

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**PERFIL INFLAMATÓRIO E ESTADO
NUTRICIONAL DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES
COM HEPATOPATIA CRÔNICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DANIELE SANTETTI

Porto Alegre, Brasil

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**PERFIL INFLAMATÓRIO E ESTADO
NUTRICIONAL DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES
COM HEPATOPATIA CRÔNICA**

DANIELE SANTETTI

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Ayako Sueno Goldani

Coorientadora: Dra. Cristina Toscani Leal Dornelles

Porto Alegre, Brasil

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Santetti, Daniele

Perfil inflamatório e estado nutricional de crianças e adolescentes com hepatopatia crônica / Daniele Santetti. -- 2013.

118 f.

Orientadora: Helena Ayako Sueno Goldani.

Coorientadora: Cristina Toscani Leal Dornelles.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. citocinas. 2. estado nutricional. 3. doença hepática crônica. 4. cirrose. 5. criança. I. Goldani, Helena Ayako Sueno, orient. II. Dornelles, Cristina Toscani Leal, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

22/10/2013

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof^a. Dr^a. Denise Zaffari

Universidade do Vale do Rio dos Sinos

Prof^a. Dr^a. Elza Daniel de Mello

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo Roberto Antonacci Carvalho

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a minha família, Cladis e Márcio Santetti, pelo apoio, amor e incentivo constante. Ao meu pai, Luiz Carlos Santetti, que lá de cima me guia e me protege a cada dia.

Às amigas e aos amigos queridos pela motivação, cumplicidade e carinho de sempre. Em especial a Bruna Grings Robalo pelo auxílio na revisão do artigo em língua inglesa.

À oportunidade de realizar esta pós-graduação, em especial a minha coorientadora, nutricionista Cristina Toscani Leal Dornelles, que já durante o estágio curricular da faculdade me apresentou ao mundo da pesquisa clínica e da nutrição em pediatria.

A minha orientadora, professora Helena Ayako Sueno Goldani, pelos ensinamentos, pelo auxílio e colaboração ao longo de todo o trabalho.

Aos colaboradores do projeto: Carlos O. Kieling, Jorge L. Santos, Sandra M. G. Vieira, Maria Inês Wilasco, Fernanda U. Fontella e Isabel R. Werlang pela troca de conhecimentos e pelo imenso aprendizado adquirido nas áreas de nutrição infantil, hepatologia pediátrica, estatística, técnicas de laboratório e produção científica em geral. Aos pediatras residentes da gastroenterologia pediátrica e às nutricionistas do PICCAP e da Residência Integrada Multiprofissional em Saúde pelo auxílio e convívio no ambulatório.

Aos profissionais, professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da UFRGS. À equipe do Centro de Pesquisa Experimental, da UAMP, do Laboratório de Pediatria Translacional, da Unidade de Bioestatística e ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Ao Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Introdução: A patogênese da desnutrição na doença hepática tem como possível etiologia a combinação de condições como a redução do consumo calórico, a má absorção intestinal, as anormalidades no metabolismo de macronutrientes e o aumento de citocinas pró-inflamatórias, resultando em um estado hipermetabólico causador da piora nutricional.

Objetivo: Avaliar o perfil inflamatório, mensurado pela dosagem de interleucina-1 beta (IL-1 beta), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), relacionando-o com estado nutricional de crianças e adolescentes com hepatopatia crônica. **Método:** Estudo transversal realizado com 43 crianças e adolescentes, com diagnóstico clínico de hepatopatia crônica, regularmente atendidos no ambulatório de Hepatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A gravidade da hepatopatia foi avaliada através da classificação de Child-Pugh e dos escores *Pediatric End Stage Liver Disease* (PELD) e *Model for End Stage Liver Disease* (MELD). Os parâmetros antropométricos empregados foram estatura/idade, índice de massa corporal/idade e dobra cutânea tricípital/idade, de acordo com os padrões da Organização Mundial da Saúde. Os pontos de corte para classificação do estado nutricional adotados foram: risco para baixo peso (escore-z < -1,00) e desnutrição (escore-z < -2,00). A avaliação do consumo alimentar foi feita a partir de um registro alimentar de três dias. A dosagem sérica de citocinas foi determinada pelo método ELISA. **Resultados:** A mediana (P25-75) de idade da amostra foi de 60 (17-116) meses. A atresia biliar correspondeu a 72% dos casos. Cinquenta e sete por cento dos pacientes cirróticos pertenciam à classificação Child-Pugh A, 34,2% B e 8,6% C, sendo esta a apresentação mais grave. Escores PELD e MELD superiores a 15 foram encontrados em 14,3%. Foi detectado risco para baixo peso em 23,3% da amostra e 11,6% eram desnutridos, totalizando 34,9% de risco nutricional. A ingestão calórica média (\pm DP) apresentada foi de 1331 (\pm 455,2) kcal/dia. A IL-6 apresentou valores aumentados nos pacientes em risco nutricional ($P=0,02$), correlacionando-se com o escore-z da dobra cutânea tricípital para a idade ($r_s = -0,61$; $P < 0,001$). Foi encontrada associação entre a IL-6 e a gravidade da doença hepática, avaliada a partir da classificação de Child-Pugh ($P = 0,001$), com manutenção do efeito após o controle de variáveis. **Conclusão:** Os achados indicam que a atividade inflamatória se faz presente na evolução da doença hepática crônica. Do ponto de vista nutricional, parece existir associação entre o aumento de IL-6 sérica e a presença de risco nutricional em crianças e adolescentes com hepatopatia crônica.

Palavras-chave: Desnutrição. Citocinas. Doença hepática crônica. Cirrose. Criança.

ABSTRACT

Introduction: The pathogenesis of malnutrition in liver disease is related to several conditions such as reduced caloric intake, intestinal malabsorption, abnormalities in the metabolism of macronutrients and increased proinflammatory cytokines, resulting in a hypermetabolic state. **Objective:** To evaluate the nutritional status of children and adolescents with chronic liver disease and its association with inflammatory activity, by measurement of proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 beta), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha). **Methods:** Cross-sectional study comprised of 43 children and adolescents diagnosed with chronic liver disease from the Pediatric Hepatology Unit, Hospital de Clinicas de Porto Alegre. The severity of liver disease was assessed by the Child-Pugh score, Pediatric End Stage Liver Disease (PELD) and Model for End Stage Liver Disease (MELD) scores. Anthropometric parameters employed were height/age, body mass index/age and triceps skinfold/age, according to World Health Organization standards. The cutoff points for classification of nutritional status were the following: at risk of malnutrition (z-score <-1.00) and malnutrition (z-score <-2.00). The assessment of food intake was obtained from a three-day food record. Serum cytokines were determined by ELISA. **Results:** Median (25th-75th centile) age was 60 (17-116) months. Biliary atresia accounted for 72% of cases. Fifty-seven percent of the cirrhotic patients were Child-Pugh A, 34.1% B and 8.6% C, this being the most severe presentation. PELD and MELD scores greater than 15 were found in 14.3%. Children at risk of malnutrition corresponded to 23.3% of the sample and 11.6% were malnourished, totaling 34.9% of nutritional risk. The mean (\pm SD) caloric intake presented was 1331 (\pm 455.2) kcal/day. IL-6 values were increased in patients at nutritional risk ($P = 0.02$), correlating with triceps skinfold-for-age z-score ($r_s = -0.61$, $P < 0.001$). An association was found between IL-6 levels and liver disease severity assessed by Child-Pugh score ($P = 0.001$), with maintenance of effect after adjustment for nutritional status. **Conclusion:** This study suggests that inflammatory activity is present in the evolution of chronic liver disease. From a nutritional standpoint, it seems to be an association between increased serum IL-6 and the presence of nutritional risk in children and adolescents with chronic liver disease.

Key Words: Malnutrition. Cytokines. Chronic Liver Diseases. Cirrhosis. Child.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Material “Alerta Amarelo” implementado no Brasil.....	19
Figura 2 – Tipos de atresia biliar.....	21
Figura 3 – Secreção de citocinas pró-inflamatórias no fígado.....	45
Figura 4 – Caracterização da amostra estudada.....	49
Figura 5 – Critérios para classificação do estado nutricional de crianças e adolescentes com hepatopatia crônica.....	52
Figura 6 – Distribuição dos valores de interleucina-6 em relação à idade na amostra.....	64
Figura 7 – Distribuição dos valores de fator de necrose tumoral-alfa em relação à idade na amostra.....	65
Figura 8 – Distribuição de valores de interleucina-6 conforme o escore <i>Pediatric End Stage Liver Disease</i> (PELD).....	67
Figura 9 – Distribuição de valores de fator de necrose tumoral-alfa conforme o escore <i>Pediatric End Stage Liver Disease</i> (PELD).....	67
Figura 10 – Distribuição de valores de interleucina-6 entre as categorias de Child-Pugh.....	68
Figura 11 – Conceito de risco nutricional.....	71
Figura 12 – Racionalização da desnutrição relacionada à doença de base.....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais grupos etiológicos de hepatopatias na população pediátrica.....	16
Quadro 2 – Formas de apresentação da atresia biliar.....	22
Quadro 3 – Fatores relacionados às deficiências nutricionais nas hepatopatias colestáticas crônicas.....	35
Quadro 4 – Principais características das citocinas estudadas.....	42
Quadro 5 – Classificação de Child-Pugh.....	53
Quadro 6 – Descrição da equação do escore <i>Pediatric End Stage Liver Disease</i> (PELD).....	53
Quadro 7 – Descrição da equação do escore <i>Model for End Stage Liver Disease</i> (MELD).....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas e demográficas da amostra estudada.....	60
Tabela 2 – Classificação do estado nutricional.....	61
Tabela 3 – Correlação de exames laboratoriais com parâmetros antropométricos.....	62
Tabela 4 – Ingestão calórica, proteica, de micronutrientes e fibra por faixa etária.....	63
Tabela 5 – Perfil inflamatório da amostra estudada conforme o estado nutricional.....	65
Tabela 6 – Regressão linear múltipla para interleucina-6 (modelo 1).....	68
Tabela 7 – Regressão linear múltipla para interleucina-6 (modelo 2).....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACR	Aminoácido de Cadeia Ramificada
AB	Atresia Biliar
ALT	Alanina Aminotransferase
ASPEN	<i>American Society of Parenteral and Enteral Nutrition</i>
AST	Aspartato Aminotransferase
BD	Bilirrubina Direta
BI	Bilirrubina Indireta
BIA	Bioimpedância Elétrica
BT	Bilirrubina Total
CB	Circunferência do Braço
CPE	Centro de Pesquisa Experimental
DA1AT	Deficiência de Alfa-1 Antitripsina
DCT	Dobra Cutânea Tricipital
DEXA	<i>Dual Energy X-ray Absorptiometry</i>
EAR	<i>Estimated Average Requirements</i>
EER	<i>Estimated Energy Requirements</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
ESPEN	<i>European Society of Parenteral and Enteral Nutrition</i>
E/I	Estatura por Idade
FA	Fosfatase Alcalina
GGT	Gamaglutamil Transferase
IDR	Ingestão Dietética de Referência
IL-1	Interleucina-1

IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
MELD	<i>Model for End Stage Liver Disease</i>
NE	Nutrição Enteral
NPT	Nutrição Parenteral
PCR	Proteína C Reativa
PELD	<i>Pediatric End Stage Liver Disease</i>
P/E	Peso por Estatura
P/I	Peso por Idade
TCM	Triglicerídeos de Cadeia Média
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th-1	<i>T helper 1</i>
Th-2	<i>T helper 2</i>
Th-17	<i>T helper 17</i>
TN	Terapia Nutricional
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TP	Tempo de Protrombina
Tx	Transplante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 HEPATOPATIAS NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA.....	15
2.1.1 Fluxo biliar e colestase	17
2.1.2 Atresia biliar	20
2.1.3 Deficiência de alfa-1 antitripsina.....	24
2.1.4 Cirrose	26
2.2 NUTRIÇÃO DO HEPATOPATA CRÔNICO.....	28
2.2.1 Avaliação nutricional	28
2.2.2 Risco nutricional e desnutrição	32
2.2.3 Anorexia do hepatopata	33
2.2.4 Deficiências nutricionais e alterações metabólicas	34
2.2.5 Hipermetabolismo	35
2.2.6 Terapia nutricional.....	37
2.3 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	41
2.3.1 Citocinas e estado nutricional.....	43
2.3.2 Citocinas nas hepatopatias crônicas	44
3 JUSTIFICATIVA	46
4 OBJETIVOS	47
4.1 OBJETIVO GERAL	47
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
5 PACIENTES E MÉTODOS	48
5.1 DELINEAMENTO	48
5.2 AMOSTRA.....	48

5.2.1 Cálculo de tamanho de amostra	48
5.2.2 Critérios de inclusão	49
5.2.3 Critérios de exclusão	49
5.2.4 Coleta de dados	50
5.2.5 Variáveis estudadas	50
5.3 ASPECTOS ÉTICOS	56
5.4 LOGÍSTICA	56
5.4.1 Equipe de pesquisa	57
5.5 ANÁLISE DOS DADOS	57
5.5.1 Análise estatística.....	58
6 RESULTADOS	59
6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS	59
6.2 PERFIL NUTRICIONAL.....	61
6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA	64
7 DISCUSSÃO	70
8 CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXO A – PROTOCOLO DE ANÁLISE TNF-ALFA	92
ANEXO B – PROTOCOLO DE ANÁLISE INTERLEUCINA-6	93
ANEXO C – PROTOCOLO DE ANÁLISE INTERLEUCINA-1 BETA	94
ANEXO D - REGISTRO ALIMENTAR DE TRÊS DIAS.....	95
ANEXO E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	99
ANEXO F – PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO NUTRICIONAL	100
ANEXO G – TABELAS COMPLEMENTARES.....	101
ANEXO H – ARTIGO ORIGINAL.....	104

1 INTRODUÇÃO

A doença hepática crônica resulta em grande impacto nutricional, uma vez que o fígado tem função central na regulação metabólica e energética do organismo. Este órgão exerce também uma série de efeitos extra-hepáticos na regulação do metabolismo de macronutrientes como proteínas, carboidratos e gorduras. Tendo em vista este panorama, entende-se que complicações nutricionais são desenvolvidas com frequência quando a integridade hepática encontra-se comprometida (HARDY; KLEINMAN, 2007).

A patogênese da desnutrição na doença hepática é multifatorial, tendo como possível etiologia a combinação de condições como a redução do consumo calórico decorrente de anorexia e de restrições dietéticas, - especialmente quando em vigência de colestase -, a má absorção intestinal, as anormalidades no metabolismo de macronutrientes e o aumento de citocinas pró-inflamatórias, resultando em um estado hipermetabólico causador da piora nutricional (MERLI *et al.*, 2010). É sugerida intervenção precoce na nutrição do paciente hepatopata em idade pediátrica antes de qualquer sinal de risco nutricional. Os objetivos da terapia nutricional (TN) incluem reabilitação da composição corporal e das deficiências nutricionais, prevenção de danos às células hepáticas, promoção de regeneração e crescimento, podendo assim, melhorar o prognóstico pré e pós-transplante (CLEGHORN, 2009).

Esta pesquisa visou estudar o perfil inflamatório de crianças e adolescentes com hepatopatia crônica e relacioná-lo com o estado nutricional e a gravidade da doença apresentada por estes pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HEPATOPATIAS NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA

O fígado é o segundo maior órgão do corpo humano, situado no hipocôndrio direito e, tem importante função de conexão entre o sistema digestório e o sangue. Está diretamente envolvido no processamento de nutrientes, hormônios, drogas e toxinas, atuando também na síntese de substâncias que desempenham papel central na manutenção da homeostase corporal (BUCHMAN *et al.*, 2007).

Os hepatócitos são os tipos celulares mais comumente encontrados no fígado, correspondendo a cerca de 80% do volume total do órgão. Realizam funções endócrinas e exócrinas, além de detoxificação, transporte e síntese de substâncias como os ácidos biliares e o colesterol. Estas células produzem, ainda, uma série de lipoproteínas, enzimas e proteínas séricas essenciais como a albumina, a protrombina e o fibrinogênio, responsáveis por processos de coagulação e pela manutenção da pressão osmótica (ESCANHOELA, 2009). O fígado é formado ainda pelas células endoteliais sinusoidais, estruturas que permitem trocas entre o sangue e os hepatócitos, pelas células estreladas e pelo epitélio biliar. Outro tipo celular presente neste órgão são as chamadas células de Kupffer, macrófagos específicos do fígado, que participam de ações de defesa do organismo, através da secreção de mediadores de resposta inflamatória, como as citocinas e o óxido nítrico, e da fagocitose de grandes partículas (WANLESS, 2007).

As doenças hepáticas em crianças são raras. No que diz respeito à epidemiologia, estima-se que a prevalência de hepatopatias ao nascimento seja de, aproximadamente, 1:2.500 nascidos vivos (KIM *et al.*, 2002). A icterícia fisiológica neonatal ocorre em 10 a 15% dos recém-nascidos vivos e geralmente é de natureza benigna. No entanto, este quadro deve ser

corretamente diferenciado dos casos de icterícia colestática. As principais causas de hepatopatias na infância variam de acordo com a idade de apresentação dos sintomas iniciais, cursando frequentemente com colestase. A causa mais comum de doença hepática crônica na infância é a atresia biliar (AB), enfermidade responsável por 25% dos casos de colestase neonatal (BALISTRERI; BEZERRA, 2006). É indicado que toda a criança que apresente icterícia por mais de 14 dias (ou três semanas, no caso de prematuros) seja investigada para a possível presença de doença hepática com a dosagem inicial de bilirrubina e suas frações.

As principais etiologias das hepatopatias na infância são descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Principais grupos etiológicos de hepatopatias na população pediátrica.

Principais grupos etiológicos
<p>Extra-hepáticas Atresia biliar Cisto de colédoco</p>
<p>Intra-hepáticas Síndrome de Alagille Síndromes colestáticas intra-hepáticas familiares progressivas Hepatite neonatal idiopática</p>
<p>Metabólicas Deficiência de alfa-1 antitripsina Erros inatos do metabolismo dos açúcares e dos aminoácidos</p>

Fonte: Modificado de Nightgale e Ng (2009, p.1162).

Dentre as principais complicações relacionadas à doença hepática crônica estão a presença de hipertensão portal, ascite, encefalopatia hepática, desnutrição e cirrose. O prognóstico varia de acordo com a etiologia da doença, a qualidade e a precocidade com que o correto tratamento é disponibilizado à criança e a sua família.

2.1.1 Fluxo biliar e colestase

A bile é um complexo formado por água, ácidos biliares, fosfolípidios, colesterol, bilirrubinas, eletrólitos e xenobióticos, sendo sua síntese e secreção essenciais para a manutenção da função hepática. Atua na eliminação de toxinas e drogas, na modulação do metabolismo do colesterol e na digestão e absorção de lipídios e vitaminas lipossolúveis (HARB; THOMAS, 2007).

A colestase é uma condição clínica decorrente da redução do fluxo biliar causada por alterações anatômicas ou funcionais no trato biliar (SANTOS *et al.*, 2012). É considerada a principal manifestação da doença hepatobiliar. Os sinais clínicos incluem icterícia, colúria, hipocolia ou acolia fecal, prurido e xantomas (TOMMASO; MATTAR, 2009).

A icterícia se caracteriza por coloração amarelada da pele, mucosas e escleróticas, e ocorre em função da deposição de bilirrubina quando esta se apresenta elevada no plasma. Este achado clínico pode ocorrer por uma série de razões, dentre as quais estão o aumento da produção de bilirrubinas, a diminuição de sua captação, a redução da conjugação pelos hepatócitos ou a diminuição de sua secreção (SANTOS *et al.*, 2012). É de grande importância clínica definir se a icterícia apresentada pela criança é decorrente do aumento de bilirrubina indireta (BI) ou de bilirrubina direta (BD). A hiperbilirrubinemia indireta, em muitos casos, está relacionada à imaturidade enzimática do lactente, podendo ser classificada como “fisiológica” até a segunda semana de vida. Outra causa da elevação de BI é a icterícia ligada ao leite materno; no entanto, sua fisiopatologia ainda não está totalmente elucidada (BRANDÃO, 2009). Já a elevação de BD reflete a presença de doença hepatocelular ou biliar, e deve ser investigada de imediato. Do ponto de vista bioquímico, o conceito de colestase admite três possibilidades: níveis séricos de BD maiores que 2 mg/dL, níveis séricos de BD

superiores a 20% da bilirrubina total (BT) e, para aquelas situações nas quais os níveis de BT são inferiores a 5 mg/dL, valores de BD maiores que 1 mg/dL (HARB; THOMAS, 2007).

Os mecanismos responsáveis pelo dano hepático causado pela colestase têm sido extensamente estudados. Inicialmente, foi sugerida a hipótese de que a toxicidade causada pelas altas concentrações de ácidos biliares levaria a apoptose de células hepáticas; no entanto, estudos posteriores demonstraram que os mesmos não atingiriam níveis tão elevados, ao ponto de gerar tal toxicidade celular (ZHANG *et al.*, 2012). Propõe-se que o possível envolvimento de células inflamatórias, como os neutrófilos, ativadas por ácidos biliares, resultaria na lesão inicial ao hepatócito (ALLEN *et al.*, 2011; WOOLBRIGHT; JAESCHKE, 2012).

A colestase pode ser definida como neonatal quando se apresenta nos primeiros três meses de vida (MOYER *et al.*, 2004). A frequência de colestase neonatal é de aproximadamente 1:2.500 nascidos vivos. As causas mais comuns são a AB, a deficiência de alfa-1 antitripsina (DA1AT) e a hepatite neonatal idiopática, sendo o diagnóstico e o tratamento clínico e/ou cirúrgico precoces ações para a prevenção de complicações (SUCHY, 2004).

Os efeitos da colestase crônica, quando presente por mais de seis meses, são graves e independentes da etiologia. A diminuição de sais biliares no intestino causa má absorção de triglicerídeos de cadeia longa e eleva o risco de deficiência de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), podendo evoluir para um quadro de desnutrição (SUCHY, 2004). Um dos desafios do tratamento da criança colestática é a promoção de crescimento e desenvolvimento adequados, com investimento em TN precoce, aliado à suplementação de micronutrientes.

No Brasil, muitos casos de colestase neonatal ainda são encaminhados tardiamente a centros de referência para investigação diagnóstica (KIELING *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2010). Espelhando-se em experiências bem sucedidas no Reino Unido e na França (DAVENPORT *et al.*, 2004; SERINET *et al.*, 2006), o Brasil vem buscando aprimorar esta

prática, através da implementação de políticas públicas voltadas ao manejo de doenças colestáticas. Neste sentido, foi introduzido na caderneta de saúde da criança distribuída pelo Ministério da Saúde, orientações à população sobre sinais de alerta para doença hepática neonatal, quando da presença de icterícia por período superior a 14 dias, informando sobre a necessidade de avaliação em centros de referência. Há, ainda, a reprodução de uma escala colorimétrica fecal, na qual estão indicadas as colorações fecais sugestivas de acolia ou hipocolia. A estratégia é parte de uma campanha intitulada “Alerta Amarelo”, a qual está representada na Figura 1.

Figura 1 - Material “Alerta Amarelo” implementado no Brasil.



Fonte: Sociedade Brasileira de Pediatria (2009).

O emprego da escala colorimétrica de fezes idealizada por Matsui e Dodoriki (1995) causou grande impacto no tratamento cirúrgico precoce e na expectativa de vida de crianças com AB (HSIAO *et al.*, 2008; LIEN *et al.*, 2011; TSENG *et al.*, 2011).

2.1.2 Atresia biliar

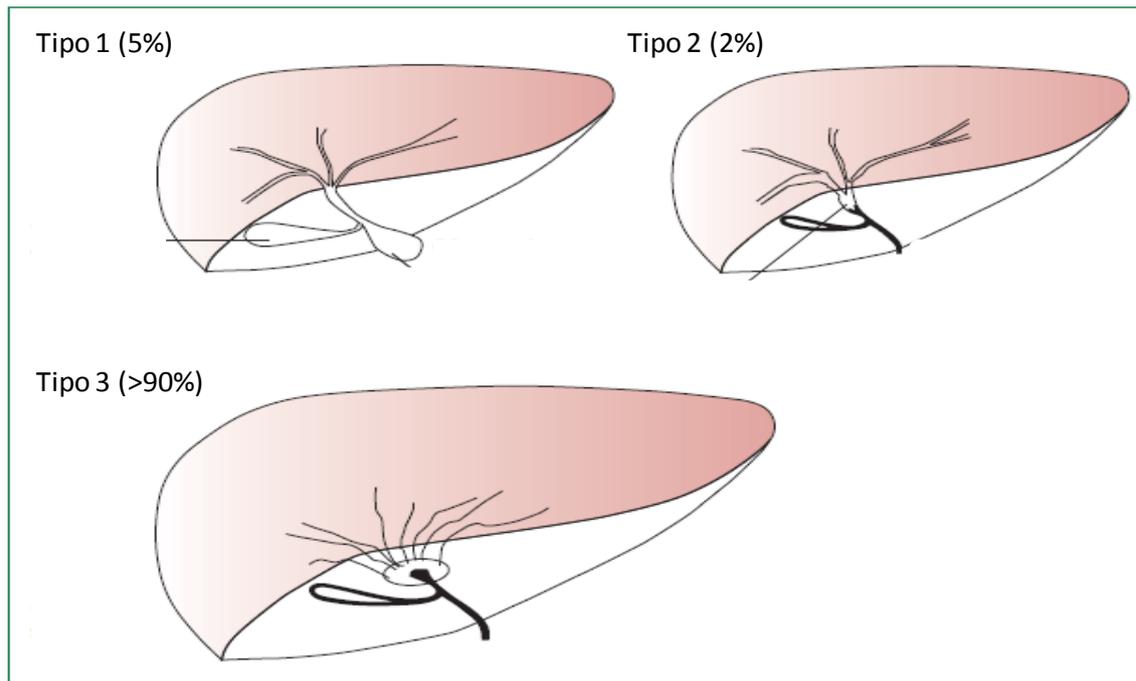
A AB é resultante de um processo inflamatório progressivo que afeta a árvore biliar, caracterizada por obstrução das vias biliares extra-hepáticas (BAUMANN; URE, 2012). É uma colangiopatia com manifestação já ao nascimento ou nas primeiras semanas de vida, sendo a causa mais comum de colestase crônica em crianças (HARB; THOMAS, 2007).

Pode ser considerada uma patologia rara, cuja prevalência na Europa é de 1:18.000 nascidos vivos (BAUMANN; URE, 2012) e de 1:13.000 nos Estados Unidos (SOKOL *et al.*, 2007). Sua incidência é maior no continente asiático, atingindo 1,51:10.000 nascidos vivos em Taiwan (LIN *et al.*, 2011) e 1,04:10.000 no Japão, com discreto predomínio de apresentação no sexo feminino (NIO *et al.*, 2003). No Rio Grande do Sul, Kieling *et al.* (2008) estudaram 112 casos de crianças com AB, sendo que 33,9% destes ocorreram de 1982 a 1989, 41,1% de 1990 a 1999 e 25,0% a partir de 2000.

É a causa mais frequente de morte por doença hepática na infância e corresponde a 40-50% das indicações de transplante (Tx) hepático nesta faixa etária (KAMATH; OLTHOFF, 2010). As crianças portadoras de AB não tratadas apresentam prognóstico extremamente pobre, com expectativa de vida de até três anos, devido a complicações relacionadas à hipertensão portal e à cirrose (SERINET *et al.*, 2006).

Esta patologia é comumente classificada, de acordo com a extensão do dano ao sistema biliar, em tipos 1, 2 e 3, sendo este último a apresentação mais comum e a única que afeta a árvore biliar extra-hepática como um todo. A classificação adotada pela *Japanese Society of Pediatric Surgeons* (em português, Sociedade Japonesa de Cirurgiões Pediátricos) está indicada na Figura 2.

Figura 2 – Tipos de atresia biliar.



Fonte: Adaptado de Hartley *et al.* (2009, p. 1705).

De acordo com Sokol e Mack (2001), a AB seria o fenótipo clínico resultante de uma série de insultos pré e perinatais à árvore biliar. Os dados referentes à causa desta patologia seguem limitados; no entanto, muito tem se estudado sobre este tema. Classicamente, são propostas duas formas de apresentação clínica: a fetal, que corresponde a 10-20% dos casos, cursa com icterícia e acolia fecal desde o nascimento, associa-se frequentemente a malformações congênitas (poliesplenia, *situs inversus* e cardiopatias) e à ausência de estruturas biliares no *porta hepatis* (BALISTRERI *et al.*, 1996). Na forma perinatal, presente em 80% dos casos, a criança apresenta um período livre de icterícia, sem a associação com outras malformações, onde uma série de eventos perinatais e pós-natais teriam importante papel na destruição da árvore biliar (SOKOL; MACK, 2001). Recentemente, foi demonstrado que, em alguns pacientes, os níveis de BD estão elevados desde o nascimento, sugerindo a importância da implementação deste tipo de *screening* como rotina para todos os recém-nascidos (HARPAVAT *et al.*, 2011).

Davenport (2012) propõe quatro formas de apresentação da AB (Quadro 2).

Quadro 2 - Formas de apresentação da atresia biliar.

Grupo etiológico	Principais características clínicas
Forma sindrômica de atresia biliar	Predomínio no sexo feminino. Caracterizada por anomalia esplênica associada à atresia biliar ou outras malformações extra-hepáticas associadas (sem padrão sindrômico), ou ainda, má rotação intestinal isolada.
Forma cística de atresia biliar	Predomínio no sexo feminino. Presença de alteração cística no trato biliar.
Atresia biliar associada ao citomegalovírus	Presença de sorologia positiva (anticorpo IgM) e infecção no período perinatal.
Atresia biliar isolada	Corresponde a maioria dos casos. Grupo não homogêneo com variações no tempo de apresentação, grau de inflamação e obliteração da árvore biliar.

Fonte: Adaptado de Davenport (2012, p. 175).

Estudos observacionais sugerem uma série de fatores que estariam relacionados com a patogênese da AB, dentre eles estão a exposição a toxinas ambientais, os defeitos na circulação fetal, a morfogênese anormal do trato biliar, a presença de infecção viral e de inflamação (BEZERRA, 2006). As três últimas hipóteses descritas acima são as mais estudadas atualmente, com ênfase no papel da inflamação na lesão hepática e biliar presente nesta patologia (BESSHO; BEZERRA, 2011).

O quadro clínico de lactentes com AB inclui icterícia colestática, acolia fecal, colúria e hepatomegalia. O diagnóstico é baseado na clínica apresentada e confirmado por exames que avaliam a presença de lesão hepática (alanina e aspartato aminotransferases), colestase (bilirrubina total e frações, fosfatase alcalina e gamaglutamil transferase), capacidade sintética do fígado (nível sérico de albumina, tempo de protrombina e fatores de coagulação) e alterações histológicas características, obtidas por biópsia hepática percutânea (DANESI, 2009).

O tratamento inicial da AB deve ser cirúrgico, com realização da portoenterostomia proposta por Kasai e Suzuki (1959) nos tipos 2 e 3 e da anastomose hepático jejunal no tipo 1, antes dos 60 dias de vida para tentativa de reestabelecimento do fluxo biliar. A idade da criança no momento da cirurgia está diretamente correlacionada ao sucesso da intervenção, embora este impacto a curto e longo prazo ainda seja discutido por alguns pesquisadores (NIO *et al.*, 2010).

De acordo com o estudo realizado na França por Serinet *et al.* (2006), a efetividade da cirurgia de Kasai está diretamente correlacionada a maiores taxas de sobrevida com o fígado nativo. Cerca de 20% das crianças com AB chegam a idade adulta sem necessidade de Tx, como foi demonstrado por Lykavieris *et al.* (2005). Em estudo conduzido por Chen *et al.* (2012) foi demonstrado que, mesmo depois dos 90 dias de vida, pacientes com AB ainda podem se beneficiar com a cirurgia de Kasai. No Japão, a taxa de sobrevida com o fígado nativo aos 20 anos chega a 44%, porém grande parte destes pacientes apresenta cirrose e suas complicações clínicas (SHINKAI *et al.*, 2009). No que diz respeito à evolução clínica de crianças brasileiras com AB, Carvalho *et al.* (2010) demonstraram uma taxa de sobrevida com o fígado nativo igual a 36,8% aos quatro anos de idade.

A conduta terapêutica após a cirurgia consiste em intervenção multidisciplinar baseada na prevenção de complicações, como os episódios de colangite ascendente, no suporte nutricional e no apoio à família do paciente (KELLY; DAVENPORT, 2007). Ao longo do período de evolução da doença, observa-se ainda o desenvolvimento de esplenomegalia, circulação colateral, ascite, desnutrição e episódios de hemorragia digestiva decorrentes da hipertensão portal e progressão para cirrose (SOKOL *et al.*, 2003).

A necessidade de Tx hepático depende do sucesso da cirurgia de Kasai e do grau de ocorrência de complicações advindas do processo de cirrose e da hipertensão portal (CHARDOT, 2003). Às crianças nas quais não houve reestabelecimento do fluxo biliar, o Tx

é frequentemente indicado ainda no primeiro ano de vida (KELLY; DAVENPORT, 2007). De acordo com o relatório anual divulgado pela OPTN (*Organ Procurement and Transplantation Network*, em português, Rede de Alocação e Transplante de Órgãos), no período de 2009-2011, as doenças colestáticas, dentre elas a AB, representaram 46,7% dos Tx pediátricos realizados nos Estados Unidos (2012). Prevalência semelhante é observada em nosso meio: no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, AB correspondeu a 44% das indicações de Tx infantil, sendo também a principal causa de Tx (dados não publicados).

Atualmente, o prognóstico da criança transplantada é bom, associando-se a crescimento, melhora do estado nutricional e desenvolvimento saudável (MCKIERNAN *et al.*, 2009). O acompanhamento pós-transplante é vital, com atenção especial ao controle das complicações associadas ao uso de imunossupressores a longo prazo, como hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, doença linfoproliferativa, entre outras (NG *et al.*, 2012).

2.1.3 Deficiência de alfa-1 antitripsina

A A1AT é uma glicoproteína codificada no gene *SERPINA1*, localizado no braço longo do cromossomo 14 (14q31-32). É sintetizada principalmente pelos hepatócitos e também por macrófagos, monócitos e células epiteliais pulmonares em menor quantidade. Pode ser caracterizada como uma proteína de fase aguda, com elevação de suas concentrações plasmáticas na vigência de processos inflamatórios. Tem como principal função a inibição das proteases a nível tissular, em particular a elastase neutrofílica (PERLMUTTER, 2011).

A deficiência desta glicoproteína se manifesta, em geral, como doença hepática em crianças e enfisema pulmonar na idade adulta. É uma doença autossômica codominante,

sendo a causa genética mais frequente de doença hepática na infância (RUDNICK; PERLMUTTER, 2005).

O desenvolvimento de hepatopatia está ligado ao fenótipo PiZZ na maioria dos casos, no entanto, a patogênese da lesão é ainda desconhecida. Estudos indicam que seria causada pelo acúmulo intracelular da proteína mutante no retículo endoplasmático dos hepatócitos, decorrente do dobramento incorreto da alfa-1 antitripsina e consequente formação de polímeros. Este processo geraria hepatotoxicidade, algo como um mecanismo de “ganho de função tóxica” (PERLMUTTER *et al.*, 2007). Contudo, de acordo com clássico estudo sueco realizado com 200.000 nascidos vivos, somente 10-15% dos pacientes PiZZ desenvolvem hepatopatias (SVEGER, 1976; SVEGER; ERIKSSON, 1995). Sugere-se que o grau de intensidade da doença hepática possa estar associado a fatores genéticos e/ou ambientais (RUDNICK; PERLMUTTER, 2005).

A prevalência da variante PiZZ é de aproximadamente 1:1800 a 2000 nascidos vivos, correspondendo a cerca de 10% dos casos de colestase neonatal (SUCHY, 2004). O quadro clínico inicial assemelha-se à AB, com alterações nos níveis de transaminases, icterícia colestática e com possível desenvolvimento de hipertensão portal e cirrose criptogênica em alguns casos, assim como hepatocarcinoma na idade adulta (SVEGER, 1988; STOLLER; ABOUSSOUAN, 2005).

O tratamento da doença hepática consiste em TN para promoção de crescimento, suplementação de vitaminas lipossolúveis e tratamento da colestase (MCKIERNAN, 2002). Em termos de evolução clínica da patologia, no caso de crianças cirróticas, o Tx hepático é uma opção terapêutica que tem mostrado resultados satisfatórios (PERLMUTTER, 2011).

2.1.4 Cirrose

A cirrose é classicamente entendida como o resultado de um processo patológico contínuo, que tem como marco inicial o dano ao hepatócito seguido por necrose, com consequente formação de fibrose e de nódulos de regeneração, acarretando prejuízo à nutrição sanguínea do fígado (ANTHONY *et al.*, 1977). À medida que esse processo avança, há distorção da arquitetura hepática, compressão das estruturas vasculares e biliares, modificação do fluxo sanguíneo e desenvolvimento de hipertensão portal. Essa alteração estrutural leva a uma oferta irregular de nutrientes, oxigênio e metabólitos a diversas partes do fígado e pode perpetuar o processo de cirrose, mesmo quando o fator desencadeante é controlado ou eliminado (HARDY; KLEINMAN, 2007). A grande maioria dos casos de hepatopatias crônicas da infância tem como consequência a cirrose.

A apresentação clínica da cirrose depende da causa da doença hepática, assim como da progressão da fibrose e do grau de falência hepatocelular. Denomina-se cirrose compensada quando a criança apresenta-se sem sinais e sintomas aparentes de doença hepática. Quando estes surgem ou progridem, tornando-se clinicamente evidentes, utiliza-se o termo cirrose descompensada, quadro que usualmente cursa com a presença de ascite, sangramento de varizes esofágicas, encefalopatia e icterícia (HARDY; KLEINMAN, 2007).

A evolução do paciente com cirrose é normalmente caracterizada por um período de compensação da doença, seguido da ocorrência de complicações decorrentes da disfunção hepática progressiva, com comprometimento do estado nutricional. A hipertensão portal pode ser definida como uma elevação patológica da pressão sanguínea no sistema portal com formação de colaterais portossistêmicos, os quais tentam restaurar parte do fluxo sanguíneo para a circulação sistêmica (SHNEIDER, 2007). As principais complicações clínicas decorrentes da hipertensão portal cirrogênica são: a) ascite, b) peritonite bacteriana

espontânea, c) sangramento de varizes gastroesofágicas, d) esplenomegalia, e) hiperesplenismo, f) encefalopatia, g) síndrome hepatopulmonar e h) síndrome hepatorrenal (TSOUKA; MCLIN, 2012). Estas se apresentam como as principais causas de morbimortalidade do hepatopata crônico tanto na idade pediátrica quanto na vida adulta (SHNEIDER *et al.*, 2012).

A gravidade e o prognóstico da cirrose costumam ser avaliados através da aplicação de parâmetros clínicos, laboratoriais e/ou de imagem, tanto isoladamente quanto sob a forma de escores. Na prática diária, destaca-se a classificação de Child-Pugh (1973), uma das mais utilizadas na clínica, dado seu baixo nível de complexidade e elevado valor preditivo. Apesar de ter sido formatado tendo como alvo o paciente cirrótico adulto, esta classificação é bastante utilizada também para a população pediátrica. Os métodos atuais de alocação de órgãos têm sido igualmente utilizados como índices prognósticos em cirróticos. Existem dois modelos principais, o escore MELD (*Model for End Stage Liver Disease*, em português, Modelo para Doença Hepática em Estágio Final), modelo prognóstico que calcula o risco de morte em três meses de pacientes hepatopatas crônicos acima de 12 anos, independente da etiologia da hepatopatia (KAMATH *et al.*, 2001; FREEMAN *et al.*, 2004) e o PELD (*Pediatric End Stage Liver Disease*, em português, Doença Hepática Pediátrica em Estágio Final) voltado para crianças e adolescentes até 12 anos (MCDIARMID *et al.*, 2002). No Brasil, os escores MELD e PELD foram adotados como critério para alocação de órgãos a partir do ano de 2006. Estes modelos prognósticos serão demonstrados detalhadamente na seção Pacientes e Métodos desta dissertação.

O Tx hepático continua sendo a única opção terapêutica efetiva para o tratamento da cirrose, contudo, algumas terapias medicamentosas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de reverter sua rápida progressão (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

2.2 NUTRIÇÃO DO HEPATOPATA CRÔNICO

As deficiências nutricionais são comuns no hepatopata crônico em idade pediátrica, principalmente na presença de colestase com início precoce nos primeiros seis meses de vida. Os efeitos da doença hepática sobre o crescimento e o desenvolvimento neuropsicomotor, complicados pela presença de desnutrição, ainda não estão completamente elucidados (ALONSO, 2008). De acordo com a literatura, a desnutrição por si só pode causar disfunção hepática, visto que o fígado necessita de energia para suas funções de síntese, armazenamento e detoxificação (SHEPHERD, 2001).

O principal objetivo da TN é oferecer um aporte energético suficiente para reverter ou prevenir a condição de risco nutricional e desnutrição, assim como a má absorção de gorduras e vitaminas lipossolúveis. Portanto, a TN na hepatopatia crônica durante a infância exige medidas agressivas como a indicação precoce de uso de nutrição enteral (NE), aliada à nutrição por via oral, lançando mão de fórmulas infantis especializadas, quando necessário.

2.2.1 Avaliação nutricional

O crescimento caracteriza-se por um processo dinâmico de aumento linear contínuo, resultante da interação de fatores genéticos, neuroendócrinos, nutricionais e ambientais. Este deve ser observado constantemente, seguindo as recomendações indicadas para cada faixa etária e comparado às curvas de crescimento atuais. De acordo com Seres (2005), um marcador de estado nutricional ideal deve ser sensível o suficiente para identificar alterações em estágios iniciais, específico para ser mudado apenas por desequilíbrios nutricionais e corrigido a partir de uma intervenção nutricional.

A avaliação nutricional é uma etapa fundamental no atendimento da criança e do adolescente hepatopata, salientando-se que, quanto mais jovem a criança, mais vulnerável estará aos distúrbios nutricionais. A avaliação nutricional de pacientes com hepatopatia crônica é considerada difícil, não existindo um método padrão-ouro (MCCULLOUGH, 2000). Faltam estudos específicos na área de nutrição e indicadores antropométricos precisos para crianças e adolescentes cirróticos, principalmente nos estágios avançados da doença. É sabido que o risco nutricional deste grupo tende a ser subdiagnosticado na avaliação dos parâmetros antropométricos recomendados para crianças e adolescentes saudáveis (CABRE; GASSULL, 1998).

Foram propostas por Soeters *et al.* (2008) as seguintes ferramentas para avaliação do estado nutricional: realização de história dietética; cálculo do balanço nitrogenado; cálculo do gasto energético por calorimetria indireta; avaliação da composição corporal a partir de antropometria e bioimpedância elétrica (BIA); análise da atividade inflamatória através de dosagens de albumina, hemoglobina, proteína C reativa (PCR) e citocinas; incluindo ainda as funções muscular, imune e cognitiva.

Alguns dos métodos expostos acima apresentam limitações quando se trata do binômio criança-doença hepática crônica. A BIA não está indicada na avaliação nutricional do hepatopata. É um método cujos resultados estão associados à distribuição de água do organismo e, por isso, são frequentemente influenciados pela flutuação na hidratação. O DEXA (*Dual Energy X-ray Absorptiometry*, em português, Absorciometria de Raio-X de Dupla Energia), considerado o padrão-ouro para avaliação da composição corporal, tem seu uso limitado pelo alto custo e pela falta de valores de referência para lactentes e crianças em idade pré-escolar (GORDON *et al.*, 2008).

A avaliação nutricional subjetiva global foi validada para a população pediátrica por Secker e Jeejeebhoy (2007; 2012), porém não pode ser extrapolada para hepatopatas em idade

pediátrica. Em nosso meio, está sendo realizada atualmente a validação desta ferramenta para a população pediátrica brasileira (dados não publicados).

- Parâmetros clínicos e laboratoriais

A avaliação clínica e laboratorial é de extrema relevância no acompanhamento do hepatopata crônico, havendo, inclusive, sugestões de associação entre alguns destes parâmetros e o estado nutricional. Estudo conduzido por Hurtado-Lopez *et al.* (2007), por exemplo, demonstrou haver forte correlação entre a gravidade da doença hepática, estimada por testes que avaliam a presença de lesão hepática e de colestase (dosagens de transaminases e bilirrubinas), e estado nutricional comprometido, mensurado através de indicadores antropométricos. Outros parâmetros laboratoriais utilizados para avaliação nutricional são a dosagem de albumina, pré-albumina, transferrina e colesterol sérico, ressaltando-se que estes exames podem ter seus resultados influenciados pela gravidade da hepatopatia e não necessariamente refletirem a piora do estado nutricional (TAYLOR; DHAWAN, 2005).

- Parâmetros antropométricos

A antropometria é um método utilizado para avaliar o risco nutricional e as condições de saúde, especialmente em crianças e adolescentes, estimando a relação entre a ingestão alimentar e as dimensões corporais, em um determinado período do crescimento (KAC *et al.*, 2007). É baseada em parâmetros como: peso, estatura e dobras cutâneas e em indicadores como o índice de massa corporal (IMC). Este tem sido o método mais utilizado para o diagnóstico nutricional, sobretudo na infância, pela facilidade de execução e baixo custo (HULST *et al.*, 2004).

No estágio inicial da doença hepática, as crianças e os adolescentes apresentam-se eutróficos, entretanto, estes podem evoluir com baixa ingestão alimentar e perda de massa magra, mesmo sem manifestações clínicas. À medida que a doença avança, a avaliação

antropométrica do hepatopata torna-se difícil, em decorrência da presença de organomegalia, ascite e/ou edema periférico (DORNELLES *et al.*, 2010). Estes fatores podem mascarar os parâmetros tradicionalmente utilizados, como, por exemplo, os índices peso por estatura (P/E), peso por idade (P/I) e IMC por idade (IMC/I). O acompanhamento regular destes pacientes deve ser estimulado, com o intuito de detectar sinais precoces de comprometimento nutricional.

De acordo com estudo conduzido por Greer *et al.* (2003), crianças hepatopatas apresentam alterações de composição corporal importantes, mesmo tendo peso e estatura dentro dos limites esperados para a idade. Os parâmetros antropométricos são avaliados de acordo com o sexo e a idade estabelecidos pela *World Health Organization* (WHO, em português, Organização Mundial da Saúde) (2006). Recomenda-se também a aferição da circunferência do braço (CB) e da dobra cutânea tricípital (DCT), pois estas são medidas pouco afetadas pela presença de ascite e edema periférico (SOKOL; STALL, 1990; HURTADO-LÓPEZ *et al.*, 2007). Já o crescimento linear, avaliado a partir do parâmetro estatura por idade (E/I), é um bom indicador de nutrição a longo prazo; no entanto, mostra-se insuficiente para o manejo de situações agudas (SMART *et al.*, 2011).

- Parâmetros dietéticos

O método de água duplamente marcada é considerado o padrão-ouro para mensuração do consumo energético, porém, sua aplicabilidade ainda é limitada devido ao alto custo, a necessidade de conhecimento técnico e de equipamentos especiais (BURROWS *et al.*, 2010).

A aplicação de recordatórios alimentares de 24 horas, bem como a solicitação do preenchimento de registros alimentares de três dias, viabiliza uma avaliação mais detalhada da alimentação, possibilitando estimar componentes importantes da dieta como as calorias, os macro e micronutrientes da dieta (KOLODZIEJCZYK *et al.*, 2012). Além disso, é possível

observar o padrão alimentar, o tipo e a qualidade de alimento ofertado, assim como o volume, o fracionamento e a adequação das refeições para a idade (TAYLOR; DHAWAN, 2005).

2.2.2 Risco nutricional e desnutrição

O risco nutricional deve ser identificado o mais breve possível para que a intervenção nutricional apropriada seja posta em prática (HARTMAN *et al.*, 2012). Esta racionalização se aplica no manejo dietético de crianças e adolescentes com hepatopatia crônica (DORNELLES *et al.*, 2012). Considera-se risco nutricional quando IMC/I e/ou DCT por idade (DCT/I) encontram-se entre -1,00 a -2,00 desvios-padrão (DP), e desnutrição quando os índices antropométricos são inferiores a -2,00 DP, de acordo com diretrizes da WHO (2006; 2007).

Quanto a conceituação, Soeters *et al.* (2008, p. 713) definem como desnutrição: “[...] um estado subagudo ou crônico de nutrição no qual a combinação de vários graus de sobre e subnutrição e atividade inflamatória levam a mudanças na composição corporal e diminuição de função”. Esta definição parece ser apropriada para crianças e adolescentes com hepatopatia crônica e cirrose, que apresentam um intenso catabolismo proteico e alterações na composição corporal em função da hepatopatia, anorexia, perda de massa muscular e redistribuição dos compartimentos hídricos.

A desnutrição faz parte da evolução da doença hepática crônica, principalmente quando não manejada propriamente. É correto afirmar que esta condição pode influenciar o prognóstico e a morbimortalidade pré e pós-transplante, tanto que representa um forte indicador no escore de gravidade pediátrico PELD, utilizado no sistema de alocação de órgão para Tx (UTTERSON *et al.*, 2005). Outra evidência da importância deste tema sobre a evolução natural da doença hepática crônica pediátrica está demonstrada em estudo conduzido por DeRusso *et al.* (2007) nos Estados Unidos. De acordo com a casuística destes autores, o

crescimento insuficiente de crianças com AB, durante os primeiros dois anos após a cirurgia de Kasai, está associado a um aumento na indicação de Tx ou até mesmo morte aos 24 meses. A partir deste panorama clínico do paciente pediátrico, sugere-se que a identificação do risco nutricional possa proporcionar a possibilidade de intervenção dietética precoce (DORNELLES *et al.*, 2012).

2.2.3 Anorexia do hepatopata

O apetite pode ser entendido como um marcador de saúde (AREZZO DI TRIFILETTI *et al.*, 2012). A anorexia é um problema de fundamental importância em pacientes com doença hepática avançada, contribuindo significativamente para o processo de desnutrição. Em crianças e adolescentes, os acréscimos energéticos necessários para promover o crescimento, aliados à inapetência característica da doença, reforçam a necessidade de intervenção nutricional precoce (PLAETH; SCHUTZ, 2002). Dietas hipocalóricas não intencionais e/ou pouco palatáveis, em decorrência do manejo dietético específico da colestase e da ascite, podem contribuir para a anorexia nestes pacientes, assim como as hospitalizações frequentes e a necessidade de jejum para a realização de exames e procedimentos (PLAETH; SCHUTZ, 2002; TSIAOUSHI *et al.*, 2008).

A anorexia pode aumentar em decorrência de organomegalia e de complicações oriundas da hipertensão do sistema portal, como a ascite, por promover distensão abdominal importante (ZHAO; ZIEGLER, 2010). Até mesmo a presença de prurido pode distrair a criança do ato de alimentar-se (BAKER *et al.*, 2007). Alterações da motilidade intestinal que se manifestam através de sintomas como dor abdominal, náusea e saciedade precoce podem também ser consideradas fatores predisponentes de anorexia (KALAITZAKIS *et al.*, 2006).

As citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e o TNF-alfa (*Tumor Necrosis Factor-Alpha*, em português, Fator de Necrose Tumoral-Alfa) parecem estar associadas com a anorexia presente nas hepatopatias crônicas. O TNF-alfa agiria na redução do apetite e do consumo alimentar (PLAETH; SCHUTZ, 2002). Alterações nos níveis de hormônios como a leptina e a grelina também podem ter participação nos mecanismos que levam à anorexia neste grupo de pacientes (DORNELLES *et al.*, 2013).

2.2.4 Deficiências nutricionais e alterações metabólicas

Nos quadros colestáticos há uma diminuição importante na concentração de ácidos biliares no intestino, má absorção de lipídios e de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (NIGHTINGALE; NG, 2009). Como consequência da hipertensão portal pode ser desenvolvida enteropatia por congestão vascular que contribui para a má absorção de nutrientes (NORMAN; PIRLICH, 2008).

A deficiência de vitaminas lipossolúveis na colestase ocorre em razão da dependência da formação de micelas para sua absorção, portanto a suplementação oral deve ser garantida (TSOUKA; MCLIN, 2012). Se não corretamente suplementada, há risco de coagulopatia por deficiência de vitamina K e raquitismo por falta de vitamina D, já as manifestações clínicas por deficiência de vitamina A e E são menos habituais (KELLY; DAVENPORT, 2007). Alguns minerais como ferro, magnésio e cálcio também podem estar deficientes nestes pacientes (NIGHTINGALE; NG, 2009). A deficiência de zinco pode causar alterações de paladar e olfato, anorexia, diminuição do consumo alimentar e déficit de crescimento (KIRBY; DANNER, 2009; CHASAPIS *et al.*, 2012).

No que tange a utilização desordenada de substratos, é sugerido que a criança hepatopata dependa mais da oxidação de ácidos graxos quando comparada a controles

saudáveis, possivelmente devido a uma diminuição no depósito de glicogênio. Em virtude do desarranjo do metabolismo glicídico, passam a ser utilizados aminoácidos para a gliconeogênese ocasionando balanço nitrogenado negativo (GREER *et al.*, 2003). Ainda com relação ao metabolismo proteico, em adultos cirróticos foi demonstrado que o processo de catabolismo se deu após oito horas de jejum, período de curta duração quando comparado a adultos não cirróticos, onde este processo foi iniciado após 48 horas (MULLER, 1998). Parece existir uma proporção anormal entre a quantidade de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) e aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) na cirrose que poderia estar implicada na etiopatogenia da encefalopatia hepática, através da formação de falsos neurotransmissores e consequente disfunção cerebral (KAWAGUCHI *et al.*, 2011).

O Quadro 3 sumariza os principais fatores associados às deficiências nutricionais presentes nas hepatopatias colestáticas crônicas.

Quadro 3 - Fatores relacionados às deficiências nutricionais nas hepatopatias colestáticas crônicas.

Absorção diminuída
<ul style="list-style-type: none"> - Circulação irregular de ácidos biliares - Enteropatia hipertensiva - Crescimento bacteriano intestinal
Utilização desordenada de substratos
<ul style="list-style-type: none"> - Depósito de glicogênio diminuído e resistência insulínica - Balanço nitrogenado negativo (por síntese hepática inadequada de proteína e aumento das perdas por sangramentos ou uso de diuréticos) - Oxidação lipídica aumentada

Fonte: Modificado de Tsouka e McLin (2012, p. 264).

2.2.5 Hipermetabolismo

Um estado hipermetabólico parece estar presente na doença hepática crônica que atinge crianças e adolescentes. O aumento do gasto energético em repouso é apontado como

uma das possíveis causas da dificuldade de ganho de peso e crescimento, podendo ser aproximadamente 30% maior, quando comparado a uma criança hígida (GREER *et al.*, 2003). As infecções de repetição, comuns nos hepatopatas, parecem desencadear este estado (HENKEL; BUCHMAN, 2006). O hipermetabolismo pode estar relacionado a uma série de fatores como distúrbios no metabolismo que levam à utilização ineficiente de energia, à inflamação por ocorrência de colangite e à presença de ascite, responsável pela elevação do esforço respiratório (NIGHTINGALE; NG, 2009).

Sugere-se hipermetabolismo mesmo nos casos de cirrose compensada, ainda que sem prejuízo aparente ao estado nutricional. Considera-se hipermetabólico aquele paciente que apresentar 10 a 20% a mais que o valor previsto de REE (*Resting Energy Expenditure*, em português, Gasto Energético em Repouso) obtido por calorimetria indireta (MULLER *et al.*, 1999).

Sabe-se que a detecção precoce de hipermetabolismo, aliada à intervenção nutricional, é uma importante ação no combate à desnutrição decorrente da doença hepática. Mathur *et al.* (2007) demonstraram, a partir de sua pesquisa com cirróticos adultos, que o hipermetabolismo está relacionado com um menor período de sobrevivência sem Tx, independente do fator etiológico da hepatopatia.

O tratamento da hipertensão portal com TIPS (*Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt*, em português, Derivação Portossistêmica Transjugular Intra-hepática) poderia ter efeito benéfico no estado nutricional e hipermetabólico de pacientes desnutridos por propiciar diminuição da pressão no sistema portal (PLAETH *et al.*, 2004).

2.2.6 Terapia nutricional

A TN pode ser definida como o conjunto de procedimentos terapêuticos para manutenção ou recuperação do estado nutricional do paciente por meio de nutrição parenteral ou enteral. É um tratamento fundamental a todo e qualquer paciente gravemente enfermo e/ou depletado nutricionalmente, sendo seus principais objetivos a estabilização do estado metabólico e a manutenção da massa corpórea e do crescimento (BRASIL, 2000). A intervenção nutricional e a prescrição dietética adequada para suplementação oral ou enteral, quando necessárias, são fundamentais no manejo das crianças e adolescentes com cirrose (DORNELLES *et al.*, 2010).

Cleghorn (2009) indicou que se deve intervir na nutrição do paciente antes de qualquer sinal de risco nutricional. Os objetivos da TN neste contexto incluem reabilitação da composição corporal e das deficiências nutricionais, prevenção de danos às células hepáticas, promoção de regeneração e de crescimento, podendo assim melhorar o prognóstico pré e pós-transplante. Huisman *et al.* (2011) descreveram os seguintes achados em um estudo com cirróticos adultos: a desnutrição pode estar presente mesmo nos estágios iniciais da doença, o risco de complicações está aumentado quando o paciente se encontra desnutrido e que o consumo energético e proteico diminui, ao passo que a gravidade da hepatopatia se eleva.

A implementação da TN é ponto chave no tratamento da AB, conforme Bauman e Ure (2012). As necessidades calóricas de crianças hepatopatas estão aumentadas em decorrência de problemas de má absorção e gasto energético em repouso aumentado. A recomendação calórica para hepatopatas é de 130-150% do recomendado para a idade (INSTITUTE OF MEDICINE, 2002/2005; MCKIERNAN, 2012). Para lactentes, é indicada a oferta de 120-150 kcal/kg/dia com fórmula infantil rica e/ou com adição de triglicerídeos de cadeia média (TCM), principalmente para crianças com colestase, uma vez que este tipo de gordura não

necessita de sais biliares para ser absorvida (ALONSO, 2008). Nos casos de esteatorrêia decorrente da má absorção lipídica, o uso de TCM pode corresponder de 40 a 60% das gorduras totais oferecidas (KELLY; DAVENPORT, 2007). Se o ganho de peso configurar-se como insatisfatório, o uso de fórmulas à base de proteína extensamente hidrolisada deve ser proposto.

É postulado que o sucesso do Tx hepático tem estreita relação com o estado nutricional do receptor, conseqüentemente, se faz necessário que todos os pacientes colestáticos em lista de Tx recebam acompanhamento nutricional, assim como intervenção dietética quando indicado (BAKER *et al.*, 2007). De acordo com Alonso (2008), quando o paciente pediátrico em fase pré-transplante não responde a TN, dentro de quatro a seis semanas, com recuperação de massa muscular, deve presumir-se que a função sintética do fígado não está mais em condições de promover crescimento. Em estudo clássico conduzido por Chin *et al.* (1992a) com 19 crianças em lista de Tx para avaliação da TN pré-operatória constatou-se que a utilização de fórmulas enriquecidas com aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), oferecidas por sonda nasoentérica, melhorou o estado nutricional dos participantes. Sugere-se que o emprego de fórmulas enriquecidas com AACR poderia reduzir o estado catabólico e diminuir a produção de amônia, prevenindo o desenvolvimento de encefalopatia hepática (TSOUKA, MCLIN, 2012). Não obstante, o uso deste tipo de formulação na população pediátrica ainda gera dúvidas. A suplementação de AACR está restrita a pacientes cirróticos com encefalopatia hepática crônica não responsiva a fármacos (PLAUTH *et al.*, 2006).

O modo mais apropriado de intervenção nutricional é determinado a partir da idade do paciente, da condição clínica, da função gastrointestinal, da possibilidade de utilização da via oral, dos hábitos alimentares e dos custos (BRAEGGER *et al.*, 2010). A via oral é a principal forma de ofertar alimentos à criança e ao adolescente, por ser o método mais natural e

fisiológico. No entanto, quando existe algum impedimento para utilização desta via de alimentação, é necessário que se inicie a TN enteral e/ou parenteral.

2.2.6.1 Nutrição enteral e parenteral

A NE caracteriza-se como um conjunto de procedimentos terapêuticos que tem como objetivo a manutenção ou a recuperação do estado nutricional do paciente (BRASIL, 2000). A ASPEN (*American Society of Parenteral and Enteral Nutrition*, em português, Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral) recomenda que pacientes pediátricos recebam NE quando na presença de trato gastrointestinal funcionante, sendo a rota preferencial de alimentação (MEHTA *et al.*, 2009). A NE está indicada em situações nas quais há risco ou presença de desnutrição associados à baixa ingestão alimentar por via oral, estados hipermetabólicos, incapacidade de deglutição ou risco de aspiração (TANNURI, 2009).

Uma série de aspectos merece destaque no manejo da NE como, por exemplo, a posição da sonda, podendo esta ser gástrica ou pós-pilórica. Na prática clínica esta decisão terapêutica deve ser tomada levando-se em consideração a integridade morfológica e funcional do trato gastrointestinal, assim como a duração estimada do uso de NE e o risco de aspiração; todavia, a posição gástrica é a opção preferencial (AXELROD *et al.*, 2006). Quanto à rota da NE, as mais indicadas na hepatopatia são a nasoenteral ou nasogástrica em detrimento de gastrostomia, em função das complicações da hipertensão portal já discutidas anteriormente. Quanto à forma de oferta da NE, é indicado que o modo intermitente estaria mais próximo da alimentação fisiológica (BRAEGGER *et al.*, 2010). O uso de NE noturna contínua pode ser uma opção para crianças maiores, para que estas possam manter seu padrão de alimentação durante o dia (ALONSO, 2008).

Algumas complicações podem ocorrer durante o período de utilização de NE como, por exemplo, as mecânicas relacionadas ao tamanho, à posição e ao tipo de sonda utilizada (erosão e necrose da asa do nariz, esofagite de refluxo, perfuração do estômago, duodeno ou jejuno e aspiração para a árvore brônquica). As complicações gastrointestinais mais comuns dizem respeito à velocidade e ao volume de dieta administrado causando cólicas, distensão abdominal, vômitos e diarreia (TANNURI, 2009). Particulares à hepatopatia são as complicações relacionadas à sobrecarga de líquidos e ao risco de hiponatremia (BAKER *et al.*, 2007).

De acordo com as diretrizes da ESPEN (*European Society of Parenteral and Enteral Nutrition*, em português, Sociedade Europeia de Nutrição Parenteral e Enteral) para pacientes com doença hepática, a NE está indicada por promover melhora no estado nutricional e na função hepática, reduzir complicações e prolongar a sobrevida (PLAETH *et al.*, 2006). Em muitos casos, a NE é iniciada tardiamente fazendo com que os possíveis resultados da intervenção não tenham impacto na melhora do estado nutricional do paciente (CAMPILLO *et al.*, 2003; DERRUSO *et al.*, 2007).

Um dos desafios da NE é fazer com que a dieta prescrita seja de fato oferecida ao paciente. Em estudo brasileiro com adultos internados em Unidade de Terapia Intensiva, foi comprovada a existência desta discrepância que perpassa desde questões operacionais do hospital até a retirada acidental ou proposital da sonda por parte do paciente (MARTINS *et al.*, 2012). Em pediatria, esta realidade se repete como foi demonstrado em estudo internacional multicêntrico com crianças internadas na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica em ventilação mecânica, expondo a relação entre a falha no oferecimento de calorias que foram prescritas e a probabilidade aumentada de morte (MEHTA *et al.*, 2012).

A nutrição parenteral (NPT) deve ser instituída quando a via oral e enteral forem insuficientes ou contraindicadas. Tem como objetivo oferecer a possibilidade de suprimento das necessidades nutricionais ao paciente (PLAETH *et al.*, 2009). Na doença hepática, há

indicação do uso da via parenteral para alimentação quando na presença de sintomas como diarreia persistente, vômitos frequentes e repetidos episódios de hemorragia gastrointestinal. É indicado que a prescrição seja criteriosa no que tange o equilíbrio de eletrólitos, como o sódio, e micronutrientes, como o manganês (BAKER *et al.*, 2007). Quando possível clinicamente, deve ser considerada a administração simultânea de NE mínima (até 10 mL/kg) para proteção da função hepática e estimulação gastrointestinal (BAKER *et al.*, 2007; SMART *et al.*, 2011).

2.3 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

As citocinas são polipeptídeos de pequeno peso molecular envolvidos na emissão de sinais entre as células durante a resposta imune. São produzidas por células T e macrófagos ativados, sendo sua síntese transitória e regulada por estímulos de diferentes tipos celulares. Níveis circulantes de citocinas são identificados em vigência de hiperprodução com consequente impacto na homeostase (VILCEK, 2003).

Podem ser chamadas de moléculas sinalizadoras, uma vez que estão envolvidas diretamente na comunicação entre as células executando ações autócrinas, parácrinas e até mesmo endócrinas. Uma citocina pode atuar em diversos tipos celulares e exercer múltiplos efeitos biológicos, sendo caracterizadas como pleiotrópicas, antagonistas, sinérgicas, ou ainda, redundantes (ABBAS *et al.*, 2008). Este grande grupo de moléculas heterogêneas é dividido nas seguintes categorias: interferons, interleucinas, fator estimulador de colônias, fator de necrose tumoral e fator de transformação de crescimento.

Estes marcadores inflamatórios são importantes mediadores da resposta imune, regulando diversos aspectos da imunidade natural e adaptativa. Estão presentes em inúmeros processos biológicos como: diferenciação e desenvolvimento embriológico; resposta a

infecções; patogênese de doenças; resposta a antígenos; progressão de doenças degenerativas; processo de envelhecimento; diferenciação celular e rejeição a transplantes. Com exceção das hemácias, todas as células humanas podem produzir e responder ao estímulo de citocinas (DINARELLO, 2007). As citocinas participam também da regulação do músculo, quando em vigência de inflamação, na promoção de catabolismo, inibição da síntese proteica e reparo muscular, desencadeando o processo de apoptose (ABBAS *et al.*, 2011).

No Quadro 4 são descritas as principais características das citocinas estudadas.

Quadro 4 - Principais características das citocinas estudadas.

Citocinas	Principal fonte	Principais características
Fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa)	Macrófagos e células T.	Ativação de neutrófilos e indução de apoptose. Ação no hipotálamo para indução de febre (pirógeno endógeno). Estimulação da produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos. Supressão do apetite e redução da lipase lipoproteica. Perda de células musculares e adiposas (catabolismo) e promoção de caquexia.
Interleucina-1 beta	Macrófagos, células endoteliais e epiteliais.	É a principal forma biologicamente ativa secretada de interleucina-1. Indução sistêmica de febre. Estimulação dos hepatócitos para produção de proteínas de fase aguda. Produz efeitos semelhantes ao TNF-alfa, no entanto não induz apoptose celular.
Interleucina-6	Macrófagos, células endoteliais e células T.	Estimulação da síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos. Indução da produção de outras citocinas pró-inflamatórias.

Fonte: Modificado de Abbas *et al.* (2011, p. 76).

As células T *helper* têm participação fundamental na resposta imunológica, diferenciam-se em subgrupos de células efetoras que produzem tipos diferentes de citocinas com efeitos distintos. A resposta imune pode ser dividida em T *helper* 1 (Th-1) que produz principalmente citocinas como o Interferon-gama, a interleucina-2 e o TNF-alfa, sendo sua principal função ativar macrófagos para ingerir e destruir os microorganismos. As células Th-2 secretam Interleucina-4 e Interleucina-5, estão envolvidas na indução de respostas aos anticorpos IgE e na ativação de eosinófilos, entre outras. E, as células Th-17 secretam citocinas que recrutam neutrófilos para os sítios de infecção (Interleucina-17), sendo o desenvolvimento destas células estimulado por citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e a IL-6. Assume-se que uma destas subpopulações se encontra de maneira predominante nas respostas imunes que se tornam crônicas (ABBAS *et al.*, 2011).

2.3.1 Citocinas e estado nutricional

Em adultos, as citocinas estão ligadas a condição clínica de caquexia, que se traduz por perda de massa magra, perda de peso, anorexia, desorganização metabólica e se faz presente em uma série de doenças crônicas. Evidências indicam que a IL-6 e o TNF-alfa seriam os mediadores deste estado (FAINBOIM *et al.*, 2007).

Em pacientes com câncer, os níveis sistêmicos de IL-6 demonstraram correlação com a perda ponderal. Supõe-se que esta citocina, assim como o TNF-alfa, seja mediadora do processo de caquexia (FEARON *et al.*, 2012). Em doenças inflamatórias que se desenvolvem durante a infância, como a doença de Crohn e a colite ulcerativa, é postulado que as citocinas (IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa) seriam as responsáveis pelo déficit de crescimento apresentado por estes pacientes (MARCOVECCHIO *et al.*, 2012).

A desnutrição relacionada à doença de base (*illness-related malnutrition*) demonstra associação com componentes inflamatórios, através do aumento do gasto energético em repouso, da diminuição do consumo calórico e da anorexia. É sugerido que concentrações séricas de IL-6 poderiam ser utilizadas para identificar pacientes em risco de deterioração nutricional (MEHTA; DUGGAN, 2009).

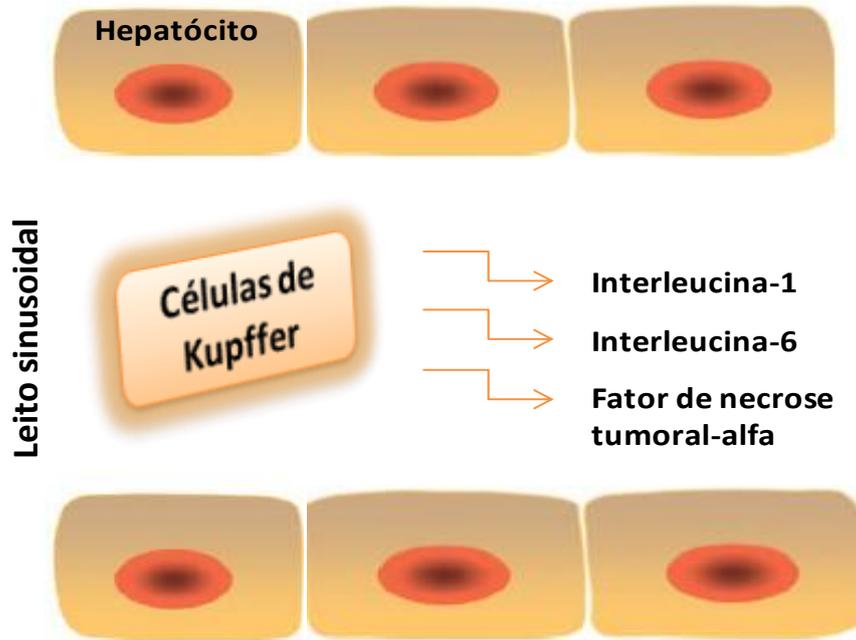
Em publicação, a ASPEN reconheceu o papel da inflamação na piora do estado nutricional, recomendando a inclusão da dosagem de PCR e citocinas (IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa) na avaliação nutricional, quando disponível. Indica, ainda, a necessidade de novos estudos focados em biomarcadores inflamatórios e no impacto da inflamação na desnutrição, especificamente em crianças (MEHTA *et al.*, 2013).

2.3.2 Citocinas nas hepatopatias crônicas

No que tange especificamente ao paciente cirrótico, parece existir um desequilíbrio no balanço entre citocinas pró/anti-inflamatórias. As células de Kupffer ativadas do fígado estão envolvidas na secreção de citocinas. A IL-6 liberada pelas células de Kupffer é uma potente indutora da síntese de reagentes de fase aguda e inibidora da síntese de proteínas, como a albumina. A IL-1 beta também participa do mecanismo de lesão hepática, sendo entendida como um potente indutor da liberação de TNF-alfa e IL-6 por este grupo celular (MARTINS, 2001), como ilustrado na Figura 3.

A permeabilidade intestinal alterada com consequente endotoxemia está diretamente ligada ao aumento da produção de citocinas observada na cirrose. É sugerido que pacientes cirróticos desnutridos apresentam a permeabilidade intestinal aumentada, quando comparados aos eutróficos (NORMAN; PIRLICH, 2008).

Figura 3. Secreção de citocinas pró-inflamatórias no fígado.



Fonte: Adaptado de Copple *et al.* (2010, p. 201).

O aumento dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa, estão associados com anorexia, hipermetabolismo, catabolismo proteico e resistência à insulina (TILG, 2001). A elevação crônica da IL-6 na circulação pode contribuir para a ocorrência de complicações cardiovasculares em pacientes com cirrose na idade adulta (SCHUETT *et al.*, 2009).

O TNF-alfa tem importante papel no desenvolvimento de anorexia por estar relacionado à regulação do metabolismo energético na cirrose. Esta citocina induz a oxidação de ácidos graxos de forma mais eficiente do que quando comparado à oxidação de carboidratos (MIWA *et al.*, 2000). A produção de ATP (adenosina trifosfato), por meio de beta oxidação de ácidos graxos, seria maior do que por oxidação de glicose, levando a uma expressão anormal do metabolismo energético, estando esta condição correlacionada à gravidade da doença hepática crônica e à cirrose em adultos (SHIRAKI *et al.*, 2010).

3 JUSTIFICATIVA

A desnutrição relacionada à doença de base demonstra associação com componentes inflamatórios, através do aumento do gasto energético em repouso, da diminuição do consumo calórico e de anorexia. É sugerido que concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, poderiam ser utilizadas para identificar pacientes em risco de deterioração do estado nutricional.

São necessários estudos que auxiliem no entendimento do possível papel da inflamação na piora do estado nutricional, sobretudo nas hepatopatias crônicas que acometem crianças e adolescentes.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil inflamatório, através da dosagem sérica de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa), e o estado nutricional de crianças e adolescentes com hepatopatia crônica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer as possíveis relações entre:

- avaliação antropométrica
- exames laboratoriais
- gravidade da doença hepática
- mediadores inflamatórios (IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa).

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO

Foi realizado um estudo transversal contemporâneo, considerando-se como fator de exposição a presença de hepatopatia crônica. Os desfechos estudados foram os resultados da avaliação do estado nutricional e das concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias.

5.2 AMOSTRA

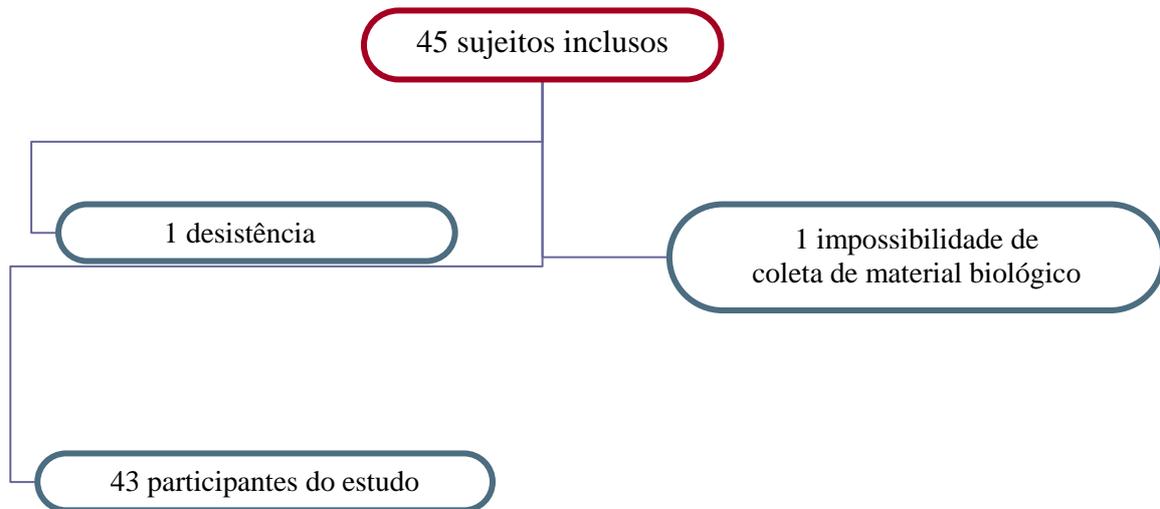
A amostra do estudo foi constituída por crianças e adolescentes entre três e 213 meses, com diagnóstico clínico de hepatopatia crônica, atendidos regularmente na Unidade de Hepatologia Pediátrica, Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Quarenta e cinco crianças e adolescentes com hepatopatia crônica foram incluídas no estudo mediante concordância de seus pais e/ou responsáveis. Desta amostra, dois sujeitos foram excluídos, um por motivo de desistência e outro por não realizar a coleta de material biológico neste hospital, totalizando 43 sujeitos de pesquisa, conforme exposto na Figura 4.

5.2.1 Cálculo de tamanho de amostra

Para que fosse possível estimar uma diferença dos parâmetros inflamatórios entre crianças com hepatopatia crônica com risco nutricional e sem risco nutricional, cujo tamanho do efeito padronizado (*effect size*) fosse maior ou igual a 0,9 e considerando um poder de 80% com nível de significância estatística de 0,05, seriam necessários no mínimo 42 sujeitos.

Figura 4 – Caracterização da amostra estudada.



5.2.2 Critérios de inclusão

Crianças e adolescentes de zero a 19 anos, com diagnóstico clínico de hepatopatia crônica, com ou sem cirrose, em acompanhamento regular no ambulatório de Hepatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O diagnóstico de cirrose foi obtido através de histologia (presença de formação nodular e fibrose na biópsia hepática) ou, na ausência desta, por exames laboratoriais que avaliaram a presença de lesão hepática, exames endoscópicos (presença de varizes esofágicas) e/ou ultrassonográficos (fígado com ecogenicidade heterogênea e sinais de hipertensão portal).

5.2.3 Critérios de exclusão

Presença de infecções agudas, febre de qualquer etiologia, uso de antibióticos 15 dias antes da entrada no estudo, diagnóstico de erros inatos do metabolismo e concomitância com

outras doenças crônicas (como, por exemplo: fibrose cística, cardiopatias, diabetes mellitus, pneumopatia crônica e hipotireoidismo).

5.2.4 Coleta de dados

A coleta de dados ocorreu entre maio de 2011 e dezembro de 2012, nos ambulatórios de Hepatologia Pediátrica e Nutrição Gastropediátrica, do Serviço de Pediatria e do Serviço de Nutrição do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5.2.5 Variáveis estudadas

- Idade (meses): obtida através da diferença entre data da entrevista e data de nascimento.
- Sexo: masculino ou feminino.
- Idade gestacional (semanas): verificada no prontuário eletrônico do paciente, na caderneta de saúde da criança ou informada pelo responsável.
- Peso ao nascer (gramas): verificado no prontuário eletrônico do paciente, na caderneta de saúde da criança ou informado pelo responsável.
- Peso atual (g): foi medido, com as crianças despidas e sem fralda, em balança eletrônica de marca Filizola®, naquelas até 24 meses com carga máxima de 15 kg e variação 5 g. As crianças maiores de dois anos e os adolescentes foram pesados com avental e sem calçados em balança da marca Filizola®, com carga máxima de 120 kg.
- Estatura (cm): crianças até 24 meses foram medidas em decúbito dorsal, realizada do topo da cabeça ao calcanhar, utilizando régua antropométrica com cursor móvel. As

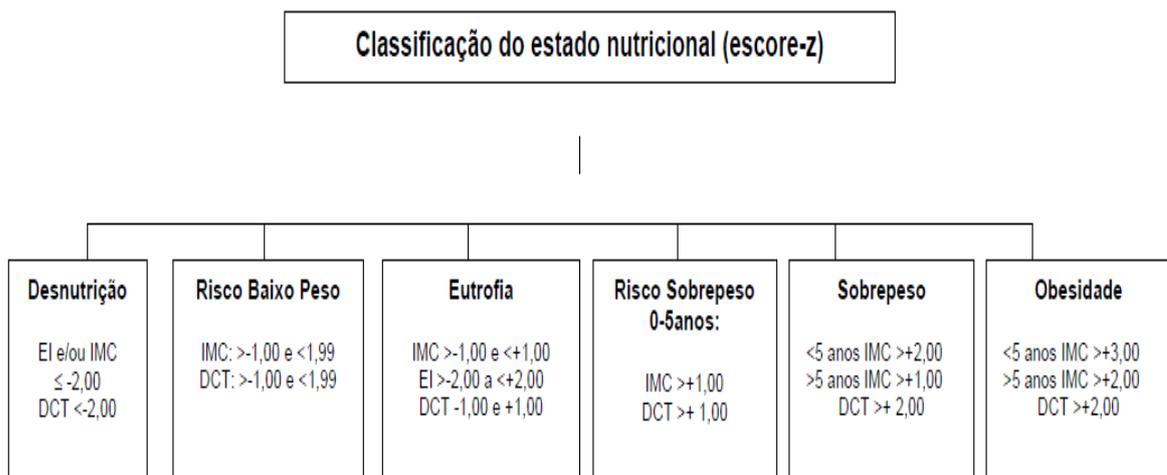
crianças acima de 24 meses foram medidas em pé com régua antropométrica vertical com cursor móvel graduada em centímetros.

- Índice de massa corporal (kg/m^2): o IMC foi calculado dividindo-se o peso pela altura elevada ao quadrado, no *software Anthro* (WHO, 2011) e *Anthro Plus* (WHO, 2009).
- Circunferência braquial (cm): medida com fita métrica em fibra de vidro flexível e retrátil, circundando a porção média do braço não dominante, estando o braço relaxado.
- Dobra cutânea tricípital (mm): foram realizadas três medidas consecutivas e alternadas, no ponto médio entre o acrômio e o olécrano do braço contralateral ao dominante com a utilização do adipômetro científico da marca Cescorf®.
- Circunferência muscular do braço (cm): calculada a partir da equação proposta por Frisancho (1981): $[\text{CMB} = \text{CB} - (\text{DCT} \times 0,314)]$.
- Área muscular do braço (cm^2): calculada a partir da equação proposta por Frisancho (1981): $[\text{AMB} = \text{CMB}^2/4\pi]$.
- Avaliação antropométrica e classificação do estado nutricional: foram realizadas a partir dos seguintes critérios e ferramentas da WHO (2006; 2007).
 - **Crianças de zero a cinco anos:** foi utilizado o *software WHO Anthro* (2011), que determina os percentis e escores-z para as relações P/E, P/I, E/I, IMC/I, CB/I e DCT/I.
 - **Crianças acima de cinco anos:** foi utilizado *software WHO Anthro Plus* (2009), que determina os percentis e escores-z para as relações P/I, E/I e IMC/I. Os dados de CB/I, DCT/I e AMB foram avaliados através do programa de Frisancho (2008), sendo os valores abaixo do percentil 5 indicadores de desnutrição.

A classificação do estado nutricional foi realizada através da avaliação de parâmetros antropométricos como o escore-z para DCT/I ou IMC/I, quando este se apresentava menor

que o valor da dobra cutânea avaliada. A classificação do estado nutricional dos participantes que apresentaram edema e/ou ascite foi determinada exclusivamente pela espessura da DCT, conforme a Figura 5. Em caso de discrepância entre a antropometria e as dobras cutâneas, foi utilizado o menor valor para o diagnóstico antropométrico.

Figura 5 - Critérios para classificação do estado nutricional de crianças e adolescentes com hepatopatia crônica.



EI: Estatura para idade; **IMC:** Índice de massa corporal; **DCT:** dobra cutânea tricípital.
 Fonte: Dornelles *et al.* (2010, p. 147).

- Gravidade da hepatopatia: foram utilizados os seguintes critérios previamente estabelecidos de gravidade da doença hepática: a classificação de Child-Pugh e os escores PELD e MELD.

A classificação de gravidade proposta por Child-Pugh (PUGH *et al.*, 1973) foi realizada de acordo com a soma de pontos obtidos após a avaliação de aspectos clínicos e laboratoriais. Considera-se doença de intensidade leve (Child-Pugh A) quando a soma de pontos é inferior ou igual a seis; de intensidade moderada (Child-Pugh B) quando a soma situa-se entre sete e nove, e grave (Child-Pugh C) quando for maior ou igual a dez, vide Quadro 5.

Quadro 5 - Classificação de Child-Pugh.

Avaliação clínica e bioquímica	Pontuação 01	Pontuação 02	Pontuação 03
Encefalopatia (grau)	Ausente	Discreta	Moderada/Grave
Ascite	Ausente	Discreta	Volumosa
Bilirrubina Total (mg/dL)	< 2	2 – 3	> 3
Albumina (g/L)	> 3,5	2,8 – 3,5	< 2,8
Prolongamento do tempo de protrombina (segundos)	< 4	4 - 10	> 10

Grau A (leve) ≤ 6 ; **Grau B** (moderada) 7 – 9; **Grau C** (grave) ≥ 10

Fonte: Pugh *et al.* (1973).

O escore PELD é um modelo prognóstico específico para crianças com doença hepática crônica até 12 anos de idade. Neste modelo, através de análise multivariada, foram identificadas cinco variáveis consideradas preditivas de morte ou internação em unidade de tratamento intensivo em crianças com doença hepática crônica: a) idade; b) albumina; c) bilirrubina total; d) INR (*International Normalized Ratio*); e) -2,0 DP do escore-z do peso ou da estatura para a idade. Atribuindo-se um peso para cada uma das variáveis, conforme equação específica obtém-se o valor do PELD. A partir do escore 15, considera-se mais grave o estado do paciente (MCDIARMID *et al.*, 2002). A equação está descrita no Quadro 6.

Quadro 6 - Descrição da equação do escore *Pediatric End Stage Liver Disease* (PELD).

Equação PELD
$\text{PELD} = 0,48 \times \text{Log}(\text{bilirrubina total mg/dL}) + 1,1857 \times \text{Log}(\text{INR}) - 0,687 \times \text{Log}(\text{albumina g/dL})$ $+ 0,436 \text{ (paciente } < 12 \text{ meses. Caso o paciente tenha sido incluído em lista de transplante antes de 12 meses, este valor continua no cálculo até que ele alcance 24 meses de idade).}$ $+ 0,667 \text{ (se o paciente estiver abaixo de } - 2,00 \text{ DP do escore-z do PI ou EI)}$

PELD: *Pediatric End Stage Liver Disease*; **DP:** desvio padrão; **PI:** peso para idade; **EI:** estatura para idade.
Fonte: McDiarmid *et al.* (2001, p. 178).

O MELD é calculado para pacientes a partir de 12 anos de idade. Para seu cálculo, são utilizadas as seguintes variáveis: creatinina, BT e INR. A equação para o cálculo do MELD está representada no Quadro 7. Este modelo utiliza uma escala numérica cujos escores variam de seis a 40, a fim de categorizar a gravidade do paciente (KAMATH *et al.*, 2001).

Quadro 7 - Descrição da equação do escore *Model for End Stage Liver Disease* (MELD).

Equação MELD

$$\begin{aligned} \text{MELD} &= 0,957 \times \text{Log}_e (\text{creatinina mg/dL}) \\ &+ 0,378 \times \text{Log}_e (\text{bilirrubina mg/dL}) \\ &+ 1,120 \times \text{Log}_e (\text{INR}) \\ &+ 0,643 \end{aligned}$$

MELD: *Model for End Stage Liver Disease*; **INR:** *International Normalized Ratio*.

Fonte: Kamath *et al.* (2001, p. 465).

- Níveis séricos de albumina, creatinina, bilirrubinas (total e direta), aminotransferases, hemoglobina, fatores de coagulação (TP e INR) e PCR: determinados conforme o Protocolo Operacional Padrão do Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre como parte da rotina assistencial. Os valores de referência utilizados neste hospital são:
 - Albumina: 3,2 - 4,8 g/dL
 - Creatinina: $\leq 1,3$ mg/dL
 - Bilirrubina total (BT): 0,3 - 1,2 mg/dL
 - Bilirrubina direta (BD): $\leq 0,2$ mg/dL
 - Fosfatase Alcalina (FA):
 - 1 a 12 meses: 82 – 383 U/L
 - 1 a 7 anos: 93 – 345 U/L
 - 7 a 10 anos: 69 – 325 U/L
 - 10 a 15 anos: 42 – 420 U/L
 - 15 a 18 anos: 47 – 171 U/L
 - Alanina Aminotrasferase (ALT): 10 - 49 U/L
 - Aspartato Aminotrasferase (AST): ≤ 34 U/L
 - Gamaglutamil Transferase (GGT): ≤ 73 U/L
 - Hemoglobina (Hb): 11,7 - 14,7 g/dL
 - Tempo de Protrombina (TP): atividade superior a 70%
 - Proteína C Reativa (PCR): ≤ 5 mg/L (não reagente)

- Coleta e armazenamento de sangue para dosagem de citocinas (IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa): foi realizada durante os exames de rotina solicitados pelo médico assistente, sem coleta adicional. O sangue coletado (2 mL) foi transportado para a Unidade de Análise Molecular e de Proteínas, localizada no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde foi centrifugado conforme protocolo indicado pelo fabricante de cada kit utilizado (R&D Systems, Inc.). Após a centrifugação, o soro foi pipetado e colocado em microtubos. Cada microtubo (em triplicata) foi identificado e armazenado a - 80°C, até o momento da análise.
- Dosagem da concentração de citocinas (IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa) (pg/mL): foram realizadas no Laboratório de Pediatria Translacional localizado do CPE, pelo método ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*), utilizando kits comerciais específicos para cada citocina, conforme protocolos do fabricante (R&D Systems, Inc.) demonstrados nos ANEXOS A, B e C.
 - IL-1 beta: limite inferior de detecção do kit igual a 1,0 pg/mL.
 - IL-6: limite inferior de detecção do kit igual a 0,7 pg/mL.
 - TNF-alfa: limite inferior de detecção do kit igual a 5,5 pg/mL.
- Avaliação do consumo alimentar: foi solicitado o preenchimento de um registro alimentar de três dias, onde todos os alimentos sólidos ou líquidos consumidos pelo paciente e suas respectivas quantidades foram anotados por um responsável. Esse registro foi feito em dois dias da semana e em um dia de fim de semana, na semana da coleta de material para os exames laboratoriais (ANEXO D). A forma correta de preenchimento desta ferramenta foi orientada aos participantes do estudo.
- Ingestão alimentar: os cálculos da ingestão calórica, de macro e micronutrientes foram realizados no programa Nutwin – Sistema de Apoio à Decisão em Nutrição da Escola Paulista de Medicina, versão 2.5 (ANÇÃO *et al.*, 2002).

5.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o número 11-0078. Esta pesquisa foi executado de acordo com as diretrizes sobre pesquisa envolvendo seres humanos estabelecidas pela Resolução n° 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996). Durante este estudo não houve qualquer interferência quanto à prática assistencial desenvolvida nos ambulatórios. Para viabilizar a participação do paciente no estudo, foi assinado pelos pais e/ou responsáveis um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO E).

5.4 LOGÍSTICA

Realizou-se uma busca eletrônica semanal nas agendas dos ambulatórios de Hepatologia Pediátrica do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para identificar as crianças e os adolescentes portadores de hepatopatia crônica que possuíam consultas agendadas e preenchiam os critérios de inclusão. Os dados da história clínica, diagnóstico, informações perinatais, entre outros, eram verificados no prontuário eletrônico do paciente na instituição e confirmados com o médico hepatologista da equipe (ANEXO F).

Os hepatopatas crônicos que preencheram os critérios de inclusão foram contatados conforme a data marcada para seu retorno nos ambulatórios de Hepatologia Pediátrica e de Nutrição Gastropediátrica dos Serviços de Pediatria e de Nutrição da instituição. A pesquisa foi explicada aos pais e verificou-se a intenção das famílias em participar. Após a assinatura do TCLE pelos pais e/ou responsáveis, solicitou-se o preenchimento de um registro alimentar de três dias, a ser trazido na próxima consulta agendada no ambulatório.

As amostras de sangue para exames laboratoriais de rotina e para a dosagem das concentrações das citocinas pró-inflamatórias foram coletadas no mesmo momento, conforme rotina no setor responsável pela coleta de material biológico do hospital (zona 14).

No dia da consulta de retorno no ambulatório foi feita a entrevista alimentar, a avaliação antropométrica e de composição corporal, por uma nutricionista com treinamento específico, assim como a entrega do registro alimentar de três dias preenchido pelos pais e/ou responsáveis.

5.4.1 Equipe de pesquisa

A equipe constituída para execução desta pesquisa foi composta pela nutricionista pesquisadora e por duas farmacêuticas. A pesquisadora foi responsável pelo contato com os participantes do estudo, pela entrevista nutricional, avaliação antropométrica e cálculos dos inquéritos alimentares. O processamento e armazenamento do material biológico foram feitos pela pesquisadora, com realização de treinamento prévio para padronização de rotinas e técnicas laboratoriais. As dosagens de citocinas pró-inflamatórias foram executadas pelas farmacêuticas assistentes ao projeto.

5.5 ANÁLISE DOS DADOS

Foi realizada dupla digitação para assegurar melhor confiabilidade dos dados armazenados. O nível de significância adotado foi de 5% ($P \leq 0,05$). As análises foram realizadas a partir do pacote estatístico SPSS (SPSS Inc, Chicago, Illinois), versão 18.

5.5.1 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão (distribuição simétrica) ou mediana e amplitude interquartilica (Percentil 25–Percentil 75) (distribuição assimétrica). Na análise de variáveis categóricas, as frequências absolutas e relativas foram utilizadas. Para verificar a associação entre as variáveis categóricas foi aplicado o teste Qui-Quadrado. Na associação entre as variáveis quantitativas o coeficiente de Correlação de Spearman (distribuição assimétrica) foi utilizado.

Os pacientes foram agrupados por idade, classificação de Child-Pugh, escores PELD/MELD e estado nutricional. Para comparar dois grupos em relação às variáveis quantitativas foi utilizado o teste de Mann-Whitney e, para comparar mais de dois grupos, o teste de Kruskal-Wallis (ambos para distribuição assimétrica).

Para controlar possíveis fatores de confusão e avaliar as variáveis independentemente associadas com os desfechos em estudo, a análise de Regressão Linear Múltipla foi aplicada nos valores de citocinas (IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa) controlados para presença de risco nutricional e gravidade da cirrose (avaliadas através da classificação de Child-Pugh e dos escores PELD e MELD). Não houve multicolinearidade, testada a partir do VIF (*Variance Inflation Factor*), entre as variáveis controladas. Como a maioria dos desfechos apresentou distribuição assimétrica, a transformação logarítmica foi escolhida para satisfazer os pressupostos da análise de regressão.

6 RESULTADOS

Foram arrolados para o estudo 43 crianças e adolescentes com hepatopatia crônica, entre três e 213 meses de idade, selecionados conforme os critérios de inclusão previamente descritos, advindos do ambulatório de Hepatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A AB foi o principal diagnóstico dentre os participantes, tendo como maior representação o grupo etário que compreende crianças até 10 anos. Os achados de maior relevância são apresentados a seguir. As tabelas complementares dos resultados obtidos encontram-se no ANEXO G.

6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS

A amostra estudada apresentou uma mediana (P25-P75) de idade igual a 60 (17-116) meses. Não houve distinção entre grupos étnicos com uma representação 100% caucasóide. A AB correspondeu a 72% dos casos de hepatopatia crônica, sendo seguida pela DA1AT com 14% dos casos, 7% de cirrose criptogênica e outros diagnósticos (1 cirrose por citomegalovírus, 1 síndrome de obstrução sinusoidal e 1 hepatopatia crônica sem diagnóstico etiológico) representando 7%. Oito participantes não apresentaram sinais clínicos e laboratoriais de cirrose no momento de inclusão no estudo.

Quanto à classificação de Child-Pugh, a amostra de cirróticos distribuiu-se da seguinte forma: 57,1% Child-Pugh A, considerada uma apresentação leve da cirrose, 34,3% Child-Pugh B, moderada e 8,6% Child-Pugh C, considerados casos graves. Para os escores PELD e MELD, foram encontrados cinco casos considerados graves (valores superiores a 15). Na Tabela 1 são descritas as principais características clínicas e demográficas da amostra.

Tabela 1 – Características clínicas e demográficas da amostra estudada.

Características gerais	Amostra (n = 43)
Idade (anos)	
< 2	13 (30,2)
2 – 5	9 (20,9)
5 – 10	11 (25,6)
> 10	10 (23,3)
Sexo feminino	23 (53,5)
Diagnóstico	
Atresia biliar	31 (72)
Deficiência de alfa-1 antitripsina	6 (14)
Cirrose criptogênica	3 (7)
Outros	3 (7)
Albuminemia (< 3,5 g/dL)	12 (27,9)
Colestase (BD ≥ 2 mg/dL)	12 (27,9)
Hipertensão portal	24 (55,8)
Cirrose	35 (81,4)
Child-Pugh n = 35	
A	20 (57,1)
B	12 (34,3)
C	3 (8,6)
PELD (> 15) n = 27	4 (14,8)
MELD (> 15) n = 8	1 (12,5)

Os dados foram expressos como números absolutos (%).

BD: Bilirrubina Direta; **PELD:** *Pediatric End Stage Liver Disease*;

MELD: *Model for End Stage Liver Disease*.

Os principais achados clínicos descritos no exame físico realizado nos participantes do estudo foram os seguintes: presença de ascite em 7%; edema periférico em 4,7%; hepatomegalia em 58,1% e esplenomegalia em 74,4%.

Com relação à medicação, 79,1% dos pacientes fazia uso de ácido ursodesoxicólico como parte da conduta terapêutica instituída pela equipe médica. É importante destacar que 16,3% dos participantes encontravam-se sem indicação de uso de qualquer medicação, no momento da inclusão no estudo, por compensação da doença. A utilização de suplementação vitamínica e de minerais no manejo destes pacientes em acompanhamento ambulatorial foi, respectivamente, de 74,4% (vitaminas lipossolúveis A, D, E e K) e 18,6% (carbonato de cálcio, sulfato ferroso e sulfato de zinco).

6.2 PERFIL NUTRICIONAL

Foi encontrado um total de 11,6% de desnutrição entre os hepatopatas crônicos estudados, já a categoria de risco para baixo peso correspondeu a 23,3% dos casos, perfazendo um total de 34,9% de risco nutricional na amostra. Os parâmetros antropométricos utilizados para classificação do estado nutricional estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação do estado nutricional.

Características	Amostra (n = 43)
Escore z EI	
< -2,00	10 (23,3)
-1,99 a + 1,99	33 (76,7)
Escore z IMC n = 39*	
< -2,00	2 (5,1)
-1,99 a -1,00	1 (2,6)
-1,00 a +1,00	27 (69,2)
+1,00 a +1,99	8 (20,5)
> + 2,00	1 (2,6)
Escore z CB	
< -2,00	4 (9,3)
-1,99 a -1,00	15 (34,9)
-1,00 a +1,00	19 (44,2)
+1,00 a +1,99	4 (9,3)
> + 2,00	1 (2,3)
Escore z DCT	
< -2,00	4 (9,3)
-1,99 a -1,00	9 (20,9)
-1,00 a +1,00	28 (65,1)
+1,00 a +1,99	2 (4,7)
Estado nutricional (DCT e/ou IMC)	
Desnutrição	5 (11,6)
Risco para baixo peso	10 (23,3)
Eutrofia	26 (60,5)
Risco para sobrepeso	1 (2,3)
Sobrepeso	1 (2,3)

Os dados foram expressos como número absoluto (%).

EI: estatura para idade; **IMC:** índice de massa corporal;

CB: circunferência do braço; **DCT:** dobra cutânea tricípital.

*IMC não foi calculado em pacientes com ascite e/ou edema.

DCT e/ou IMC com escore-z < -2,00 foram considerados como desnutrição.

A presença de risco nutricional foi maior em crianças com até dois anos de idade, correspondendo a 61,5% neste grupo etário ($P = 0,037$). Já a frequência de baixa estatura para a idade, avaliada a partir do escore-z para E/I, foi igual a 23,3%. O valor mediano (P25-P75) para a AMB na amostra foi igual a 16,9 (11,4 – 27,5) cm^2 .

Ainda referente a parâmetros antropométricos, foi constatada correlação inversa entre o escore-z da DCT/I e exames laboratoriais coletados. Os dados de maior relevância estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Correlação de exames laboratoriais com parâmetros antropométricos.

Parâmetros*	BD		AST		ALT		GGT	
	r_s	P	r_s	P	r_s	P	r_s	P
Estatura/idade	-0,49	0,001	-0,36	0,016	-0,22	0,139	-0,41	0,006
Peso/idade	-0,49	0,003	-0,37	0,032	-0,31	0,072	-0,39	0,023
CB/idade	-0,64	<0,001	-0,45	0,002	-0,28	0,067	-0,26	0,092
DCT/idade	-0,68	<0,001	-0,56	<0,001	-0,33	0,028	-0,33	0,029

CB: circunferência do braço; **DCT:** dobra cutânea tricípital; **BD:** bilirrubina direta; **AST:** aspartato aminotransferase; **ALT:** alanina aminotransferase; **GGT:** gamaglutamil transferase.

*Avaliados em escore-z. r_s : Coeficiente de Correlação de Spearman.

Foi detectada uma correlação direta entre a DCT/I e os valores séricos de albumina ($r_s = 0,63$; $P < 0,001$). Por outro lado, os parâmetros P/E e IMC/I não demonstraram correlação com nenhum dos exames realizados. O escore PELD correlacionou-se inversamente com os seguintes parâmetros: E/I ($r_s = -0,48$; $P = 0,004$), P/I ($r_s = -0,34$; $P = 0,048$), CB/I ($r_s = -0,66$; $P < 0,001$) e DCT/I ($r_s = -0,72$; $P < 0,001$). Não foi encontrada correlação entre estes indicadores antropométricos e o escore MELD.

Quanto às características da dieta da amostra estudada, cinco crianças estavam em aleitamento materno no momento da coleta e 67% da amostra relatou consumo de leite de vaca ou leite em pó na dieta. A utilização de fórmula com proteína extensamente hidrolisada, de forma exclusiva ou combinada a leite materno ou fórmula infantil, atingiu 16,3%. O uso de

nutrição enteral ocorreu em 4,7% da amostra. O consumo de algum tipo de complemento alimentar, módulo de carboidrato ou TCM foi praticado por 32,6% dos participantes, para aumento do aporte calórico da dieta.

A ingestão calórica média (\pm DP) apresentada, de acordo com os registros alimentares de três dias analisados, foi de 1331 (\pm 455,2) kcal/dia. A distribuição média de macronutrientes no valor energético total (VET) foi igual a 58,2% no grupo dos carboidratos, 13,1% de proteínas e 28,7% de lipídios. A ingestão calórica, proteica, de micronutrientes e fibras por faixa etária, estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Ingestão calórica, proteica, de micronutrientes e fibra por faixa etária.

Variáveis	0 – 2 anos (n = 12)	2 – 5 anos (n = 9)	5 – 10 anos (n = 11)	10 – 17 anos (n = 10)
Kcal/dia	991,5 (\pm 376,5)	1369 (\pm 478,2)	1395,5 (\pm 223)	1634,4 (\pm 499,7)
Kcal/kg/dia	96,3 (91-173,5)	79,1 (72,3-105,6)	56,4 (44,5-59,9)	43,6 (19,8-52,8)
Prot/kg/dia	2,9 (2,1-3,9)	2,5 (1,9-3,6)	1,8 (1,7-2,5)	1,3 (0,8-1,6)
Cálcio (mg)	628 (\pm 337,6)	810,3 (\pm 321,6)	701,7 (\pm 326,4)	548,1 (\pm 185,8)
Ferro (mg)	9,1 (5,3-12,7)	8 (3,8-12,3)	9,1 (3,9-12,6)	6,7 (4,8-7,6)
Zinco (mg)	4,8 (2,9-6,9)	2,8 (1,8-5,8)	3,6 (2,0-6,9)	3,9 (2,9-4,8)
Sódio (mg)	695,5(\pm 725,9)	1266 (\pm 166,6)	1677,6 (\pm 353,9)	2031 (\pm 675,2)
Potássio (mg)	766,2 (620-1492)	1050 (798-1357)	1100 (884-1684)	1265 (824-2522)
Fibra (g)	4 (\pm 3,7)	7,6 (\pm 1,8)	7,7 (\pm 3,4)	10 (\pm 4,8)

Os dados foram expressos como média (\pm DP) ou mediana (P25 - P75) quando indicado.

Kcal: quilocalorias; **Prot:** proteína.

A mediana (P25-P75) da adequação energética, em relação à ingestão dietética de referência (IDR) calculada a partir da necessidade energética estimada (em inglês, *estimated energy requirement* – EER), foi de 108,6% (89-128) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2002/2005). O consumo de zinco e de cálcio apresentou-se abaixo da necessidade média estimada (em inglês, *estimated average requirement* – EAR) a partir dos quatro anos em diante, tanto nas meninas quanto nos meninos (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001; 2011). A

ingestão de ferro mostrou-se inferior a EAR na faixa etária dos 14 aos 17 anos (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

A mediana (P25-P75) encontrada na amostra estudada para a IL-1 beta foi de 0,07 (0-0,30) pg/mL, para IL-6 este valor foi de 2,2 (0,58-6,8) pg/mL, para TNF-alfa igual a 8,3 (4,6-11,9) pg/mL e 4 (4-9,5) mg/dL para PCR. Não houve associação entre citocinas e sexo na amostra. Tanto a distribuição de IL-6 quanto de TNF-alfa se mostraram diferentes entre as faixas etárias ($P = 0,004$; $P = 0,003$, respectivamente), conforme descrito nas Figuras 6 e 7.

Figura 6 - Distribuição dos valores de interleucina-6 em relação à idade na amostra.

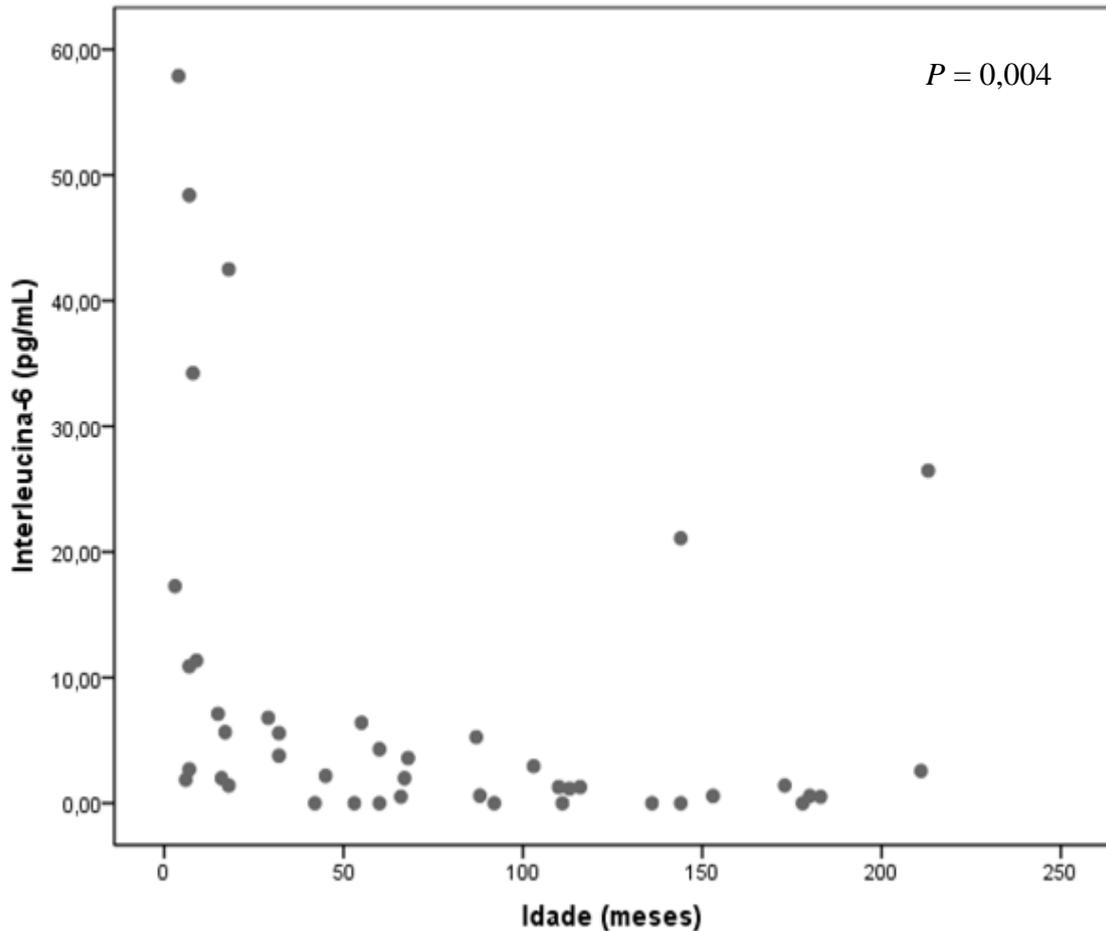
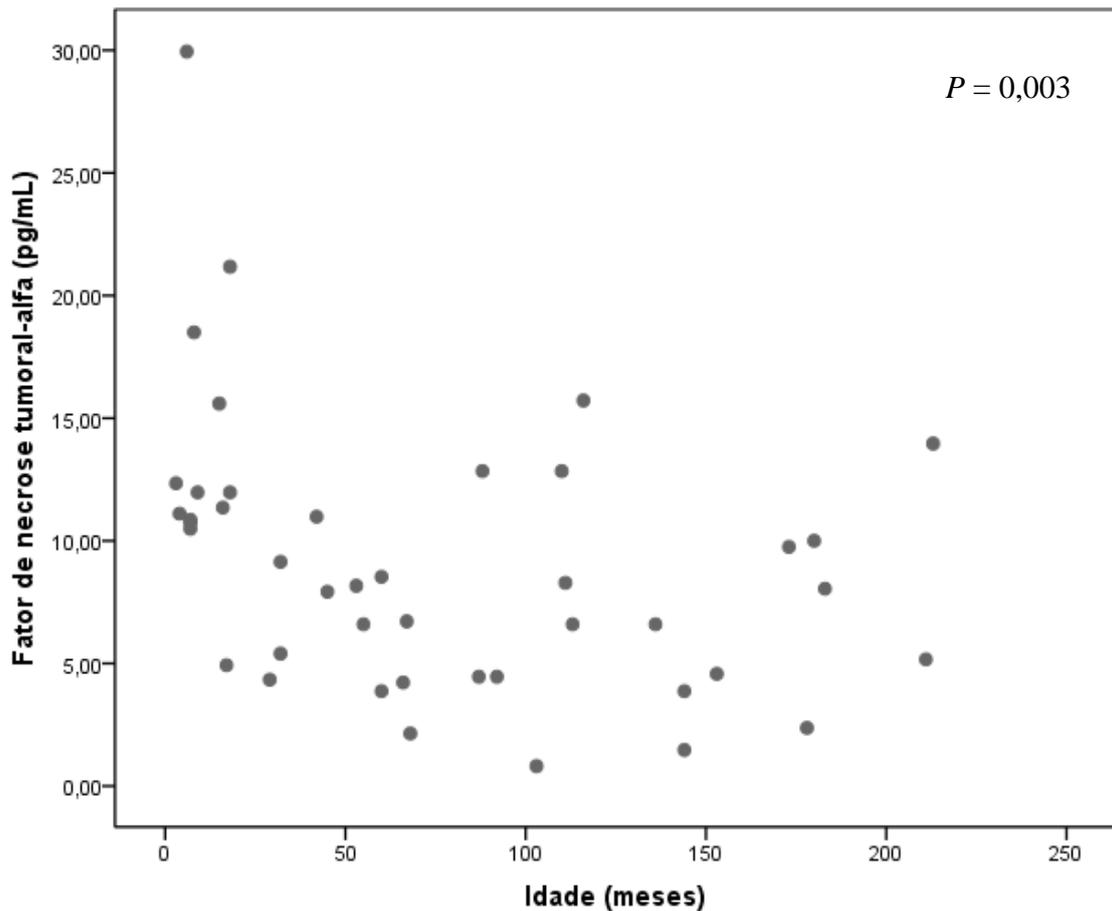


Figura 7 - Distribuição dos valores de fator de necrose tumoral-alfa em relação à idade na amostra.



A IL-6 apresentou valores significativamente aumentados nas crianças e adolescentes em risco nutricional ($P = 0,02$), diferentemente das demais citocinas estudadas, como está demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Perfil inflamatório da amostra estudada conforme o estado nutricional.

Citocinas	Grupo com risco nutricional (n = 15)	Grupo sem risco nutricional (n = 28)	P †
Interleucina-1 beta (pg/mL)	0,10 (0-0,66)	0,05 (0-0,28)	0,144
Interleucina-6 (pg/mL)	7,12 (0,58-34,23)	1,63 (0,53-3,43)	0,02
TNF-alfa (pg/mL)	10,74 (8,17-12,35)	6,66 (4,28-11,26)	0,88

TNF-alfa: fator de necrose tumoral-alfa.

Os dados foram expressos como mediana (P25 - P75).

† Teste U Mann-Whitney.

Houve correlação inversa entre a IL-6 e o escore-z para DCT/I ($r_s = -0,61$; $P < 0,001$), assim como entre a IL-6 e CB/I ($r_s = -0,51$; $P = 0,001$), E/I ($r_s = -0,34$; $P = 0,023$) e P/I ($r_s = -0,43$; $P = 0,011$). Os valores para AMB igualmente demonstraram correlação inversa com a IL-6 ($r_s = -0,59$; $P < 0,001$). A IL-1 beta correlacionou-se inversamente somente com a DCT/I ($r_s = -0,41$; $P = 0,006$). Não houve correlação entre os valores séricos de TNF-alfa e DCT/I, apenas com valores para CB/I ($r_s = -0,33$; $P = 0,027$).

Quanto às relações observadas entre as citocinas e os exames laboratoriais, houve forte correlação positiva entre os níveis séricos de IL-6 e de PCR ($r_s = 0,76$; $P < 0,001$). Entre a IL-6 e BT, BD, FA, AST, ALT as correlações foram as seguintes: [$r_s = 0,67$; $P < 0,001$]; ($r_s = 0,72$; $P < 0,001$); ($r_s = 0,56$; $P < 0,001$); ($r_s = 0,70$; $P < 0,001$); ($r_s = 0,49$; $P = 0,001$)]. Com a albumina esta citocina correlacionou-se de forma inversa ($r_s = -0,80$; $P < 0,001$).

A IL-1 beta mostrou correlação positiva apenas com exames relacionados à presença de colestase como BT, BD e FA [$r_s = 0,37$; $P = 0,013$]; ($r_s = 0,35$; $P = 0,020$); ($r_s = 0,32$; $P = 0,033$)]. O TNF-alfa não demonstrou correlação com nenhum dos exames acima citados nesta amostra. A GGT não se correlacionou com nenhuma das citocinas em estudo. Foi observada correlação também entre a IL-6 e o escore PELD ($r_s = 0,79$; $P < 0,001$) e entre TNF-alfa e o escore MELD ($r_s = 0,76$; $P = 0,017$).

Ao analisar as possíveis relações das citocinas estudadas com a gravidade da doença hepática, foi detectada associação entre o escore PELD e os níveis séricos de IL-6 e de TNF-alfa ($P = 0,014$; $P = 0,026$, respectivamente), estes dados estão demonstrados nas Figuras 8 e 9. O escore MELD não demonstrou associação com nenhuma das citocinas.

A IL-6 demonstrou associação significativa com a gravidade da doença hepática, avaliada a partir da classificação de Child-Pugh ($P = 0,001$). A distribuição da IL-6 entre as categorias A, B e C de Child-Pugh (Figura 10). O TNF-alfa apresentou uma associação

limítrofe com a classificação de Child-Pugh ($P = 0,050$). Não houve diferença na distribuição de IL-1 beta em relação à gravidade da hepatopatia ($P = 0,122$).

Figura 8 - Distribuição de valores de interleucina-6 conforme o escore *Pediatric End Stage Liver Disease*.

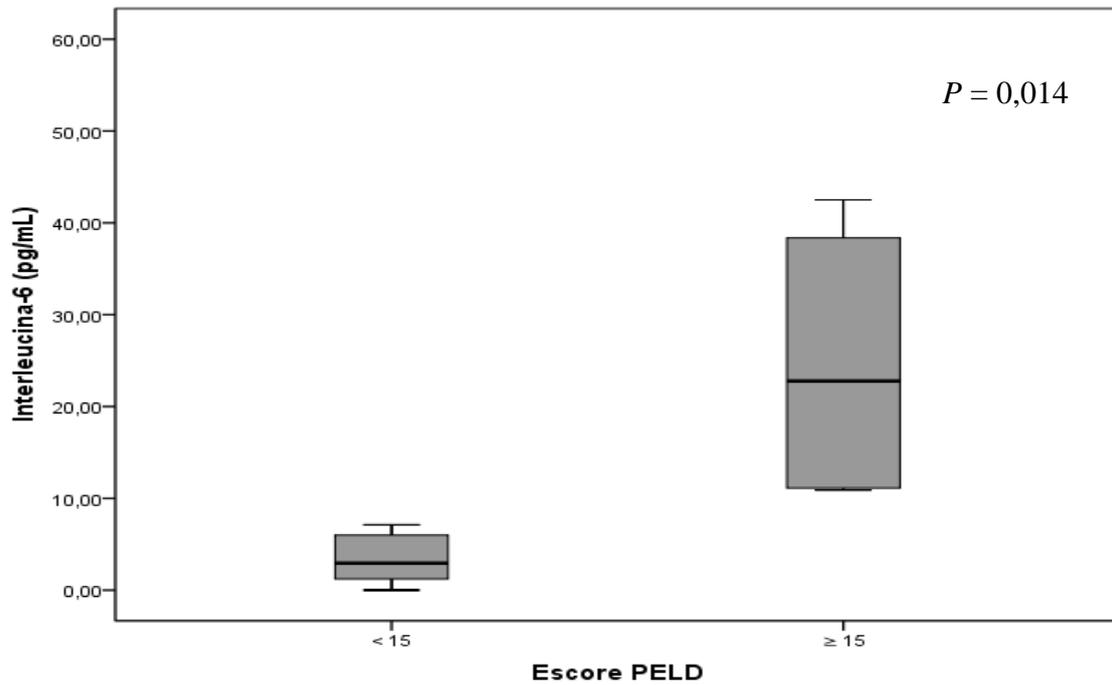


Figura 9 - Distribuição de valores de fator de necrose tumoral-alfa conforme o escore *Pediatric End Stage Liver Disease*.

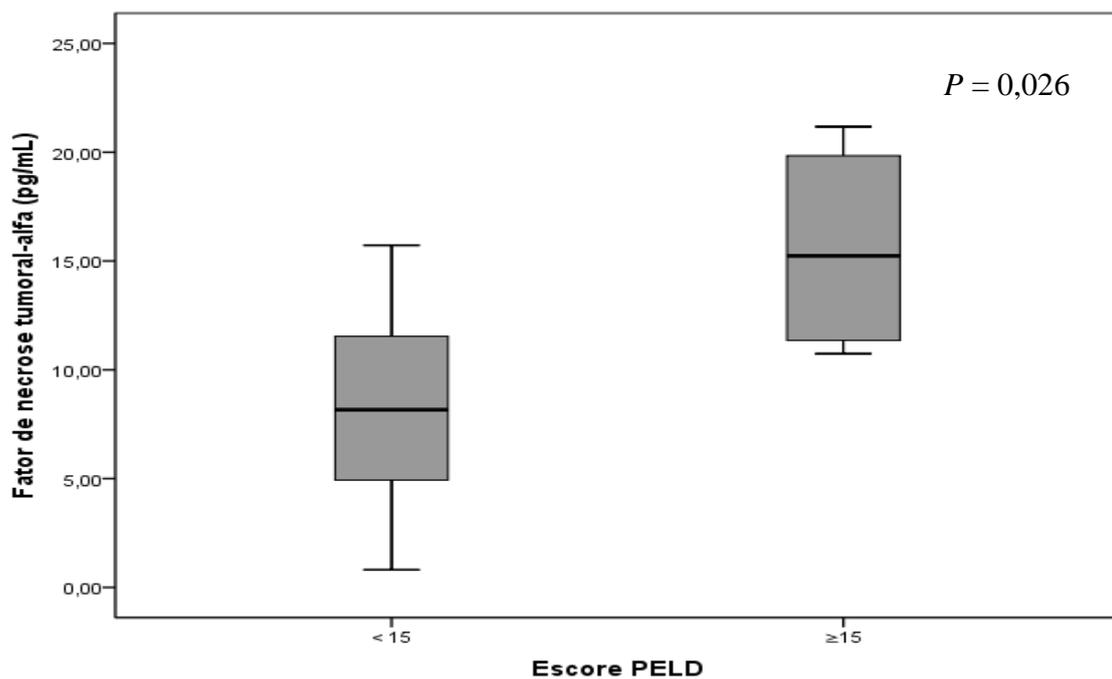
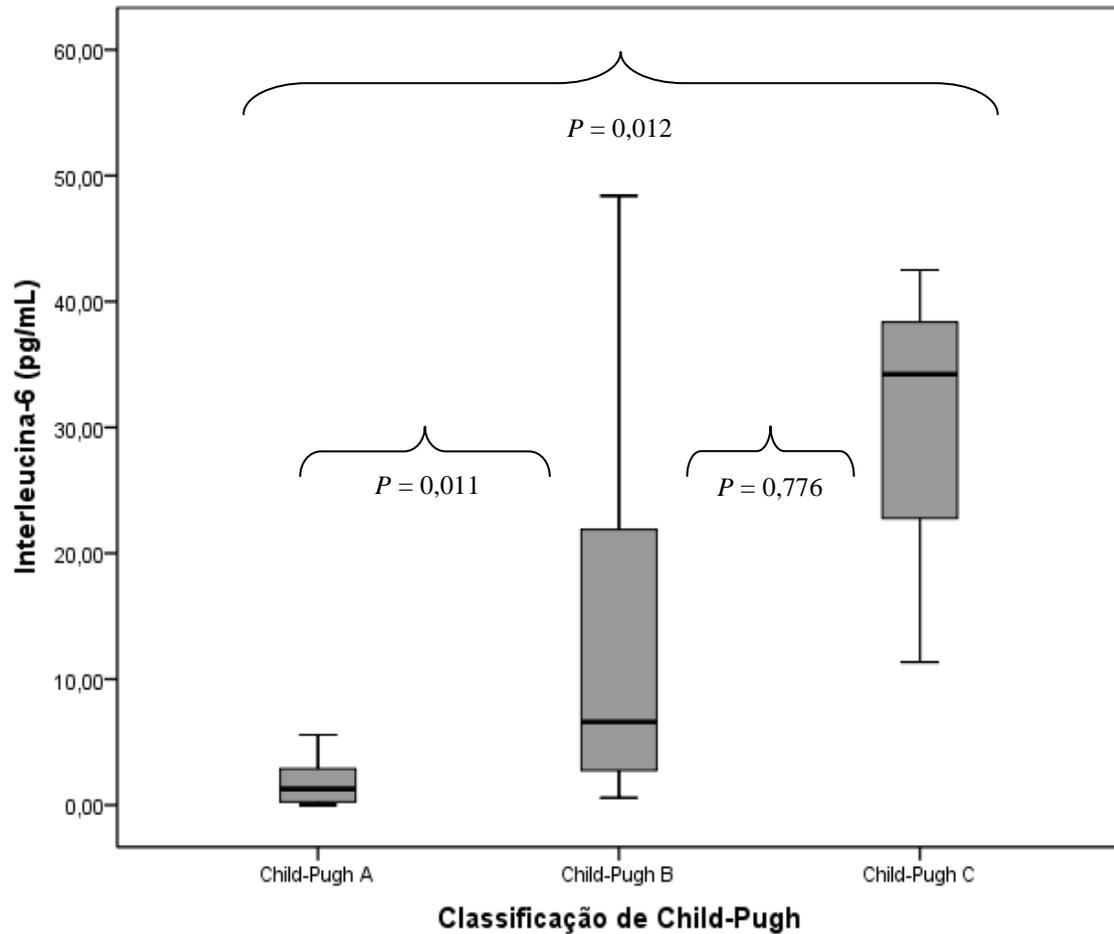


Figura 10 - Distribuição de valores de interleucina-6 entre as categorias de Child-Pugh.

No modelo multivariado, a IL-6 permaneceu associada à gravidade da doença, avaliada através da classificação de Child-Pugh, após ajuste para a presença de risco nutricional, como é demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Regressão linear múltipla para interleucina-6* (modelo 1).

Variáveis**	Beta	P
Risco nutricional	0,080	0,553
Child-Pugh	0,581	<0,001

* Ajustada para risco nutricional e gravidade da hepatopatia. $R^2 = 37,8\%$.

**Foi aplicada transformação logarítmica.

Ao controlar a dada citocina pelos escores PELD/MELD, o efeito da gravidade da hepatopatia igualmente permaneceu significativo, conforme exposto na Tabela 7.

Tabela 7 - Regressão linear múltipla para interleucina-6* (modelo 2).

Variáveis**	Beta	P
Risco nutricional	0,035	0,818
PELD/MELD	0,535	0,001

PELD: *Pediatric End Stage Liver Disease*; **MELD:** *Model for End Stage Liver Disease*.

* Ajustada para risco nutricional e gravidade da hepatopatia. $R^2 = 30,6\%$.

**Foi aplicada transformação logarítmica.

7 DISCUSSÃO

A AB é a causa mais comum de colestase neonatal, com possibilidade de progressão para cirrose (SOKOL *et al.*, 2007). Este foi o principal diagnóstico encontrado na amostra, correspondendo a 72% dos casos, com apresentação predominante no sexo feminino (22/31), concordando com dados da literatura nacional e internacional (LIVESEY *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2010). No que se refere à evolução clínica da AB, um recente estudo francês relatou aumento da expectativa de vida de crianças com AB e até 30% de chance de que estas possam atingir a idade adulta sem a necessidade de Tx (CHARDOT *et al.*, 2013).

Em relação à gravidade da cirrose, 57,1% das crianças e adolescentes foram classificados como Child-Pugh A indicando, portanto, compensação da doença em grande parte da amostra constituída por pacientes advindos do ambulatório de Hepatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os escores PELD e MELD também apresentaram uma baixa frequência (n=5) de casos graves (valores superiores a 15).

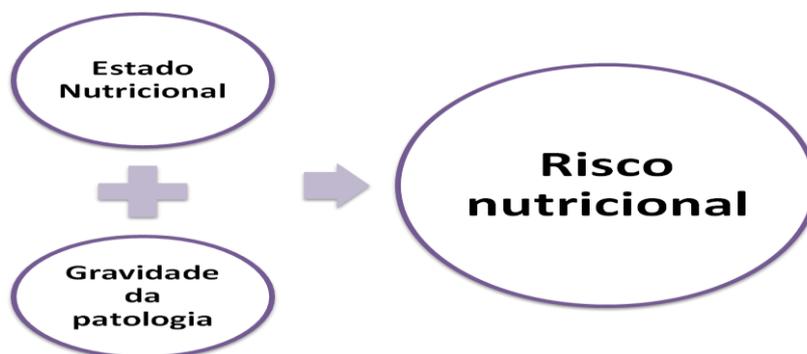
A população pediátrica acometida por hepatopatias crônicas deve ter seu crescimento constantemente monitorado e o risco nutricional prontamente identificado. Déficit de crescimento parece estar associado com aumento da morbimortalidade (DERUSSO *et al.*, 2007); podendo este ser revertido através de suplementação alimentar e uso de nutrição enteral, principalmente em crianças com AB (CHIN *et al.*, 1992a; HOLT *et al.*, 2000; SHNEIDER; MAZARIEGOS, 2007). No presente estudo identificou-se um total de 23,3% de baixa estatura para a idade, a partir do parâmetro E/I, concordando com achados previamente divulgados (HURTADO-LOPEZ *et al.*; DORNELLES *et al.*, 2013). A presença de déficit estatural pré-transplante parece estar associada a um maior tempo de internação e elevação dos custos da hospitalização no momento do Tx (BARSHES *et al.*, 2006). Mattar *et al.* (2005) indicaram maior frequência de déficit nutricional em crianças e adolescentes colestatícos,

quando comparado aqueles não colestáticos, principalmente ao avaliar o parâmetro antropométrico E/I. Na amostra atual, a colestase foi identificada em 27,9% (n=12) dos casos, sendo que quatro destes (33,3%) encontravam-se abaixo do escore-z de -2,00 para E/I.

Quanto aos métodos de avaliação nutricional disponíveis para a população pediátrica, as dobras cutâneas, dependentes de treinamento prévio do avaliador, constituem-se como a melhor opção na avaliação dos hepatopatas crônicos, uma vez que não são influenciadas pela retenção hídrica, exceto no edema generalizado. Schneider *et al.* (2007), em estudo com crianças e adolescentes cirróticos em nosso meio, apontaram a DCT como o indicador que melhor refletiu a presença de risco nutricional. No presente estudo, foi encontrada forte correlação inversa entre a avaliação da gravidade da doença hepática, estimada por dosagens de bilirrubina e suas frações, e estado nutricional comprometido, mensurado através de indicadores antropométricos, como a DCT e CB. Já entre estes indicadores e as aminotransferases (ALT e AST) foram identificadas correlações fracas a regulares. Estes achados são semelhantes àqueles descritos por Hurtado-Lopez *et al.* (2007), atestando a relação entre o grau de comprometimento hepático e estado nutricional.

Conforme descrito por Johansen *et al.* (2004), risco nutricional pode ser entendido como a avaliação do binômio “estado nutricional + gravidade da doença”. Este conceito pode ser aplicado também para a amostra estudada, como é ilustrado na Figura 11

Figura 11 - Conceito de risco nutricional.



Fonte: Adaptado de Dias *et al.*(2009, p. 304).

A desnutrição foi identificada em 11,6% da amostra estudada, através da avaliação da DCT/I e do IMC/I, o que reflete importante melhora no estado nutricional de pacientes acompanhados no ambulatório da instituição, em comparação a achados prévios divulgados por Dornelles *et al.* (2013), de 26,3% de desnutrição, referente ao período de 2006 a 2009. Achados como estes reforçam a importância da intervenção precoce na nutrição destes pacientes, aliado ao trabalho interdisciplinar entre as áreas de medicina e nutrição. No entanto, a frequência de desnutrição descrita por outros centros de referência em doença hepática pediátrica brasileiros ainda é bastante elevada. Zamberlan *et al.* (2012) relataram 51% de desnutrição, utilizando também a DCT/I como parâmetro antropométrico, em pacientes pediátricos avaliados 24 horas após a realização de Tx hepático, em hospital universitário de São Paulo. E, Neto *et al.* (2012), ao analisar pacientes menores de 18 anos transplantados entre 1995 e 2011, descreveram cerca de 40% de pacientes classificados como desnutridos severos. Ao comparar com dados advindos de fora do Brasil, um estudo mexicano, com 79 crianças e adolescentes hepatopatas, descreveu uma frequência de 21,5% de desnutrição (HURTADO-LOPEZ *et al.*, 2007).

Entre os adultos com cirrose, a prevalência de desnutrição também é alta, variando de 10% a até 100%, conforme o método de avaliação nutricional adotado. Ferreira *et al.* (2009) relataram prevalência de 74,7% de desnutrição, através da utilização da ferramenta de avaliação subjetiva global, em amostra composta por adultos cirróticos candidatos a Tx hepático, em Minas Gerais. Dados similares foram encontrados por Huisman *et al.* (2011), em estudo holandês com cirróticos em idade adulta, cujos resultados sugerem que a desnutrição pode ser entendida como uma preditora independente de complicações na cirrose.

A avaliação correta do consumo alimentar de crianças e adolescentes é um importante fator na determinação da adequação da dieta consumida. Contudo, inúmeros estudos indicam o quanto esta tarefa pode ser difícil para o profissional nutricionista, particularmente nestes

grupos etários, devido à incapacidade da criança informar com precisão sua ingestão ao longo de um dia antes dos 8-10 anos e por depender da motivação dos pais e cuidadores em efetuar a dada tarefa, principalmente no que se refere à porcionamento (LIVINGSTONE *et al.*, 2004). O registro alimentar consiste na descrição detalhada de tipos e quantidades de alimentos e líquidos consumidos diariamente, discriminados por horário e/ou refeição. Esta ferramenta propõe-se a obter uma estimativa do consumo usual de alimentos. Para que se constitua como uma boa ferramenta é necessária a colaboração dos participantes do estudo e que estes sejam dotados de certo grau de escolaridade para a realização das anotações necessárias (KAC *et al.*, 2007). Valendo-se disto, este foi o método escolhido para avaliação do consumo alimentar neste estudo, visando à eliminação do viés de memória.

Na avaliação do registro alimentar de três dias, a ingestão calórica média (\pm DP) encontrada foi de 1331 (\pm 455,2) kcal/dia. A mediana de adequação calórica diária nesta população se apresentou abaixo da recomendação específica para hepatopatas em idade pediátrica, cuja indicação de consumo é superior a 120% da IDR (ALONSO, 2008; LEONIS; BALISTRERI, 2008; YOUNG *et al.*, 2013). Dados comparativos referentes à ingestão alimentar de crianças e adolescentes hepatopatas são limitados na literatura. No estudo clássico de Chin *et al.* (1992b), observou-se consumo energético de apenas 70% da recomendação para a idade. Dornelles *et al.* (2012) descreveram adequação calórica média (\pm DP) de 112% (\pm 36), em relação a IDR para idade, de cirróticos em idade pediátrica. O consumo proteico médio até os cinco anos apresentou-se dentro dos níveis recomendados para hepatopatas. A dieta dos adolescentes que compuseram a presente amostra demonstrou perfil hiperproteico, variando de 1,3 a 1,8 g/kg de peso de proteína ingerida por dia. A ingestão média de fibras alimentares esteve abaixo do recomendado a partir dos três anos (WILLIAMS *et al.*, 1995).

Em relação à distribuição de micronutrientes por faixa etária, o baixo consumo de zinco merece atenção e deve ser revertido a partir da estimulação de ingestão de alimentos-

fonte e suplementação (1 mg/kg/dia) (NIGHTIGALE; NG, 2009). Este elemento tem estreita relação com a palatabilidade dos alimentos e crescimento (CHASAPIS *et al*, 2012). Estudos indicam que até 40% dos hepatopatas pediátricos possam ser deficientes em zinco por má absorção e perdas urinárias (STAMOULIS *et al.*, 2007). Baixas concentrações plasmáticas de zinco parecem estar associadas com a gravidade da doença hepática (SCHNEIDER *et al.*, 2009). O cálcio também apresentou ingestão média inadequada a partir dos quatro anos na amostra. Os níveis séricos deste micronutriente podem estar alterados pela má absorção de vitamina D em pacientes colestáticos (NIGHTIGALE; NG, 2009).

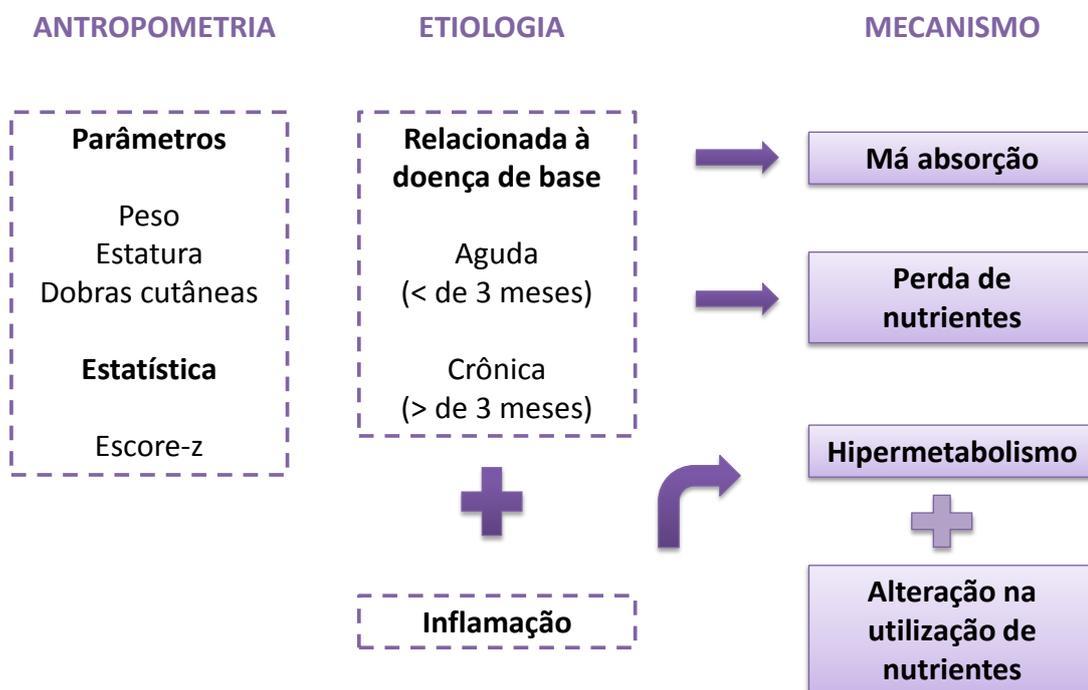
Segundo Bauman (2012), a TN é uma opção chave no tratamento da AB. A intervenção precoce, aliada ao suporte nutricional agressivo, podem minimizar efeitos neurocognitivos deletérios e demais dificuldades atreladas ao desenvolvimento de crianças com AB (CAUDLE *et al*, 2010). Sugere-se que a TN se faça presente desde o diagnóstico de AB até o Tx (SOKOL *et al.*, 2007). O uso de nutrição enteral é estimulado por uma série de pesquisadores (LEONIS; BALISTRERI, 2008; SULTAN *et al.*, 2011; YOUNG *et al.*, 2013). Na amostra, dois pacientes utilizavam sonda nasoenteral para alimentação. Outros dois lactentes teriam indicação de uso, no entanto foi relatado pelos pais e/ou cuidadores a perda acidental do acesso, em data prévia à coleta de dados. Holt *et al.* (2000) comprovaram o efeito positivo da NE, ao longo de 3,7 meses, sobre a composição corporal de 33 crianças com AB. A suplementação da dieta com módulos de carboidrato (maltodextrina), TCM, cereais e complementos alimentares foi praticada por 32,6% dos pacientes. Conduas como esta são adotadas para aumentar o aporte calórico da dieta, com objetivo de manutenção e/ou recuperação do estado nutricional (SMART *et al*, 2011).

Paralelamente, em recente revisão da Cochrane sobre TN nas doenças hepáticas, foi demonstrado que não existem evidências que embasem o uso de NE, NPT e suplementação oral nestes pacientes (KORETZ *et al*, 2012). Isto se deve a falta de ensaios clínicos

randomizados corretamente delineados que avaliem a ingestão alimentar e a resposta a intervenção nutricional em hepatopatas, seja em idade pediátrica ou em adultos

No que tange o entendimento da atividade inflamatória como componente ativo da piora nutricional apresentada por pacientes com doenças crônicas, ainda há muito a ser investigado. Segundo Meijers *et al* (2010), a fisiopatologia da desnutrição consiste na influência combinada de subnutrição e atividade inflamatória na composição corporal. A definição de desnutrição, divulgado recentemente pela ASPEN, engloba esta racionalização frente à avaliação nutricional em pediatria, descrita na Figura 12 (MEHTA *et al.*, 2013). No presente estudo, está foi a abordagem teórica adotada para a avaliação do perfil nutricional de crianças e adolescentes com hepatopatia crônica.

Figura 12 - Racionalização da desnutrição relacionada à doença de base.



Fonte: Adaptado de Mehta *et al.* (2013, p. 461).

O método para avaliar a atividade inflamatória ainda é bastante debatido. Em adultos, os níveis séricos de IL-6 e PCR estão contemplados entre os critérios diagnósticos para

caquexia com os seguintes pontos de corte: IL-6 > 4 pg/mL e PCR > 5 mg/L (EVANS *et al.*, 2008). Neste estudo, as citocinas (IL-1, IL-6 e TNF-alfa) foram os mediadores inflamatórios escolhidos para tal função. Estes polipeptídeos cumprem importante papel na regulação do músculo, quando em vigência de inflamação, tais como a promoção de catabolismo, inibição da síntese proteica e de reparo muscular (ABBAS *et al.*, 2011).

É sugerido que concentrações séricas de IL-6 poderiam ter a capacidade de identificar pacientes em risco nutricional (MEHTA; DUGGAN, 2009). No presente estudo, os achados concordaram com a literatura atual, uma vez que a IL-6 demonstrou estar significativamente aumentada no grupo de crianças e adolescentes com hepatopatia crônica em risco nutricional ($P = 0,02$). Isto se deve, possivelmente, ao aumento da permeabilidade intestinal identificada em pacientes cirróticos desnutridos quando comparado àqueles eutróficos, promovendo endotoxemia sistêmica e conseqüente aumento de citocinas circulantes, disfunção imune e elevação no risco de infecções (WIEST; GARCIA-TSAO, 2005; PIRLICH *et al.*, 2006; NORMAN; PIRLICH, 2008).

Além disto, é também postulado que a presença de atividade inflamatória induza a perda periférica de massa magra (SOETERS *et al.*, 2009). Os valores encontrados de AMB em nosso estudo correlacionaram-se inversamente com a IL-6. Tal achado concorda com a possível ligação entre a perda de massa magra e a presença de atividade inflamatória vigente. Foi encontrada também correlação inversa de grau forte entre a IL-6 e o escore-z para a DCT/I, um dos principais parâmetros de composição corporal utilizados na avaliação nutricional de hepatopatas crônicos. Em contrapartida, estas associações e correlações não foram comprovadas entre as demais citocinas estudadas (IL-1 beta e TNF-alfa) e os desfechos relacionados ao perfil nutricional da amostra.

Quanto aos exames laboratoriais comumente utilizados na prática clínica, é sabido que a albumina demonstra baixa sensibilidade e especificidade como marcador do estado

nutricional, principalmente em hepatopatas. No entanto, supõe-se que esta proteína possa sinalizar a presença de inflamação (JENSEN, 2006). De acordo com esta suposição teórica, foi encontrada forte correlação inversa entre os valores de IL-6 e a albumina sérica na amostra. E, ao analisar as correlações demonstradas entre os exames que avaliam a presença de lesão hepática (ALT e AST) e colestase (BD, BT, FA e GGT) com os níveis séricos da IL-6, estas se deram de forma positiva, ou seja, a atividade inflamatória supostamente atuaria paralelamente à deterioração da função hepática.

A IL-6 estimula também a liberação de PCR pelo fígado na fase aguda da inflamação, podendo esta ser considerada um indicador de atividade inflamatória. Jensen (2006) sugere que a PCR deve ser incluída na rotina da avaliação nutricional, especialmente para o acompanhamento daqueles pacientes com baixos níveis de proteínas viscerais. A PCR poderia ser uma ferramenta capaz de prever mortalidade em pacientes cirróticos graves hospitalizados (CERVONI *et al.*, 2012). É proposto, ainda, que a PCR refletiria a síntese de IL-6 (JENSEN, 2006). No atual estudo, foi comprovada a correlação positiva existente entre esta citocina e a PCR.

A AB parece cursar com um processo inflamatório progressivo com envolvimento de células Th-1, levando à destruição da via biliar e à fibrose (MACK *et al.*, 2012). Em estudo, El-Faramawy *et al.* (2011) compararam grupos de crianças com AB (n=20) e com doenças colestáticas intra-hepáticas (n=20); encontrando valores de IL-6 mais elevados naqueles com AB, evidenciando a presença de inflamação crônica. Os autores concluíram que a IL-6 poderia auxiliar na determinação da gravidade da doença. Já Kobayashi *et al.* (2002) propuseram considerar a inclusão da dosagem de IL-6 na rotina do acompanhamento laboratorial. Destaca-se que não houve menção ao estado nutricional dos sujeitos nos estudos acima citados. Em nossa amostra, os valores desta citocina demonstram associação significativa com a gravidade da hepatopatia, através da classificação de Child-Pugh, e dos

escores PELD e MELD. Este efeito da IL-6 sob a gravidade da patologia permaneceu mesmo após o controle de variáveis, feito através do método de regressão linear múltipla ($P < 0,001$).

Wiest *et al.* (2011) relataram associação entre a presença de ascite e níveis sistêmicos aumentados de IL-6 em adultos cirróticos; no entanto, esta relação não pode ser verificada em nossa amostra devido ao pequeno número de pacientes com ascite ($n=3/43$) no momento de inclusão no estudo. Traçando um paralelo com outras patologias, em nefropatas adultos, a IL-6 foi capaz de prever desnutrição e mortalidade (HONDA *et al.*, 2006). Em estudo que acompanhou, por 24 meses, pacientes em hemodiálise, os valores de IL-6 acima de 6,6 pg/mL mostraram-se associados com mortalidade (BEBERASHVILI *et al.*, 2011). Já em pacientes pediátricos em diálise esta associação não foi comprovada (CANPOLAT *et al.*, 2013).

Algumas publicações destacam também a elevação do TNF-alfa na cirrose e associação com a gravidade da hepatopatia (TILG, 2001; ATASEVEN *et al.*, 2006). Shiraki *et al.* (2010) comprovaram, através de calorimetria indireta, a elevação da oxidação lipídica e diminuição do uso de glicose em cirróticos e a correlação significativa desta anormalidade metabólica com a gravidade da hepatopatia e com níveis circulantes de TNF-alfa. Esta citocina apresentou associação significativa limítrofe ($P = 0,050$) com a classificação de Child-Pugh na presente amostra. É possível especular que apenas 8,6% da população estudada se encontrava em estágios mais avançados da doença hepática (Child-Pugh C), podendo, portanto, sugerir que os níveis de TNF-alfa se elevariam com maior intensidade a medida que a função hepática se deteriora.

No que diz respeito à atuação das citocinas pró-inflamatórias, há uma grande diversidade de ações que estes polipeptídeos podem desempenhar, como, por exemplo, estimular a produção uma da outra (SCHUETT *et al.*, 2009). No presente estudo, esta ação pode ter ocorrido com a IL-1 beta, uma vez que seus níveis circulantes não demonstraram

associações significativas com os principais desfechos estudados, mas poderiam de alguma forma, estar estimulando a síntese e liberação de IL-6 e TNF-alfa na circulação.

Ao analisar os principais achados do presente estudo entende-se que a atividade inflamatória parece fazer parte da evolução da doença hepática crônica que acomete crianças e adolescentes, uma vez que o efeito da IL-6 sobre a gravidade da hepatopatia, mensurada através da classificação de Child-Pugh e dos escores PELD/MELD se manteve, mesmo após o controle de variáveis realizado. Quanto ao perfil nutricional da amostra estudada, os achados concordaram com a literatura, ao sugerirem a existência de uma relação entre o aumento de citocinas pró-inflamatórias e a piora do estado nutricional, descrito pelo aumento significativo da IL-6 naqueles pacientes em risco nutricional. O conhecimento deste panorama nutricional e inflamatório é de grande importância para o profissional nutricionista, viabilizando a criação de novas abordagens ao suporte nutricional nas hepatopatias crônicas que acometem crianças e adolescente. De acordo com Jensen (2006), possíveis intervenções dietéticas no estado inflamatório incluem o uso de nutrição enteral, fórmulas enriquecidas com ácido graxo ômega-3, antioxidantes e probióticos. No entanto, mais estudos de correto delineamento são necessários nesta área de atuação.

8 CONCLUSÕES

Os achados indicam que a atividade inflamatória se faz presente na evolução da doença hepática crônica, uma vez que a elevação dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF-alfa, correlacionou-se com os exames laboratoriais que avaliam a presença de lesão hepática e colestase em nossa amostra. Estes mediadores inflamatórios demonstraram também associações estatisticamente significativas com a gravidade da doença hepática, avaliada a partir dos escores PELD e MELD, e da classificação de Child-Pugh.

Do ponto de vista nutricional, parece existir associação entre o aumento de IL-6 sérica e a presença de risco nutricional, em crianças e adolescentes com hepatopatia crônica. Sugere-se a realização de estudos longitudinais, com enfoque no efeito da terapia nutricional via oral e/ou enteral sobre resposta inflamatória, em crianças e adolescentes com hepatopatia crônica, sobretudo na AB.

REFERÊNCIAS

1. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
2. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
3. Allen K, Jaeschke H, Copple BL. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am J Pathol*. 2011;178(1):175-86.
4. Alonso EM. Growth and developmental considerations in pediatric liver transplantation. *Liver Transpl*. 2008;14(5):585-91.
5. Anção M, Cuppari L, Tudisco E, Draibe S, Sigulem D. *Sistema de Apoio à Nutrição. NutWin [programa de computador]. Versão 2.5. São Paulo: Centro de Informática em Saúde Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina; 2002.*
6. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. *Bull World Health Organ*. 1977;55(4):521-40.
7. Arezzo di Trifiletti A, Misino P, Giannantoni P, Giannantoni B, Cascino A, Fazi L, et al. Comparison of the performance of four different tools in diagnosing disease-associated anorexia and their relationship with nutritional, functional and clinical outcome measures in hospitalized patients. *Clin Nutr*. 2013;32(4):527-32
8. Ataseven H, Bahcecioglu IH, Kuzu N, Yalniz M, Celebi S, Erensoy A, et al. The levels of ghrelin, leptin, TNF-alpha, and IL-6 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma due to HBV and HDV infection. *Mediators Inflamm*. 2006;2006(4):78380.
9. Axelrod D, Kazmerski K, Iyer K. Pediatric enteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2006;30(1 Suppl):S21-6.
10. Baker A, Stevenson R, Dhawan A, Goncalves I, Socha P, Sokal E. Guidelines for nutritional care for infants with cholestatic liver disease before liver transplantation. *Pediatr Transplant*. 2007;11(8):825-34.
11. Balistreri WF, Bezerra JA. Whatever happened to "neonatal hepatitis"? *Clin Liver Dis*. 2006;10(1):27-53.
12. Balistreri WF, Grand R, Hoofnagle JH, Suchy FJ, Ryckman FC, Perlmutter DH, et al. Biliary atresia: current concepts and research directions. Summary of a symposium. *Hepatology*. 1996;23(6):1682-92.
13. Barshes NR, Chang IF, Karpen SJ, Carter BA, Goss JA. Impact of pretransplant growth retardation in pediatric liver transplantation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006;43(1):89-94.
14. Baumann U, Ure B. Biliary atresia. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012;36(3):257-9.
15. Beberashvili I, Sinuani I, Azar A, Yasur H, Shapiro G, Feldman L, et al. IL-6 levels, nutritional status, and mortality in prevalent hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(9):2253-63.

16. Bessho K, Bezerra JA. Biliary atresia: will blocking inflammation tame the disease? *Annu Rev Med.* 2011;62:171-85.
17. Bezerra JA. The next challenge in pediatric cholestasis: deciphering the pathogenesis of biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;43 Suppl 1:S23-9.
18. Braegger C, Decsi T, Dias JA, Hartman C, Kolacek S, Koletzko B, et al. Practical approach to paediatric enteral nutrition: a comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;51(1):110-22.
19. Brandão M. Hiperbilirrubinemia indireta na infância. In: Tommaso A, Porta G, editores. *Manual de Hepatologia Pediátrica.* 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 31.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº196/96. Diretrizes e Normas Regulamentadora de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Brasília: Ministério da Saúde; 1996.
21. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 63/00. Regulamento técnico para a terapia de nutrição enteral. Brasília: Ministério da Saúde; 2000
22. Buchman A, Korenblatt K, Klein S. Nutrition and the liver. In: Schiff E, Sorrell M, Maddrey W, eds. *Schiff's Disease of the liver.* 10ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 366-92.
23. Burrows TL, Martin RJ, Collins CE. A systematic review of the validity of dietary assessment methods in children when compared with the method of doubly labeled water. *J Am Diet Assoc.* 2010;110(10):1501-10.
24. Cabré E, Gassull MA. Nutrition in chronic liver disease and liver transplantation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1998;1(5):423-30.
25. Campillo B, Richardet JP, Scherman E, Bories PN. Evaluation of nutritional practice in hospitalized cirrhotic patients: results of a prospective study. *Nutrition.* 2003;19(6):515-21.
26. Canpolat N, Caliskan S, Sever L, Tasdemir M, Ekmekci OB, Pehlivan G, et al. Malnutrition and its association with inflammation and vascular disease in children on maintenance dialysis. *Pediatr Nephrol.* 2013.
27. Carvalho E, Santos JL, Silveira TR, Kieling CO, Silva LR, Porta G, et al. Biliary atresia: the Brazilian experience. *J Pediatr (Rio J).* 2010;86(6):473-9.
28. Caudle SE, Katzenstein JM, Karpen SJ, McLin VA. Language and motor skills are impaired in infants with biliary atresia before transplantation. *J Pediatr.* 2010;156(6):936-40, 40.e1.
29. Cervoni JP, Thévenot T, Weil D, Muel E, Barbot O, Sheppard F, et al. C-reactive protein predicts short-term mortality in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 2012;56(6):1299-304.
30. Chardot C. Treatment for biliary atresia in 2003. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;37(4):407-8.
31. Chardot C, Buet C, Serinet MO, Golmard JL, Lachaux A, Roquelaure B, et al. Improving outcomes of biliary atresia: French national series 1986-2009. *J Hepatol.* 2013;58(6):1209-17.
32. Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol.* 2012;86(4):521-34.

33. Chen G, Zheng S, Sun S, Xiao X, Ma Y, Shen W, et al. Early surgical outcomes and pathological scoring values of older infants (≥ 90 d old) with biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 2012;47(12):2184-8.
34. Copple BL, Jaeschke H, Klaassen CD. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Cholestasis. *Semin Liver Dis* 2010;30:195–204
35. Chin SE, Shepherd RW, Thomas BJ, Cleghorn GJ, Patrick MK, Wilcox JA, et al. Nutritional support in children with end-stage liver disease: a randomized crossover trial of a branched-chain amino acid supplement. *Am J Clin Nutr.* 1992a;56(1):158-63.
36. Chin SE, Shepherd RW, Thomas BJ, Cleghorn GJ, Patrick MK, Wilcox JA, et al. The nature of malnutrition in children with end-stage liver disease awaiting orthotopic liver transplantation. *Am J Clin Nutr.* 1992b;56(1):164-8.
37. Cleghorn G. The role of basic nutritional research in pediatric liver disease: An historical perspective. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24 Suppl 3:S93-6.
38. Danesi V. Avaliação e Provas de Função Hepática. In: Tommaso A, Porta G, eds. *Manual de Hepatologia Pediátrica.* 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 18-29.
39. Davenport M. Biliary atresia: clinical aspects. *Semin Pediatr Surg.* 2012;21(3):175-84.
40. Davenport M, De Ville de Goyet J, Stringer MD, Mieli-Vergani G, Kelly DA, McClean P, et al. Seamless management of biliary atresia in England and Wales (1999-2002). *Lancet.* 2004;363(9418):1354-7.
41. DeRusso PA, Ye W, Shepherd R, Haber BA, Shneider BL, Whittington PF, et al. Growth failure and outcomes in infants with biliary atresia: a report from the Biliary Atresia Research Consortium. *Hepatology.* 2007;46(5):1632-8.
42. Dias M, Silva M, Raslan M. Rastreamento Nutricional. In: Waitzberg D, editor. *Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica.* 1. 4a ed. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 303-4.
43. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol.* 2007;37 Suppl 1:S34-45.
44. Dornelles CT, Goldani HA, Wilasco MI, Maurer RL, Kieling CO, Porowski M, et al. Ghrelin, leptin and insulin in cirrhotic children and adolescents: relationship with cirrhosis severity and nutritional status. *Regul Pept.* 2013;180:26-32.
45. Dornelles CT, Wilasco M, Hammes T, Vieira S, Goldani H, Silveira T. terapia nutricional em crianças e adolescentes com cirrose: uma visão atual. *Rev HCPA.* 2010;30(2):140-52.
46. Dornelles CT, Santetti D, Wilasco M, Kieling C, Goldani H, Silveira T. Risco nutricional e desnutrição em crianças e adolescentes com cirrose: o papel da avaliação nutricional *Rev AMRIGS.* 2012;56(1):51-6
47. El-Faramawy AA, El-Shazly LB, Abbass AA, Ismail HA. Serum IL-6 and IL-8 in infants with biliary atresia in comparison to intrahepatic cholestasis. *Trop Gastroenterol.* 2011;32(1):50-5.
48. Escanhoela C. O fígado normal. In: Tommaso A, Porta G, editors. *Manual de Hepatologia Pediátrica.* São Paulo: Atheneu; 2009. p. 1-2.
49. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr.* 2008;27(6):793-9.

50. Fainboim L, Cherñavsky A, Paladino N, Flores AC, Arruvito L. Cytokines and chronic liver disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18(1-2):143-57.
51. Fearon KC, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metab.* 2012;16(2):153-66.
52. Ferreira LG, Anastácio LR, Lima AS, Correia MI. [Malnutrition and inadequate food intake of patients in the waiting list for liver transplant]. *Rev Assoc Med Bras.* 2009;55(4):389-93.
53. Freeman RB, Wiesner RH, Edwards E, Harper A, Merion R, Wolfe R, et al. Results of the first year of the new liver allocation plan. *Liver Transpl.* 2004;10(1):7-15.
54. Frisancho A. *Anthropometric Standards: An Interactive Nutritional Reference of Body Size and Body Composition for Children and Adults.* 2^a ed. Ann Arbor: University of Michigan Press; 2008.
55. Gordon CM, Baim S, Bianchi ML, Bishop NJ, Hans DB, Kalkwarf H, et al. Special report on the 2007 Pediatric Position Development Conference of the International Society for Clinical Densitometry. *South Med J.* 2008;101(7):740-3.
56. Greer R, Lehnert M, Lewindon P, Cleghorn GJ, Shepherd RW. Body composition and components of energy expenditure in children with end-stage liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;36(3):358-63.
57. Harb R, Thomas DW. Conjugated hyperbilirubinemia: screening and treatment in older infants and children. *Pediatr Rev.* 2007;28(3):83-91.
58. Hardy S, Kleinman R. *Cirrhosis and Chronic Liver Failure.* In: Suchy F, Sokol R, Balistreri W, eds. *Liver Disease in Children.* 3^a ed: Cambridge University Press; 2007. p. 97-137.
59. Harpavat S, Finegold MJ, Karpen SJ. Patients with biliary atresia have elevated direct/conjugated bilirubin levels shortly after birth. *Pediatrics.* 2011;128(6):e1428-33.
60. Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia. *Lancet.* 2009;374(9702):1704-13.
61. Hartman C, Shamir R, Hecht C, Koletzko B. Malnutrition screening tools for hospitalized children. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;15(3):303-9.
62. Henkel AS, Buchman AL. Nutritional support in patients with chronic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006;3(4):202-9.
63. Holt RI, Miell JP, Jones JS, Mieli-Vergani G, Baker AJ. Nasogastric feeding enhances nutritional status in paediatric liver disease but does not alter circulating levels of IGF-I and IGF binding proteins. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000;52(2):217-24.
64. Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, Barany P, Wang K, Pecoits-Filho R, et al. Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis.* 2006;47(1):139-48.
65. Hsiao CH, Chang MH, Chen HL, Lee HC, Wu TC, Lin CC, et al. Universal screening for biliary atresia using an infant stool color card in Taiwan. *Hepatology.* 2008;47(4):1233-40.
66. Huisman EJ, Trip EJ, Siersema PD, van Hoek B, van Erpecum KJ. Protein energy malnutrition predicts complications in liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23(11):982-9.

67. Hulst J, Joosten K, Zimmermann L, Hop W, van Buuren S, Büller H, et al. Malnutrition in critically ill children: from admission to 6 months after discharge. *Clin Nutr.* 2004;23(2):223-32.
68. Hurtado-López EF, Larrosa-Haro A, Vásquez-Garibay EM, Macías-Rosales R, Troyo-Sanromán R, Bojórquez-Ramos MC. Liver function test results predict nutritional status evaluated by arm anthropometric indicators. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;45(4):451-7.
69. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). Washington, DC: The National Academies Press; 2002/2005.
70. Jensen GL. Inflammation as the key interface of the medical and nutrition universes: a provocative examination of the future of clinical nutrition and medicine. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2006;30(5):453-63.
71. Johansen N, Kondrup J, Plum LM, Bak L, Nørregaard P, Bunch E, et al. Effect of nutritional support on clinical outcome in patients at nutritional risk. *Clin Nutr.* 2004;23(4):539-50.
72. Kac G, Sichieri R, Gigante DP. *Epidemiologia Nutricional.* 1ª ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz/Atheneu; 2007.
73. Kalaitzakis E, Simrén M, Olsson R, Henfridsson P, Hugosson I, Bengtsson M, et al. Gastrointestinal symptoms in patients with liver cirrhosis: associations with nutritional status and health-related quality of life. *Scand J Gastroenterol.* 2006;41(12):1464-72.
74. Kamath BM, Olthoff KM. Liver transplantation in children: update 2010. *Pediatr Clin North Am.* 2010;57(2):401-14.
75. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology.* 2001;33(2):464-70.
76. Kasai M, Suzuki S. A new operation for 'non correctable' biliary atresia: portoenterostomy. *Shijitsu* 1959;13:457-81.
77. Kawaguchi T, Izumi N, Charlton MR, Sata M. Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease. *Hepatology.* 2011;54(3):1063-70.
78. Kelly DA, Davenport M. Current management of biliary atresia. *Arch Dis Child.* 2007;92(12):1132-5.
79. Kieling CO, Santos JL, Vieira SM, Ferreira CT, Linhares AR, Lorentz AL, et al. Biliary atresia: we still operate too late. *J Pediatr (Rio J).* 2008;84(5):436-41.
80. Kim WR, Brown RS, Terrault NA, El-Serag H. Burden of liver disease in the United States: summary of a workshop. *Hepatology.* 2002;36(1):227-42.
81. Kirby M, Danner E. Nutritional deficiencies in children on restricted diets. *Pediatr Clin North Am.* 2009;56(5):1085-103.
82. Kobayashi H, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T. Levels of circulating antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist and proinflammatory cytokines at different stages of biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 2002;37(7):1038-41.

83. Kolodziejczyk JK, Merchant G, Norman GJ. Reliability and validity of child/adolescent food frequency questionnaires that assess foods and/or food groups. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;55(1):4-13.
84. Koretz RL, Avenell A, Lipman TO. Nutritional support for liver disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;5:CD008344.
85. Lien TH, Chang MH, Wu JF, Chen HL, Lee HC, Chen AC, et al. Effects of the infant stool color card screening program on 5-year outcome of biliary atresia in Taiwan. *Hepatology.* 2011;53(1):202-8.
86. Lin YC, Chang MH, Liao SF, Wu JF, Ni YH, Tiao MM, et al. Decreasing rate of biliary atresia in Taiwan: a survey, 2004-2009. *Pediatrics.* 2011;128(3):e530-6.
87. Livesey E, Cortina Borja M, Sharif K, Alizai N, McClean P, Kelly D, et al. Epidemiology of biliary atresia in England and Wales (1999-2006). *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2009;94(6):F451-5.
88. Livingstone MB, Robson PJ, Wallace JM. Issues in dietary intake assessment of children and adolescents. *Br J Nutr.* 2004;92 Suppl 2:S213-22.
89. Lykavieris P, Chardot C, Sokhn M, Gauthier F, Valayer J, Bernard O. Outcome in adulthood of biliary atresia: a study of 63 patients who survived for over 20 years with their native liver. *Hepatology.* 2005;41(2):366-71.
90. Mack CL, Feldman AG, Sokol RJ. Clues to the etiology of bile duct injury in biliary atresia. *Semin Liver Dis.* 2012;32(4):307-16.
91. Marcovecchio ML, Mohn A, Chiarelli F. Inflammatory cytokines and growth in childhood. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19(1):57-62.
92. Martins E. O Fígado e o Sistema Imunológico. In: Gayotto L, Alves V, eds. *Doenças do Fígado e Vias Biliares.* 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 93-101.
93. Martins JR, Shiroma GM, Horie LM, Logullo L, Silva MeL, Waitzberg DL. Factors leading to discrepancies between prescription and intake of enteral nutrition therapy in hospitalized patients. *Nutrition.* 2012;28(9):864-7.
94. Mathur S, Peng S, Gane EJ, McCall JL, Plank LD. Hypermetabolism predicts reduced transplant-free survival independent of MELD and Child-Pugh scores in liver cirrhosis. *Nutrition.* 2007;23(5):398-403.
95. Matsui A, Dodoriki M. Screening for biliary atresia. *Lancet.* 1995;345(8958):1181.
96. Mattar RH, Azevedo RA, Speridião PG, Fagundes Neto U, Morais MB. [Nutritional status and intestinal iron absorption in children with chronic hepatic disease with and without cholestasis]. *J Pediatr (Rio J).* 2005;81(4):317-24.
97. McCullough AJ. Malnutrition in liver disease. *Liver Transpl.* 2000(4 Suppl 1):S85-96.
98. McDiarmid SV, Anand R, Lindblad AS, Principal Investigators and Institutions of the Studies of Pediatric Liver Transplantation (SPLIT) Research Group. Development of a pediatric end-stage liver disease score to predict poor outcome in children awaiting liver transplantation. *Transplantation.* 2002;74(2):173-81.

99. McKiernan PJ. Neonatal jaundice. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012;36(3):253-6.
100. McKiernan PJ. Neonatal cholestasis. *Semin Neonatol*. 2002;7(2):153-65.
101. McKiernan PJ, Baker AJ, Lloyd C, Mieli-Vergani G, Kelly DA. British paediatric surveillance unit study of biliary atresia: outcome at 13 years. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009;48(1):78-81.
102. Mehta NM, Bechard LJ, Cahill N, Wang M, Day A, Duggan CP, et al. Nutritional practices and their relationship to clinical outcomes in critically ill children--an international multicenter cohort study*. *Crit Care Med*. 2012;40(7):2204-11.
103. Mehta NM, Compher C, Directors A.S.P.E.N. Board of Directors. A.S.P.E.N. Clinical Guidelines: nutrition support of the critically ill child. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2009;33(3):260-76.
104. Mehta NM, Corkins MR, Lyman B, Malone A, Goday PS, Carney LN, et al. Defining pediatric malnutrition: a paradigm shift toward etiology-related definitions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2013;37(4):460-81.
105. Mehta NM, Duggan CP. Nutritional deficiencies during critical illness. *Pediatr Clin North Am*. 2009;56(5):1143-60.
106. Meijers JM, van Bokhorst-de van der Schueren MA, Schols JM, Soeters PB, Halfens RJ. Defining malnutrition: mission or mission impossible? *Nutrition*. 2010;26(4):432-40.
107. Merli M, Giusto M, Gentili F, Novelli G, Ferretti G, Riggio O, et al. Nutritional status: its influence on the outcome of patients undergoing liver transplantation. *Liver Int*. 2010;30(2):208-14.
108. Miwa Y, Shiraki M, Kato M, Tajika M, Mohri H, Murakami N, et al. Improvement of fuel metabolism by nocturnal energy supplementation in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res*. 2000;18(3):184-9.
109. Mowat AP, Davidson LL, Dick MC. Earlier identification of biliary atresia and hepatobiliary disease: selective screening in the third week of life. *Arch Dis Child*. 1995;72(1):90-2.
110. Moyer V, Freese DK, Whittington PF, Olson AD, Brewer F, Colletti RB, et al. Guideline for the evaluation of cholestatic jaundice in infants: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;39(2):115-28.
111. Müller MJ. Hepatic energy and substrate metabolism: a possible metabolic basis for early nutritional support in cirrhotic patients. *Nutrition*. 1998;14(1):30-8.
112. Müller MJ, Böttcher J, Selberg O, Weselmann S, Böker KH, Schwarze M, et al. Hypermetabolism in clinically stable patients with liver cirrhosis. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(6):1194-201.
113. Neto JS, Pugliese R, Fonseca EA, Vincenzi R, Pugliese V, Candido H, et al. Four hundred thirty consecutive pediatric living donor liver transplants: variables associated with posttransplant patient and graft survival. *Liver Transpl*. 2012;18(5):577-84.
114. Ng VL, Alonso EM, Bucuvalas JC, Cohen G, Limbers CA, Varni JW, et al. Health status of children alive 10 years after pediatric liver transplantation performed in the US and Canada: report of the studies of pediatric liver transplantation experience. *J Pediatr*. 2012;160(5):820-6.e3.

115. Nightingale S, Ng VL. Optimizing nutritional management in children with chronic liver disease. *Pediatr Clin North Am.* 2009;56(5):1161-83.
116. Nio M, Ohi R, Miyano T, Saeki M, Shiraki K, Tanaka K, et al. Five- and 10-year survival rates after surgery for biliary atresia: a report from the Japanese Biliary Atresia Registry. *J Pediatr Surg.* 2003;38(7):997-1000.
117. Nio M, Sasaki H, Wada M, Kazama T, Nishi K, Tanaka H. Impact of age at Kasai operation on short- and long-term outcomes of type III biliary atresia at a single institution. *J Pediatr Surg.* 2010;45(12):2361-3.
118. Norman K, Pirlich M. Gastrointestinal tract in liver disease: which organ is sick? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008;11(5):613-9.
119. Organ Procurement and Transplantation Network and Scientific Registry of Transplant Recipients (OPTN/SRTR). Annual Data Report: Liver. Department of Health and Human Services, Health Resources and Services Administration, Healthcare Systems Bureau, Division of Transplantation, 2012.
120. Perlmutter DH. Alpha-1-antitrypsin deficiency: importance of proteasomal and autophagic degradative pathways in disposal of liver disease-associated protein aggregates. *Annu Rev Med.* 2011;62:333-45.
121. Perlmutter DH, Brodsky JL, Balistreri WF, Trapnell BC. Molecular pathogenesis of alpha-1-antitrypsin deficiency-associated liver disease: a meeting review. *Hepatology.* 2007;45(5):1313-23.
122. Pirlich M, Norman K, Lochs H, Bauditz J. Role of intestinal function in cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006;9(5):603-6.
123. Plauth M, Cabré E, Campillo B, Kondrup J, Marchesini G, Schütz T, et al. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: hepatology. *Clin Nutr.* 2009;28(4):436-44.
124. Plauth M, Cabré E, Riggio O, Assis-Camilo M, Pirlich M, Kondrup J, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Liver disease. *Clin Nutr.* 2006;25(2):285-94.
125. Plauth M, Schütz ET. Cachexia in liver cirrhosis. *Int J Cardiol.* 2002;85(1):83-7.
126. Plauth M, Schütz T, Buckendahl DP, Kreymann G, Pirlich M, Grüngreiff S, et al. Weight gain after transjugular intrahepatic portosystemic shunt is associated with improvement in body composition in malnourished patients with cirrhosis and hypermetabolism. *J Hepatol.* 2004;40(2):228-33.
127. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg.* 1973;60(8):646-9.
128. Rudnick DA, Perlmutter DH. Alpha-1-antitrypsin deficiency: a new paradigm for hepatocellular carcinoma in genetic liver disease. *Hepatology.* 2005;42(3):514-21.
129. Santos J, Carvalho E, Seixas R. Colestase neonatal. In: Silva L, Ferreira C, Carvalho E, eds. *Hepatologia em Pediatria.* 1^a ed. Barueri, São Paulo: Manole; 2012. p. 219
130. Schneider AC, Pinto RB, Fröhlich PE, Hammes TO, Silveira TR. Low plasma zinc concentrations in pediatric patients with cirrhosis. *J Pediatr (Rio J).* 2009;85(4):359-64.

131. Schneider AC, Pinto RB, Silveira TR. [Nutritional risk and malnutrition determination by anthropometry in cirrhotic children and adolescents]. *Arq Gastroenterol.* 2007;44(4):345-9.
132. Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B. How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2009;102(2):215-22.
133. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2008;371(9615):838-51.
134. Secker DJ, Jeejeebhoy KN. Subjective Global Nutritional Assessment for children. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(4):1083-9.
135. Secker DJ, Jeejeebhoy KN. How to perform Subjective Global Nutritional assessment in children. *J Acad Nutr Diet.* 2012;112(3):424-31.e6.
136. Seres DS. Surrogate nutrition markers, malnutrition, and adequacy of nutrition support. *Nutr Clin Pract.* 2005;20(3):308-13.
137. Serinet MO, Broué P, Jacquemin E, Lachaux A, Sarles J, Gottrand F, et al. Management of patients with biliary atresia in France: results of a decentralized policy 1986-2002. *Hepatology.* 2006;44(1):75-84.
138. Shepherd R. Complicações e tratamento das doenças hepáticas crônicas. In: Kelly DA, editor. *Doenças Hepáticas e do Sistema Biliar em Crianças.* 1a ed: Blackwell Science Ltd. Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda; 2001.
139. Shinkai M, Ohhama Y, Take H, Kitagawa N, Kudo H, Mochizuki K, et al. Long-term outcome of children with biliary atresia who were not transplanted after the Kasai operation: >20-year experience at a children's hospital. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48(4):443-50.
140. Shiraki M, Terakura Y, Iwasa J, Shimizu M, Miwa Y, Murakami N, et al. Elevated serum tumor necrosis factor-alpha and soluble tumor necrosis factor receptors correlate with aberrant energy metabolism in liver cirrhosis. *Nutrition.* 2010;26(3):269-75.
141. Shneider BL, Abel B, Haber B, Karpen SJ, Magee JC, Romero R, et al. Portal hypertension in children and young adults with biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;55(5):567-73.
142. Shneider BL, Mazariegos GV. Biliary atresia: a transplant perspective. *Liver Transpl.* 2007;13(11):1482-95.
143. Shneider B. Portal Hypertension. In: Suchy F, Sokol R, Balistreri W, eds. *Liver Disease in Children.* 3^a ed. Cambridge University Press; 2007. p. 138-56.
144. Smart KM, Alex G, Hardikar W. Feeding the child with liver disease: a review and practical clinical guide. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(5):810-5.
145. Soeters PB, Reijven PL, van Bokhorst-de van der Schueren MA, Schols JM, Halfens RJ, Meijers JM, et al. A rational approach to nutritional assessment. *Clin Nutr.* 2008;27(5):706-16.
146. Soeters PB, Schols AM. Advances in understanding and assessing malnutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2009;12(5):487-94.
147. Sokol RJ, Mack C. Etiopathogenesis of biliary atresia. *Semin Liver Dis.* 2001;21(4):517-24.
148. Sokol RJ, Mack C, Narkewicz MR, Karrer FM. Pathogenesis and outcome of biliary atresia: current concepts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;37(1):4-21.

149. Sokol RJ, Shepherd RW, Superina R, Bezerra JA, Robuck P, Hoofnagle JH. Screening and outcomes in biliary atresia: summary of a National Institutes of Health workshop. *Hepatology*. 2007;46(2):566-81.
150. Sokol RJ, Stall C. Anthropometric evaluation of children with chronic liver disease. *Am J Clin Nutr*. 1990;52(2):203-8.
151. Stamoulis I, Kouraklis G, Theocharis S. Zinc and the liver: an active interaction. *Dig Dis Sci*. 2007;52(7):1595-612.
152. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. 2005;365(9478):2225-36.
153. Suchy FJ. Neonatal cholestasis. *Pediatr Rev*. 2004;25(11):388-96.
154. Sultan MI, Leon CD, Biank VF. Role of nutrition in pediatric chronic liver disease. *Nutr Clin Pract*. 2011;26(4):401-8.
155. Sveger T. Liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200,000 infants. *N Engl J Med*. 1976;294(24):1316-21.
156. Sveger T. The natural history of liver disease in alpha 1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatr Scand*. 1988;77(6):847-51.
157. Sveger T, Eriksson S. The liver in adolescents with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Hepatology*. 1995;22(2):514-7.
158. Tannuri U. Nutrição parenteral e enteral na criança. In: Waitzberg D, editor. *Nutricao oral, enteral e parenteral na prática clinica*. 4ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu; 2009.
159. Taylor RM, Dhawan A. Assessing nutritional status in children with chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005;20(12):1817-24.
160. Tilg H. Cytokines and liver diseases. *Can J Gastroenterol*. 2001;15(10):661-8.
161. Tommaso A, Mattar R. Conduta e tratamento da colestase em recém-nascido e lactente. In: Tommaso A, Porta G, eds. *Manual de Hepatologia Pediátrica*. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2009. p. 51.
162. Tseng JJ, Lai MS, Lin MC, Fu YC. Stool color card screening for biliary atresia. *Pediatrics*. 2011;128(5):e1209-15.
163. Tsiaousi ET, Hatzitolios AI, Trygonis SK, Savopoulos CG. Malnutrition in end stage liver disease: recommendations and nutritional support. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23(4):527-33.
164. Tsouka A, McLin VA. Complications of chronic liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012;36(3):262-7.
165. Utterson EC, Shepherd RW, Sokol RJ, Bucuvalas J, Magee JC, McDiarmid SV, et al. Biliary atresia: clinical profiles, risk factors, and outcomes of 755 patients listed for liver transplantation. *J Pediatr*. 2005;147(2):180-5.
166. Vilcek J. The cytokines: an overview. In: Thompson A, Lotze M, eds. *The cytokines handbook*. 4ª ed. USA: Academic Press; 2003.
167. Wanless I. Physioanatomic Considerations. In: Schiff E, Sorrell M, Maddrey W, eds. *Schiff's*

Disease of the liver. 10^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 181-212.

168. Williams CL, Bozzella M, Wyder EL. A new recommendation for dietary fiber in childhood. *Pediatrics*. 1995;96(5 Pt 2):985-8.

169. World Health Organization (WHO). WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization; 2006.

170. World Health Organization (WHO). WHO Child Growth Standards: Methods and development: Head circumference-for-age, arm circumference-for-age, triceps skinfold-for-age and subscapular skinfold-for-age. Geneva: World Health Organization; 2007.

171. World Health Organization (WHO). WHO Anthro Plus for personal computers: Software for assessing growth of the world's children and adolescents [programa de computador]. Geneva; 2009.

172 World Health Organization (WHO). WHO Anthro for personal computers, version 3.2.2: Software for assessing growth and development of the world's children [programa de computador]. Geneva; 2011.

173. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology*. 2005;41(3):422-33.

174. Wiest R, Weigert J, Wanninger J, Neumeier M, Bauer S, Schmidhofer S, et al. Impaired hepatic removal of interleukin-6 in patients with liver cirrhosis. *Cytokine*. 2011;53(2):178-83.

175. Woolbright BL, Jaeschke H. Novel insight into mechanisms of cholestatic liver injury. *World J Gastroenterol*. 2012;18(36):4985-93.

176. Young S, Kwart E, Azzam R, Sentongo T. Nutrition assessment and support in children with end-stage liver disease. *Nutr Clin Pract*. 2013;28(3):317-29.

177. Zamberlan P, Leone C, Tannuri U, de Carvalho WB, Delgado AF. Nutritional risk and anthropometric evaluation in pediatric liver transplantation. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(12):1387-92.

178. Zhang Y, Hong JY, Rockwell CE, Copple BL, Jaeschke H, Klaassen CD. Effect of bile duct ligation on bile acid composition in mouse serum and liver. *Liver Int*. 2012;32(1):58-69.

179. Zhao VM, Ziegler TR. Nutrition support in end-stage liver disease. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2010;22(3):369-80.

ANEXO A – PROTOCOLO DE ANÁLISE TNF-ALFA

Kit Human TNF-alpha Quantikine ELISA

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de lavagem – dilua 20 mL da solução tampão concentrada em água destilada para preparar 500 mL.

Solução de substrato – reagentes coloridos A e B devem ser misturados em igual volume dentro de 15 minutos do uso. Proteja da luz. São necessários 200 µL da mistura resultante por poço.

Padrão TNF-alfa – reconstitua o padrão TNF-alfa com água destilada. Esta reconstituição produz uma solução estoque de 10,000 pg/mL. Reserve o padrão por no mínimo 15 minutos com agitação suave antes de realizar as diluições.

Pipetar 900 µL do diluente calibrador em um tubo contendo 100 µL da solução padrão estoque (10.000 pg/mL); este tubo (1000 pg/mL) será o padrão mais alto da curva e a partir deste deverá ser realizada a diluição seriada. Para a diluição, pipetar 500 µL de diluente calibrador em tubos separados e começar a diluição transferindo 500 µL do padrão mais alto (1000 pg/mL) ao primeiro tubo e, assim, sucessivamente. Misture cada tubo completamente antes da próxima transferência. O diluente calibrador serve como branco (0 pg/mL).

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1. Prepare todos os reagentes e padrões conforme descrito na seção anterior.
2. Remova as tiras de microplaca excedente da moldura da placa.
3. Adicione 50 µL do diluente RD1F em cada poço.
4. Adicione 200 µL do padrão, amostra ou controle por poço. Cubra com a fita adesiva fornecida. Incube por 2 horas em temperatura ambiente.
5. Aspire cada poço e lave, repetindo o processo 3 vezes num total de 4 lavagens. Lave enchendo cada poço com o tampão de lavagem (400 µL). A remoção completa do líquido em cada passo é essencial para uma boa performance. Depois da última lavagem, remova qualquer tampão de lavagem remanescente. Inverta a placa e seque com toalhas de papel.
6. Adicione 200 µL de TNF-alfa conjugado em cada poço. Cubra com uma nova fita adesiva. Incube por 2 horas em temperatura ambiente.
7. Repita a lavagem no passo 5.
8. Adicione 200 µL da solução de substrato em cada poço. Incube por 20 minutos em temperatura ambiente. Proteja da luz.
9. Adicione 50 µL da solução de parada em cada poço. A coloração nos poços deve mudar do azul para amarelo. Se a coloração nos poços for verde ou a mudança de coloração não parecer uniforme, bata suavemente na placa para garantir a mistura completa.
10. Determine a densidade óptica de cada poço dentro de 30 minutos, usando um leitor de microplaca ajustado para 450 nm.

ANEXO B – PROTOCOLO DE ANÁLISE INTERLEUCINA-6

Kit Human IL-6 Quantikine ELISA

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de lavagem – dilua 20 mL da solução tampão concentrada em água destilada para preparar 500 mL.

Solução de substrato – reagentes coloridos A e B devem ser misturados em igual volume dentro de 15 minutos do uso. Proteja da luz. São necessários 200 µL da mistura resultante por poço.

Padrão IL-6 – reconstitua o padrão IL-6 com 5 mL do Diluente Calibrador RD6F. Esta reconstituição produz uma solução estoque de 300 pg/mL. Reserve o padrão por no mínimo 15 minutos com agitação suave antes de realizar as diluições.

Pipetar 667 µL do diluente calibrador em um tubo contendo 333 µL da solução padrão estoque (300 pg/mL); este tubo (100 pg/mL) será o padrão mais alto da curva e a partir deste deverá ser realizada a diluição seriada. Para a diluição, pipetar 500 µL de diluente calibrador em tubos separados e começar a diluição transferindo 500 µL do padrão mais alto (100 pg/mL) ao primeiro tubo e, assim, sucessivamente. Misture cada tubo completamente antes da próxima transferência. O diluente calibrador serve como branco (0 pg/mL).

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1. Prepare todos os reagentes e padrões conforme descrito na seção anterior.
2. Remova as tiras de microplaca excedente da moldura da placa.
3. Adicione 100 µL do diluente RD1W em cada poço.
4. Adicione 100 µL do padrão, amostra ou controle por poço. Cubra com a fita adesiva fornecida. Incube por 2 horas em temperatura ambiente.
5. Aspire cada poço e lave, repetindo o processo 3 vezes num total de 4 lavagens. Lave enchendo cada poço com o tampão de lavagem (400 µL). A remoção completa do líquido em cada passo é essencial para uma boa performance. Depois da última lavagem, remova qualquer tampão de lavagem remanescente. Inverta a placa e seque com toalhas de papel.
6. Adicione 200 µL de IL-6 conjugado em cada poço. Cubra com uma nova fita adesiva. Incube por 2 horas em temperatura ambiente.
7. Repita a lavagem no passo 5.
8. Adicione 200 µL da solução de substrato em cada poço. Incube por 20 minutos em temperatura ambiente. Proteja da luz.
9. Adicione 50 µL da solução de parada em cada poço. A coloração nos poços deve mudar do azul para amarelo. Se a coloração nos poços for verde ou a mudança de coloração não parece ser uniforme, bata suavemente na placa para garantir a mistura completa.
10. Determine a densidade óptica de cada poço dentro de 30 minutos, usando um leitor de microplaca ajustado para 450 nm.

ANEXO C – PROTOCOLO DE ANÁLISE INTERLEUCINA-1 BETA

Kit Human IL-1 beta Quantikine ELISA

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de lavagem – dilua 20 mL da solução tampão concentrada em água destilada para preparar 500 mL.

Solução de substrato – reagentes coloridos A e B devem ser misturados em igual volume dentro de 15 minutos do uso. Proteja da luz. São necessários 200 µL da mistura resultante por poço.

Padrão IL-1 beta – reconstitua o padrão IL-1 beta com 5 mL de diluente calibrador RD6C. Esta reconstituição produz uma solução estoque de 250 pg/mL. Reserve o padrão por no mínimo 15 minutos com agitação suave antes de realizar as diluições.

Pipetar 500 µL de diluente calibrador em tubos separados. Utilize a solução padrão estoque (250 pg/mL) para produzir a série de diluições, transferido 500 µL em cada tubo consecutivamente. Misture cada tubo completamente antes da próxima transferência. A solução padrão estoque (250 pg/mL) será o padrão mais alto da curva. O diluente calibrador serve como branco (0 pg/mL).

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1. Prepare todos os reagentes e padrões conforme descrito na seção anterior.
2. Remova as tiras de microplaca excedente da moldura da placa.
3. Adicione 50 µL do diluente RD1-83 em cada poço.
4. Adicione 200 µL do padrão, amostra ou controle por poço. Cubra com a fita adesiva fornecida. Incube por 2 horas em temperatura ambiente.
5. Aspire cada poço e lave, repetindo o processo 3 vezes num total de 4 lavagens. Lave enchendo cada poço com o tampão de lavagem (400 µL). A remoção completa do líquido em cada passo é essencial para uma boa performance. Depois da última lavagem, remova qualquer tampão de lavagem remanescente. Inverta a placa e seque com toalhas de papel.
6. Adicione 200 µL de IL-1 beta conjugado em cada poço. Cubra com uma nova fita adesiva. Incube por 2 horas em temperatura ambiente.
7. Repita a lavagem no passo 5.
8. Adicione 200 µL da solução de substrato em cada poço. Incube por 20 minutos em temperatura ambiente. Proteja da luz.
9. Adicione 50 µL da solução de parada em cada poço. A coloração nos poços deve mudar do azul para amarelo. Se a coloração nos poços for verde ou a mudança de coloração não parece ser uniforme, bata suavemente na placa para garantir a mistura completa.
10. Determine a densidade óptica de cada poço dentro de 30 minutos, usando um leitor de microplaca ajustado para 450 nm.

ANEXO D - REGISTRO ALIMENTAR DE TRÊS DIAS

REGISTRO DA INGESTÃO ALIMENTAR

INSTRUÇÕES PARA O PREENCHIMENTO DO REGISTRO ALIMENTAR DE 3 DIAS:

1. Anotar o que foi ingerido em 3 dias, dois dias da semana e 1 dia do final de semana. Preferencialmente não preencher nos feriados ou férias.
2. As informações devem ser claras, constando também os métodos e ingredientes usados para a preparação dos alimentos, por exemplo: frito, assado ou cozido.
3. A quantidade ingerida dos alimentos deve ser registrada, por exemplo: colher de sopa, sobremesa ou chá, xícara ou copo, se possível medir em mililitros (mL) os líquidos.
4. Lembrar de escrever todos os ingredientes, por exemplo: açúcar, maionese, manteiga ou margarina, tempero para saladas; bem como os alimentos ingeridos fora do horário das refeições.
5. Anotar sempre a quantidade de alimento que foi ingerida pelo paciente e não a quantidade servida.

TODOS OS DADOS DEVEM SER PREENCHIDOS CORRETAMENTE, POIS SÃO MUITO IMPORTANTES PARA QUE O NUTRICIONISTA POSSA CALCULAR AS QUANTIDADES DE CALORIAS, PROTEÍNAS E DEMAIS NUTRIENTES INGERIDOS.

NOME DO PACIENTE: _____

DATA DE NASCIMENTO: _____

PRONTUÁRIO: _____

1º dia Data: ___/___/___	ALIMENTOS INGERIDOS	QUANTIDADE INGERIDA (colheres, copo, xícara ou mamadeiras)
CAFÉ DA MANHÃ Horário: _____		
LANCHE DA MANHÃ Horário: _____		
ALMOÇO Horário: _____		
LANCHE DA TARDE Horário: _____		
JANTAR Horário: _____		
CEIA Horário: _____		
INTERVALO ENTRE AS REFEIÇÕES		

2º dia Data: ___/___/___	ALIMENTOS INGERIDOS	QUANTIDADE INGERIDA (colheres, copo, xícara ou mamadeiras)
CAFÉ DA MANHÃ Horário: _____		
LANCHE DA MANHÃ Horário: _____		
ALMOÇO Horário: _____		
LANCHE DA TARDE Horário: _____		
JANTAR Horário: _____		
CEIA Horário: _____		
INTERVALO ENTRE AS REFEIÇÕES		

3º dia Data: ___/___/___	ALIMENTOS INGERIDOS	QUANTIDADE INGERIDA (colheres, copo, xícara ou mamadeiras)
CAFÉ DA MANHÃ Horário: _____		
LANCHE DA MANHÃ Horário: _____		
ALMOÇO Horário: _____		
LANCHE DA TARDE Horário: _____		
JANTAR Horário: _____		
CEIA Horário: _____		
INTERVALO ENTRE AS REFEIÇÕES		

ANEXO E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Nome do estudo: Perfil nutricional e de atividade inflamatória em crianças com hepatopatia crônica.

Pesquisadores responsáveis: Dra. Helena A. S. Goldani e Nutricionista Daniele Santetti

1. Justificativa e Objetivo do estudo:

A desnutrição é comum nos pacientes com doença crônica do fígado. Para os pacientes que necessitam de transplante de fígado, a desnutrição pode influenciar na evolução antes e após o transplante. É importante identificar a desnutrição e as alterações associadas para sua prevenção e tratamento. O objetivo desse estudo é avaliar o estado nutricional dos pacientes com doença crônica do fígado e relacionar com algumas proteínas que fazem parte da atividade inflamatória.

2. Procedimento:

Serão coletados 2 ml de sangue para dosagem das proteínas inflamatórias dos pacientes com doença crônica do fígado, no momento em que farão coleta de sangue para exames solicitados pelo médico responsável. Não será realizada coleta adicional. Serão realizadas medidas de peso corporal, estatura e medidas no braço. Será solicitado também o preenchimento de um registro de tudo o que a criança comer e beber durante 3 dias, para ser calculado.

3. Possíveis riscos e desconfortos:

Os riscos e desconfortos são aqueles associados à coleta de sangue de rotina: dor ou sintomas locais de desconforto.

4. Possíveis benefícios deste estudo:

O melhor conhecimento das alterações do estado nutricional do paciente com doença crônica do fígado poderá beneficiar outras crianças em situações semelhantes a de seu(sua) filho(a) atuando na prevenção da desnutrição.

5. Direito de desistência:

A participação no estudo é inteiramente voluntária, podendo desistir de participar em qualquer momento, sem prejuízos no atendimento médico e assistência de terapia nutricional.

6. Confidencialidade:

As informações e identidade das crianças e dos pais serão confidenciais e utilizadas apenas com finalidade científica.

7. Perguntas:

Na existência de dúvidas com relação à participação do estudo, o contato com os pesquisadores se dará pelo fone 51 99170299 e 51 3359 8293, 10º andar. Serviço de Pediatria do HCPA. Outras dúvidas deverão ser dirigidas ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA através do telefone 51 33597640, 2º andar.

8. Consentimento:

Este documento é feito em duas vias, sendo que uma via será entregue ao participante e a outra via será arquivada pela instituição. Os participantes deste projeto não receberão ressarcimento das despesas com deslocamento e alimentação porque o projeto não implica em procedimentos adicionais aos que o paciente usualmente recebe na assistência.

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos, riscos e benefícios desta pesquisa e autorizo o armazenamento do sangue coletado e utilização em pesquisas futuras por até 5 anos. Outras pesquisas só serão realizadas após aprovação do Comitê de Ética em pesquisa.

() sim () não

Nome e Assinatura do (a) responsável pela criança: _____
(vínculo com a criança: _____)

Nome e Assinatura do (a) participante (acima 7 anos): _____

Assinatura do investigador responsável: _____

Data: ___/___/___

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

19/10/2011
11.0078

ANEXO F – PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

1. IDENTIFICAÇÃO

Ficha nº: _____
 Data (1º contato): ____/____/____

Nome do paciente: _____
 Registro: _____ Gênero: ()M ()F Data de nascimento: ____/____/____
 Etnia: ()Cauc ()NC Nacionalidade: _____ Naturalidade: _____
 Endereço: _____
 Bairro: _____ CEP: _____ Cidade: _____
 Nome do responsável: _____
 Telefones para contato: _____

Data: ____/____/____
 Hora: _____
 Local: _____
 Nº coleta: _____

2. ETIOLOGIA DA HEPATOPATIA

Alterações estruturais das vias biliares	Doenças genéticas/metabólicas	Outros
() Atresia biliar () Hipoplasia de vias biliares () Cisto de colédoco	() Deficiência de alfa-1 antitripsina () Doença de Wilson () Glicogenose	() Hepatites () Cirrose Criptogênica () _____

2.2. Classificação de Child-Pugh

Avaliação clínica e bioquímica	Pontuação 01	Pontuação 02	Pontuação 03
Encefalopatia	Ausente	Discreta	Moderada/Grave
Ascite	Ausente	Discreta	Volumosa
Bilirrubina total (mg/dL)	< 2	2 - 3	> 3
Albumina (g/dl)	> 3,5	2,8 - 3,5	< 2,8
Tempo de protrombina (s)	< 4	4 - 10	> 10

Child-Pugh
 () A leve ≤ 6
 () B moderada 7-9
 () C severa ≥ 10

2.3. Uso de medicamentos? Quais?

3. EXAMES LABORATORIAS:

Data/Exame	Albumina (g/dL)	BT (mg/dL)	TP (s)	INR	Creat (mg/dL)	IL-1	IL-6	TNF α	PCR

4. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

IG: _____ semanas	Peso nascer: _____ g	Comprimento nascer: _____ cm
Idade: _____ anos _____ meses		
Peso: _____ Kg *ascite () sim () não		
Estatura: _____ cm		
IMC: _____ Kg/m ²		
CB: _____ cm		
DCT: _____ mm		
	Percentil	Score-z
	PE= _____	PE= _____
	PI= _____	PI= _____
	EI= _____	EI= _____
	IMC= _____	IMC= _____
	CB= _____	CB= _____
	DCT= _____	DCT= _____

4.1 Classificação do estado nutricional: _____

ANEXO G – TABELAS COMPLEMENTARES

Tabela A. Concentração sérica das citocinas estudadas na amostra.

Paciente	Interleucina-1beta (pg/mL)	Interleucina-6 (pg/mL)	TNF-alfa (pg/mL)
1	0,000	0,000	8,288
2	0,066	6,795	4,338
3	0,000	0,000	2,370
4	0,000	1,987	11,354
5	0,000	21,090	3,869
6	0,000	5,577	5,401
7	11,089	42,500	21,174
8	0,000	0,000	4,455
9	0,103	11,346	11,973
10	0,000	0,000	10,984
11	0,000	0,513	4,220
12	0,000	1,410	9,754
13	0,000	2,949	0,814
14	0,347	2,179	7,924
15	0,000	26,474	13,965
16	0,000	1,282	12,843
17	0,066	3,590	2,143
18	0,305	1,859	29,948
19	0,000	0,577	4,573
20	0,066	1,410	11,973
21	0,000	0,000	3,869
22	0,000	48,397	10,861
23	0,181	3,782	9,142
24	0,000	0,577	9,999
25	0,103	1,282	15,721
26	0,066	2,692	10,491
27	0,031	10,897	10,737
28	0,305	6,410	6,596
29	0,305	7,115	15,595
30	0,066	0,000	8,167
31	0,031	0,513	8,045
32	0,142	1,154	6,596
33	0,656	34,231	18,500
34	0,103	1,987	6,716
35	0,477	5,256	4,455
36	1,364	57,885	11,107
37	0,222	0,000	1,470
38	0,702	2,564	5,164
39	0,390	4,293	8,532
40	0,347	0,598	12,843
41	0,611	0,000	6,596
42	0,933	17,283	12,346
43	0,000	5,652	4,927

TNF-alfa: Fator de necrose tumoral-alfa.

Tabela B. Valores medianos das citocinas estudadas por grupos.

Grupos	Interleucina-1 beta (pg/mL)	Interleucina-6 (pg/mL)	TNF-alfa (pg/mL)
Sexo			
Feminino n=23	0,10 (0-0,48)	3,78 (1,15-11,35)	8,17 (4,46-11,97)
Masculino n=20	0,02 (0-0,19)	1,41 (0,13-5,08)	9,02 (5,05-11,73)
<i>P</i> †	0,068	0,112	0,932
Estado nutricional			
Com risco n=15	0,10 (0-0,66)	7,12 (0,58-34,23)	10,74 (8,17-12,35)
Sem risco n=28	0,05 (0-0,28)	1,63 (0,53-3,43)	6,66 (4,28-11,26)
<i>P</i> †	0,144	0,02	0,88
Colestase			
Sim n=12	0,33 (0,08-0,88)	8,85 (2,87-29,99)	10,37 (6,93-12,25)
Não n=31	0 (0-0,14)	1,41 (0-4,29)	8,05 (4,46-11,35)
<i>P</i> †	0,002	0,002	0,155
Cirrose			
Sim n=35	0,07 (0-0,33)	2,56 (0,59-6,96)	8,17 (4,46-11,97)
Não n=8	0,02 (0-0,38)	1,92 (0-8,56)	10,68 (6,18-11,60)
<i>P</i> †	0,485	0,498	0,396
Child-Pugh			
A n=20	0,06 (0-0,21)	1,28 (0,12-4,16)	7,44 (4,45-11,41)
B n=12	0,06 (0-0,61)	6,60 (2,66-24,17)	8,96 (4,54-11,04)
C n=3	0,65 (0,10)	34,23 (11,34)	18,50 (11,97)
<i>P</i> ‡	0,122	0,001	0,050
PELD			
< 15 n=23	0,07 (0-0,31)	2,08 (0,58-5,59)	8,23 (4,81-11,51)
> 15 n=4	0,38 (0,05-8,48)	22,79 (11,01-40,43)	15,24 (11,05-20,51)
<i>P</i> †	0,270	0,014	0,026

TNF-alfa: Fator de necrose tumoral-alfa; **PELD:** *Pediatric End Stage Liver Disease*.

† Teste U Mann-Whitney.

‡ Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela C. Concentrações séricas dos exames laboratoriais realizados.

Participante	Albumina (g/dL)	BT (mg/dL)	BD (mg/dL)	INR	TP (s)	Creatinina (mg/dL)
1	4,4	0,4	0,2	1,13	13,8	0,38
2	3,1	10,4	8,2	1,21	14,8	0,3
3	4,4	0,4	0,2	1,11	13,4	0,72
4	4,4	0,3	0,2	0,98	12,1	0,3
5	3,6	2,0	1,1	1,0	12,2	0,3
6	4,0	1,9	1,3	0,95	11,7	0,3
7	2,2	30	25,3	1,79	21,3	0,41
8	4,4	1,0	0,4	1,15	14,1	0,34
9	3,0	15,3	11,3	1,55	18,2	0,3
10	4,5	0,3	0,2	1,04	12,8	0,34
11	4,0	0,6	0,3	1,3	15,8	0,3
12	3,4	0,8	0,4	1,22	14,8	0,33
13	3,8	2,3	0,6	1,44	17,3	0,43
14	4,0	3,5	2,7	1,11	13,5	0,3
15	2,4	1,5	0,9	1,64	19,4	0,5
16	4,0	0,3	0,2	1,22	14,9	0,5
17	3,2	2,3	1,7	1,4	16,9	0,3
18	3,9	0,4	0,2	1,21	14,7	0,3
19	4,0	1,1	0,5	0,9	11,1	0,42
20	4,3	0,6	0,2	1,11	13,4	0,3
21	4,5	0,4	0,2	1,04	12,7	0,42
22	3,2	2,6	1,9	1,25	15,2	0,3
23	3,6	3,0	2,2	1,16	14,1	0,3
24	3,8	11,8	3,7	1,7	20,2	0,79
25	4,5	0,7	0,3	1,17	14,2	0,3
26	4,3	0,3	0,2	1,26	15,3	0,3
27	2,8	19,3	13,9	1,49	18	0,3
28	2,9	10,2	8,3	1,21	14,6	0,3
29	3,1	1,1	0,8	1,16	14,2	0,3
30	4,5	0,3	0,2	1,05	12,7	0,3
31	4,0	1,6	0,9	1,14	13,9	0,62
32	4,5	0,5	0,2	1,06	12,9	0,37
33	2,6	16,8	13	1,72	21	0,3
34	4,2	1,6	0,7	1,33	16,1	0,3
35	3,9	2,9	1,0	1,32	16	0,3
36	2,9	8,5	7,1	1,3	15,8	0,3
37	4,3	0,3	0,2	1,18	14,3	0,75
38	3,7	4,4	3,6	1,06	13	0,45
39	3,8	1,1	0,7	1,12	13,6	0,3
40	4,6	0,6	0,2	1,1	13,3	0,41
41	4,6	0,4	0,2	1,08	13,1	0,58
42	4,0	5,8	4,9	1,05	12,7	0,3
43	4,2	0,3	0,2	0,93	11,1	0,3

BD: bilirrubina direta; **BT:** bilirrubina total; **INR:** *International Normalized Ratio*;

TP: prolongamento de protrombina. (s): segundos.

ANEXO H – ARTIGO ORIGINAL**Serum proinflammatory cytokines and nutritional status in children and adolescents with chronic liver disease**

Daniele Santetti, MSc^{1*}; Cristina T. L. Dornelles, PhD², Maria Inês A. Wilasco, MSc¹, Isabel C. R. Werlang, PhD^{1,3}, Fernanda U. Fontella, PhD³, Carlos O. Kieling, MD, PhD⁴, Jorge L. Santos, MD, PhD⁴, Sandra M. G. Vieira, MD, PhD⁴, Helena A. S. Goldani, MD, PhD^{1,4}

¹Post-Graduate Program of Child and Adolescent Health, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil; ² Nutrition Service; ³ Laboratory of Translational Pediatrics-NESCA, Centro de Pesquisa Experimental; ⁴ Pediatric Gastroenterology and Hepatology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Financial Support

This study was funded by Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE), Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Post-Graduate Program of Child and Adolescent Health-UFRGS and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Acknowledgement

Thanks are due to the Unit of Biostatistics, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Word count of the manuscript body: 2372

Number of figures: 1

Number of tables: 3

Corresponding author: Daniele Santetti, Rua Ramiro Barcelos, 2350. CEP: 90035-903 Porto Alegre, RS – Brazil. Phone/fax: +55 51 3359 8293.

Email address: danisantetti@gmail.com

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study was to evaluate the nutritional status of children and adolescents with chronic liver disease and its association with inflammatory activity, by measurement of proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α).

Methods: Cross-sectional study comprised of 43 children and adolescents, aged 0 to 17 years, diagnosed with chronic liver disease from a tertiary pediatric hospital in Brazil. The severity of liver disease was assessed by Child-Pugh, MELD and PELD scores. Anthropometric parameters were height/age, body mass index/age and triceps skinfold/age according to WHO standards. The cutoff points for classification of nutritional status were the following: risk of malnutrition (z-score < -1.00) and malnutrition (z-score < -2.00). IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels were assessed by commercial ELISA kits.

Results: Median (25th-75th centile) age was 60 (17-116) months, 53.5% were female. Biliary atresia accounted for 72% of cases. IL-6 values were increased in patients at nutritional risk compared to those well-nourished [7.12 (0.58-34.23) pg/mL vs 1.63 (0.53-3.43) pg/mL; $P = 0.02$], correlating inversely with triceps skinfold-for-age z-score ($r_s = -0.61$; $P < 0.001$). IL-6 levels were associated with liver disease severity assessed by Child-Pugh score ($P = 0.001$). This association remained significant after adjustment for nutritional status in a linear regression model.

Conclusions: High IL-6 levels were found in children and adolescents with chronic liver disease at nutritional risk. These data could suggest that inflammatory activity may play a role in the progression of pediatric chronic liver disease and nutritional status deterioration.

Key Words: cytokines – malnutrition– chronic liver diseases – cirrhosis – child

INTRODUCTION

Biliary atresia (BA) is an obstructive cholangiopathy present at birth or developed during the first two weeks of life (1). It is the most common cause of chronic liver disease in children, with possibility of progression to cirrhosis (2). The etiology of this disease is still unknown (3). Late referral to specialized centers still is a problem that can affect patient's survival (4). Alpha-1 antitrypsin deficiency, Alagille syndrome and progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) are other causes of liver disease in pediatrics (5). Complications related to chronic liver disease and cirrhosis include portal hypertension, variceal bleeding, ascites and failure to thrive (6-8).

It is well established that nutritional status is an important factor in the prognosis of chronic liver disease (9). Growth deficit may influence pre- and post-transplantation mortality (10, 11). The presence of pre-transplant stunting seems to be associated with longer hospital stays and increased costs with hospitalization at the time of transplantation (12). Early identification of nutritional risk should be sought so that individualized dietary intervention can be implemented by a multidisciplinary team (13).

Malnutrition in liver disease is related to several conditions such as reduced caloric intake, anorexia, early satiety, abnormalities in the metabolism of macronutrients, hypermetabolism and increased proinflammatory cytokines (14-16). In cholestatic patients there is a significant decrease of bile acids concentrations in the intestine with consequent malabsorption of lipids and fat soluble vitamins (17). This clinical issue remains frequent, especially in end stage liver disease (18, 19).

Recently, inflammatory activity has been suggested as a component of the pathogenesis of illness-related malnutrition (20, 21). Moreover, it appears to be possible that proinflammatory cytokines could impair growth and muscle breakdown through several pathways (20, 22). The inclusion of proinflammatory cytokines assessment such as interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and C-reactive protein (CRP) concentrations is being currently recommended in routine clinical care (20, 23, 24).

Many studies have been evaluating cytokine profiles of children with chronic liver diseases (25-27), but neither seemed to explore the possible association between these biomarkers of inflammation and nutritional status. Given the lack of studies regarding this relationship, the present study aimed to evaluate the nutritional status of children and

adolescents with chronic liver disease and its association with inflammatory activity, by measurement of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α .

METHODS

Subjects and design

The present cross-sectional study evaluated a total of 43 children and adolescents from 3 months to 17 years with clinical diagnosis of chronic liver disease. All patients regularly attended the Pediatric Hepatology Unit, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, a tertiary reference center for pediatric liver disease and liver transplantation in Southern Brazil.

In our study, cirrhosis was defined as presence of nodular formation and fibrosis on liver biopsy, or by laboratory tests that assess the existence of liver injury, or presence of esophageal varices on endoscopy and/or ultrasound showing heterogeneous echogenicity of the liver and signs of portal hypertension.

Exclusion criteria were as follows: fever of any etiology at the time of enrollment, inborn errors of the metabolism and any chronic illnesses besides cirrhosis.

This study was approved by the Research and Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (protocol n^o.11/0078). Informed and written consent was obtained from patients' parents or caretakers.

Disease severity

The severity of liver disease was assessed according to Child–Pugh score (28); Model for End-stage Liver Disease (MELD) score (29), for adolescents above 12 years and Pediatric End Stage Liver Disease (PELD) score (30) for those under 12 years. Scores above 15 were considered the cut-off point for liver disease severity.

Anthropometric parameters

Anthropometric parameters employed were the following: body mass index-for-age (BMI/A), height-for-age (H/A), mid upper arm circumference-for-age (MUAC/A) and triceps skinfold-for-age (TSF/A), according to World Health Organization (WHO) references (31, 32). All measurements were performed by the same trained researcher. The variables were presented as z-scores. For children under 5 years old the software WHO Anthro (version 3.2.2) was applied. Children above 5 years old were evaluated using WHO Anthro Plus and

anthropometric standards proposed by Frisancho (33) to calculate MUAC/A and TSF/A. Risk of malnutrition was defined based on z-score < -1.00 for BMI/A or TSF/A, and malnutrition as z-score < -2.00 . For statistical purposes the two categories, risk of malnutrition and malnutrition, were assembled in a single group called nutritional risk. In patients with ascites, we did not consider values of BMI/A, since this parameter may underestimate the diagnosis of malnutrition due to fluid retention.

Biochemical assays

Blood samples were collected from all patients during the performance of routine tests: serum albumin, creatinine, conjugated bilirubin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), hemoglobin, prothrombin time, international normalized ratio (INR) and C reactive protein (CRP).

For cytokine assessment (IL-1 β , IL-6 and TNF- α), serum (2.0 mL) was immediately separated by centrifugation for 15 minutes at 3000 rpm and stored at -80°C , until analysis. Cytokines concentrations were measured in duplicates using commercial ELISA kits (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's protocol. The minimum detectable levels for cytokines were as follows: 1.0 pg/mL (IL-1 β), 0.7 pg/mL (IL-6) and 5.5 pg/mL (TNF- α).

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range (25th-75th centile). To evaluate the association between categorical variables chi-square test was used. Regarding the correlation between quantitative variables Spearman correlation rank was applied. To compare two groups concerning quantitative variables it was employed the Mann-Whitney U test, and to compare more than two groups, Kruskal-Wallis test. Linearity was tested and logarithm adjustment was performed. For multivariate analysis, linear regression was applied to assess the association between cytokine levels, disease severity and nutritional status. Data were considered significant at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Subjects

Study population median (25th - 75th centile) age was 60 (17-116) months. BA was the main cause of chronic liver disease (72%). Eight patients had no clinical or laboratory signs of

cirrhosis at the time of enrollment. Regarding Child-Pugh score, cirrhotic patients were distributed as follows: 57.1% Child-Pugh A, a mild presentation of the disease, 34.3% Child-Pugh B, a moderate stage of cirrhosis and 8.6% Child-Pugh C, considered severe cases. PELD and MELD scores were above the cutoff point of 15 in only 5 cases. Complete demographic and clinical data are shown in Table 1.

Nutritional status

Malnutrition detected among children and adolescents with chronic liver disease was equal to 11.6% and 23.3% were considered at risk of malnutrition. The frequency of nutritional risk (risk of malnutrition plus malnutrition) was higher in children under 2 years, corresponding to 61.5% in this age group ($P = 0.037$). With respect to linear growth, a frequency of 23.3% of low height-for-age was found.

Cytokine assessment

Overall median (25th - 75th centile) levels detected for IL-1 β , IL-6 and TNF- α were, respectively, 0.07 (0-0.30) pg/mL, 2.2 (0.58-6.8) pg/mL and 8.3 (4.6-11.9) pg/mL. There was no association between sex and cytokines values distribution. Both IL-6 and TNF- α levels were different between age groups ($P = 0.004$; $P = 0.003$).

We found an inverse correlation between IL-6 and TSF/A ($r_s = -0.61$; $P < 0.001$), IL-6 and MUAC/A ($r_s = -0.51$; $P = 0.001$), IL-6 and H/A ($r_s = -0.34$; $P = 0.023$). IL-1 β correlated inversely only with TSF/A ($r_s = -0.41$; $P = 0.006$). There was no correlation between serum TNF- α and TSF/A.

IL-6 values were significantly increased in patients at nutritional risk ($P = 0.02$). Cytokines levels in well-nourished children with chronic liver disease compared to those at nutritional risk are presented in Table 2.

Relationship between cytokines and disease severity

Cytokines levels and laboratory tests showed a positive correlation, especially between IL-6 and the following routine tests: CRP ($r_s = 0.76$; $P < 0.001$), conjugated bilirubin ($r_s = 0.72$; $P < 0.001$), AST ($r_s = 0.70$; $P < 0.001$) and ALT ($r_s = 0.49$; $P = 0.001$). With regards to serum albumin, this cytokine correlated inversely with IL-6 levels ($r_s = -0.80$; $P < 0.001$).

A strong correlation was verified between IL-6 and PELD score ($r_s = 0.79$; $P < 0.001$) and also between TNF- α and MELD score ($r_s = 0.76$; $P = 0.017$).

L-1 β levels showed no association with liver disease severity assessed through Child-Pugh, PELD and MELD scores in our study population. TNF- α levels were associated with PELD ($P = 0.026$) and Child-Pugh score ($P = 0.050$).

IL-6 levels also showed significant association with liver disease severity evaluated by both PELD score ($P = 0.014$) and Child-Pugh score ($P = 0.001$). The distribution of this cytokine among Child-Pugh's categories A, B and C is shown in Figure 1. In the multivariate model, IL-6 remained associated with disease severity measured by Child-Pugh score and PELD/MELD scores, after adjustment for nutritional status as presented in Table 3.

DISCUSSION

This study assessed the role of serum proinflammatory cytokines in the nutritional status of children and adolescents with chronic liver disease. We demonstrated that IL-6 levels were significantly increased in children and adolescents at nutritional risk enrolled in our study. To our knowledge, this is the first study to analyze the relationship between cytokine levels and nutritional status in children and adolescents with chronic liver disease.

Our results agreed with previous findings which suggested that serum concentrations of IL-6 could be used to identify patients at risk of nutritional deterioration (34). Illness-related malnutrition appears to display an association with inflammatory components through increased resting energy expenditure, decreased calorie consumption, anorexia, nutrient loss, altered nutrient utilization and malabsorption (20). This concept seems to be appropriate for children and adolescents with chronic liver disease who have an intense protein catabolism, changes in body composition and muscle loss.

Increased resting energy expenditure could be related to weight and growth impairment in pediatric chronic liver disease, which may be approximately 30% higher compared to a healthy child (35). This hypermetabolic state could be due to inflammation by the presence of ascending cholangitis, ascites and disordered substrate and energy uptake (15). Also, altered intestinal permeability with consequent endotoxemia is directly linked to increased cytokine production observed in cirrhosis. It is suggested that malnourished cirrhotic patients have increased intestinal permeability compared to those well-nourished (36), data which could explain the higher levels of IL-6 found in our patients at nutritional risk. However, in cirrhotic adults, increased systemic levels of IL-6 did not correlate with body mass index (37). We can assume that there are still conflicting data related to the

possible relationship between malnutrition and proinflammatory cytokines production, particularly in chronic liver disease.

The pathophysiology of malnutrition is thought to be the combined influence of undernutrition and inflammatory activity in body composition (38). It is well established that the presence of inflammatory activity induces peripheral loss of lean body mass (24). In our study, we found strong inverse correlation between IL-6 and TSF/A z-score, a parameter of body composition. This finding agrees with a possible link between loss of lean body mass and inflammatory activity. However, these associations were not confirmed for IL-1 β and TNF- α , likewise in a study with cystic fibrosis patients (39). Anthropometric parameters, such as TSF/A, are important tools for nutritional assessment of cirrhotic patients, especially at advanced stages of the disease. It has been reported correlation between liver disease severity, estimated by liver function tests and impaired nutritional status, measured by anthropometric markers (40).

Concerning nutritional assessment tools, it is well known that serum albumin shows low sensitivity and specificity as a marker of nutritional status, especially in patients with liver disease. Furthermore, it is assumed that albumin could point out the presence of inflammation (41). Agreeing with this theoretical assumption, we found a strong inverse correlation between IL-6 levels and albumin. Regarding the relationship between CRP and IL-6, a positive correlation was detected in our study, once this cytokine stimulates the release of CRP by the liver during the acute phase of inflammation. A recent study reported that this acute-phase protein could also be used as a tool to predict short-term mortality in severe hospitalized cirrhotic patients (42).

Recent studies have suggested that IL-6 plays an important role in the pathogenesis of several diseases (43, 44). Focusing on liver disease patients, it seems to be an imbalance between proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in cirrhosis. The activated Kupffer cells of the liver are involved in cytokine secretion. A study comparing children with BA and intra-hepatic cholestatic diseases reported higher values of IL-6 in the BA group, indicating the presence of chronic inflammation. Nevertheless, there was no mention of patient's nutritional status. The authors concluded that IL-6 could contribute in determining disease severity (45). In our study, it was found an association between liver disease severity, assessed by Child-Pugh score, and increased IL-6 levels, indicating that our findings seem to be consistent with current data.

Increased lipid oxidation and decreased glucose uptake was proven by indirect calorimetry in cirrhotic patients; and this metabolic abnormality was reported to be correlated

to disease severity and circulating levels of TNF- α (46). In our study, TNF- α levels were also associated with liver disease severity, but not with nutritional status assessed by anthropometric parameters. IL-1 β levels were not significantly related to outcomes in our study. However, it is well established that proinflammatory cytokines can act through stimulating each other's production (47). We can speculate that this may have occurred in our study, since IL-1 β could be somehow stimulating IL-6 and TNF- α production.

The small amount of severe liver disease patients (Child-Pugh C) in our study population may be a limitation; however the enrollment was done in the outpatient clinic. The strength of this study is that we found the relationship between high IL-6 levels in children and adolescents with chronic liver disease at nutritional risk. Even though we cannot assure the cause of increased IL-6 levels, either malnutrition or chronic liver disease, or both.

CONCLUSIONS

We showed a relationship between high IL-6 levels and nutritional status in children and adolescents with chronic liver disease. Our findings suggest that inflammatory activity appears to be part of the evolution of pediatric chronic liver disease. Extensive knowledge of this inflammatory panorama is of main importance in our field, enabling the creation of new approaches to nutritional support. Further research is required to evaluate the effect of dietary intervention on inflammatory response, in children and adolescents with chronic liver disease.

REFERENCES

1. Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia. *Lancet* 2009;374:1704-1713.
2. Jimenez-Rivera C, Jolin-Dahel KS, Fortinsky KJ, et al. International incidence and outcomes of biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013;56:344-354.
3. Santos JL, Carvalho E, Bezerra JA. Advances in biliary atresia: from patient care to research. *Braz J Med Biol Res* 2010;43:522-527.
4. Carvalho E, Santos JL, Silveira TR, et al. Biliary atresia: the Brazilian experience. *J Pediatr (Rio J)* 2010;86:473-479.
5. Suchy FJ. Neonatal cholestasis. *Pediatr Rev* 2004;25:388-396.
6. Davenport M. Biliary atresia: clinical aspects. *Semin Pediatr Surg* 2012;21:175-184.

7. Kelly DA, Davenport M. Current management of biliary atresia. *Arch Dis Child* 2007;92:1132-1135.
8. Shneider BL, Abel B, Haber B, et al. Portal hypertension in children and young adults with biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;55:567-573.
9. Tsouka A, McLin VA. Complications of chronic liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36:262-267.
10. Utterson EC, Shepherd RW, Sokol RJ, et al. Biliary atresia: clinical profiles, risk factors, and outcomes of 755 patients listed for liver transplantation. *J Pediatr* 2005;147:180-185.
11. DeRusso PA, Ye W, Shepherd R, et al. Growth failure and outcomes in infants with biliary atresia: a report from the Biliary Atresia Research Consortium. *Hepatology* 2007;46:1632-1638.
12. Barshes NR, Chang IF, Karpen SJ, et al. Impact of pretransplant growth retardation in pediatric liver transplantation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43:89-94.
13. Hartman C, Shamir R, Hecht C, et al. Malnutrition screening tools for hospitalized children. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012;15:303-309.
14. Merli M, Giusto M, Gentili F, et al. Nutritional status: its influence on the outcome of patients undergoing liver transplantation. *Liver Int* 2010;30:208-214.
15. Nightingale S, Ng VL. Optimizing nutritional management in children with chronic liver disease. *Pediatr Clin North Am* 2009;56:1161-1183.
16. Sanchez AJ, Aranda-Michel J. Nutrition for the liver transplant patient. *Liver Transpl* 2006;12:1310-1316.
17. McKiernan P. Neonatal jaundice. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36:253-256.
18. Dornelles CT, Goldani HA, Wilasco MI, et al. Ghrelin, leptin and insulin in cirrhotic children and adolescents: relationship with cirrhosis severity and nutritional status. *Regul Pept* 2013;180:26-32.
19. Neto JS, Pugliese R, Fonseca EA, et al. Four hundred thirty consecutive pediatric living donor liver transplants: variables associated with posttransplant patient and graft survival. *Liver Transpl* 2012;18:577-584.
20. Mehta NM, Corkins MR, Lyman B, et al. Defining pediatric malnutrition: a paradigm shift toward etiology-related definitions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2013;37:460-481.
21. White JV, Guenter P, Jensen G, et al. Consensus statement: Academy of Nutrition and Dietetics and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: characteristics recommended for the identification and documentation of adult malnutrition (undernutrition). *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2012;36:275-283.
22. Zoico E, Roubenoff R. The role of cytokines in regulating protein metabolism and muscle function. *Nutr Rev* 2002;60:39-51.
23. Soeters PB, Reijven PL, van Bokhorst-de van der Schueren MA, et al. A rational approach to nutritional assessment. *Clin Nutr* 2008;27:706-716.

24. Soeters PB, Schols AM. Advances in understanding and assessing malnutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:487-494.
25. Nobili V, Marcellini M, Giovannelli L, et al. Association of serum interleukin-8 levels with the degree of fibrosis in infants with chronic liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39:540-544.
26. Kobayashi H, Yamataka A, Lane GJ, et al. Levels of circulating antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist and proinflammatory cytokines at different stages of biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2002;37:1038-1041.
27. Narayanaswamy B, Gonde C, Tredger JM, et al. Serial circulating markers of inflammation in biliary atresia-evolution of the post-operative inflammatory process. *Hepatology* 2007;46:180-187.
28. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, et al. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60:646-649.
29. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001;33:464-470.
30. McDiarmid SV, Anand R, Lindblad AS, et al. Development of a pediatric end-stage liver disease score to predict poor outcome in children awaiting liver transplantation. *Transplantation* 2002;74:173-181.
31. World Health Organization. WHO Child Growth Standards: Methods and development: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age. Geneva: World Health Organization ; 2006.
32. World Health Organization. WHO Child Growth Standards: Methods and development: Head circumference-for-age, arm circumference-for-age, triceps skinfold-for-age and subscapular skinfold-for-age. Geneva: World Health Organization; 2007.
33. Frisancho A. Anthropometric Standards An Interactive Nutritional Reference of Body Size and Body Composition for Children and Adults. 2nd ed. Michigan: University of Michigan Press; 2008.
34. Mehta NM, Duggan CP. Nutritional deficiencies during critical illness. *Pediatr Clin North Am* 2009;56:1143-1160.
35. Greer R, Lehnert M, Lewindon P, et al. Body composition and components of energy expenditure in children with end-stage liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:358-363.
36. Norman K, Pirlich M. Gastrointestinal tract in liver disease: which organ is sick? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:613-619.
37. Wiest R, Weigert J, Wanninger J, et al. Impaired hepatic removal of interleukin-6 in patients with liver cirrhosis. *Cytokine* 2011;53:178-183.
38. Meijers JM, van Bokhorst-de van der Schueren MA, Schols JM, et al. Defining malnutrition: mission or mission impossible? *Nutrition* 2010;26:432-440.

39. King SJ, Nyulasi IB, Bailey M, et al (in press). Loss of fat-free mass over four years in adult cystic fibrosis is associated with high serum interleukin-6 levels but not tumour necrosis factor-alpha. *Clin Nutr* 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2013.04.012>.
40. Hurtado-López EF, Larrosa-Haro A, Vásquez-Garibay EM, et al. Liver function test results predict nutritional status evaluated by arm anthropometric indicators. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;45:451-457.
41. Jensen GL. Inflammation as the key interface of the medical and nutrition universes: a provocative examination of the future of clinical nutrition and medicine. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006;30:453-463.
42. Cervoni JP, Thévenot T, Weil D, et al. C-reactive protein predicts short-term mortality in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2012;56:1299-1304.
43. Beberashvili I, Sinuani I, Azar A, et al. IL-6 levels, nutritional status, and mortality in prevalent hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:2253-2263.
44. Jang JW, Oh BS, Kwon JH, et al. Serum interleukin-6 and C-reactive protein as a prognostic indicator in hepatocellular carcinoma. *Cytokine* 2012;60:686-693.
45. El-Faramawy AA, El-Shazly LB, Abbass AA, et al. Serum IL-6 and IL-8 in infants with biliary atresia in comparison to intrahepatic cholestasis. *Trop Gastroenterol* 2011;32:50-55.
46. Shiraki M, Terakura Y, Iwasa J, et al. Elevated serum tumor necrosis factor-alpha and soluble tumor necrosis factor receptors correlate with aberrant energy metabolism in liver cirrhosis. *Nutrition* 2010;26:269-275.
47. Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, et al. How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2009;102:215-222.

Table 1
Demographic and clinical data of the study population.

Variables	Patients (%) n = 43
Age (years)	
< 2	13 (30.2)
2 – 5	9 (20.9)
5 – 10	11 (25.6)
> 10	10 (23.3)
Female	23 (53.5)
Nutritional status*	
Well-nourished	28 (65.1)
Risk of malnutrition	10 (23.3)
Malnutrition	5 (11.6)
Causes of chronic liver disease	
Biliary atresia	31 (72)
Alpha-1 antitrypsin deficiency	6 (14)
Sinusoidal obstruction syndrome	1 (2.3)
Idiopathic chronic liver disease	1 (2.3)
Cirrhosis caused by cytomegalovirus	1 (2.3)
Cryptogenic cirrhosis	3 (7)
Cholestasis (CB \geq 2.0 mg/dL)	12 (27.9)
Albumin (< 3.5 g/L)	12 (27.9)
Portal hypertension	24 (55.8)
Ascites	3 (7)
Hepatomegaly	25 (58.1)
Splenomegaly	32 (74.4)
Cirrhosis	35 (81.4)
Child-Pugh score	
A	20/35 (57.1)
B	12/35 (34.3)
C	3/35 (8.6)
PELD score (> 15)	4/27 (14.8)
MELD score (> 15)	1/8 (12.5)

CB: Conjugated Bilirubin. **PELD:** Pediatric End Stage Liver Disease; **MELD:** Model for End Stage Liver Disease

*Parameters used for nutritional assessment: triceps skinfold-for-age and body mass index-for-age.

Table 2

Cytokines levels in children with chronic liver disease at nutritional risk vs well-nourished.

Cytokine	Nutritional risk	Well-nourished	<i>P</i> †
Interleukin-1 β (pg/mL)	0.10 (0-0.66)	0.05 (0-0.28)	0.144
Interleukin-6 (pg/mL)	7.12 (0.58-34.23)	1.63 (0.53-3.43)	0.02
TNF-α (pg/mL)	10.74 (8.17-12.35)	6.66 (4.28-11.26)	0.88

TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha.

Data expressed as median (25th-75th centile).

† Mann-Whitney U test.

Table 3

Multiple linear regression models for interleukin-6 levels adjusted for liver disease severity and nutritional status.

Models ^a	Beta	<i>P</i>
Child-Pugh score ^b	0.581	<0.001
PELD/MELD score ^c	0.535	0.001

^a Logarithmic transformation was applied.

^b Adjusted for nutritional status. $R^2 = 37.8\%$.

^c Adjusted for nutritional status. $R^2 = 30.6\%$.

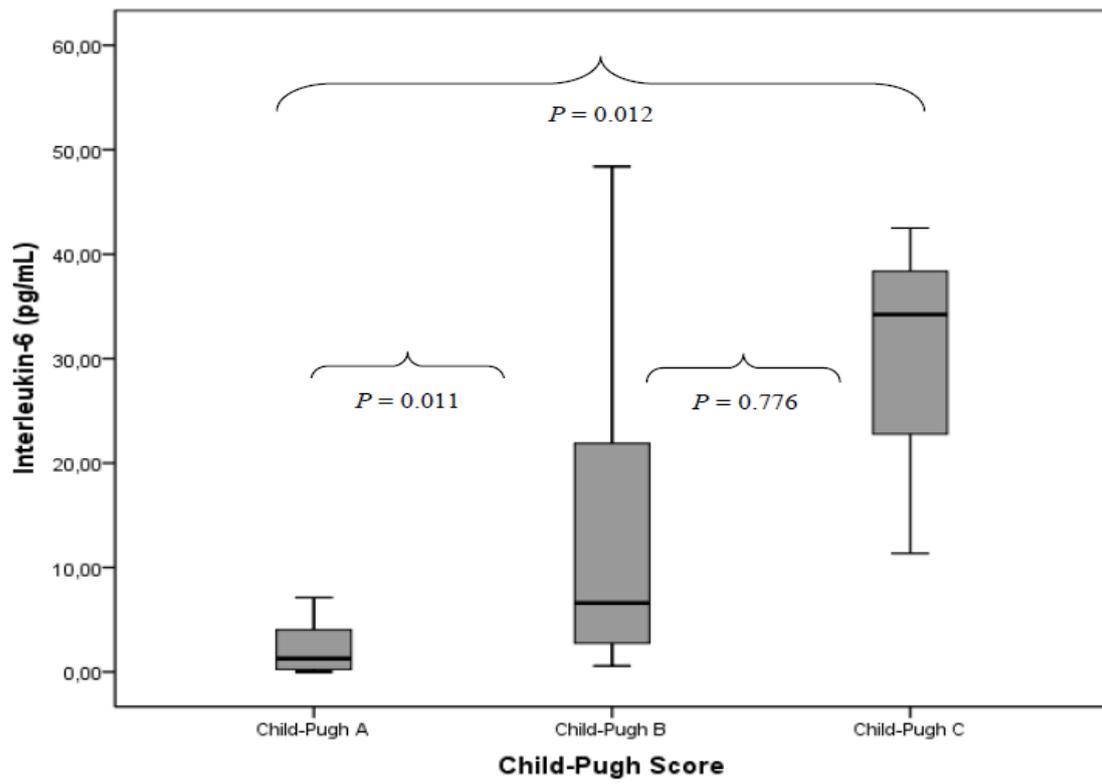


Figure 1

Interleukin-6 levels in children and adolescents with chronic liver disease according to Child-Pugh score.