vitamins A and E. *Am J Clin Pathol* 1969;51:538-41.

Hashim SA, Schuttringer GR. Rapid determination of tocopherol in macro and microquantities of plasma. results obtained in various nutrition and metabolic studies. *American Journal of clinical Nutrition* 1996;19:137-45.

Heubi JE, Hollis BW, Specker B, Tsang RC. Bone disease in chronic childhood cholestasis. I. vitamin D absorption and metabolism. *Hepatology* 1989;9(2):258-64.

Hollick M. Vitamina D. In: Nóbrega FJ. Distúrbios da nutrição. Revinter, Rio de Janeiro, 1998:339-45.

Hollis BW. Comparison of commercially Available 125I-based RIA methods for determination of circulating 25-hydroxyvitamin D. *Clinical Chemistry* 2000;46(10):1657-61.

Ihara H, Ishigaki H, Shino Y, Hashizume N, Takase M, Nagao J, Sumiyama Y. Clinical and analytical evaluation of the simultaneous, HPLC assay of retinol and α tocoferol. *J Nutr Sci Vitaminol* 2000;46:257-62.

Issa S, Rotthauwe HW, Burmeister W. 25-Hdroxyvitamin D and vitamin E absorption in healthy children and children with chronic intrahepatic cholestasis. *Eur J Pediatr* 1989;148: 605-9.

Issler RMS, Giugliani ERJ. Identificação de grupos mais vulneráveis à desnutrição infantil pela medição do nível de pobreza. *Journal de Pediatria* 1997;73(2):101-5.

Jones G, Blizzard CL, Riley MD, Parameswaran V, Greenaway TM, Dwyer T. Vitamin D levels in prepuberal children in southern tasmanic: prevalence and determinants. *European Journal of Clinical Nutrition* 1999;52:824-9.

Julianto T, Yuen KH, Noor AM. Simple high performance liquid chromatographic method for determination of α tocopherol in human plasma. *Journal of Chromatography B* 1999;732:227-31.

Kalra V, Grover JK, Ahuja GK, Rathi S, Gulatis, Kalra N. Vitamin E administration and reversal of neurological deficits in protein-energy malnutrition. *Journal of Pediatrics* 2001;47:39-45.

Kaplan MM, Elta GH, Furie B, Sadowski JA, Russel RM. Fat soluble vitamin nutriture in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1988;95:787-92.

Kaufman SS, Murray ND, Wood R. Shaw Jr BW, Vanderhoof JA. Nutritional support for the infant with extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr* 1987;110:679-86.

Lefrève AFB. In: Tolosa AP, Canelas HM eds. *Propedêutica neurológica. temas essenciais*. 2^o ed. Savier, São Paulo, 1971. p. 413.

Mahan LK, Stump ES. eds. *Vitaminas*. In: Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia. 9^o ed. São Paulo: Roca, 1998. p. 77-121.

Maller ES. Jaudice. In: Altschuler SM, Liacouras CA. *Clinical pediatric gastroenterology*. Philadelphia 1998. p. 49-61.

Marsh MN, Riley SA. Digestion and absorption of nutrients and vitamins. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, ed. *Sleisenger & Fordtran's. Gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis and management*. 6^o ed. Philadelphia: WB Saunder Company, 1998:1471-500.

Mattar REG. Estado nutricional, indicadores de ferro corporal e absorção intestinal de ferro em crianças portadoras de doença hepática crônica com colestase e sem colestase. São Paulo. 1999 [Dissertação-Mestrado-Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina].

Mechica JB. Raquitismo e osteomalácia. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 1999;43(6):457-66.

Mello ED, Silveira TR. Esteatócrito: um método semiquantitativo de avaliação de gordura fecal-padronização do teste. *Jornal de Pediatria* 1995;71(5):273-5.

Mieli-Vergani G, Haward ER, Mowat AP. Liver disease in infancy: a 20 years perspective. *Gut* 1991;8(supl):123-8.

Ministério da Saúde. *Metas governamentais para o ano 2000*. Brasília: Ministério da Saúde; 1996.

Monte CMG. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. *Jornal de Pediatria*, 2000;76(3):285-97.

Moreno LA, Gottrand F, Hoden S, Tusck D, Loeville GA, Farriax JP. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1991;12:213-6.

Müller MJ. Malnutrition in cirrosis. *Journal of Hepatology* 1995;23(1):31-5.

Munõz SJ. Nutritional therapies em liver disease. *Seminars in Liver Disease*, 1991;11(4):278-91.

Murray KF, Jonas MM. Biliary atresia. In: Altschuler SM, Liacouras CA. *Clinical Pediatric Gastroenterolog*. Philadelphia 1998:331-9

NCHS - National Center for Health Statistic - Organização Mundial de Saúde - Growth Curves for Children, Birth - 18 years Washington DC, U.S.; 1997. Department of Health, Education and Welfare. Publication PHS (78):1650.

Nogueira-de-Almeida CA, Ricco RG, Nogueira PC, Del Campo LA, Muccillo G. Avaliação do uso do percentil 10 de peso para idade como ponto de corte para detecção de crianças sob risco nutricional. *Jornal de Pediatria* 1999;75(5):345-9.

Nomplegi DJ, Bonkovsky HL. Nutritional supplementation in chronic liver disease: an analytical review. *Hepatology* 1994;19:518-33.

Nora DB, Amaral OB *et al.* Evokade potentials for the evaluation of latent hepatic encephalopathy pediatric liver transplant candidates. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2000;31:371-6.

Norman AW, Henry LH. Vitamin D: metabolism and mechanism of action. In: Favus MJ. ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2^o ed. New York, Raven, 1993:63-70.

Phelps DL. Current perspectives on vitamin E in infants nutrition. *Am J Clin Nutr* 1987; 46:187-91.

Phillips J, Angulo P, Petterson T, Lindor KD. Fat soluble vitamin level in patients with primary biliary cirrhosis. *The American Journal of Gastroenterology* 2001;96(9):2745-50.

Pugliese MT, Blumberg DL, Hludzinski J, Kay S. Nutritional rickets in suburbia. *Journal of the American College of Nutrition* 1998;17(6):637-41.

Recommended dietary allowances (RDA). Subcommittee on the tenth edition of RDAs. Food and nutrition board commission on life sciences - National Research Council, Washington D.C., National Academy Press, 1989.

Reichen J, Ross FJ, Zimmermann H. Functional considerations in the assessment of therapy in chronic cholestasis diseases. In: Lentz M, Reichen J. *Paediatric Cholestasis: novel approach to treatment*. United Kingdom: Kluwer, 1993:119-25.

Risteli L, Risteli J. Biochemical markers of bone metabolism. *Ann Int Med* 1993;25:116-21.

Roquete MLV. Colestase neonatal. *Jornal de Pediatria* 2000;76(2):187-97.

Rosenblum JL, Kreating JP, Prensky AL, Nelson JS. A progressive neurologic syndrome in children with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1981;304:503-8.

Satya-Murty S, Howard L, Krohel G, Wolf B. The spectrum of neurologic disorder from vitamin E deficiency. *Neurology* 1986;36:917-21.

Sherlock S, Dooley. J. eds. Cholestasis. In: *Diseases of the liver and biliary System*. 10 ed. Oxford: Blackwell Science, 1997:217-37.

Sigulen DM, Devicenzi UM, Less AC. Diagnóstico do estado nutricional da criança e do adolescente. *Jornal de Pediatria*, 2000(3):275-84.

Silveira TR. Icterícia na infância. In: Mattos AA, Dantas W. Compendio de Hepatologia. 2^o ed. São Paulo. Fundação Editorial BYK, 2001:207-36.

Silveira TR. Icterícia na infância. In: Mattos AA, Dantas W. Compêndio de Hepatologia. São Paulo. Fundação Editorial Byk, 1995:100-26.

Silveira, TR, Pires ALG. Icterícia colestática neonatal. In: Pena, F.J.; Wehba, J, Fagundes Neto U. Gastroenterologia Pediátrica, 2^o ed. Rio de Janeiro, Medsi. 1991 p. 465-87.

Socha P, Koletzko B, Pawlowska J, Proszynska K, Socha J. Treatment of cholestatic children with water – soluble vitamin E (α Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate): Effects on serum vitamin E, lipid peroxides and polyunsaturated fatty acids. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1997;24:189-93.

Socha P, Koletzko B, Swiatkowska E, Pawlowska J, Stolarczyk A, Socha J. Essencial fatty acid metabolism in infants with cholestasis. *Acta Paediatr* 1998;87:278-83.

Sokol RJ, Bove KE, Heubi JE, Iannaccone ST. Vitamin E deficiency during childhood cholestasis: presence of sural nerve lesion prior to 2 1/2 years age. *J Pediatr* 1983,103:197-204.

Sokol RJ, Heubi JE, Iannaccone S, Bove KE, Balistreri WF. Mecanism causing vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis. *Gastroenterology* 1983;85:1172-82.

Sokol RJ, Heubi JE, Dannacone ST, Bore KE, Balestreri WF. Vitamin E deficiency with normal serum vitamin E concentrations in children with chronic cholestasis. *The New England Journal of Medicine* 1984;310(19):1209-12.

Sokol RJ, Guggenheim MA, Heubi JE, Iannaccone ST, Butler-Simon N, Jackson V *et al.* Frequency and clinical progression of the vitamin E deficiency neurologic disorder in children with prolonged neonatal cholestasis. *AJDC* 1985;139:1211-5.

Sokol RJ, Guggenheim MA, Iannaccone ST, Barkhaus PE, Miller C, Silverman A *et al.* Improved neurologic function after long - term correction of vitamin E deficiency in children with chronic cholestasis. *N Engl J Med* 1985;313:1580-6.

Sokol RJ. Vitamin E and neurological deficits. *Adv pediatr* 1990;37:119-48.

Sokol RJ, Stall C. Anthropometric evaluation of children with chronic liver disease. *Am J Clin Nutr* 1990;52:203-8.

Sokol RJ, Butler-Simon N, Conner C, Heubi JE, Sinatra FR, Suchy FJ *et al.* Multicenter trial of d- α -tocophery polyethylene glycol 1000 succinate for treatment of vitamine deficiency in children with chronic cholestasis. *Gastroenterology* 1993;104:1727-35.

Stormon M, Dorney S, Kamath KR, O'Loughlin E, Gaskin KJ. The changing pattern of diagnosis of infantile cholestasis. *J Paediatr Child Health* 2001;37:47-50.

Suchy FJ. Approach to the infant with cholestasis. In: Suchy FJ, Sokol RJ, Balistreri F eds. *Liver disease in children*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2001:187-93.

Tazawa Y, Nakagawa M, Yamada M, Konno T, Tada K, Ohi R, Kasai M. Serum vitamin E levels in children with corrected biliary atresia. *Am J Clin Nutr* 1984;40:246-50.

Tershakovec AM. In: Altschuler SM; Liacouras CA. *Clinical Pediatric Gastroenterology*. Philadelphia 1998:95-103.

Trautwein C, Possienke M, Schlitt H, Böker KHW, Horn R, Raab R, Manns MP, Brabant G. Bone density and metabolism in patients with viral hepatitis and cholestatic liver diseases before and after liver transplantation. *The American Journal of Gastroenterology* 2000;95(2):2343-51.

Victora CG, Gigante DP, Barros AJD, Monteiro CA, Onis M. Estimativa da prevalência de déficit de peso/idade em crianças brasileiras. *Rev Saúde Pública* 1998;32(4):321-7.

Vieira SMG. Densidometria óssea e fosfatase alcalina esquelética em crianças e adolescentes com colestase crônica. Porto Alegre, 1995. [Dissertação-Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

Waldum HL. Sodium fluoride prevents bone loss in primary biliary cirrhosis. *J Hepatology* 1992;15:345-9.

Weinmann ARM, Oliveira MS, Jorge SM, Martins AR. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of retinol by fluorimetry and tocopherol by ultraviolet absorbance in serum of newborns. *Journal of chromatography* 1999;729:231-6.

WHO Expert Committee on Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry Geneva, WHO Technical Report Series:854, 1995.

Willet WC, Stampfer MJ, Underwood BA, Speizer FE, Rosner B, Hennekens CH. Validation of a dietary questionnaire with plasma carotenoid and α -tocopherol levels. *Am J Clin Nutr* 1983;38(4):631-9.

ANEXOS

ANEXO I

Termo de Consentimento (Colestáticos)

As crianças portadoras de doenças crônicas de fígado têm dificuldades em absorver as gorduras e as vitaminas de uma dieta normal. Por isso, procuramos recuperar, da melhor forma possível, essas perdas através da orientação nutricional e da reposição das vitaminas. Porém, tem-se observado em estudos que, muitas vezes, essa reposição não é suficiente e pode haver conseqüências para as crianças.

Como sabemos que a deficiência da vitamina E pode levar a problemas neurológicos nas crianças com doença crônica de fígado e que esses problemas podem ser revertidos com um ajuste de dose ou modificações na administração da vitamina, propusemo-nos, através de um estudo, a verificar a quantidade de vitamina E no sangue e compara-la com o tipo de alimentação, com o estado nutricional e detectar sinais neurológicos precoces dessa deficiência.

Caso haja concordância de seu filho participar desse estudo, serão realizados os seguintes procedimentos, no mesmo dia, em que vier coletar os exames habituais:

- coleta de sangue juntamente com os exames que realiza de rotina. Esta coleta será feita da mesma forma a que seu filho já está acostumado;
- exame neurológico, realizado por um médico neurologista, que constará apenas de exame físico, sem colocação de aparelhos que causem dor ou desconforto;
- avaliação nutricional que consistirá na determinação do peso, da altura, da circunferência do braço e medida da quantidade de gordura do braço, usando um adipômetro (aparelho que mede a gordura abaixo da pele);
- Nos 3 dias antes de vir realizar os exames acima, será necessário que sejam anotados todos os alimentos e a quantidades deles ingeridas pela criança.

Eu, fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa dessa pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual a criança por quem sou responsável estará envolvida, dos desconfortos tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que posso solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, novas informações, obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a essas informações.

O profissional certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Fui informado que, caso existam gastos adicionais, esses serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Assinatura do Paciente: _____

Assinatura do Investigador: _____

Assinatura do Orientador: _____

Pesquisador responsável: Marília Dornelles Bastos

Telefone para contato: 9995 - 1730

ANEXO II

Protocolo

Níveis plasmáticos de α tocoferol em crianças e em adolescentes com colestase crônica.

I - Identificação:

- 1 – Número: _____
- 2 – Nome: _____
- 3 – Registro HCPA: _____ 4 – Data de nasc.: ___/___/___
- 5 – Sexo: _____ 6 – Cor: _____
- 7 – Data da realização do estudo: ___/___/___
- 8 – Idade: _____

II - Diagnóstico clínico: _____

Data do diagnóstico: ___/___/___

III - Exames laboratoriais:

- TGO: _____
- TGP: _____
- Bilirrubinas: _____
- GGT: _____
- Albumina: _____
- Fosfatase Alcalina: _____

IV - Inquérito nutricional:

- VCT: _____
- % lipídios: _____
- % proteínas: _____
- % carboidrato: _____
- % oligoelementos: _____

V - Suplementação de vitamina:

Vitamina A? () S () N

- Especialidade: _____

- Via: _____

- Dose: _____

- Início: _____

Vitamina K? () S () N

- Especialidade: _____

- Via: _____

- Dose: _____

- Início: _____

Vitamina D? () S () N

- Especialidade: _____

- Via: _____

- Dose: _____

- Início: _____

Vitamina E? () S () N

- Especialidade: _____

- Via: _____

- Dose: _____

- Início: _____

VI - Uso de medicamentos:

Dose/kg

- Fenobarbital: S () N ()

- Rifampicina: S () N ()

- Carbamazepina: S () N ()

- Ac. Ursodexosicólico: S () N ()

- Corticóide: S () N ()

- Azatioprina: S () N ()

- Outros: S () N ()

VII - Avaliação nutricional:

1. Peso: _____ 2. Altura: _____ 3. Circunferência do Braço: _____

4. Espessura da Prega Tricipital (ept): _____ - Percentil _____

5. Circunferência Muscular do Braço (cmb): _____ - Percentil _____

6. Área Muscular do Braço (AMB): _____ - Percentil _____

7. Escore Z p/idade cronológica: _____

Z Peso/idade: _____

Z Altura/idade: _____

Z Peso/altura: _____

VIII - Avaliação neurológica: (vide protocolos anexos)

Outros achados: _____

Observações: _____

IX - Dosagem de vitamina E: _____

X - Dosagem de Lipídios totais (LT):

Lipídios totais: _____

Colesterol: _____

Triglicerídios: _____

XI - Relação vitamina E/LT: _____

XII - Dosagem de vitamina D: _____

ANEXO III

ANEXO IV

Exame Neurológico do Lactente

1 - Exame de Crânio

a) Perímetros: PC: _____ BA: _____ AP: _____ PT: _____

b) Fontanela: _____

c) Transiluminação: _____

2 - Fácies: _____

3 - Atitude: _____

4 - Estado de Consciência: _____

5 - Fala: _____

6 - Equilíbrio: _____

a) Estático: _____

b) Dinâmico: _____

7 - Sistema Motor: _____

a) Mobilidade espontânea: _____

b) Tono muscular: _____

c) Força muscular: _____

d) Coordenação: _____

e) Movimentação automática: _____

f) Reflexos _____

1. Profundos: _____

1.1 - Aquileu: _____

1.2 - Patelar: _____

1.3 - Adutor: _____

1.4 - Estilo-radial: _____

1.5 - Bicipital: _____

1.6 - Tricipital: _____

1.7 - Nasopalpebral: _____

1.8 - Mental: _____

1.9 - Oro-orbicular: _____

2. Superficiais: _____

2.1 - Cutâneo-abdominais: _____

2.2 – Cutâneo-plantares: _____

2.3 – Cremasterianos: _____

3. Primitivos: _____

3. 1 - Sucção: _____

3. 2 - Pontos Cardeais: _____

3. 3 - Fuga asfixia: _____

3. 4 - Moro: _____

3. 5 - Preensão dos dedos: _____

3. 6 - Preensão dos artelhos: _____

3. 7 - Apoio plantar: _____

3. 8 - Marcha reflexa: _____

3. 9 - Magnus -e-Kleijn: _____

3.10 - Landau I: _____

3.11 - Landau II: _____

3.12 - Extensão cruzada: _____

3.13 - Reptação: _____

8 - Sinais Meningorradiculares: _____

9 - Sensibilidade

a) Tátil: _____ c) Dolorosa: _____

b) Térmica _____ d) Vibratória: _____

10 - Nervos Cranianos: _____

ANEXO V

Exame Neurológico Pediátrico

1 - Exame de Crânio

a) Perímetros: PC: _____ BA: _____ AP: _____ PT: _____

2 - Fácies: _____

3 - Atitude: _____

4 - Estado de Consciência: _____

5 - Fala: _____

6 - Equilíbrio: _____

7 - Sistema Motor: _____

a) Mobilidade ativa: _____

a.1 - Trofismo: _____

a.2 - Força muscular: _____

a.3 - Manobras deficitárias: _____

b) Motricidade automática: _____

c) Tono muscular: _____

d) Coordenação: _____

e) Reflexos: _____

1. Profundos: _____

1.1 - Aquileu: _____

1.2 - Patelar: _____

1.3 - Adutor: _____

1.4 - Estilo-radial: _____

1.5 - Bicipital: _____

1.6 - Tricipital: _____

1.7 - Nasopalpebral: _____

1.8 - Mental: _____

1.9 - Oro-orbicular: _____

2. Superficiais: _____

2.1 - Cutâneo-abdominais: _____

2.2 – Cutâneo-plantares: _____

2.3 – Cremasterianos: _____

8 - Sinais Meningorradiculares: _____

9 - Sensibilidade

a) Superficial

a.1) Tátil: _____

a.2) Térmoalgésica: _____

b) Profunda: _____

b.1) Dor: _____

b.2) Palestésica: _____

b.3) Discriminativa: _____

10 - Nervos Cranianos: _____

ANEXO VI

Termo de Consentimento (Controles)

As quantidades de vitaminas que se encontram no sangue podem ser dosadas por exames laboratoriais. Este exame é muito importante para pessoas que tenham dificuldade de absorver os alimentos por apresentar doenças do fígado ou do intestino.

Estamos realizando um estudo para verificar a quantidade de vitamina E no sangue de crianças portadoras de doenças do fígado e, assim, poder prevenir as conseqüências dessa deficiência que são problemas neurológicos.

Para podermos obter um padrão com crianças normais, solicitamos a autorização de utilizar uma amostra do sangue que será coletado de seu filho para os exames que necessita realizar, e dosar a quantidade de vitamina E existente. A coleta de sangue será como qualquer outra, não aumentando riscos ou dor para a criança.

A pesquisadora Marília Dornelles Bastos compromete-se a enviar o resultado do exame ao endereço abaixo assim que os obtiver.

Eu, _____ fui informado dos objetivos da pesquisa. Recebi as informações necessárias e foram esclarecidas as minhas dúvidas. Dessa forma, autorizo a utilização de parte do sangue coletado da criança por quem sou responsável para a referida pesquisa. Ficou claro que este procedimento não aumentará os riscos, a dor e que não será cobrado nenhum valor para a realização dos referidos exames.

Nome da criança: _____

Data de nascimento: _____

Registro HCPA: _____

Endereço: _____

Grau de parentesco do responsável: _____

Assinatura do Responsável

Pesquisadora: Marília Dornelles Bastos

Telefone p/contato: 9995-1730

ANEXO VII

Perfil Bioquímico Lipídico e Vitamina D das Crianças com Colestase

Ident.	Idade	TGO	TGP	BT/BD	GGT	FA	ALB.	LT	COL	TRI	VIT.D ng/ml	Suplemento oral	OBS.
1	9 m	191	237	3,1/1,6	317	858	3,9	720	211	115	17,821	S	AVBEH
2	5 a 2 m	170	69	16,2 / 7,6	72	836	2,9	410	103	101	10,192	S	AVBEH
3	10 m	224	53	8,4/ 3,9	53	1062	2,6	505	98	158	11,174	S	AVBEH
4	13 a	154	58	8,1/4,9	850	1204	3,5	920	202	427	15,884	S	HCPT
5	1 a 9 m	137	84	11,5/ 6,5	130	459	2,4	580	153	234	15,413	S	AVBEH
6	9 m	225	229	14,5/ 7,9	215	2,305	2,7	585	188	211	10,748	S	S/D
7	13 a 11 m	338	190	5,3/ 2,5	33	617	2,2	396	82	73	4,1055	N	S/D
8	5 m 15 d	152	79	8,1/ 4,1	440	1567	2,6	792	233	204	7,9937	S	AVBEH
9	6 m	105	30	38/ 19,2	38	359	3	413	82	90	28,115	N	Hepatite N.
10	3 a 5 m	125	72	1,6/ 0,7	105	1682	3,2	510	136	93	28,033	S	AVBEH
11	7 a 9 m	83	111	1,8/ 0,8	341	1303	4	670	218	143	21,007	N	S. Alagille
12	1 a 3 m	154	68	29,5/ 22,6	180	1205	4	540	143	125	4,3446	S	AVBEH
13	18 a	187	89	3,8/ 2,2	80	587	2,1	510	148	86	6,9592	N	FHC/Col.
14	13 a	675	417	4,7/ 3,5	133	946	4,4	480	108	80	5,2052	N	HCAI
15	3 a	131	115	1,6/ 0,8	482	996	3,8	794	242	162	13,631	S	AVBEH
16	4 m	477	365	17,9/ 9,3	733	1935	3,5	1.169	450	134	4,7355	S	AVBEH
17	13 a	134	144	2,9/ 1,0	43	698	3	530	124	89	9,7474	N	HCAI
18	16 a	96	119	3,2 / 1,3	316	737	3,6	552	137	69	18,601	N	AVBEH
19	7 m	95	72	7,4 / 4,4	322	1236	2,7	605	154	150	32,662	S	AVBEH
20	3 a 11 m	212	149	14,3/ 7,3	100	1500	4,5	897	250	292	3,1203	S	S. Alagille
21	11 a 5 m	125	115	5,0/2,5	94	745	2,5	445	126	56	7,3323	S	AVBEH
22	2 a 9 m	150	208	4,6/2,5	178	3562	4	560	169	80	10,757	N	S/D

ANEXO VIII

Vitamina D e Perfil Lipídico de Crianças Normais (Controles)

Identificação	Idade (m)	LT	COL	TRI	Vitamina D (ng/ml)
23	108	416	142	61	37,161
24	144	388	120	51	67,783
25	156	500	124	73	13,086
26		580	165	69	43,532
27	108	610	171	55	44,644
28	144	530	160	56	19,222
29	48	650	169	162	23,768
30	25	488	131	92	18,552
31	9	405	95	107	13,845
32	19	540	156	90	10,944
33	17				12,824
34	130	530	144	113	9,2984
35	148	720	168	220	11,67
36	52	550	130	126	27,227
37	41	436	111	86	45,14
38	5	667	161	132	9,102
39	35	668	144	201	27,214

ANEXO IX

Perfil Nutricional das Crianças com Colestase

Ident.	Padrão NCHS (Percentil)					Score Z		
	Peso (%)	Estatura (%)	CB	CMB	PCT	A / I	P / I	P / A
1	5 a 10	5	< 5	< 5	< 5	- 1,6	- 1,6	- 0,3
2	70	10 a 20	25 a 50	75 a 90	5	0,5	- 0,9	1,5
3	10 a 20	5 a 10	< 5	< 5	< 5	- 1,4	- 1	0,1
4	2 a 5	< 2	< 5	< 5	10 a 25	- 2,4	- 1,9	
5	50 - 60	80 a 90	< 5	< 5	10 a 25	0,1	- 0,1	- 0,5
6	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	- 1,8	- 2,6	- 1,6
7	90 a 95	50 a 65	50 a 75	75 a 90	25 a 50	- 0,3	- 1	
8	< 3	< 3	< 5	< 5	< 5	- 2,9	- 2,7	- 0,7
9	< 3	< 3	< 5	< 5	< 5	- 2,1	- 2,2	- 0,6
10	60	5 a 10	75	> 95	10	- 1,5	0,2	1,4
11	< 3	< 3	< 3	10 a 25	10 a 25	- 3	- 2,6	- 1
12	20 a 30	5 a 10	< 5	10 a 29	< 5	- 1,5	- 0,7	0,3
13	35 a 50	5 a 10	10 a 25	< 5	75 a 90			
14	2 a 5	< 5	< 5	< 5	< 5	0	1,7	
15	50 a 60	< 3	25 a 50	75 a 90	5	- 2,8	0,2	2,1
16	20 a 30	60 a 70	< 5	< 5	< 5	0,5	- 0,6	- 1,4
17	85 a 90	35 a 50	50 a 75	90 a 95	10 a 25	- 0,4	0,7	
18	95 a 97	65 a 75	50 a 75	75 a 90	50	0,1	1	
19	20 a 30	20 a 30	10	10 a 25	10 a 25	- 0,6	- 0,6	- 0,4
20	< 3	< 3	< 5	< 5	< 25	- 3,2	- 2,1	- 0,1
21	25 - 30	85 - 90	< 5	< 5	< 5	0,8	- 1,1	
22	3 - 5	< 5	< 5	< 5	< 5	- 2,7	- 1,8	- 0,2

ANEXO X

Inquérito Alimentar

Ident.	%RDA				% em relação ao VET				
	VET	Prot.	Lip.	Gli.	Ca	P	Mg	Fe	Zn
1	94%	15%	33%	52%	124%	137%	172%	24%	56%
2	86%	12%	26%	62%	99%	107%	108%	53%	32%
3	108%	14%	31%	55%	115%	133%	178%	99%	171%
4	63%	16%	31%	53%	36%	57%	47%	37%	21%
5	115%	14%	29%	57%	90%	92%	134%	34%	29%
6	89%	12%	25%	63%	125%	123%	126%	10%	59%
7	62%	17%	39%	44%	38%	66%	36%	55%	45%
8	42%	16%	27%	58%	63%	66%	62%	1%	27%
9	55	5%	32%	63%	40%	32%	60%	2%	23%
10	84%	14%	27%	59%	84%	88%	117%	120%	50%
11									
12	113%	14%	28%	58%	57%	98%	133%	38%	35%
13	69%	10%	26%	64%	63%	68%	44%	100%	38%
14	64%	13%	36%	51%	48%	63%	32%	44%	29%
15	102%	14%	28%	58%	127%	135%	134%	73%	17%
16	150%	13%	30%	57%	262%	279%	271%	8.0%	76%
17	58%	16%	35%	49%	23%	51%	21%	42%	17%
18	87%	18%	32%	50%	97%	149%	51%	100%	67%
19	93%	13%	31%	56%	62%	92%	125%	33%	40%
20	112%	13%	25%	62%	107%	118%	75%	130%	48%
21	135%	8%	30%	62%	105%	99%	80%	186%	96%
22	95%	10%	27%	64%	99%	83%	160%	150%	86%

