

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PEDIATRIA

**DENSITOMETRIA ÓSSEA E FOSFATASEMIA  
ALCALINA ESQUELÉTICA EM CRIANÇAS E  
ADOLESCENTES COM COLESTASE CRÔNICA**

**SANDRA MARIA GONÇALVES VIEIRA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Medicina: Pediatria, para  
obtenção do título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira

Coorientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre

1995

20021

MED

05187418

T

WS310 V658d 1995

[000172580] Vieira, Sandra Maria Goncalves.  
Densitometria ossea e fosfatasemia alcalina  
esqueletica em crianas e adolescentes com  
colestase crônica. 1995. 196 f. : il. color.

***“ ... idéias vêm ao mundo tão suavemente quanto os pombos. Talvez por isso, se escutarmos atentamente, ouviremos, por entre o bulício de impérios e nações, um suave bater de asas, a terna agitação de vida e esperança. Alguns dirão que esta esperança repousa numa nação; outros num homem. No entanto acredito que ela é despertada, revivida e alimentada por milhões de pessoas isoladamente, cujos feitos e ações cotidianas ultrapassam as fronteiras e as implicações mais indisfarçáveis da história... Cada homem e todos os homens, sobre os alicerces do seu próprio sofrimento e de suas alegrias, constroem o porvir “***

***Albert Camus***

***Aos meus pais: meu alicerce, o amor que me ensinou a  
nunca desistir dos meus sonhos.***

***Ao Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, grande alicerce deste estudo, onde cada momento foi partilhado, vivido e festejado.***

## **AGRADECIMIENTO ESPECIAL**

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

***“ ... no processo de orientar, o orientador atende, responde, personaliza e orienta. Como consequência, o orientando se envolve, explica onde está, compreende onde quer chegar e age para chegar lá, numa verdadeira integração onde orientador e orientando se envolvem na troca de saberes.”***

À Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira, pela boa acolhida, pelo grande incentivo, pelo exemplo de pesquisadora incansável e profundamente criativa, pelo dia-a-dia compartilhado.

Ao Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, pela dedicação, seriedade, companheirismo e dinamismo demonstrados no acompanhamento deste estudo. Por ter me ensinado, na prática, a inestimável importância do trabalho em equipe, especialmente, pelo carinho de amigo.

# **AGRADECIMENTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

- À Dra Beatriz Amaral, pela orientação radiológica, pelo espírito de pesquisadora e principalmente pelas extremas competência e boa vontade demonstradas no decorrer do estudo radiológico.

- Aos funcionários da clínica RADIMAGEM pelo excelente atendimento dispensados aos pacientes e a minha pessoa.

- Aos professores Almira Maria Vinhaes Dantas, Jorge Carvalho Guedes e Hugo da Costa Ribeiro Júnior da Universidade Federal da Bahia - o primeiro incentivo à carreira acadêmica.

- Aos amigos gaúchos: Adelar Nora, Alexandre Islabão, Angela Islabão, Daniel Nora, Débora Duro, Ivo Prolla, Rosimeri Alves e Susana Luft - “é tão bonito quando a gente sente que nunca está sózinho por mais que pense estar”.

- À Dra. Silmara Moura Maia, pelo estímulo e companheirismo.

- À Dra. Elza D. de Mello, por parte da minha formação em gastroenterologia infantil, pelo exemplo de pessoa humana, pelo apoio de amiga.

- Aos amigos: Carmem Maria Andrade Pinheiro, Eгна Rossato, Gledison José Gastaldo, Maria Luíza Leão Brisolará, Rosalva M. B. Pereira, Vera Lúcia Haas, Jorge Barjeski pelas sugestões, estímulo e principalmente pela solidariedade.

- À Lya Luft, pela inestimável ajuda a adequação da língua portuguesa.

- À Dra. Carmem Pilla, pela inestimável ajuda, pelo treinamento de informática e especialmente pelo grande exemplo de boa vontade.
- À Dra. Viviane Rocha de Barros pelas sugestões durante a digitação do banco de dados e da redação de toda a dissertação.
- À Estatística Lúcia do Carmo Sousa Cabrita do Nascimento pela orientação estatística.
- À Dra. Mary C. Buseti, pela ajuda com os dados epidemiológicos e pelo empenho junto à Comissão de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- Ao Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti, pelas importantes sugestões nas redações do *abstract* e do material e métodos.
- À Zuleica Santos pela qualidade da impressão deste estudo e paciência.
- Ao Ricardo Pilla Kronbauer pelo trabalho, extremamente habilidoso com as figuras 2, 4 e 5.
- Aos residentes Carmem Vinhas, Daniel Nora, Isabel Delgado, Rita de Cássia Silveira, pelo encaminhamento de crianças e adolescentes normais.
- Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani pelo empenho na importação da lectina de germe de trigo.
- Ao Prof. José Sisson de Castro, gentil colaboração em nos ceder os soros de pacientes com doença de Paset.
- À minha terapeuta, Dra. Fernanda Menezes por me ajudar a entender que “nós seres humanos como iguais não somos sempre iguais e por sermos humanos, temos todos necessidade de ajuda”.
- A cada paciente e a cada criança normal, que com o consentimento de seus pais possibilitaram a realização desta pesquisa.

# SUMÁRIO

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	13
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	16
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	19
<b>RESUMO</b> .....	25
<b>ABSTRACT</b> .....	30
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	32
1.1. Colestase crônica em crianças e adolescentes .....	33
1.2. O tecido ósseo - considerações gerais .....	39
1.3. Alterações ósseas relacionadas à colestase crônica .....	61
<b>2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO</b> .....	71
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	73
3.1. Objetivos Gerais.....	74
3.2. Objetivos Específicos .....	74
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	76
4.1. Aspectos gerais .....	76
4.2. Estudo bioquímico .....	77
4.3. Estudo radiológico .....	94
<b>5. MÉTODO ESTATÍSTICO</b> .....	100
<b>6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	102

<b>7. RESULTADOS</b> .....	104
7.1. Pacientes: características demográficas, antropométricas e clínico-laboratoriais .....	106
7.2. Estudo bioquímico .....	119
7.3. Estudo radiológico: densitometria óssea em crianças e adolescentes com colestase crônica .....	136
<b>8. DISCUSSÃO</b> .....	148
8.1. Pacientes: características demográficas, antropométricas e clínico-laboratoriais .....	149
8.2. Estudo bioquímico.....	155
8.3. Estudo radiológico: densitometria óssea em crianças e adolescentes com colestase crônica .....	166
8.4. Osteopenia e hiperfosfataseia alcalina esquelética em crianças e adolescentes com colestase crônica .....	171
<b>9. CONCLUSÕES</b> .....	174
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	177
<b>ANEXOS</b> .....	188

## **LISTA DE FIGURAS**

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	- Repercussões clínicas da colestase crônica.....	37
<b>FIGURA 2</b>	- Seqüência do remodelamento ósseo.....	44
<b>FIGURA 3</b>	- Alterações ósseas relacionadas à colestase crônica.....	62
<b>FIGURA 4</b>	- O equipamento de densitometria óssea de dupla emissão, fonte de raios X .....	96
<b>FIGURA 5</b>	- Análise computadorizada da densidade óssea da coluna lombar por densitometria óssea de dupla emissão, fonte de raios X .....	98
<b>FIGURA 6</b>	- Distribuição dos pacientes por etiologia da colestase (n = 32): estudo bioquímico .....	108
<b>FIGURA 7</b>	- Distribuição dos pacientes por etiologia da colestase (n = 20): estudo radiológico .....	108
<b>FIGURA 8</b>	- Distribuição dos sinais e sintomas observados em 32 pacientes por ocasião da densitometria óssea .....	110
<b>FIGURA 9</b>	- Curva de inativação térmica da fosfatase alcalina total em 6 diferentes tempos de incubação das amostras a 56° C: soros de crianças e adolescentes normais .....	124

- FIGURA 10 -** Comparação entre valores de densidade óssea mineral ( $\text{g/cm}^2$ ) observados em pacientes do sexo feminino e os respectivos valores normais, segundo Thomas e colaboradores ..... 141
- FIGURA 11 -** Comparação entre valores de densidade óssea mineral ( $\text{g/cm}^2$ ) observados em pacientes do sexo masculino, segundo Thomas e colaboradores ..... 141

# **LISTA DE QUADROS**

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1</b>	- Classificação da colestase na infância .....	36
<b>QUADRO 2</b>	- Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo .....	49
<b>QUADRO 3</b>	- Características bioquímicas das múltiplas formas de fosfatase alcalina humana .....	52
<b>QUADRO 4</b>	- Técnicas para medidas da massa óssea .....	60
<b>QUADRO 5</b>	- Estudos relacionados a osteodistrofia hepática em adultos .....	65
<b>QUADRO 6</b>	- Avaliação nutricional segundo o escore Z .....	81
<b>QUADRO 7</b>	- Avaliação nutricional segundo o critério de Gomez.....	81
<b>QUADRO 8</b>	- Avaliação nutricional segundo os critérios de Waterlow .....	82
<b>QUADRO 9</b>	- Estudos relacionados a osteodistrofia hepática em pediatria: distribuição dos pacientes por idade e sexo..	151
<b>QUADRO 10</b>	- Estudos relacionados a osteodistrofia hepática em pediatria: prevalência de osteopenia .....	168

## **LISTA DE TABELAS**

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA I</b>	- Tamanho do fígado em crianças .....	80
<b>TABELA II</b>	- Distribuição dos pacientes por idade, sexo e etiologia da colestase .....	107
<b>TABELA III</b>	- Distribuição de crianças e adolescentes normais por idade e sexo .....	109
<b>TABELA IV</b>	- Concentrações séricas de bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD), albumina (ÁLB), atividades de aminotransferases (AST/ALT), gama glutamiltransferase ( $\gamma$ GT), 5 nucleotidase (5'N) e valores de tempo de protrombina (TP) .....	112
<b>TABELA V</b>	- Concentrações séricas de cálcio (corrigidas pela albumina), fósforo e magnésio .....	115
<b>TABELA VI</b>	- Distribuição dos pacientes em relação ao estado nutricional de acordo com o escore Z .....	117
<b>TABELA VII</b>	- Distribuição dos pacientes em relação ao estado nutricional de acordo com o critério de Gomez .....	118

<b>TABELA VIII</b>	- Distribuição dos pacientes em relação ao estado nutricional de acordo com os critérios de Waterlow .....	118
<b>TABELA IX</b>	- Comparação entre os valores médios de fosfatase alcalina total nos grupos de pacientes e indivíduos normais .....	119
<b>TABELA X</b>	- Atividades de fosfatase alcalina total (fosfatasemia): correlação entre resultados fornecidos pela literatura (Meits,1977) e resultados observados neste estudo, em relação a faixa etária.....	120
<b>TABELA XI</b>	- Resultados das atividades de fosfatase alcalina total (fosfatasemia alcalina) e fosfatase alcalina esquelética (método da precipitação por lectina) em 23 pacientes com colestase crônica .....	121
<b>TABELA XII</b>	- Resultados das atividades de fosfatase alcalina esquelética (método da precipitação por lectina) em 10 crianças e adolescentes normais .....	122
<b>TABELA XIII</b>	- Comparação entre os valores médios de atividades da fosfatase alcalina esquelética (método da precipitação da lectina de germe de trigo) nos grupos de pacientes e indivíduos normais (teste U de Mann Whitney).....	123

<b>TABELA XIV</b>	- Resultados das atividades de fosfatase alcalina total (fosfatasemia) e fosfatase alcalina esquelética (método da inativação pelo calor) em 23 pacientes com coléctase crônica .....	125
<b>TABELA XV</b>	- Resultados das atividades de fosfatase alcalina total (fosfatasemia) e fosfatase alcalina esquelética (método da inativação pelo calor) em 16 crianças e adolescentes normais .....	126
<b>TABELA XVI</b>	- Comparação entre os valores médios de atividades de fosfatase alcalina esquelética nos grupos de pacientes e indivíduos normais .....	127
<b>TABELA XVII</b>	- Estudo de correlação entre os métodos bioquímicos estudados para determinação da atividade da fosfatase alcalina esquelética.....	128
<b>TABELA XVIII</b>	- Estudo da exatidão dos métodos: atividade de fosfatase alcalina total (fosfatasemia) e fosfatase alcalina esquelética em 4 pacientes adultos com doença de Paget.....	129
<b>TABELA XIX</b>	- Reprodutibilidade dos métodos .....	131
<b>TABELA XX</b>	- Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e avaliação nutricional segundo o escore Z (teste U de Mann Whiyney) .....	132

- TABELA XXI** - Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e avaliação nutricional segundo o critério de Gomez (teste U de Mann Whitney) ..... 133
- TABELA XXII** - Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e estado nutricional segundo os critérios de Waterlow (teste U de Mann Whitney) ... 133
- TABELA XXIII** - Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e estágios de desnutrição segundo os critérios de Waterlow (teste U de Mann Whitney) .... 134
- TABELA XXIV** - Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética, tempo de colestase e provas de “função” hepática ..... 135
- TABELA XXV** - Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e concentrações séricas de cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg) ..... 136
- TABELA XXVI** - Análise de regressão múltipla para verificação da influência do peso, estatura e idade sobre a densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) de pacientes do sexo feminino ... 137
- TABELA XXVII** - Análise de regressão múltipla para verificação da influência do peso, estatura e idade sobre a densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) de pacientes do sexo masculino . 138

<b>TABELA XXVIII</b>	- Estudo de correlação entre densidade óssea mineral (g/cm <sup>2</sup> ) e estágios de puberdade, determinado pela idade cronológica.....	138
<b>TABELA XXIX</b>	- Comparação entre valores de densidade óssea mineral (g/cm <sup>2</sup> ) observados em pacientes do sexo feminino e os respectivos valores normais para idade.....	139
<b>TABELA XXX</b>	- Comparação entre valores de densidade óssea mineral (g/cm <sup>2</sup> ) observados em pacientes do sexo masculino e os respectivos valores normais para idade .....	140
<b>TABELA XXXI</b>	- Estudo de correlação entre densidade óssea mineral (g/cm <sup>2</sup> ) e avaliação nutricional de acordo com o escore Z (teste U de Mann Whitney) .....	142
<b>TABELA XXXII</b>	- Estudo de correlação entre densidade óssea mineral (g/cm <sup>2</sup> ) e avaliação nutricional de acordo com o critério de Gomez (teste U de Mann Whitney) .....	143
<b>TABELA XXXIII</b>	- Estudo de correlação entre densidade óssea mineral (g/cm <sup>2</sup> ) e estado nutricional segundo a classificação de Waterlow (teste U de Mann Whitney) .....	143
<b>TABELA XXXIV</b>	- Estudo de correlação entre densidade óssea mineral (g/cm <sup>2</sup> ) e estágios de desnutrição segundo os critérios de Waterlow (teste U de Mann Whitney) .....	144

## RESUMO

## RESUMO

Osteopenia pode acometer tanto adultos quanto crianças e adolescentes com colestase crônica. Os estudos envolvendo a faixa etária pediátrica são escassos e dependem de métodos indiretos de avaliação do metabolismo ósseo, desde que existem restrições à realização de biópsia óssea nesta faixa etária.

A densitometria óssea de dupla emissão com fonte de raios X é atualmente, o melhor método radiológico de determinação da densidade óssea mineral já devidamente validado para utilização em crianças. A determinação da fosfatase alcalina esquelética, enzima abundante nos osteoblastos (células que sintetizam a matriz óssea) é um bom marcador bioquímico da formação óssea.

Os objetivos gerais deste estudo foram determinar a densidade óssea mineral de crianças e adolescentes com colestase crônica, por densitometria óssea de dupla emissão com fonte de raios X, a atividade de fosfatase alcalina esquelética e estudar as eventuais relações destas variáveis com tempo de colestase, estado nutricional, provas de "função" hepática e concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio.

A pesquisa foi dividida em dois estudos: bioquímico e radiológico. Na etapa bioquímica, dois métodos de determinação da atividade da fosfatase alcalina esquelética foram testados quanto às suas exatidão e precisão: os métodos da precipitação por lectina e da inativação pelo calor. Posteriormente, foi determinado o melhor método e procedeu-se aos estudos de correlação entre

atividade da enzima, estado nutricional, provas de “função” hepática e concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio. Participaram deste estudo 32 crianças com idade variando de 0,5 a 18 anos. Na etapa radiológica, determinou-se a densidade óssea mineral de 20 crianças com idade variando entre 3 e 18 anos, utilizando-se o método de densitometria de dupla emissão com fonte de raios X. A exemplo do estudo bioquímico, foram realizados estudos de correlação entre densidade óssea mineral, avaliação nutricional, provas de “função” hepática, concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio e atividade de fosfatase alcalina esquelética.

O método da inativação pelo calor para determinação da atividade da fosfatase alcalina esquelética, à incubação das amostras a 56<sup>o</sup> C por 10 minutos foi superior ao método da precipitação da lectina de germe de trigo. Hiperfosfatasemia alcalina esquelética foi observada em 97% dos pacientes estudados, não havendo correlação estatisticamente significativa entre atividade desta enzima, estado nutricional, provas de “função” hepática e concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio. Todos os pacientes apresentaram diminuição da densidade óssea mineral, entretanto nenhuma correlação, pode ser observada entre estes resultados, atividade da fosfatase alcalina esquelética e os demais parâmetros estudados.

Conclui-se que: (1) Para determinação da atividade da fosfatase alcalina esquelética, o método da inativação pelo calor à incubação das amostras a 56<sup>o</sup>C por 10 minutos foi um método simples, exato e preciso. (2) Hiperfosfatasemia alcalina esquelética e osteopenia foram comuns a 97% dos pacientes estudados. Nenhuma correlação estatisticamente significativa foi observada entre estes

resultados e tempo de colestase, testes de “função” hepática e concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio.

# **ABSTRACT**

## **ABSTRACT**

Osteopenia is a common occurrence not only in adults but also in children and adolescents with chronic cholestasis. Few pediatric studies are reported in the literature. All of them using indirect methods to assess bone mineral metabolism since bone histomorphometry is an invasive technique not suitable for studies in children.

Dual-energy radiographic absorptiometry is the best non-invasive way of measuring bone density. It has yet to be validated in the pediatric age group. Bone alkaline phosphatase, an enzyme of osteoblasts, is a good marker of bone formation.

The main goals of this study were to assess the bone density of children and adolescents with chronic cholestasis by dual-energy radiographic absorptiometry, the bone alkaline phosphatase activity and to evaluate its correlation liver "function" tests length of cholestasis, nutritional status and serum concentration of calcium, phosphorus and magnesium.

The study was pursued following two approaches: a biochemical and a radiological one. Along the biochemical approach, two methods for quantification of the bone alkaline activity were tested: the method by heat inactivation and the method by lectin precipitation. Furthermore, the best method was chosen and correlation studies were made between enzymatic activity, nutritional status, liver

“function” tests and serum concentration of calcium, phosphorus and magnesium. Thirty-two subjects were evaluated (age 0,5 to 18 years). In the radiological study, the bone mineral density of 20 subjects (age 3 to 18 years) was assessed by dual-energy radiographic absorptiometry. Stastical correlations between bone density, nutritional status, liver “function” tests and serum concentrations of calcium, phosphorus and magnesium were analysed.

The heat inactivation assay was the best method for quantification of bone alkaline phosphatase activity in our experience. High bone alkaline phosphatase activity was observed in 97% of the patients but no significative statistical correlations were established between enzymatic activity, nutritional status, liver “function” tests and serum concentrations of calcium, phosphorus and magnesium. All patients presented bone undermineralization, although no correlation was observed among these results and bone alkaline phosphatase activity and the various parameters studied.

The conclusions are: (1) The heat inativavation assay for quantification of bone alkaline phosphatase activity is a simple, precise and an accurate method; (2) High bone alkaline phosphatase occurred in the majority of patients (97%). Osteopenia was observed in all patients. No statistical correlations were observed between these results and lenght of cholestasis, nutritional status, liver “function” tests and serum concentrations of calcium, phospurus and magnesium.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Colestase crônica em crianças e adolescentes

### 1.1.1. Aspectos etiopatogênicos e repercussões clínicas

## 1.2. O tecido ósseo - considerações gerais

### 1.2.1. Regulação do metabolismo ósseo

### 1.2.2. Estudo do metabolismo ósseo

#### 1.2.2.1. Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo

##### 1.2.2.1.1. Marcadores da formação óssea

##### 1.2.2.1.2. Marcadores de reabsorção óssea

#### 1.2.2.2. Avaliação radiológica da densidade óssea mineral

##### 1.2.2.2.1. Avaliação qualitativa da densidade óssea mineral

##### 1.2.2.2.2. Avaliação quantitativa da densidade óssea mineral

## 1.3. Alterações ósseas relacionadas à colestase crônica

### 1.3.1. Osteoporose

### 1.3.2. Raquitismo e osteomalácia

### 1.3.3. Osteodistrofia hepática

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Colestase crônica em crianças e adolescentes

### 1.1.1. Aspectos etiopatogênicos e repercussões clínicas

Secreção biliar é exclusiva do fígado e tem duas funções principais: excretar substâncias endógenas e exógenas do corpo como bilirrubinas e colesterol e promover a digestão e absorção intestinal de lipídeos. A bile é primariamente secretada no canalículo biliar, formada nos hepatócitos a partir de colesterol e por fim, transportada ao espaço intercelular. O processo habitual de secreção biliar envolve múltiplos transportadores e diversas vias metabólicas, ainda não totalmente elucidadas, mas com alguns aspectos bem definidos (Gerok, 1993): (1) o fluxo biliar é orientado pela existência de gradientes osmóticos entre o sangue, o espaço intercelular e os hepatócitos de um lado e o lúmen dos canalículos biliares de outro, sendo o fluxo transcelular e paracelular; (2) ácidos biliares conjugados são os solutos orgânicos mais concentrados na bile; (3) na ausência de ácidos biliares permanece um fluxo basal independente de ácido biliar relacionado à influência de ânions orgânicos e inorgânicos; (4) durante sua passagem pelos ductúlos biliares, a bile é modificada através da secreção e reabsorção de água e solutos.

Ao deixarem o fígado, os ácidos biliares primários alcançam os intestinos e, principalmente no intestino grosso são convertidos em ácidos biliares secundários pela ação de bactérias e retornam ao fígado pela circulação êntero-hepática, onde sofrem conjugação com aminoácidos (glicina e taurina), formando os sais biliares e estimulando nova síntese de ácido biliar. Assim entendida, a síntese hepática de ácido biliar é, portanto, um processo contínuo e determinada pela quantidade de ácidos biliares que voltam ao fígado na circulação êntero-hepática.

O principal papel fisiológico dos ácidos biliares no intestino delgado é promover a absorção lipídica, de modo que a deficiência de ácidos biliares associa-se à má absorção de gorduras e produtos lipossolúveis: os triglicerídeos dietéticos são hidrolisados por enzimas pancreáticas, e os principais produtos resultantes, monoglicerídeos e ácidos graxos, na ausência de ácidos biliares não são convertidos em micelas, tornando a absorção lipídica lenta e deficiente, principalmente no que se refere a produtos lipossolúveis de muito baixa solubilidade em meio aquoso como é o caso das vitaminas A, D, E e K (Hoffman, 1993).

Na infância, mais precisamente no período neonatal, a capacidade de formação e excreção da bile hepática é incompleta, havendo um aumento progressivo da concentração de ácidos biliares a medida em que ocorrem maturação das vias metabólicas de biossíntese de ácido biliar e aumento da capacidade de transporte hepático e intestinal destes. Isto se dá em torno do primeiro ano de vida e reflete-se pelo aumento gradual do *pool* de ácido biliar, das concentrações de ácidos biliares intraluminais e presumivelmente da

secreção biliar (Suchi, 1994).

Colestase é o impedimento do fluxo biliar canalicular independente do local do obstáculo e/ou da causa que o determinou. A definição costuma envolver aspectos clínicos, fisiopatológicos e morfológicos. Clinicamente, colestase refere-se à presença de prurido e/ou icterícia com hiperbilirrubinemia conjugada, elevação da atividade de fosfatase alcalina, 5' nucleotidase e gama glutamiltransferase (Erling, 1993). Fisiopatologicamente, há uma falência excretória do hepatócito com conseqüente acúmulo no sangue de produtos normalmente excretados pela bile. Morfologicamente, colestase significa presença de pigmento biliar nos hepatócitos e canálculos biliares - "bilirrubinoestase" - e alterações hepatocitárias típicas possivelmente relacionadas ao acúmulo de sais biliares - "colato-estase" (Desmet, 1993).

Hiperbilirrubinemia conjugada na infância é o sinal mais importante de doença hepática ou biliar subjacente, encontrada em aproximadamente 1 a cada 500 nascidos vivos (Mowat, 1994), sendo responsável por mais de 50% dos encaminhamentos a serviços terciários de hepatologia pediátrica (Trivedi, Miele-Vergani & Mowat, 1993).

Diferentes agentes etiológicos podem ser responsáveis por icterícia colestática na infância (Quadro 1), estando os pacientes agrupados em duas grandes categorias; colestase intra-hepática que refere-se a pacientes com hepatopatia definida e os casos de hepatite neonatal e colestase extra-hepática, a maioria, atresia biliar extra-hepática.

**Quadro 1: Classificação da colestase na infância\***

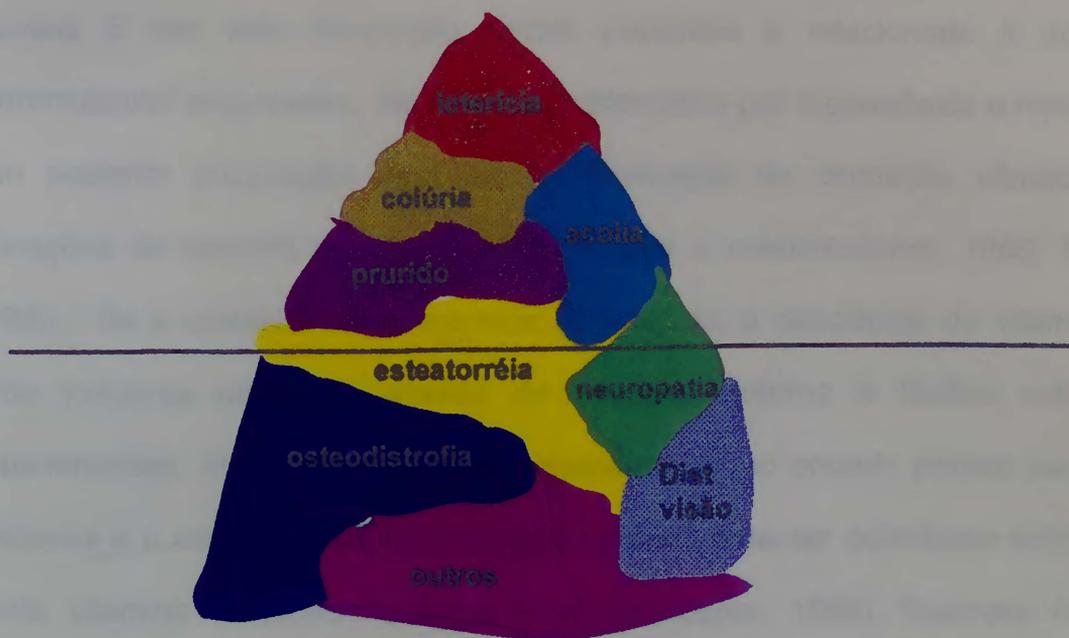
<b>I COLESTASE INTRA-HEPÁTICA</b>
<p><b>1.1 Com obstrução mecânica</b></p> <p>A - Rarefação das vias bilares intra - hepáticas: síndrômica, não síndrômica            B - Dilatação focal dos ductos biliares intra-hepáticos</p>
<p><b>1.2 Sem obstrução mecânica</b></p> <p>A - Infecciosa (bactérias, vírus, protozoários, Clamydia)            B - Metabólica (distúrbio do metabolismo dos aminoácidos, carboidratos, lipídeos, ácidos biliares, deficiência de <math>\alpha 1</math> antitripsina, fibrose cística, outros)            C - Tóxico medicamentosa            D - Hemólise            E - Neoplasia hepática            F - Genético - cromossômica            G - Familiares            H - Hepatite idiopática - hepatite neonatal</p>
<b>II COLESTASE EXTRA - HEPÁTICA</b>
<p><b>2.1 Anormalidades anatômicas das vias biliares</b></p> <p>A - Atresia de vias biliares            B - Hipoplasia de vias biliares            C - Cisto de colédoco            D - Perfuração espontânea da via biliar            E - Estenose congênita do colédoco terminal</p>
<p><b>2.2 Compressão extrínseca das vias biliares:</b></p> <p>A - Organomegalias, anomalias congênitas</p>
<p><b>2.3 Outros:</b></p> <p>A - Obstrução (litíase, parasitas, outros)            B - Colangite esclerosante</p>

Fonte: Modificado de Silveira e colaboradores, 1990.

A doença hepática colestática é um problema clínico extremamente importante, especialmente em crianças e adolescentes. A natureza progressiva de muitas destas desordens é demonstrada pelo fato de estarem entre as

principais indicações de transplante hepático (Whittington & Balistreri, 1991).

Desarranjos na fisiologia da secreção biliar com conseqüentes diminuição na concentração de ácidos biliares intraluminais, má absorção e disfunção hépato-celular, são os principais responsáveis pelas repercussões da colestase crônica, onde prurido, icterícia e, ocasionalmente, acolia são somente a ponta de um grande *iceberg* (Fig. 1).



**Figura 1: Repercussões da colestase crônica**

Fonte: Modificado de Sherlock, 1993

O impacto da colestase crônica na função hepática parece estar relacionado à retenção hepática de diferentes compostos com capacidade de induzir lesões na membrana celular, necrose e degeneração gordurosa, resultando, eventualmente em cirrose (Reinchen, Ross & Zimmerman, 1993;

Sokol, 1993).

A absorção prejudicada de gorduras pode ser responsável por diarreia crônica com esteatorreia e desnutrição. Deficiências nutricionais específicas podem ser evidentes em lactentes e crianças maiores com colestase crônica, se medidas profiláticas não são prontamente instituídas. Hipoprotrombinemia secundária à deficiência de vitamina K é um risco constante, podendo ou não estar associada a coagulopatia (Mowat, 1987; Sokol, 1993). Deficiência de vitamina E tem sido observada nestes pacientes e relacionada à doença neuromuscular progressiva, inicialmente evidenciada por hiporreflexia e hipotonia com posterior progressão para ataxia, diminuição da sensação vibratória e alterações do sistema nervoso central (Alvarez e colaboradores, 1985; Sokol, 1993)). Se a colestase é severa e/ou prolongada, a deficiência de vitamina A pode tornar-se manifesta através de cegueira noturna e lesões cutâneas características. Alterações retinianas degenerativas, no entanto podem ser mais precoces e o estudo da citologia conjuntival pode detectar deficiência subclínica desta vitamina (Amadee-Manesme e colaboradores, 1988). Doenças ósseas metabólicas e deficiência de vitamina D são também comuns nestes pacientes. A deficiência está associada tanto à absorção insuficiente, quanto à síntese cutânea diminuída conseqüentes a pouca exposição ao sol (Heubi, 1989; Sokol, 1992). No início, atribuiu-se esta deficiência à alteração na hidroxilação hepática, o que não foi confirmado posteriormente (Sherlock, 1993). O efeito da colestase sobre a síntese da vitamina D circulante e seus efeitos sobre o metabolismo ósseo são desconhecidos (Sokol, 1993). Osteodistrofia hepática será discutida posteriormente.

## 1.2. O tecido ósseo - considerações gerais

O osso é um tecido conjuntivo especializado que tem funções bem definidas: sustentação do corpo, proteção de órgãos vitais e reserva de íons, especialmente cálcio e fósforo (Baron, 1993; De Priestier, Cole & Bishop, 1991; Termine, 1993)).

Anatomicamente, distinguem-se dois tipos de osso; ossos chatos (crânio, escápula, mandíbula e quadril) e ossos longos (tíbia, fêmur e úmero). O exame externo dos ossos longos mostram duas extremidades mais largas (epífises), uma estrutura cilíndrica (diáfise) e uma região intermediária (metáfise). No osso em crescimento, as epífises e as metáfises são separadas por uma camada de cartilagem denominada cartilagem epifisária ou placa de crescimento, rica em células proliferativas, responsáveis pelo crescimento longitudinal dos ossos, tornando-se inteiramente calcificada e remodelada no final do período de crescimento (Baron, 1993).

Funcionalmente, o osso apresenta dois componentes, um cortical e um trabecular que são histologicamente semelhantes mas apresentam nítidas diferenças estruturais e funcionais (Baron, 1993; Teitelbaun, 1982). As primeiras são essencialmente quantitativas e relacionadas ao volume de osso calcificado que corresponde a 80% - 90% do osso cortical e 15% - 25% do osso trabecular. As diferenças funcionais são conseqüências destas diferenças e *vice-versa*: o osso cortical destina-se principalmente as funções mecânicas e de proteção e o osso trabecular é essencialmente metabólico, sendo a maior parte do seu conteúdo preenchido por medula óssea, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo

(Baron, 1993).

Os constituintes fundamentais dos ossos são as células e a matriz extracelular (Baron,1993; Termine,1993; Teitelbaum,1982). Teitelbaum (1982) conceitua-o como “uma variedade de células promovendo atividade metabólica em matrizes orgânica e não orgânica”. Oitenta e cinco a noventa por cento do componente orgânico são representados por colágeno do tipo 1 (Teitelbaum,1982; Termine,1993). Quando comparado a outros tecidos conjuntivos, o colágeno ósseo se caracteriza por sua relativa insolubilidade, relacionada à extensão e natureza de suas relações intermoleculares (Termine, 1993). Nos ossos do adulto, as fibras colágenas alternam-se em camadas, conferindo a este tecido uma estrutura lamelar típica. A arquitetura do osso da criança é “em trama”, com feixes de tamanhos variados, dispostos ao acaso (osso esponjoso). Este tipo de disposição também ocorre em qualquer situação em que a síntese óssea está acelerada, tais como nos processos de reparação de fraturas ou em situações como hiperparatireoidismo (Baron, 1993; Teitelbaum, 1982). No desenvolvimento normal do esqueleto ou na reparação, o osso esponjoso serve de sustentáculo à deposição de osso lamelar. O componente orgânico não colágeno do osso é denominado de substância fundamental amorfa, essencialmente composta por glicoproteínas e proteoglicanos, com alta capacidade de ligação iônica, e que desempenha um importante papel no processo de calcificação (Baron, 1993). Numerosas proteínas não colágenas presentes na matriz óssea têm sido recentemente purificadas e seqüenciadas, mas sem função totalmente caracterizada (Termine, 1993).

Os osteoblastos são as células que sintetizam a matriz óssea, sendo por

definição, as células responsáveis pela produção do “osso verdadeiro” (Puzas, 1993). As características histológicas de um osteoblasto refletem o fato de ser esta uma célula metabolicamente muito ativa: existe um extenso retículo endoplasmático rugoso e um exuberante aparelho de Golgi (Baron, 1993; Puzas, 1993). Outra característica desta célula é a presença de grande quantidade de fosfatase alcalina, que tem sido identificada na sua membrana plasmática e cuja atividade correlaciona-se claramente com a formação óssea (Baron, 1993; Puzas, 1993; Teitelbaum, 1982).

Existe uma variedade de etapas seqüenciais na formação do osso: (1) síntese e processamento intracelular de colágeno; (2) secreção e processamento extracelular de colágeno; (3) formação de microfibrilas, fibrilas e fibras de colágeno e (4) maturação da matriz celular com subsequente deposição de mineral ósseo (cristais de hidroxiapatita). Todas estas funções estão sob o controle dos osteoblastos e o resultado é um osso totalmente calcificado formado por 35% de matriz orgânica e 65% de material cristalino inorgânico (Puzas, 1993). Além disto estas células também produzem e seqüestram fatores de crescimento dentro da matriz óssea que quando liberados por processos de reabsorção reestimulam sua própria atividade.

O osteócito é um osteoblasto revestido por osso calcificado (Mundi, 1993), profundamente localizado neste tecido dentro de pequenas lacunas (lacunas osteocíticas), onde poderão sintetizar nova matriz óssea. Sua morfologia varia de acordo com seu grau de maturação e atividade funcional. Sendo derivado de um osteoblasto, um osteócito jovem conserva a maioria das características ultra-estruturais desta célula, com algumas diferenças relacionadas ao volume

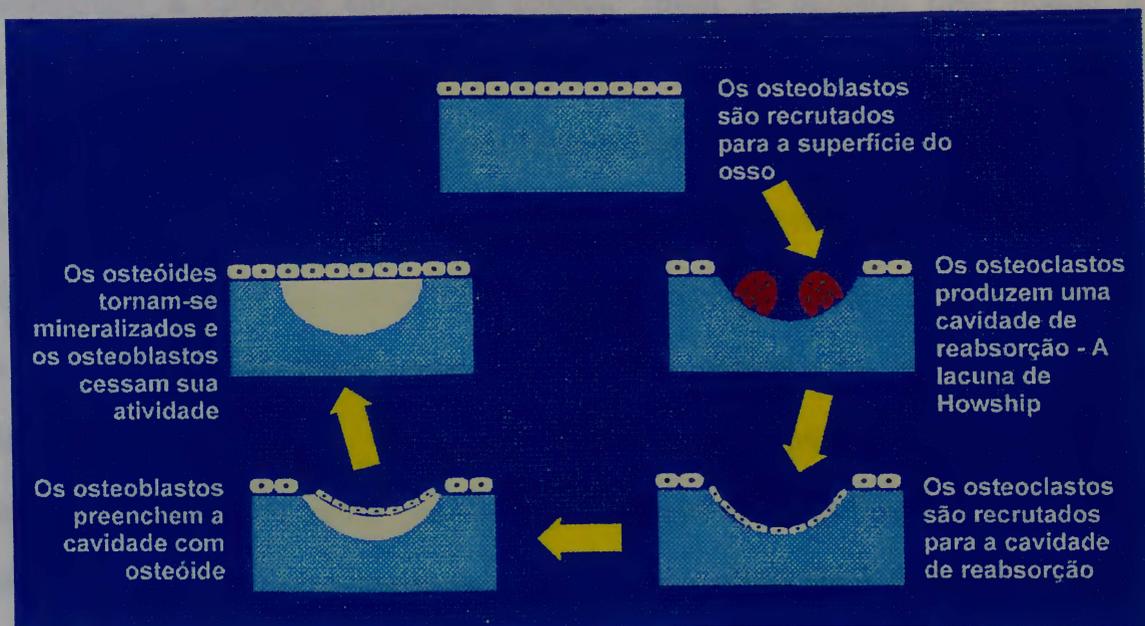
celular e a importância de organelas envolvidas na síntese protéica (Baron, 1993).

Os osteoclastos são as células reabsortivas do osso, grandes e móveis, responsáveis pela osteólise, com intensa atividade. São células altamente especializadas, localizadas na superfície óssea em áreas de contorno irregular, conhecidas como lacunas de Howship ou “lagos de reabsorção” (Mundi, 1993; Teitelbaum, 1982). Encontram-se freqüentemente em sítios de remodelação ativa, tais como metáfises de órgãos em crescimento ou em circunstâncias patológicas como no caso de certas neoplasias (Mundi, 1993). As características ultraestruturais destas células são a abundância do complexo de Golgi, mitocôndrias e vesículas de transporte sobrecarregadas com enzimas lisossomais (Baron, 1993). A mais proeminente característica desta célula, no entanto, é a existência de uma borda estriada situada próxima ao osso adjacente - a borda “franzida” ou “em escova”, envolta por proteínas contráteis que acoplam os osteoclastos à superfície óssea (Baron, 1993). É uma área altamente especializada e essencial ao processo de reabsorção.

Os osteoclastos reabsorvem o osso por produção de enzimas proteolíticas lisossomais e íons hidrogênio. Estes últimos produzem um ambiente ideal para que as enzimas degradem a matriz óssea (Mundi, 1993): o pH baixo (mantido por um transporte ativo da membrana celular que troca continuamente carbonato por cloreto), dissolve os cristais de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , expondo a matriz. As enzimas neste pH ótimo, degradam os componentes da matriz. Cronologicamente, os cristais são mobilizados por digestão e dissolvidos pelo ambiente ácido. As fibras de colágeno residuais são digeridas tanto por ativação

da colagenase latente como por ação de catepsinas. A reabsorção óssea ajuda a manter os níveis séricos de cálcio e fosfato (Baron, 1993; Teitelbaum, 1982).

As duas grandes atividades celulares do osso são modelação e remodelação. A modelação está intimamente associada ao crescimento e inclui as funções responsáveis pela transformação dos pequenos ossos do recém-nascido em ossos maiores do adulto de idêntico formato - é o crescimento do osso em diâmetro e ocorre por reabsorção contínua (Baron, 1993; Teitelbaum, 1982). A remodelação é o processo responsável pela renovação do osso e pelo seu crescimento longitudinal (Fig. 2). Durante este processo observa-se na placa de crescimento: (1) uma zona proliferativa, onde a matriz é ativamente sintetizada por condroblastos; (2) uma zona hipertrófica, onde os condroblastos tornam-se progressivamente maiores; (3) uma zona de calcificação; (4) uma zona de invasão, onde se observa reabsorção da matriz cartilaginosa pelos osteoclastos. Após a reabsorção, os osteoclastos se diferenciam e formam uma camada de osso esponjoso sobre o remanescente cartilaginoso - a esponjosa primária. Posteriormente, por nova remodelação, o osso esponjoso é substituído por osso lamelar, alcançando o estado de maturação denominado esponjosa secundária (Baron, 1993). Este processo ocorre tanto no osso em crescimento quanto no osso já crescido e está inteiramente relacionado à homeostasia mineral (Baron, 1993; Teitelbaum, 1982).



**Figura 2: Seqüência do remodelamento ósseo**

Fonte: Fiat & Mendonça, 1993

### 1.2.1. Regulação do metabolismo ósseo

O metabolismo ósseo é regulado por uma variedade de hormônios que atuam sobre a formação e reabsorção óssea.

#### a - Vitamina D:

Atualmente reconhecida como um hormônio esteróide, a vitamina D é sintetizada primariamente mas não exclusivamente pelos rins (Canalis, 1993). Concentrações séricas adequadas existem na dependência da ingestão de vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) e da biossíntese cutânea de vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol) após exposição à luz ultra-violeta. A absorção é dependente de adequado fluxo biliar e ocorre ao nível do íleo e jejuno, onde é transportada como

quilomícrons à corrente sangüínea (Sokol, 1993). É captada pelo fígado e submetida a 25-hidroxilação, sua principal forma circulante (Sokol, 1993; Sherlock, 1993). Do fígado, a 25 hidroxivitamina D [ $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] retorna à circulação onde é transportada aos rins e submetida a  $1\alpha$  hidroxilação para formar 1,25 diidroxivitamina D [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] ou 24,25 diidroxivitamina D [ $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] na dependência do estado de suficiência de vitamina  $\text{D}_2$  ou paratormônio (Norman & Henry, 1993) - esta é a forma ativa da vitamina D que aumenta a absorção intestinal de cálcio (por induzir a síntese de uma proteína ligadora de cálcio na mucosa intestinal) e estimula sua conservação renal (Norman & Henry, 1993; Sherlock, 1993; Sokol, 1993).

No tecido ósseo,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  tem funções semelhantes ao paratormônio, estimulando a reabsorção e exerce efeitos complexos sobre a formação óssea (Canalis, 1993; Sokol, 1993). Este hormônio não estimula a formação óssea diretamente mas aumenta a síntese de osteocalcina, um peptídeo sintetizado exclusivamente pelos osteoblastos, indicando que a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  atua diretamente sobre esta célula. Os efeitos sobre a formação óssea podem estar relacionados a diversas ações deste esteróide, como inibição direta da síntese de colágeno e aumento do número de receptores polipeptídicos que ao nível de osteoblastos estimulam a síntese da matriz e do colágeno ósseo (Canalis, 1993).

#### **b - Paratormônio (PTH):**

O PTH regula os níveis de cálcio e fósforo no sangue, atuando na atividade de células específicas nos ossos e nos rins (Kronenberg, 1993). Sua ação promove: (1) liberação de cálcio e fosfato do osso; (2) reabsorção de cálcio e

inibição da reabsorção de fosfato pelo filtrado glomerular; (3) estímulo da síntese renal de 1,25 hidroxivitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D]. Observa-se como resultado o aumento da calcemia e a diminuição da fosfatemia, sendo o cálcio o principal regulador da secreção do paratormônio.

#### **c - Calcitonina:**

A calcitonina é um aminopeptídeo cujo principal efeito biológico é inibir a reabsorção óssea osteoclástica, porém com efeitos transitórios, de modo que não existe resposta à exposição prolongada (Deftos, 1993). Para Canalis, este peptídeo pode ser mais importante como um agente farmacológico, do que como um hormônio fisiológico (Canalis, 1993).

#### **d - Insulina:**

A insulina estimula a síntese da matriz óssea e a formação da cartilagem, sendo um dos mais importantes hormônios sistêmicos relacionados ao crescimento ósseo. Sua ação está associada à diferenciação funcional dos osteoblastos, sendo necessária à mineralização óssea (Canalis, 1993).

#### **e - Glicocorticóides:**

Têm ações complexas sobre a formação óssea podendo tanto inibi-la quanto estimula-la. O estímulo à síntese do colágeno se dá de forma secundária e envolve mecanismos de facilitação da atuação de fatores de crescimento locais, mais precisamente IGFs (*insulin like growth factors I*). Importante diminuição da replicação de células de linhagem pré-osteoblástica é o principal fator

responsável pela inibição da mineralização da matriz óssea. Estes efeitos paradoxais estão na dependência do tempo de uso deste hormônio, de modo que só a utilização prolongada inibe a síntese do colágeno (Canalis, 1993).

Quanto à reabsorção óssea, esta é estimulada *in vivo*, possivelmente em resposta à diminuição da absorção intestinal de cálcio promovida pelos corticosteróides, com subsequente aumento nas concentrações séricas de paratormônio (Hahan, Halstead & Baran, 1982).

#### **f - Esteróides sexuais:**

Estrógenos e andrógenos são importantes para maturação do esqueleto de indivíduos em crescimento. Estrógenos inibem a reabsorção óssea, supondo-se atuar sobre a síntese de citocinas presentes no micro-ambiente ósseo e relacionadas à reabsorção óssea (Canalis, 1993).

#### **g - Outros:**

Hormônios da tireóide e fatores locais também são importantes no processo de remodelação óssea (Canalis, 1993; Tohmé e colaboradores, 1991). Estes últimos, incluem: fator de crescimento de fibroblastos, fatores de crescimento derivados de plaquetas, IGFs. Os fatores locais têm ação direta sobre o metabolismo celular, modificando a replicação ou a diferenciação de osteoblastos ou osteoclastos .

Simplificadamente, a regulação da homeostase óssea relaciona-se ao controle dos níveis extra e intra celulares dos íons cálcio, fósforo e magnésio com os hormônios 1,25 hidroxivitamina D, paratormônio e calcitonina, atuando nos

ossos, intestinos e rins. Os íons são absorvidos pelos intestinos, excretados pelos rins e estocados principalmente nos ossos, que são os principais responsáveis pela manutenção dos seus níveis sanguíneos. Este efeito se dá graças ao equilíbrio alcançado entre formação (depósito de íons nos ossos) e reabsorção (liberação de íons para a circulação) ósseas (Bikle, 1993).

## **1.2.2. Estudo do metabolismo ósseo**

### **1.2.2.1- Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo (Quadro 2):**

A degradação e a formação da matriz óssea podem ser avaliadas, de maneira não invasiva, pela determinação dos níveis circulantes de fatores ou substâncias envolvidas nos processos de modelação e remodelação ósseas descritos anteriormente. Estes podem representar tanto uma atividade enzimática específica quanto um componente da matriz óssea liberado na circulação (Azria, 1989; Delmas, 1993). O marcador ideal deveria detectar rápidas alterações na síntese e degradação de cada um dos componentes bioquímicos presentes no tecido ósseo (Risteli & Risteli, 1993). Até pouco tempo, os únicos marcadores disponíveis eram a fosfatase alcalina total para monitorizar a formação óssea e a hidroxiprolina urinária para monitorizar a reabsorção (Delmas, 1990; Tohmé e colaboradores, 1991). Atualmente, conhecem-se diversos marcadores, mais sensíveis e específicos, embora nem todos disponíveis ao nosso meio (quadro 2).

**Quadro 2: Marcadores bioquímicos da formação e reabsorção ósseas\***

Marcadores	Método	Material biológico	Especificidade	Tecido de origem
<b>Formação óssea</b>				
Fosfatase alcalina total	Colorimétrico R.I.E*	Soro/Plasma	moderada	Fígado, osso
Fosfatase alcalina óssea	Colorimétrico R.I.E I.R.M.A**	Soro/Plasma	boa	Osso (osteoblasto)
Osteocalcina	R.I.E	Soro/Plasma	forte	Osso (osteoblasto)
Colágeno tipo I (peptídeos)	R.I.E	Soro/Plasma	fraca	Osso (osteoblasto) Pele (fibroblasto)
Osteonectina	R.I.E	Soro/Plasma	indeterminada	Osso (osteoblasto) Sangue (plaquetas)
<b>Reabsorção óssea</b>				
Hidroxi-prolina	Colorimétrico H.P.L.C***	Urina	fraca	Tecido conjuntivo (colágeno)
Hidroxi-lisina	H.P.L.C	Urina	fraca	Tecido Conjuntivo (colágeno)
Fosfatase ácida tartarato resistente	Colorimétrico	Plasma	moderada	Osso (osteoclastos)
Piridinolina	H.P.L.C. ELISA****	Urina	moderada	Osso, cartilagem
Deoxi-piridinolina	H.P.L.C	Urina	forte	Osso, dentina

\* R.I.E = Radioimunoensaio;

\*\* I.R.M.A = Ensaio imunorradiométrico;

\*\*\* H.P.L.C = Cromatografia líquida de alta resolução;

\*\*\*\* ELISA = Enzima imunoensaio

Fonte: Tohmé e colaboradores, 1991

### 1.2.2.1.1 Marcadores da formação óssea

#### a - Fosfatase alcalina total:

A fosfatase alcalina humana constitui um sistema de múltiplas formas moleculares de enzimas nas quais a heterogeneidade se deve tanto a fatores genéticos como a modificações bioquímicas e estruturais (Farley e colaboradores, 1994; Moss, 1982; Risteli & Risteli, 1993). Existem, no mínimo, cinco formas identificadas de fosfatase alcalina, havendo evidências de que uma única forma

predomine em cada tecido específico (Moss, 1982).

Os primeiros estudos relacionados a fosfatase alcalina foram destinados à investigação de doenças ósseas e estavam baseados nos achados de Robinson e colaboradores, na década de 1930, que demonstraram existir uma forte associação entre atividade sérica desta enzima e atividade osteoblástica (Moss, 1976). A demonstração de aumento da fosfatasemia também em doenças hepatobiliares, particularmente associadas a colestase, suscitou o desenvolvimento de técnicas capazes de identificar possíveis variantes desta enzima (Moss, 1982). Estes estudos demonstraram a presença de fosfatase alcalina intestinal em alguns soros de indivíduos normais, particularmente aqueles dos grupos sanguíneos B e O, que são secretores positivos; fosfatase alcalina placentária em gestantes normais e isoenzimas desta em pacientes com neoplasias e fosfatase alcalina de origem renal em nefropatas (Moss, 1982). Mais recentemente, técnicas de isoeletrofocalização demonstram a existência de doze ou mais bandas de fosfatase alcalina humana (Randolph-Habecker e colaboradores, 1994). A fosfatase alcalina de origem hepática quando estudada por este método mostra possuir uma banda específica para o canalículo biliar, uma hepatocitária e outra com alta massa molecular, que não é encontrada em indivíduos com função hepática normal e tem sido proposta como um marcador precoce de rejeição em pacientes submetidos a transplante hepático (Randolph-Habecker e colaboradores, 1994).

As estruturas das diversas formas da fosfatase alcalina apresentam peculiaridades: a fosfatase alcalina de origem placentária é determinada por um locus gênico exclusivo, evidenciado pela marcante variação alélica observada

unicamente nesta isoenzima. A fosfatase alcalina do intestino delgado é determinada por outro locus gênico e isto lhe confere propriedades catalíticas, eletroforéticas e de estabilidade diversas da precedente (Moss, 1982). As fosfatases presentes no fígado, osso e rins têm sutis diferenças de estabilidade, dividem propriedades catalíticas semelhantes, possuem respostas antigênicas idênticas e quando digeridas pela neuraminidase possuem o mesmo ponto isoelétrico (quadro 3). Estas evidências sugerem que estas formas de fosfatase alcalina sejam codificadas por um único gene com expressões diferentes nos diferentes tipos de células (Duda e colaboradores, 1988; Farley e colaboradores, 1994; McKenna, Hamilton & Sussman, 1979; Moss, 1982; Risteli e Risteli, 1993; Seargeant & Stinson, 1979). Como o termo isoenzima refere-se a diferentes proteínas, existindo em um mesmo indivíduo, com propriedades catalíticas diferentes (Wilkinson, 1976), estas três últimas formas da fosfatase alcalina não podem ser designadas como isoenzimas embora frequentemente o sejam (Moss, 1982). As fosfatases de origem óssea e hepática são as que mais contribuem para atividade da fosfatase alcalina total (Moss, 1982; Siqueira e colaboradores, 1995).

A atividade da fosfatase alcalina total é o resultado da soma das atividades das fosfatases alcalinas de diferentes origens (Moss, 1982; Siqueira e colaboradores, 1995). Os valores de referência relacionam-se fortemente às faixas etárias estudadas de modo que a atividade sérica desta enzima no recém-nascido é maior do que o limite superior de normalidade do adulto e aumenta rapidamente atingindo 2,5 a 3,0 vezes este valor durante o primeiro ano de vida. No final do segundo ano, estes valores caem para 1,5 a 2,0 vezes os níveis do

adulto e a partir daí, mantém-se aproximadamente constantes durante toda a infância e início da adolescência, quando então declinam (Moss, 1976). Estas alterações são diretamente proporcionais ao crescimento ósseo, de modo que acelerações ou retardos nas taxas de crescimento são acompanhadas por elevação ou diminuição da fosfatasemia (Moss, 1976).

Assim, a determinação da fosfatasemia não é um bom método para avaliação do metabolismo ósseo, uma vez que falta-lhe especificidade.

### Quadro 3: Características bioquímicas das múltiplas formas de fosfatase alcalina humana.

Formas Enzimáticas	Características Bioquímicas					
	Inativação pelo calor	Inativação pela fenilalanina	Precipitação pela lectina	Reação com anticorpo anti-fígado	Propriedades Catalíticas	Pontos Isoelétricos
Ossos	++	+	++	+	=	=
Fígado	+	+	+	+	=	=
Rins	+	+	-	+	=	=
Placenta	-	+++	-	-	≠	≠
Intestino Delgado	+	++	-	-	≠	≠

+ - fraca

++ - moderada

+++ - forte

= - semelhantes

≠ - específicas

#### b - Fosfatase alcalina esquelética:

A fosfatase alcalina esquelética é uma ectoenzima do osteoblasto, com funções não completamente esclarecidas (Farley e colaboradores, 1994; Risteli e Risteli, 1993). Sua atividade apresenta correlação razoável com a formação óssea (Ristelli, 1993). Os níveis mais altos são geralmente encontrados na doença de Paget do osso, onde admite-se que seja a fração da fosfatase alcalina

responsável pela quase totalidade da fosfatasemia (Farley e colaboradores, 1994). No raquitismo e na osteomalácia, o possível efeito da matriz óssea submineralizada sobre a atividade dos osteoblastos é o principal responsável pelo aumento da atividade da enzima (Moss, 1976).

Em lactentes, crianças e adolescentes saudáveis, a maioria da fosfatase alcalina presente no soro é de origem óssea (cerca de 80%), enquanto em adultos saudáveis predomina a fração hepática (Moss, 1982; Risteli e Risteli, 1993). Outro aumento parece haver após os cinquenta anos (Duda e colaboradores, 1988).

Existem diversas maneiras de se estimar qualitativa ou semi-quantitativamente a atividade da fosfatase alcalina esquelética. Estas incluem inativação pelo calor ou substâncias como a uréia, fenilalanina ou hidroxiamina, solubilidade em etanol ácido, precipitação por lectina de germe de trigo, eletroforese e mais recentemente, técnicas de imunoradiometria que incluem anticorpos monoclonais específicos (Farley e colaboradores, 1994; Moss, 1982; Panighari e colaboradores, 1994; Risteli & Risteli, 1993; Rosalki, 1984; Siqueira e colaboradores, 1995). Desde o primeiro relato em 1962, da maior estabilidade da fosfatase alcalina hepática ao calor, têm surgido diversos estudos de inativação seletiva (Moss, 1974; Moss, 1976; Siqueira e colaboradores, 1995). A maioria refere-se ao uso da uréia ou do calor como agente de inativação. Os métodos de inativação pelo calor diferem quanto à temperatura utilizada e o tempo de inativação estudado. Em um procedimento típico, atividade residual menor que 20% da fosfatasemia após incubação por 10 minutos a 56°C sugere que a amostra contenha predominantemente fosfatase alcalina óssea (Moss, 1976; Moss,

1982). A eletroforese é a técnica que quando realizada isoladamente se mostra mais útil para análise qualitativa das múltiplas formas da fosfatase alcalina no soro. Entretanto, há superposição entre os picos eletroforéticos das formas óssea e hepática à quantificação por densitometria (Moss, 1982; Panighari e colaboradores, 1994). Baseados no fato de que as frações esqueléticas e hepáticas da fosfatase alcalina são diferentemente glicosiladas, Rosalki e colaboradores testaram o efeito da lectina de germe de trigo (uma proteína altamente específica e com grande capacidade de se ligar a carboidratos) sobre amostras ricas em fosfatase alcalina e observaram que a fração óssea é precipitada por este método (Rosalki & Ying Foo, 1984). Este estudo foi posteriormente repetido e os resultados não são uniformes (Behr & Barnert, 1988; Farley e colaboradores, 1994). As técnicas com anticorpos monoclonais têm mostrado resultados superiores aos outros métodos (Panighari e colaboradores, 1994), mas ainda não são universalmente disponíveis.

### **c - Osteocalcina:**

A osteocalcina é a principal proteína não colagênica da matriz óssea e é predominantemente sintetizada pelos osteoblastos. Após sua incorporação à matriz óssea, pequena fração é liberada na circulação, onde pode ser medida por radioimunoensaio (Delmas, 1990; Delmas, 1993). Interferem nos resultados: horário da coleta da amostra a ser examinada (existem variações séricas diurnas de osteocalcina) e descongelamentos múltiplos (Tohmé e colaboradores, 1991).

**d - Pró-colágeno tipo I:**

Durante o metabolismo extra celular do colágeno tipo I, antes da formação das fibrilas, ocorre clivagem amino terminal e carboxi terminal. Os peptídeos resultantes circulam no sangue, onde podem ser quantificados (Delmas, 1993; Tohmé e colaboradores, 1991). As concentrações séricas dos peptídeos carboxi terminais (PICP), mostram forte correlação com a formação óssea, avaliada histomorfometricamente (Risteli & Risteli, 1993). Em lactentes e crianças as concentrações são maiores que nos adultos, refletindo o crescimento ósseo (Risteli & Risteli, 1993). Existe pouca informação a respeito da validade da determinação do peptídeo amino terminal do colágeno (PINP), nas doenças ósseas metabólicas (Delmas, 1993; Risteli & Risteli, 1993).

**e - Osteonectina:**

A osteonectina é uma glicoproteína não colagênica, produzida por vários tecidos não calcificados e pelos osteoblastos (Azria, 1989). É encontrada em altas concentrações nas plaquetas e na matriz óssea extra celular (Azria, 1989; Delmas, 1990; Tohmé & colaboradores, 1991). Ensaios têm sido desenvolvidos com o objetivo de identificar a osteonectina específica do osso (Delmas, 1990; Tohmé & colaboradores, 1991).

**1.2.2.1.2. Marcadores de reabsorção óssea****a - Hidroxiprolina urinária:**

Um dos principais passos na síntese do colágeno é a hidroxilação da

prolina (Tohmé e colaboradores, 1991). Quando o colágeno é degradado, a hidroxiprolina livre não pode ser reutilizada, sendo então eliminada na urina, onde é mensurável (Delmas, 1990; Tohmé e colaboradores, 1991). Em lactentes e crianças a excreção é superior a dos adultos e relacionada ao peso e crescimento ósseo (Risteli & Risteli, 1993).

A determinação urinária deste aminoácido relaciona-se fracamente com o metabolismo ósseo (Azria, 1989; Delmas, 1990; Delmas, 1993; Risteli & Risteli, 1993; Tohmé e colaboradores, 1991).

#### **b - Hidroxilisina glicosilada:**

Hidroxilisina, a exemplo da hidroxiprolina, é um aminoácido exclusivo do colágeno e de proteínas que possuem seqüências semelhantes ao colágeno (Delmas, 1993; Delmas, 1990; Tohmé e colaboradores, 1991). As relativas proporções e conteúdo total das hidroxilisinas glicosiladas são diferentes para os diferentes tipos de colágeno, havendo nítidas distinções no osso e na pele (Delmas, 1990), sendo um marcador sensível da degradação do colágeno (Delmas, 1993). Limita o método, principalmente a necessidade de um analisador automático de aminoácidos (Delmas, 1990). A cromatografia líquida de alta resolução também tem sido usada para determinação deste aminoácido (Delmas, 1990; Delmas, 1993; Tohmé e colaboradores, 1991) e isto limita também seu uso em nosso meio.

**c - Fosfatase ácida tartarato-resistente:**

No plasma de indivíduos normais, a fosfatase ácida tartarato resistente, corresponde a isoenzima óssea da fosfatase ácida, encontrada nos osteoclastos (Delmas, 1993; Tohmé e colaboradores, 1991), que secretam esta enzima ativamente durante a reabsorção óssea *in vitro* (Risteli & Risteli, 1993). A baixa especificidade da fosfatase ácida tartarato resistente, sua relativa instabilidade em baixas temperaturas e a presença de inibidores séricos são fatores que limitam o uso clínico deste marcador bioquímico (Delmas, 1993).

**d - Piridinolina e deoxi-piridinolina:**

Estes são produtos da degradação do colágeno tipo I, cujos ensaios foram desenvolvidos com o objetivo de melhorar a especificidade dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo (Demers, 1995; Risteli & Risteli, 1993). Em condições onde existem aumento de atividade osteoclástica e desmineralização óssea, estes produtos são liberados na corrente sangüínea e eventualmente excretados na urina (Demers, 1994), havendo uma boa correlação entre doença óssea metabólica de alto *turnover* e excreção urinária de piridinolina e deoxi - piridinolina (Demers, 1994; Risteli & Risteli, 1993).

**1.2.2.2. Avaliação radiológica da densidade óssea mineral em crianças**

A densidade óssea mineral pode ser medida de maneira relativamente precisa por uma variedade de métodos qualitativos ou quantitativos, ambos com vantagens e desvantagens específicas.

#### **1.2.2.2.1. Avaliação qualitativa da densidade óssea mineral**

A avaliação da densidade óssea mineral pelo estudo radiológico convencional é um método bastante limitado. Vários autores demonstraram que mais de 35% do osso trabecular pode ser perdido sem qualquer evidência radiológica de osteopenia ao exame da coluna vertebral, quando estes métodos são utilizados (Chestnut, 1989; Garton e colaboradores, 1994; Johnston, Slemenda & Melton, 1991; Poznanski, 1993). Isto porque somente o osso cortical é claramente visto nas radiografias planas e perda substancial de osso trabecular pode ocorrer antes do acometimento cortical (Poznanski, 1993).

A presença de alguns sinais radiológicos auxiliam o diagnóstico de osteopenia, como por exemplo: presença de fraturas ou deformidades vertebrais, fraturas de ossos longos sem história de trauma, arqueamento de ossos longos e irregularidades metafisárias típicas de raquitismo (Poznanski, 1993).

#### **1.2.2.2.2. Avaliação quantitativa da densidade óssea mineral**

Tanto o osso cortical quanto o osso trabecular podem ser avaliados quantitativamente. Para o estudo do osso cortical empregam-se métodos convencionais de raios X ou densitometria de fótons simples. A última é superior aos raios X, sendo um método de baixa radiação e baixo custo, bastante utilizado na faixa etária pediátrica (Salle & Glorieux, 1993).

Existem três técnicas atualmente disponíveis para avaliação do osso trabecular: densitometria de fótons simples, densitometria de dupla emissão e tomografia computadorizada (quadro 4). Estes métodos calculam a massa óssea

com base na absorção tecidual de fótons provenientes de radionuclídeos ou raios X. Os resultados são expressos em unidades de massa óssea ou grama de mineral ósseo corrigidos por área exposta. Têm boa precisão e acurácia, pouco tempo de exposição e, excetuando-se o método tomográfico, baixa radiação (Hoiseh, Alho & Husby, 1994; Johnston, Slemmeda & Melton, 1991; Poznanski, 1993; Salle & Glorieux, 1993). O método com fótons simples mede principalmente o osso cortical, como já foi salientado e tem pouca precisão, provavelmente relacionada a meia vida curta do radionuclídeo utilizado (Salle & Glorieux, 1993). Além disto, com este exame não se corrige a interferência das partes moles, que limita o seu uso para o estudo do esqueleto apendicular. A densitometria de dupla emissão foi a última a ser desenvolvida e tem a capacidade de avaliar a densidade óssea em segmentos do esqueleto circundados por tecido mole, não homogêneo, como é o caso da coluna e do quadril, embora também sejam possíveis avaliação de todo o corpo (Salle & Glorieux, 1993).

**Quadro 4: Técnicas para medidas da massa óssea\***

<b>Técnicas</b>	<b>Área óssea estudada</b>	<b>Duração do exame (minutos)</b>	<b>Dose de radiação (mRem)</b>
<b>Densitometria de fótons simples</b>	rádio, calcâneo	15	10-20
<b>Densitometria de dupla emissão com fonte de radionuclídeo</b>	coluna, quadril, corpo inteiro	20-40	5
<b>Densitometria de dupla emissão com fonte de raios X</b>	coluna, quadril, corpo inteiro	3-1	1-3
<b>Tomografia computadorizada quantitativa</b>	coluna	10-15	100-1000

\* Fonte: Johnston e colaboradores, 1991

O uso de uma fonte radioativa (raios X ou isótopos) permite distinguir o conteúdo mineral ósseo também das interfaces aéreas. O tempo de exposição, no entanto, é mais longo do que o precedente (Johnston, Slemenda & Melton, 1991; Salle & Glorieux, 1993). O uso mais recente dos raios X, permite um aumento substancial na intensidade da saída do fluxo de radiação e tem diversas vantagens sobre a fonte isotópica: possibilita um exame mais rápido, com maior precisão, menor dose de radiação para o paciente e melhor resolução das imagens (Johnston, Slemenda & Melton, 1991; Poznanski, 1993; Salle & Glorieux, 1993; Southard e colaboradores, 1991; Wahner, 1989). Existe forte correlação entre conteúdo ósseo mineral medido por este método e conteúdo de cálcio ósseo, o que torna esta técnica bastante acurada e indicada para estudos longitudinais (Salle & Glorieux, 1993).

Os primeiros relatos referentes aos estudos da densidade óssea mineral,

salientavam o fato dos métodos não avaliarem a região óssea de maneira tri-dimensional. No exame das vértebras, por exemplo, não se conseguia visualizar o comprimento ântero-posterior, largamente influenciado pelo crescimento. Isto era resolvido, mudando-se a posição do paciente durante o exame, de modo a se obter uma visão lateral do corpo vertebral (Salle & Glorieux, 1993). Atualmente, os instrumentos mais modernos dispõem de detectores móveis que permitem a análise tri-dimensional do corpo vertebral sem necessitar movimentar o paciente. A densitometria de dupla emissão com fonte de raios X já foi validada no grupo pediátrico (Brunton, Bayley & Atinkson, 1993) e é considerada como método de escolha para a avaliação da densidade óssea mineral em crianças (Henderson, 1992; Kroger e colaboradores, 1992; Poznanski, 1993; Salle & Glorieux, 1993).

### **1.3. Alterações ósseas relacionadas à colestase crônica**

Diversas entidades clínicas estão associadas a desarranjos no metabolismo ósseo. Tanto osteoporose quanto raquitismo e osteomalácia podem acometer o indivíduo com osteodistrofia hepática (Fig. 3), parecendo haver uma maior prevalência de osteoporose, pelo menos, no que diz respeito aos estudos na população adulta. A definição precisa de cada uma destas condições auxilia a compreensão dos possíveis mecanismos relacionados à osteopenia colestática.

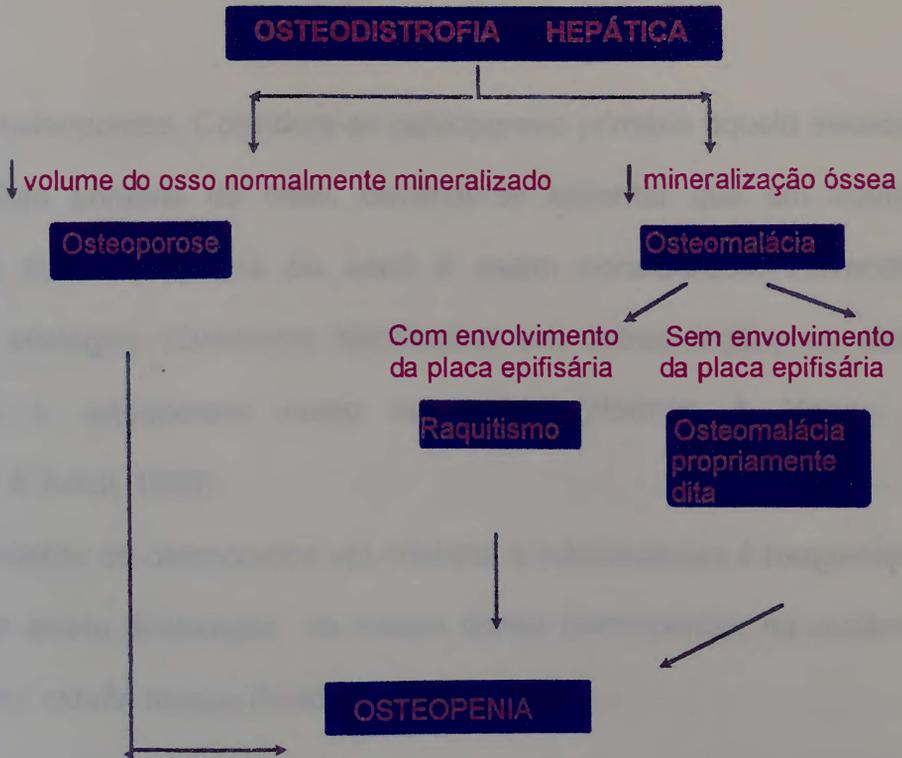


Figura 3: Alterações ósseas relacionadas à colestase crônica

### 1.3.1. Osteoporose

Histomorfometricamente, osteoporose é a diminuição do volume total de osso normalmente mineralizado (Norman & Henry, 1993). Durante a modelação e remodelação óssea dois defeitos fundamentais podem ocorrer: (1) defeito de formação da matriz; (2) desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea (Norman & Henry, 1993). Clinicamente, é uma doença caracterizada pelo desenvolvimento de fraturas não traumáticas, resultado direto da massa óssea diminuída (Kleerekoper & Avioli, 1993). Quando o defeito predominante relaciona-se ao aumento da reabsorção óssea, considera-se a osteoporose como sendo de alto *turnover*. Osteoporose de baixo *turnover* refere-se à diminuição progressiva tanto da formação quanto da reabsorção óssea (Kleerekoper, 1993). Existem diversas classificações para osteoporose. A mais comum relaciona-se a

etiologia da osteoporose. Considera-se osteoporose primária aquela associada a uma desordem primária do osso, devendo-se salientar que em adultos, a osteoporose pós menopausa ou senil é assim considerada. Havendo um mecanismo etiológico claramente identificável em outros órgãos ou sistemas classifica-se a osteoporose como secundária (Norman & Henry, 1993; Kleerekoper & Avioli, 1993).

Diagnóstico de osteoporose em crianças e adolescentes é frequentemente feito quando existe diminuição da massa óssea (osteopenia), na ausência de raquitismo ou osteíte fibrosa (Norman & Henry, 1993).

### **1.3.2. Raquitismo e osteomalácia**

Raquitismo é uma desordem no processo de mineralização da matriz óssea que envolve tanto a placa epifisária quanto os ossos cortical e trabecular já formados. Refere-se unicamente à submineralização presente no osso em crescimento. Osteomalácia também é um processo de submineralização óssea mas que ocorre após cessado o crescimento, não havendo portanto participação da placa epifisária (Klein, 1993; Teitelbaum, 1982). O mecanismo etiopatogênico é incerto, no entanto sugere-se haver uma menor habilidade da matriz óssea tornar-se mineralizada, existindo inadequada deposição de minerais (Klein, 1993).

### **1.3.3. Osteodistrofia hepática**

Osteodistrofia hepática, doença óssea metabólica associada a hepatopatia crônica, pode complicar todas as formas de colestase prolongada. Especialmente

quando existe comprometimento da função hépato-biliar como é caso da cirrose biliar primária em adultos e da atresia biliar extra hepática em crianças (Hodgson, Diekson & Wahner, 1985; Rao, 1993; Sherlock, 1993). Estes pacientes apresentam diminuição da massa óssea (osteopenia) que poderá estar associada a osteoporose, osteomalácia, ou raquitismo. Estudos em adultos sugerem ser a osteoporose a principal anormalidade óssea relacionada a osteopenia da colestase crônica (Diamond e colaboradores, 1989; Guañabens e colaboradores, 1992; Hay, 1995; Herlong, Recker & Haddrey 1989; Rao, 1993; Sherlock, 1993). A prevalência de osteomalácia varia muito: são descritas cifras desde 0% a 71,4% (quadro 5); para alguns autores, as maiores prevalências parecem estar associadas a menor rigidez nos critérios de definição admitidos (Diamond e colaboradores, 1989; Rao, 1993; Mason, 1994).

**Quadro 5: Estudos relacionados a osteodistrofia hepática em adultos**

<b>Autor (public)</b>	<b>Número da amostra estudada</b>	<b>Faixa etária (anos)</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Resultado da densitometria óssea</b>	<b>Resultado dos estudos de histomorfometria (% casos)</b>
<b>Diamond, T (1989) e colaboradores</b>	80	20-74	CBP (7)* DAF (30)** CEP (13)*** HCA (20)**** Hemoc(10)*****	-	osteopenia sem osteoporose (57%) osteoporose (21%) osteomalácia (0%)
<b>Diamond, T (1989) e colaboradores</b>	107	20-74	CBP (6) DAF (38) CEP(13) HCA(26) Hemoc(24)	osteopenia (39%)	osteoporose (39%) osteopenia sem osteoporose (33%) osteomalácia (0%)
<b>Herlong, FH (1982) e colaboradores</b>	15	33-61	CBP	osteopenia (100%)	osteoporose (80%) osteomalácia (0%)
<b>Hodgson, F (1985) e colaboradores</b>	15	24-50	CBP	osteopenia (85%)	osteoporose (85%) osteomalácia (0%)
<b>Mawer, EB (1985) e colaboradores</b>	14	30-72	CBP(30), esteatose(2) D.A.F(2), cirrose criptogênica (2)	-	osteomalácia (13,3%) osteoporose (6,7%)
<b>Reed, J (1980) e colaboradores</b>	7	38-57	CBP	100% normal	osteomalácia (71,4%)

- \* CBP = cirrose biliar primária;  
 \*\* DAF = doença alcoólica do fígado;  
 \*\*\* CEP = colangite esclerosante primária;  
 \*\*\*\* HCA = hepatite crônica ativa;  
 \*\*\*\*\* Hemoc = hemocromatose

A dificuldade na realização de estudos histomorfométricos em crianças, não nos permite identificar o processo metabólico responsável pela osteopenia observada em graus variados, associada ou não a raquitismo (Argao, Specker & Heubi, 1993; Bucuvalas e colaboradores, 1990; Heubi, 1989). Neste grupo, até o momento, foram realizados raios X convencional ou densitometria óssea com fótons simples. Diversos aspectos, dificultam a realização da biópsia óssea em crianças, como por exemplo, o caráter invasivo do procedimento e a necessidade do uso sistêmico de tetraciclinas para diferenciar osteomalácia (mineralização retardada da matriz óssea) do simples aumento da síntese de osteóide, impossível sem este marcador (Chesnut III, 1989). Deste modo, os métodos radiológicos são as melhores opções para a avaliação da densidade óssea na criança. Os raios X encontram-se em crescente desuso, devido a sua pouca especificidade e a dificuldades de interpretação. Densitometria óssea tem sido largamente utilizada em crianças e adolescentes para determinação dos valores de normalidade e correlações com padrões de crescimento e desenvolvimento (Bonjour e colaboradores, 1991; DePriestier, Cole & Bishop, 1991; Genant, Gleur & Lotz, 1994; Gilsanz e colaboradores, 1988; Gilsanz e colaboradores, 1994; Glastre e colaboradores, 1990; Gunnes, 1994; Koo e colaboradores, 1991; Miller e colaboradores, 1991; Rubin e colaboradores, 1993; Southard e colaboradores, 1991; Thomas e colaboradores, 1991) e para o diagnóstico de osteopenia de diversas etiologias: renal (Bataille e colaboradores, 1991), endócrina (Roe e colaboradores, 1991), gastrointestinal (Stalling e colaboradores, 1994; Valdimarson e colaboradores, 1994), nutricional (Chatuverdi, Garg & Choudhary, 1993; Chesney, 1990; Koo e colaboradores, 1991; Rubinacci e colaboradores,

1993) e metabólica (Allen e colaboradores, 1994). Somente os estudos publicados a partir de 1993, utilizaram a densitometria com fótons simples ou a densitometria de dupla emissão, sendo a primeira indiscutivelmente o método mais utilizado. Apesar de ser de menor valor do que a densitometria de dupla emissão com fonte de raios X a primeira fornece valores de normalidade nas variadas faixas etárias. No que diz respeito à osteodistrofia hepática, desconhecemos estudos utilizando densitometria de dupla emissão com fonte de raios X cujos padrões de normalidade só são disponíveis para crianças a partir de 3 anos.

A causa da osteopenia colestática é desconhecida até o momento (Hay, 1995) mas alguns fatores, reconhecidamente parecem contribuir para seu surgimento: ingestão inadequada de cálcio e vitamina D, diminuição da massa muscular, imobilização por hospitalização freqüente, má absorção de vitamina D e disfunção osteoblástica (Argao e colaboradores, 1994; Diamond e colaboradores, 1989; Hay, 1995; Heubi e colaboradores, 1989; Hodgson, Diekson & Wahner, 1985; Rao, 1993; Reed e colaboradores, 1980; Sherlock, 1993). Hiperparatireoidismo secundário não parece ser de relevância (Hay, 1995; Rao, 1993; Sherlock, 1993), embora já tenha sido descrito em associação com cirrose biliar primária (Fonseca e colaboradores, 1987). Concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio, não predizem as alterações ósseas (Mowat, 1987; Sherlock, 1993) e hipocalcemia, quando existe, parece estar associada a hipoalbuminemia (Rao, 1993). Absorção de cálcio não parece estar prejudicada em crianças com colestase crônica (Bucuvalas e colaboradores, 1990).

Diversos estudos têm tentado estabelecer, sem sucesso uma relação

direta entre o estado de deficiência de vitamina D e doença óssea metabólica (Argao, Specker & Heubi, 1993; Diamond e colaboradores, 1989; Herlong, Ricker & Haddrey, 1982; Heubi, 1990; Kaplan e colaboradores, 1988; Mawer e colaboradores, 1985; Reed e colaboradores, 1980; Sokol, 1993). Heubi e colaboradores estudando crianças com atresia biliar extra hepática demonstraram que os níveis séricos de vitamina D eram significativamente menores no grupo submetido a portoenterostomia sem restauração subsequente do fluxo biliar (Heubi e colaboradores, 1990). Nas outras formas de colestase da infância, a prevalência da deficiência varia de 20% a 50% (Argao, 1993; Sokol, 1993). Nenhuma correlação com osteopenia pode ser observada, entretanto (Argao, Specker & Heubi, 1993; Argao e colaboradores, 1994; Bucuvalas e colaboradores, 1990; Hay, 1995; Heubi e colaboradores, 1989). Resultados semelhantes foram encontrados em mulheres com cirrose biliar primária e em cirróticos de etiologia variada (Diamond e colaboradores, 1989; Hodgson, Dickson & Wahner, 1985).

A avaliação clínica da deficiência de vitamina D, baseia-se na determinação dos níveis séricos de 25 hidroxivitamina D, levando-se em consideração variações sazonais, idade e raça do indivíduo em estudo. Níveis séricos inferiores a 14 ng/ml são indicativos do estado de deficiência (Sokol, 1993). Na hepatopatia crônica não parece haver prejuízo da hidroxilação hepática (Sherlock, 1993; Sokol, 1993). Mais recentemente, atribuiu-se à concentração sérica de bilirrubina indireta um papel na inibição de células de linhagem osteoblástica (Hay, 1995; Jane e colaboradores, 1992). Nos pacientes pediátricos com colestase crônica, outro fator pode estar envolvido na patogênese da

osteopenia da colestase: Bucuvalas e colaboradores demonstraram diminuição de fatores locais de crescimento ósseo, particularmente *insulin like growth factor I* (IGF I) (Bucuvalas e colaboradores, 1989).

Estes pacientes estão freqüentemente assintomáticos até a ocorrência de fraturas espontâneas (Hay, 1995).

Diversas tentativas terapêuticas têm surgido: suplementação adequada de vitamina D ( 2 - 4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  em crianças e 50 -100  $\mu\text{g}/\text{dia}$  em adultos) soluciona o estado de deficiência hormonal mas não parece influenciar a densidade óssea mineral (Diamond e colaboradores, 1989; Hay, 1995; Herlong, Recker & Haddrey, 1992; Heubi e colaboradores, 1989; Reed e colaboradores, 1980; Sherlock, 1993). Estudos envolvendo a utilização de estrógenos, fluoreto e calcitonina, realizados em adultos, não mostram resultados convincentes (Guañabens e colaboradores, 1992; Hay, 1995). Medidas profiláticas incluem: suplementação de cálcio e vitamina D, adequado suporte nutricional e estímulo à exposição ao sol.

O transplante hepático parece ser a única alternativa para a osteodistrofia hepática. Argao e colaboradores (1994), em um estudo longitudinal, procuraram estabelecer um perfil dos níveis séricos de 25 hidroxivitamina D e da densidade óssea mineral em lactentes e crianças submetidas a transplante hepático ortotópico. Antes do procedimento, 33,3% dos pacientes tinham deficiência de vitamina D e todos apresentavam densidade óssea mineral diminuída, ambas alterações foram revertidas em todos os pacientes após o transplante hepático, sugerindo um papel da função parenquimatosa do fígado na existência da doença óssea metabólica. Algumas alterações ósseas podem surgir após este procedimento, muitas delas na dependência do uso de imunossupressores

(Porayko e colaboradores, 1991), mas o principal fator de risco para osteopenia pós-transplante é a existência de osteopenia pré-transplante, como salienta Hay (1995).

## **2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

## 2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Figurando entre uma das principais conseqüências sistêmicas da colestase crônica, as alterações ósseas nestes pacientes devem, indiscutivelmente, ser avaliadas. Os estudos de histomorfometria óssea são sofisticados e por demais invasivos para serem utilizados, na faixa etária pediátrica, como método diagnóstico inicial de doença óssea metabólica. Esta finalidade pode ser atendida com estudos radiológico e bioquímico combinados. O método radiológico deve ser preciso, seguro (baixos tempo de exposição e radiação) acurado e de fácil realização. Estes atributos são encontrados na densitometria de dupla emissão com fonte de raios X. O método bioquímico, por sua vez deve ser de fácil execução, baixo custo e preciso. A atividade da fosfatase alcalina esquelética é um bom marcador de formação óssea, preenchendo os pré-requisitos citados. Considerando que a osteoporose de baixo *turnover* é a principal entidade clínica relacionada a osteodistrofia hepática, desenvolvemos o presente estudo.

## **3. OBJETIVOS**

3.1. Objetivos Gerais

3.2. Objetivos Específicos

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivos Gerais**

Determinar a atividade da fosfatase alcalina esquelética em crianças e adolescentes com colestase crônica, sua densidade óssea mineral e estudar as eventuais correlações entre estas variáveis e tempo de colestase, estado nutricional, provas de “função” hepática e concentração séricas de cálcio, fósforo e magnésio.

### **3.2. Objetivos específicos**

- a** - Determinar a atividade sérica da fosfatase alcalina esquelética pelos métodos de inativação pelo calor e da precipitação por lectina de germe de trigo; estudar precisão e exatidão dos métodos e determinar o melhor método para o estudo desta enzima;
- b** - Estudar as relações entre atividade da fosfatase alcalina esquelética e tempo de colestase, provas de “função” hepática, concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio, avaliação nutricional e densidade óssea mineral;
- c** - Determinar a densidade óssea mineral de crianças com no mínimo três meses de colestase por densitometria óssea de dupla emissão, com

fonte de raios X;

- d - Estudar as relações entre densidade óssea mineral e tempo de colestase, provas de “função” hepática, concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio, atividade da fosfatase alcalina esquelética e avaliação nutricional.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Aspectos Gerais**

### **4.2. Estudo bioquímico**

#### **4.2.1. Delineamento do estudo**

#### **4.2.2. Amostra e critérios de inclusão e exclusão**

#### **4.2.3. Variáveis em estudo e cálculo do tamanho da amostra**

#### **4.2.4. Exame clínico e avaliação nutricional**

#### **4.2.5. Determinação da fosfatase alcalina total (EC 3.1.3.1.)**

#### **4.2.6. Determinação da atividade da fração esquelética da fosfatase alcalina; estudo dos métodos da precipitação por lectina de germe de trigo e inativação pelo calor**

#### **4.2.7. Provas “funcionais” hepáticas**

#### **4.2.8. Determinação das concentrações séricas de cálcio, fósforo, magnésio, glicose, uréia e creatinina**

### **4.3. Estudo radiológico**

#### **4.3.1. Delineamento do estudo**

#### **4.3.2. Amostra e critérios de inclusão e exclusão**

#### **4.3.3. Variáveis em estudo e cálculo do tamanho da amostra**

#### **4.3.4. Determinação da densidade óssea mineral**

## **4.2. Estudo bioquímico**

### **4.2.1. Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo com eixo de montagem transversal, eixo experimental observacional, unidade individual e eixo temporal contemporâneo.

**Fator em estudo:** colestase crônica

**Desfecho:** hiperfosfataseia alcalina esquelética

### **4.2.2. Amostra e critérios de inclusão e exclusão**

Foram estudados 32 pacientes de ambos os sexos com no mínimo 3 meses de colestase, acompanhados no Setor de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Participaram como controles dezesseis crianças e adolescentes normais, “voluntários”, provenientes do ambulatório de puericultura do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e filhos do *staff* do laboratório de bioquímica.

#### **- Critérios de inclusão:**

**a** - Caucasóides;

**b** - Faixa etária entre 4 (quatro) meses e 18 anos;

**c** - Evidência de colestase por, no mínimo 3 meses, definida clinicamente pela presença de icterícia colúrica e/ou acolia e/ou prurido, desde que este último

não estivesse associado a outras causas, e laboratorialmente por hiperbilirrubinemia de reação direta superior a 30% da bilirrubinemia.

**- Critérios de exclusão:**

- a - História de doença óssea prévia de etiologia não relacionada a doença hepática, capaz de determinar osteopenia;
- b - Síndromes genéticas possivelmente, associadas a alterações do metabolismo ósseo;
- c - Gestação em curso;
- d - Doença intestinal inflamatória crônica;
- e - Níveis séricos de uréia e creatinina acima dos valores de referência;
- f - Glicemia de jejum superior a 120 mg/dl, associada a glicosúria ou história sugestiva de Diabetes Melitus;
- g - Uso prévio de corticosteróides sistêmico por, no mínimo duas semanas;
- h - Uso prévio de vitamina D<sub>3</sub> parenteral.
- i - Negativa dos pais ou responsáveis em assinar termo de consentimento.

**4.2.3. Variáveis em estudo e cálculo do tamanho da amostra**

- a - Fração esquelética da fosfatase alcalina;
- b - Tempo de colestase;
- c - Avaliação nutricional por ocasião da entrada no estudo;
- d - Provas “funcionais” hepáticas (atividades séricas de aminotransferases, gama

glutamiltransferase, 5'-nucleotidase, concentrações séricas de albumina, bilirrubina total e direta e determinação do tempo de protrombina);

e - Concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio;

#### **- Cálculo do tamanho da amostra:**

Para este estudo, o tamanho da amostra analisada tem um poder estatístico de 80%, considerando-se um  $\alpha = 0,05$  e um  $\beta = 0,20$ .

#### **4.2.4. Exame clínico e avaliação nutricional**

A avaliação clínica, que constava de história e exame físico foram feitos pela pesquisadora. Considerou-se hepatomegalia, valores de extensão total do fígado acima dos valores de normalidade para idade, de acordo com os dados de Naveh e colaboradores, que podem ser apreciados na tabela I. Para avaliação das variáveis peso e comprimento/estatura utilizou-se antropômetro de madeira e balanças da marca Filizolla para lactentes com capacidade de 15 Kg graduada em intervalos de 10 gramas e balança-plataforma com capacidade de 150 Kg, graduada em intervalos de 100 gramas. Como padrão de referência, foram utilizadas as tabelas para peso e estatura do *National Center of Health Statistic* (NCHS ).

Os pacientes foram classificados em desnutridos de graus variáveis ou eutróficos de acordo com os padrões do escore Z, os critérios de Gomez e Waterlow. A padronização pelo escore Z refere-se ao número de desvios padrão

acima ou abaixo dos valores de referência. São considerados desnutridos, os indivíduos abaixo de dois desvios padrão da média (quadro 6). A classificação de desnutrição de Gomez e de Waterlow podem ser apreciadas nos quadros 7 e 8, respectivamente.

**Tabela I**

**Tamanho do fígado em crianças \***

Idade	Extensão (cm)
Nascimento	5,6 - 5,9
2 meses	5,0
1 ano	6,0
2 anos	6,5
3 anos	7,0
4 anos	7,5
5 anos	8,0
12 anos	9,0

\* Fonte: Naveh & Berant, 1984

**Quadro 6: Avaliação nutricional segundo o escore Z**

Estado nutricional	Escore Z		
	P/A	P/I	A/I
Eutrófico	até 2 desvios padrão da média		
Desnutrido	+ de 2 desvios abaixo da média		

Fonte: Waterlow e colaboradores, 1977

**Quadro 7: Avaliação nutricional segundo o critério de Gomez**

Peso / Idade (% peso ideal)	Estado Nutricional
100 - 90	Eutrófico
89 - 75	Desnutrição Grau I
74 - 60	Desnutrição Grau II
< 60	Desnutrição Grau III

Fonte: Modificado de MacLaren, 1982.

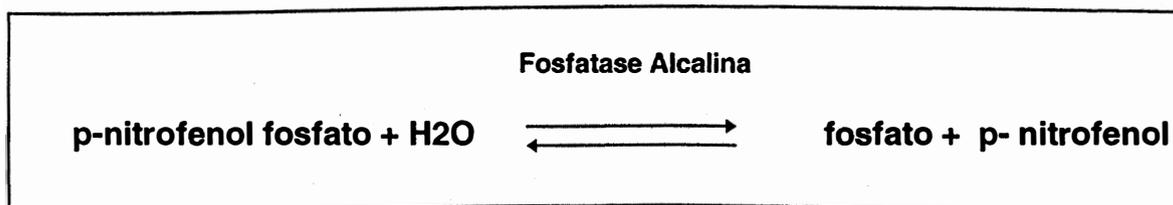
**Quadro 8: Avaliação nutricional segundo os critérios de Waterlow**

Estágio	Estado nutricional		Classificação
	% peso	% altura	
1	> 90	> 95	Eutrófico
2	= < 90	> 95	Desnutrição Atual
3	> 90	= < 95	Desnutrição Progressiva
4	= < 90	= < 95	Desnutrição crônica

Fonte: Waterlow e colaboradores, 1977

#### 4.2.5. Determinação da atividade da fosfatase alcalina total (EC 3.1.3.1)

A atividade da fosfatase alcalina total foi determinada a 25°C, utilizando-se o substrato p-nitrofenol fosfato e tampão de dietilomanida (Merckotest), segundo o mecanismo de reação descrito abaixo:



A velocidade de produção do p-nitrofenol é medida fotometricamente e é diretamente proporcional à atividade da fosfatase alcalina presente na amostra.

**Reagentes:**

Solução tampão: 98 ml;

Substrato: 20 comprimidos;

**Técnica:**

Comprimento de onda: 405 nm

Cubeta: 1 cm de espessura;

Temperatura: 25°C;

**Cálculo da atividade enzimática:**

Substitui-se o valor médio das diferenças de absorbância por minuto ( $\Delta A / \text{min}$ ) da amostra na seguinte equação:

$$\text{Atividade Enzimática (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 5454 \text{ (fator)}$$

O fator refere-se ao coeficiente de extinção molar do p-nitrofenol, fornecido pelo fabricante.

A atividade da fosfatase alcalina é expressa em U/l, onde 1 unidade corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol fosfato hidrolizado/min, à temperatura ambiente.

#### **4.2.6. Determinação da atividade de fração esquelética da fosfatase alcalina: estudo dos métodos da precipitação por lectina de germe de trigo e inativação pelo calor**

##### **- Método da precipitação por lectina:**

Este procedimento foi realizado como descrito por Rosalki e Ying Foo, que se baseia na capacidade de ligação da lectina de germe de trigo à porção glicosacarídica da fração esquelética da fosfatase alcalina (Rosalki & Ying Foo, 1984), modificando-se os volumes de soro e reagentes. Todas as amostras foram pré tratadas com o detergente Triton-X 100 diluído em água destilada na concentração de 200 mg /l, que extraí os lipídeos presentes na fosfatase alcalina biliar. Cem microlitros de soro mais 10 µl da solução do detergente foram incubados a 37°C, por 30 minutos. Após incubação, 10 µl desta mistura foram adicionadas a 10 µl de lectina de germe de trigo (Sigma) em tubos de "Eppendorf" e reincubados a 37°C. Após incubação a 37°C por 30 minutos, os tubos foram centrifugados a 8000 rpm, por 15 minutos em centrífuga refrigerada Janetski K - 23. No sobrenadante, determinou-se a atividade da fosfatase alcalina não esquelética, sendo que o valor medido era sempre multiplicado por 2,2 para corrigir a diluição da amostra (2 x 1,1).

##### **- Cálculo da atividade da enzima:**

Cerca de 80% da fosfatase alcalina esquelética do soro é precipitada por este método, estando os 20% restantes presentes no sobrenadante (Rosalki & Ying Foo, 1984). A atividade desta fração foi então calculada subtraindo-se o

valor corrigido da fosfatase alcalina presente no sobrenadante do valor da fosfatase alcalina total, multiplicando-se este resultado por 1,25 (100/80):

**Atividade da fosfatase alcalina esquelética = [Atv.FAT(Atv.FAS X 2,2)]x1,25**

**onde:**

**Atv FAT = atividade da fosfatase alcalina total;**

**Atv FAS = atividade da fosfatase alcalina do sobrenadante;**

#### **- Método da inativação pelo calor:**

Considerando a labilidade da fração esquelética da fosfatase alcalina ao calor, realizou-se o procedimento de inativação térmica da enzima como descrito por Moss e Withby (1976). Cem microlitros do soro foram incubados a 56°C durante dez minutos e transferidos para um banho com gelo. A fosfatase alcalina não esquelética foi então determinada diretamente e a fração esquelética indiretamente, calculada subtraindo-se o resultado da primeira do valor da fosfatase alcalina total do soro em estudo.

**Atividade da fosfatase alcalina esquelética = Atv. da fosf. alcalina total -  
Atv. da fosf. alcalina termoestável**

Todas as amostras estudadas foram coletadas no dia do exame radiológico e estocadas a -40°C até o momento da determinação enzimática.

#### **- Controle de qualidade dos métodos:**

A inativação pelo calor foi testada nas condições habituais do laboratório,

utilizando uma mistura de soros de crianças normais, nos tempos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de incubação a 56°C.

Para testar a exatidão dos métodos, as técnicas foram comparadas, utilizando-se soros provenientes de pacientes adultos com doença de Paget.

#### **- Reprodutibilidade dos métodos:**

Foi testada a reprodutibilidade dos métodos da fosfatase alcalina total e da inativação pelo calor, procedendo-se a dez determinações consecutivas da atividade desta enzima e de sua fração esquelética, utilizando-se a mesma mistura de soros normais citada acima. Para o método da precipitação foram realizadas sete medidas consecutivas, devido a escassez do reagente.

#### **4.2.7. Provas “funcionais” hepáticas**

Os níveis séricos de albumina, bilirrubinas, gama glutamiltransferase, 5' nucleotidase e aminotransferases, foram determinados no Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### **A - Albumina:**

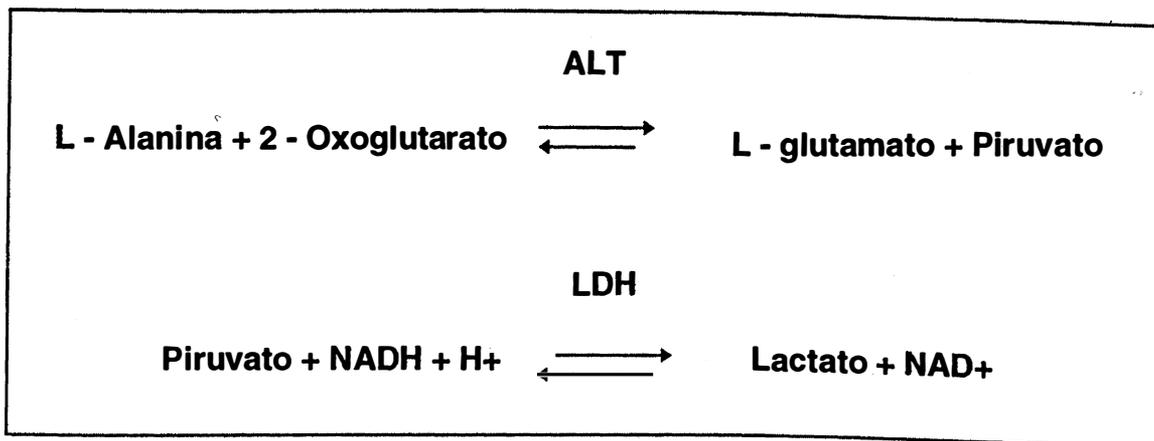
##### **a - Fundamento do método:**

Dosagem colorimétrica da albumina sérica com o verde de bromo-cresol a pH 4,2 em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) = 628 nm.

**b - Valores de referência:** 3,8 a 5,4 g/dl.

**B - Alaninoaminotranferase (ALT): EC 2.6.1.2****a - Fundamento do método:**

Método cinético em ultra-violeta.

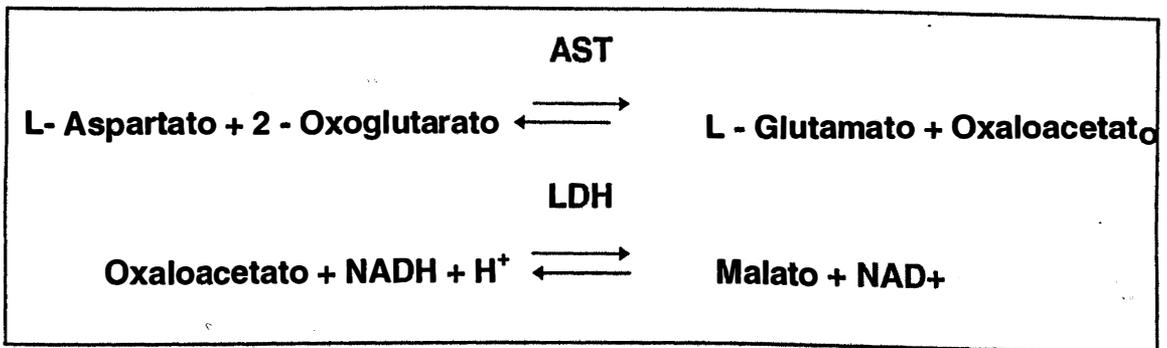


A velocidade da diminuição na concentração de NADH é proporcional à atividade da ALT, sendo medida a um  $\lambda = 340$  nm. O piruvato endógeno é eliminado durante a pré-incubação.

**b - Valores de referência:** até 25 U / l.

**C - Aspartatoaminotransferase (AST): EC 2.6.1.1****a - Fundamento do método:**

Método cinético em ultra - violeta.



A velocidade da diminuição na concentração de NADH é proporcional à atividade de AST, sendo medida em  $\lambda = 340 \text{ nm}$ . A lactato desidrogenase (LDH) está presente no substrato para converter piruvato endógeno em lactato, possibilitando medir o nível de ALT.

**b - Valores de referência:** até 20 U/l

#### **D - Bilirrubinas:**

##### **Bilirrubina Total (BT):**

##### **a - Fundamento do método:**

A bilirubina total (direta + indireta) é dosada por acoplamento com ácido sulfanílico diazotado em presença de cafeína e benzoato de sódio, por método colorimétrico, em  $\lambda = 520 \text{ nm}$ .

**b - Valores de referência:** até 20,52  $\mu\text{mol/l}$  (1,2 mg/dl)

- **Bilirrubina Direta:**

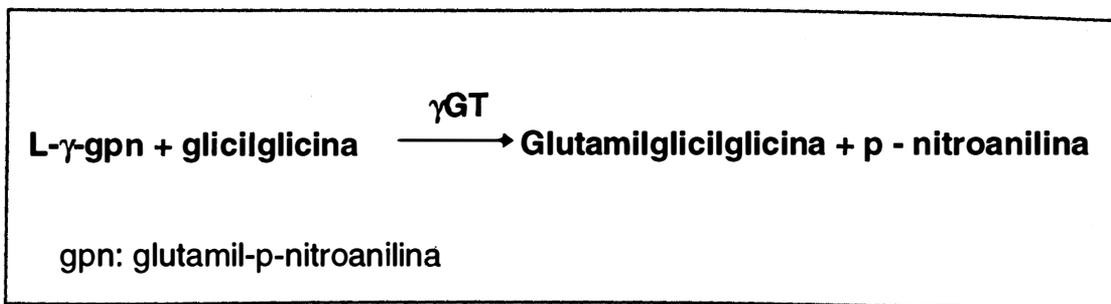
**a - Fundamento do método:**

A bilirrubina direta é acoplada com p-benzenoidiazonio-sulfonado em pH ácido, no qual a bilirrubina indireta permanece insolúvel e não reage. A cor vermelha resultante é proporcional ao teor de bilirrubina e se determina em espectrofotômetro em  $\lambda = 525 \text{ nm}$ .

**b - Valores de referência:** até  $6.8 \mu\text{mol/l}$  ( $0,4 \text{ mg/dl}$ )

**E - Gama Glutamiltransferase ( $\gamma\text{GT}$ ) (EC 2.3.2.1):**

**a - Fundamento do método:**

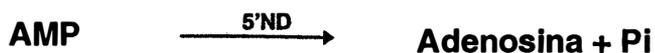


A quantidade de p-nitroanilina liberada é diretamente proporcional à atividade da  $\gamma\text{GT}$  na amostra, medida a um  $\lambda = 405 \text{ nm}$ , sendo o fator = 1158.

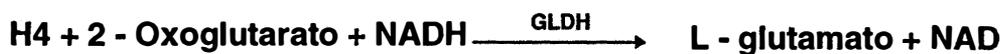
**b - Valores de referência:** Até  $28 \text{ U/l}$

**F - 5' nucleotidase (5'N): EC 3.1.3.5**

Método cinético em ultravioleta:



sendo ADA = Adenosina Deaminase



sendo GLDH = L-glutamato de hidrogenase.

A concentração de NAD produzido na reação, avaliada pelo decréscimo na absorvância a 340 nm, é diretamente proporcional à formação de adenosina que por sua vez reflete a atividade da 5' nucleotidase.

**b - Valores de referência:** Até 15 U / l.**G - Tempo de protrombina:**

A determinação do tempo de protrombina foi realizada no banco de sangue do HCPA, pelo método empregado rotineiramente no laboratório.

**a - Fundamento do método (Método de Quick):**

O tempo de protrombina é o tempo necessário para que o plasma coagule após a adição de cloreto de cálcio e do fator tecidual (extrato de cérebro ou de cérebro pulmão). O complexo formado entre o fator VII plasmático e o fator tecidual, em presença de cálcio ativa diretamente o fator X. O tempo de protrombina então avalia a integridade do sistema extrínseco.

**b - Valores de referência:** até 14,5 segundos.

**4.2.8. Determinação das concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio**

**A - Cálcio:**

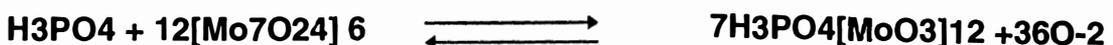
**a - Fundamento do método:**

Em solução alcalina, o cálcio forma um complexo violeta com o o-cresolftaleína, que é medido em  $\lambda = 570 \text{ nm}$ .

**b - Valores de referência:** 2,02 a 2,60  $\mu\text{mol} / \text{l}$  ( 8,10 a 10,4 mg/ 100ml).

**B - Fósforo:**

**a - Princípio do método:**



A absorvância do complexo formado lida em  $\lambda=340$  nm, é diretamente proporcional à concentração do fosfato inorgânico presente na amostra.

Amostras lipêmicas foram submetidas à desproteinização, antes da determinação bioquímica.

**b - Valores de referência:** 1,30 a 2,26  $\mu\text{mol} / \text{l}$  (4,0 a 7,0 mg/dl).

### **C - Magnésio:**

#### **a - Fundamento do método:**

Os íons magnésio reagem com o magon sulfonado em meio alcalino, formando um complexo de cor rósea que é proporcional à quantidade de íons magnésio presente na amostra, em comprimento de onda = 505 nm.

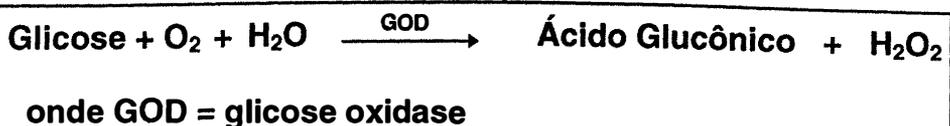
**b - Valores de referência:** 0,77 a 1,025  $\mu\text{mol} / \text{l}$  (1,9 a 2,5 mg / dl).

### **C - Glicose:**

#### **a - Fundamento do método:**

Teste enzimático-colorimétrico:

A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O produto formado é medido espectofotometricamente em  $\lambda = 490$  nm.



Para as determinações dos parâmetros bioquímicos incluídos neste estudo, foram utilizados reagentes de diferente procedência, fornecidos como “kits” e realizadas por auto-analisadores das marcas Cobas e Selectra, com exceção da determinação da fosfatase alcalina e sua fração esquelética, cuja leitura foi feita em espectrofotômetro da marca Hitachi U.2000.

### **4.3. Estudo radiológico**

#### **4.3.1. Delineamento do estudo**

Estudo com eixo de montagem transversal, eixo experimental observacional, unidade individual e eixo temporal contemporâneo.

**Fator em estudo:** colestase crônica

**Desfecho:** osteopenia

#### **4.3.2. Amostra e critérios de inclusão e exclusão**

Foram realizadas medidas da densidade óssea mineral em 20 crianças e adolescentes com colestase crônica, de ambos os sexos, com no mínimo 3 anos de idade, que também participaram do primeiro estudo. Todos os pacientes preenchiam os critérios de inclusão e exclusão já descritos, acrescentando-se a estes últimos a ingestão ou injeção de radionuclídeos, substâncias radiopacas ou medicamentos capazes de afetar a densidade óssea, nas últimas 72 horas antes do exame radiológico.

### **4.3.3. Variáveis em estudo e cálculo do tamanho da amostra**

Densidade óssea mineral foi estudada em relação às mesmas variáveis descritas para o primeiro estudo.

Por ocasião da montagem do projeto desta pesquisa não existiam publicações na literatura internacional, relacionadas a este assunto em crianças e adolescentes. Foi sugerido inicialmente o estudo de 25 doentes e respectivos controles, considerando-se um  $\alpha = 0,05$  ,  $\beta = 0,20$  e um poder da amostra de 80%.

Foram analisados 32 casos e como controles foram utilizados os resultados fornecidos por Thomas e colaboradores. Considerando que a faixa etária estudada por estes autores não inclui menores de 3 anos, 12 pacientes foram excluídos, resultando em uma amostra final de 20 doentes, com poder estatístico entre 68% e 70%.

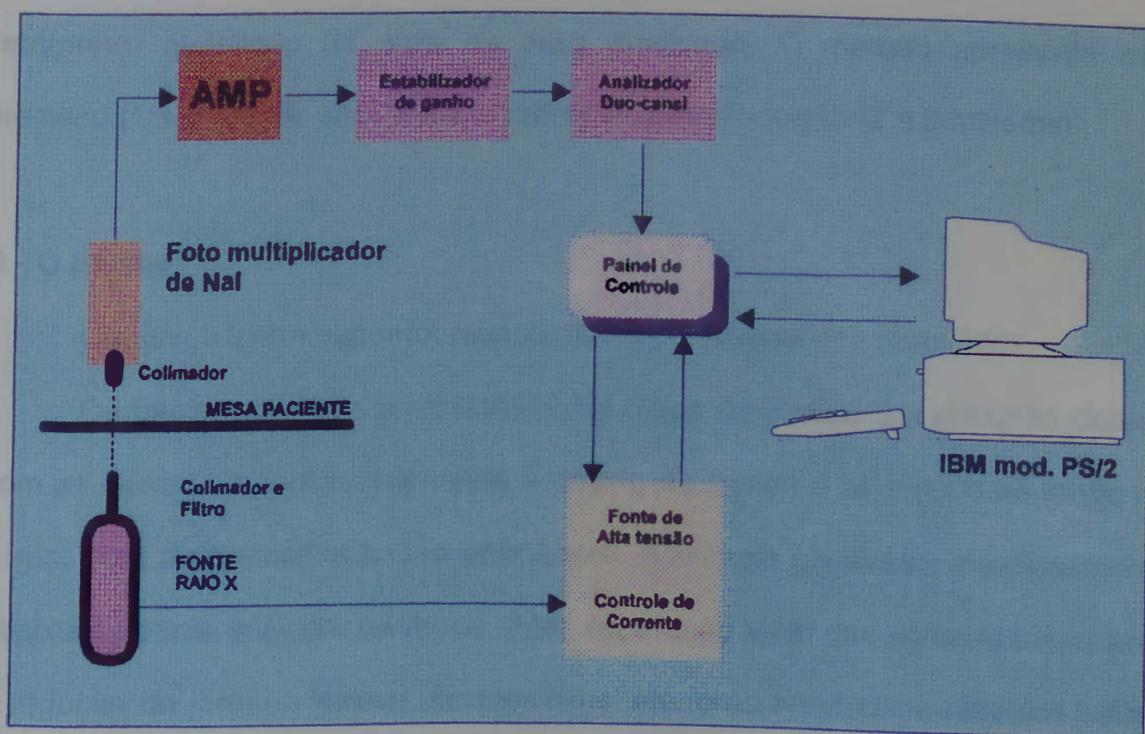
### **4.3.4. Determinação da densidade óssea mineral**

A densidade óssea mineral foi determinada por densitometria de dupla emissão com fonte de raios X (Lunar Cooperation, Model DPXL, Madison WF, USA).

## A - O equipamento de densitometria:

As seguintes estruturas compõem o aparelho de densitometria óssea utilizado nesta pesquisa (Fig. 4)

- a - Um tubo de raios X;
- b - Um tubo detector de cintilação;
- c - Um estabilizador de ganho;
- d - Um analisador Duo-canal;
- e - Um painel de controle ( IBM model PS/2 );
- f - Dois colimadores;
- g - Um filtro de raios X.



**Figura 4: O equipamento de densitometria óssea de dupla emissão, fonte de raios X.**

Fonte: Fiat & Mendonça, 1993

O tubo de raios X opera em um potencial constante de 76 Kvp, com uma corrente de 0,75 mA. Fornece feixes de radiação altamente colimados e com rápido fluxo de saída. A medida da densidade óssea mineral por dois fótons, baseia-se na análise computadorizada da atenuação integrada de um feixe punctiforme de radiação gama emitido por uma fonte externa, no caso raios X. Durante a realização do exame, o detector movendo-se juntamente com a fonte de radiação, coleta os fótons que passam através do corpo do paciente. O programa (software desenvolvido pela empresa fornecedora do equipamento) calcula a densidade óssea de cada amostra a partir da radiação que alcança o detector em cada pico de energia de acordo com a equação de transmissão de fótons. O sistema é calibrado para expressar os resultados em gramas por centímetro quadrado de área de osso analisado. O método apresenta boa precisão (1% a 2% de erro) e baixa radiação por exposição (2 a 3 mRems).

#### **B - O exame:**

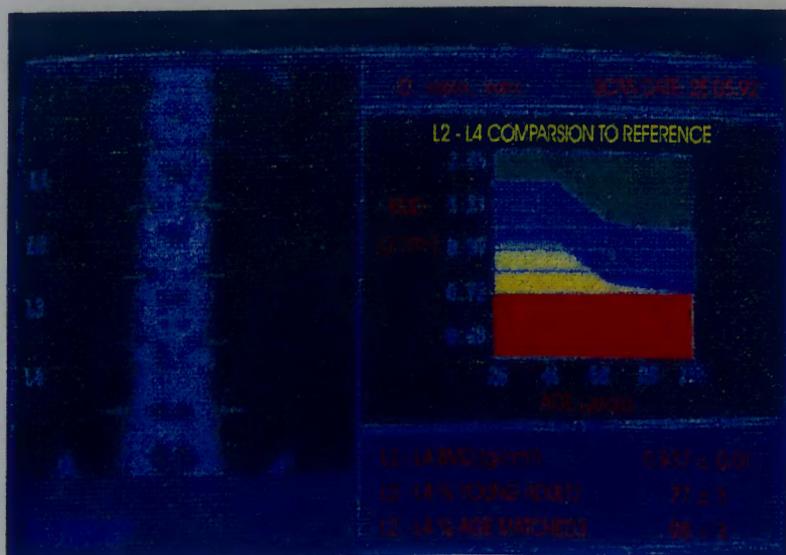
Um único examinador foi responsável pela análise dos resultados.

Os pacientes eram posicionados na mesa do exame em decúbito dorsal, com as costas no centro, mantendo a coluna estendida e os braços ao longo do corpo, com as palmas voltadas para baixo. A cabeça situava-se imediatamente abaixo da borda superior da mesa. Para separação ideal das vértebras lombares e redução da lordose lombar, os membros inferiores eram colocados em blocos de espuma, de modo a mantê-las em um ângulo de 45º em relação à mesa do exame. Eram examinadas as vértebras lombares de L1 a L4 e L2 a L4. Não foi necessário sedação ou contensão.

Responsáveis acompanhavam o exame, que tinha duração de 5 a 10 minutos.

### C - Interpretação diagnóstica:

A análise computadorizada da coluna lombar delimita os bordos laterais dos corpos vertebrais e identifica, com o auxílio do operador, os espaços intervertebrais. Qualquer estrutura lateralizada é facilmente identificada e excluída da análise. A seguir, o programa fornece a densidade óssea mineral de cada vértebra e valoriza, como resultado final, a densidade óssea da região que compreende as vértebras L2, L3 e L4 (Fig. 5).



**Figura 5: Análise computadorizada da densidade óssea da coluna lombar por densitometria óssea de dupla emissão, forte de raios X**

Fonte: Fiat & Mendonça, 1993

A interpretação dos resultados deve ser realizada em função da massa óssea ideal, assim como da idade, sexo e raça do paciente em estudo. Para comparação dos resultados, são utilizados valores de referência para maiores de 5 anos, fornecidos pelo programa. No presente estudo, foram utilizados como valores referenciais aqueles descritos por Thomas e colaboradores (Thomas e colaboradores, 1991). Foram considerados anormais valores de densidade óssea situados abaixo do limite inferior de normalidade expressos por esta tabela. (Anexo 2).

A densidade óssea mineral de cada pacientes foi estudada com relação às variáveis peso, estatura, idade, sexo e estágio de puberdade (determinada pela idade cronológica).

## **5. MÉTODO ESTADÍSTICO**

## 5. MÉTODO ESTATÍSTICO

O programa estatístico *SPSS (Statistical Package for Social Science)* foi utilizado nesta pesquisa.

Análise descritiva foi realizada com a finalidade de caracterizar a população quanto a aspectos demográficos, antropométricos e clínico-laboratoriais.

Estudos de regressão linear simples e múltipla foram realizados para avaliar as relações entre densidade óssea mineral, peso, estatura e idade de cada paciente.

Todos os testes estatísticos subseqüentes foram não-paramétricos, por não haver uma distribuição normal das variáveis de interesse. Correlações entre métodos de determinação da atividade da fosfatase alcalina esquelética, atividade desta enzima, demais parâmetros bioquímicos e valores de densidade óssea mineral foram analisadas pelo coeficiente de Spearman. Para análises comparativas foi aplicado o teste U de Mann-Whitney.

## **6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

## **6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O projeto foi aprovado quanto a seus aspectos metodológicos e éticos pela Comissão de Pesquisa e Pós-Graduação e Comissão de Ética e Pesquisa em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre de acordo com as normas de pesquisa em saúde (Portaria 01/ 88 do Congresso Nacional de Saúde).

## **7. RESULTADOS**

- 7.1. Pacientes: Características demográficas, antropométricas e clínico-laboratoriais
- 7.2. Estudo bioquímico
  - 7.2.1. Determinação da atividade da fosfatase alcalina total
  - 7.2.2. Determinação da fosfatase alcalina esquelética
    - 7.2.2.1. Método da precipitação por lectina
    - 7.2.2.2. Método da inativação pelo calor
    - 7.2.2.3. Correlação entre os métodos
    - 7.2.2.4. Estudo da exatidão dos métodos
    - 7.2.2.5. Reprodutibilidade dos métodos
  - 7.2.3. Correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e avaliação nutricional de acordo com escore Z e critérios de Gomez e Waterlow
  - 7.2.4. Correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética, tempo de colestase e provas de "função" hepática
  - 7.2.5. Correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio
- 7.3. Estudo radiológico: densitometria óssea em crianças e adolescentes com colestase crônica
  - 7.3.1. Correlação entre densidade óssea mineral e avaliação

nutricional de acordo com o escore Z e critérios de Gomez e Waterlow

- 7.3.2. Correlação entre densidade óssea mineral, tempo de colestase e provas de “função” hepática
- 7.3.3. Correlação entre densidade óssea mineral e atividades de fosfatase alcalina total e fosfatase alcalina esquelética
- 7.3.4. Correlação entre densidade óssea mineral e concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Pacientes: características demográficas, antropométricas e clínico-laboratoriais

Participaram do estudo bioquímico 32 pacientes de ambos os sexos, com idade variando de 0,4 a 18 anos (média de  $5,76 \pm 5,35$  anos). Doze eram do sexo feminino e 20 do sexo masculino. Quatorze pacientes tinham diagnóstico de atresia biliar extra hepática (43,8%), sete tinham cirrose criptogênica (21,9%), três apresentavam Síndrome de Alagille (9,4%), três tinham colestase idiopática (9,4%), dois, deficiência de  $\alpha$ 1anti-tripsina (6,3%), e houve um caso de hepatite crônica ativa auto-imune (3,1%), um de hepatite por vírus A, forma colestática (3,1%) e um cisto de colédoco (3,1%).

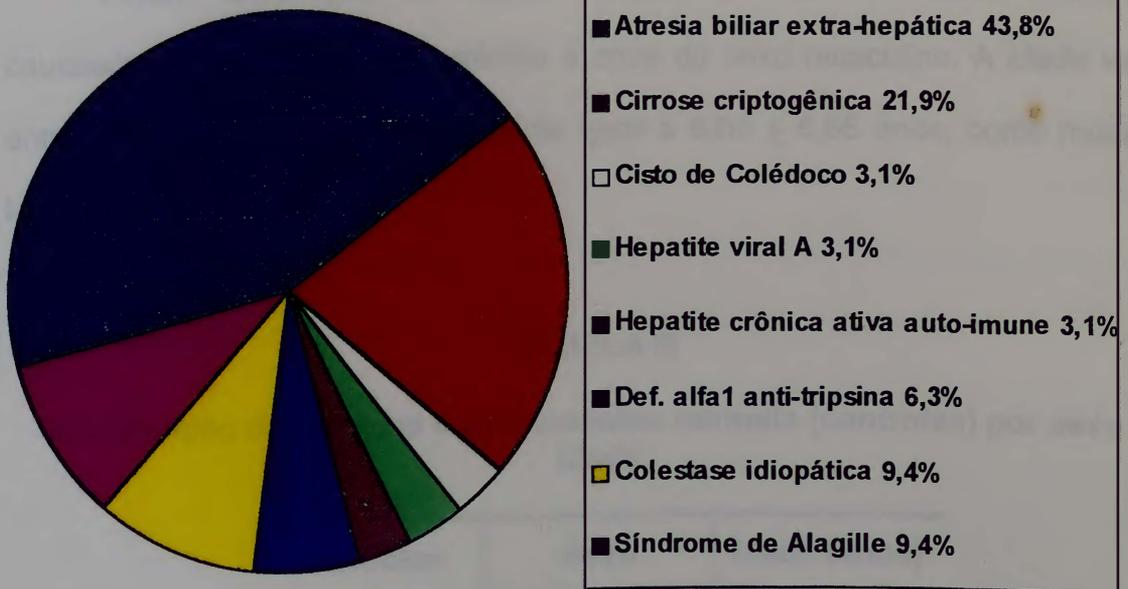
Realizaram densitometria óssea vinte destes pacientes (nº1 a nº20), com idade variando de 3 a 18 anos (média de  $8,20 \pm 4,86$  anos), sendo oito do sexo feminino. Cirrose criptogênica foi o diagnóstico mais prevalente (30%), seguido de atresia biliar extra hepática (25%).

Os dados relativos a estes pacientes são mostrados no anexo III, na tabela II e figuras 6 e 7.

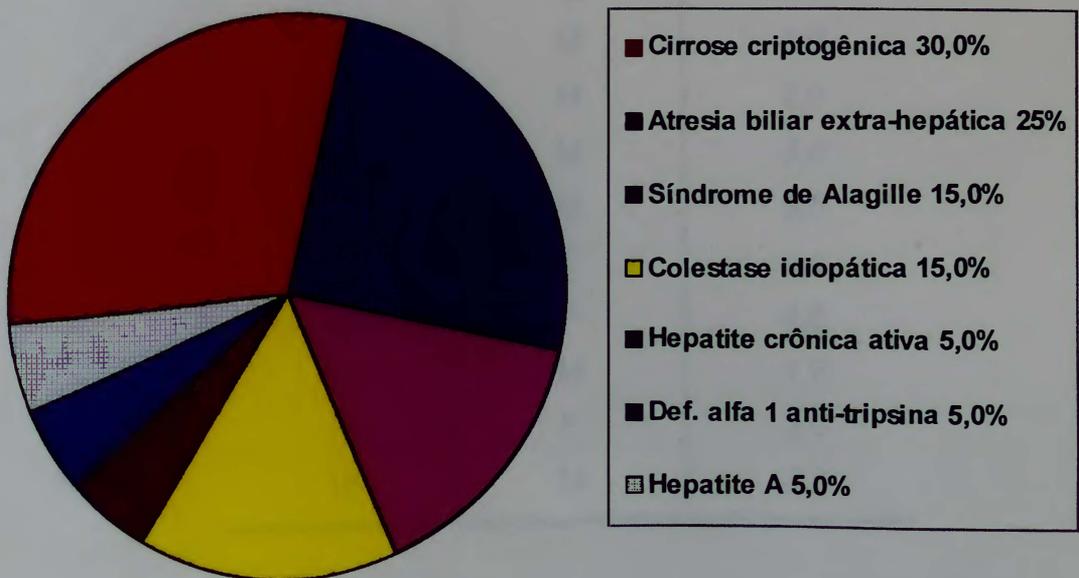
TABELA II

Distribuição dos pacientes por idade, sexo e etiologia da colestase

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Diagnóstico
1	F	9,0	Cirrose criptogênica
2	M	5,5	Atresia biliar extra hepática
3	M	15,7	Síndrome de Alagille
4	F	12,9	Cirrose criptogênica
5	F	12,6	Síndrome de Alagille
6	M	8,4	Síndrome de Alagille
7	F	6,9	Colestase Idiopática
8	F	5,3	Atresia biliar extra hepática
9	M	3,0	Deficiência de $\alpha_1$ anti-tripsina
10	M	6,8	Atresia biliar extra hepática
11	M	13,3	Hepatite crônica ativa auto-imune
12	F	7,6	Cirrose criptogênica
13	M	3,8	Atresia biliar extra hepática
14	M	18,0	Cirrose criptogênica
15	M	8,0	Hepatite viral A
16	M	18,0	Cirrose criptogênica
17	M	3,5	Colestase idiopática
18	F	7,6	Atresia biliar extra hepática
19	M	3,0	Atresia biliar extra hepática
20	F	3,0	Colestase idiopática
21	M	0,9	Atresia biliar extra hepática
22	M	1,0	Atresia biliar extra hepática
23	M	0,5	Deficiência de $\alpha_1$ anti-tripsina
24	F	1,0	Atresia biliar extra hepática
25	M	0,5	Atresia biliar extra hepática
26	M	0,9	Cisto de colédoco
27	M	2,3	Cirrose criptogênica
28	M	0,6	Cirrose criptogênica
29	M	0,8	Atresia biliar extra hepática
30	F	0,9	Atresia biliar extra hepática
31	F	0,8	Atresia biliar extra hepática
32	F	1,1	Atresia biliar extra hepática



**Figura 6: Distribuição dos pacientes por etiologia da colestase (n=32): estudo bioquímico**



**Figura 7: Distribuição dos pacientes por etiologia da colestase (n=20): estudo radiológico**

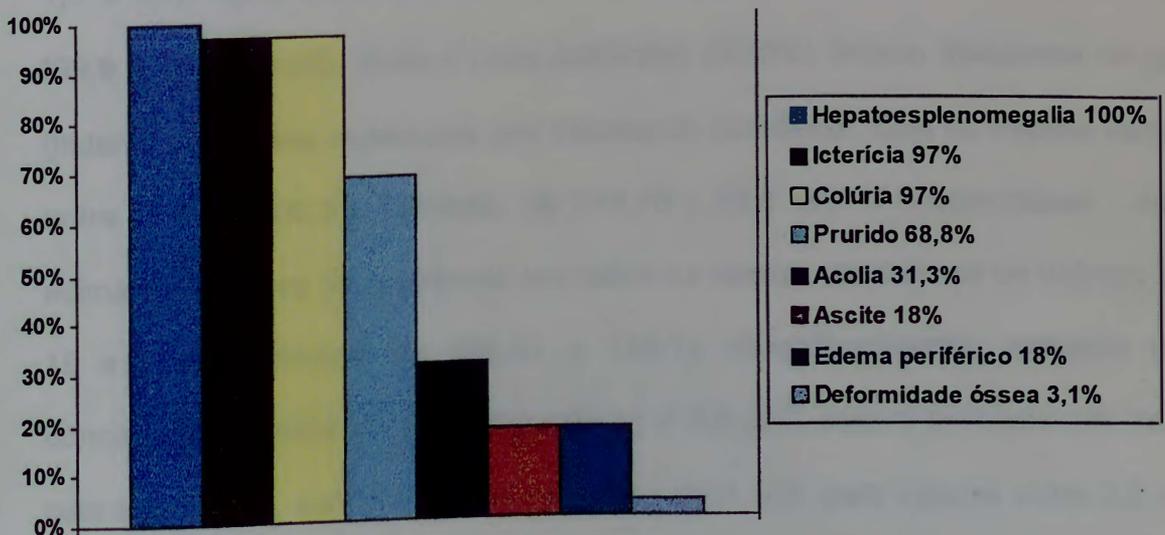
Foram envolvidos no estudo bioquímico, 16 voluntários saudáveis, caucasóides, cinco do sexo feminino e onze do sexo masculino. A idade variou entre 1,0 e 21,0 anos, sendo a média igual a  $6,06 \pm 6,65$  anos, como mostra a tabela III.

**TABELA III**

**Distribuição de crianças e adolescentes normais (controles) por sexo e idade**

<b>Controles</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>
1	M	6,0
2	M	4,0
3	F	3,0
4	F	3,0
5	M	15,0
6	M	21,0
7	M	20,0
8	M	2,0
9	M	2,0
10	M	3,0
11	M	3,5
12	F	4,6
13	F	4,6
14	M	1,8
15	F	3,0
16	M	3,0

A freqüência de sinais e sintomas apresentados pelos pacientes estudados está ilustrada na figura 8. Noventa e sete por cento destes (31/32), apresentavam icterícia-colúrica à entrada no estudo. Acolia esteve presente em 31,3% (10/32) e prurido em 68,8% (22/32). Todos apresentavam hepatoesplenomegalia. Ascite e edema periférico esteve presente em 18% dos casos (6/32). Um paciente apresentava alargamento de epífises nos membros inferiores (nº 19).



**Figura 8: Distribuição de sinais e sintomas observados em 32 pacientes por ocasião da densitometria óssea**

Tempo de colestase, definido como início da icterícia, acolia ou prurido à entrada no estudo foi, em média  $2,51 \pm 3,51$  anos. Trinta pacientes (93,7%) estavam em uso de vitaminas lipossolúveis e suplemento de cálcio por via oral. As doses de vitamina A, D e E foram respectivamente; 4500 U/I, 1200 U/I, 100 mg em 29 pacientes. Um paciente (nº 23) encontrava-se em uso de 1500 U/I de vitamina A, 400 U/I de vitamina D e 30 mg de vitamina E. Cálcio estava sendo suplementado, em trinta pacientes, na dose de cerca de 108 mg de cálcio ionizável por dia.

A tabela IV mostra os resultados das provas de "função" hepática observados nos 32 pacientes. Concentrações de bilirrubina direta variaram de 1,4 a 24,7mg/dl (22,2 a 419,9  $\mu\text{mol/l}$ ), sendo a média de  $5,88 \pm 5,11$  mg/dl ( $99,9 \pm 86,8$   $\mu\text{mol/l}$ ). Vinte e nove pacientes (90,6%) tinham atividades de gama glutamiltransferase superiores aos valores de referência, com os valores variando entre 10,0 e 1005,0 U/I (média de  $219,78 \pm 29,0$  U/I). 5'- nucleotidase esteve acima dos valores de referência em todos os casos, situando-se os valores entre 19 e 734 U/I (média de  $128,41 \pm 118,1$ ). Hipoalbuminemia, admitida como concentração sérica de albumina inferior a 3,5 g/dl, esteve presente em dezoito casos (56,25%), sendo a média de  $3,32 \pm 0,69$  g/dl, para valores entre 2,2 e 4,4 g/dl. Prolongamento do tempo de protrombina foi observado em treze casos (40,63%), com média e desvio padrão de  $17,53 \pm 8,30$  segundos, respectivamente.

TABELA IV

Concentrações séricas de bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD), albumina (ALB), valores de tempo de protrombina (TP) e atividades de aminotransferases (AST/ALT), gama glutamiltransferase ( $\gamma$ GT) e 5' Nucleotidase (5'N)

Pacientes	BT- $\mu$ mol/L (VR até 20,25)	(mg/dl) (VR=1,2)	BD- $\mu$ mol/L (VR até 6,8)	(mg/dl) (VR=0,4)	AST(U/l) (VR até 20)	ALT(U/l) (VR até 25)	ALB(g/dl) (VR até 3,5 a 5,4)	TP(s) (VR até 14,5)	$\gamma$ GT(U/l) (VR até 28)	5'N(U/l) (VR até 15)
1	160,0	9,4	138,5	8,1	42,0	56,0	2,2	16,0	56,0	106,0
2	68,4	4,0	47,8	2,8	110,0	102,0	3,5	13,0	70,0	115,0
3	68,4	4,0	34,2	2,0	240,0	155,0	4,4	13,8	548,0	123,0
4	90,6	5,3	44,5	2,6	159,0	171,0	4,1	38,0	41,0	66,0
5	61,5	3,6	29,0	1,7	20,0	49,0	3,3	18,3	145,0	150,0
6	39,3	2,3	22,2	1,3	54,0	36,0	2,3	13,5	17,0	74,0
7	53,0	3,1	37,6	2,2	23,0	20,0	3,9	14,2	10,0	55,0
8	171,0	10,0	143,5	8,0	57,0	69,0	3,4	15,5	125,0	92,0
9	63,2	3,7	44,5	2,6	79,0	108,0	3,3	14,2	335,0	60,0
10	104,3	6,1	97,4	5,7	143,0	111,0	4,2	13,2	100,0	85,0
11	164,1	9,6	119,7	7,0	390,0	663,0	2,7	13,0	57,0	56,0
12	82,0	4,8	59,8	3,5	646,0	331,0	3,0	48,0	110,0	60,0
13	116,2	6,8	99,2	5,8	50,0	67,0	2,3	12,7	252,0	151,0
14	405,2	23,7	273,6	16,0	33,0	54,0	2,7	52,0	354,0	49,0
15	312,9	18,3	186,4	10,9	66,0	69,0	4,0	11,8	40,0	29,0
16	35,9	2,1	27,4	1,6	105,0	327,0	2,0	31,0	65,0	86,0
17	141,9	8,3	88,9	5,2	9,0	37,0	4,0	12,0	45,0	61,0
18	53,0	3,1	32,5	1,9	63,0	79,0	3,3	14,0	75,0	100,0
19	461,7	27,0	273,6	16,0	85,0	170,0	2,7	16,0	90,0	62,0
20	42,7	2,5	35,9	2,1	93,0	51,0	2,5	14,0	42,0	37,0
21	127,5	7,5	68,0	4,0	118,0	146,0	2,5	12,0	339,0	167,0
22	49,0	7,0	66,3	3,9	80,0	51,0	3,2	15,0	156,0	98,0

... continuação da tabela IV

Pacientes	BT- $\mu$ mol/L (VR até 20,25)	(mg/dl) (VR=1,2)	BD- $\mu$ mol/L (VR até 6,8)	(mg/dl) (VR=0,4)	AST(U/l) (VR até 20)	ALT(U/l) (VR até 25)	ALB(g/dl) (VR até 3,5 a 5,4)	TP(s) (VR até 14,5)	$\gamma$ GT(U/l) (VR até 28)	5'N(U/l) (VR até 15)
23	79,9	4,7	59,5	3,5	118,0	134,0	3,8	14,0	597,0	140,0
24	83,3	4,9	68,0	4,0	58,0	26,0	2,3	14,0	498,0	128,0
25	243,1	14,3	154,7	9,1	61,0	38,0	4,2	15,0	170,0	71,0
26	198,9	11,7	153,0	9,0	70,0	81,0	3,6	13,0	621,0	152,0
27	49,3	2,9	27,2	1,6	70,0	43,0	3,2	16,0	64,0	40,0
28	151,3	8,9	81,6	4,8	101,0	120,0	4,0	14,0	280,0	19,0
29	134,3	7,9	73,1	4,3	53,0	41,0	3,3	12,0	352,0	135,0
30	195,5	11,5	273,7	16,1	65,0	69,0	3,9	15,0	1005,0	734,0
31	642,6	37,8	419,9	24,7	125,0	53,0	2,6	21,0	110,0	120,0
32	125,8	7,4	91,8	5,4	83,0	62,0	3,7	13,0	300,0	360,0

VR = valor de referência

A tabela V mostra as concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio. Hipocalcemia, concentrações séricas de cálcio menores que 8,5 mg/dl ( $2,12 \mu\text{mol/l}$ ), foi observada em três casos, sendo a média e desvio padrão da calcemia iguais a  $9,28 \pm 1,1 \text{ mg/dl}$  ( $2,32 \pm 0,25 \mu\text{mol/l}$ ), respectivamente. Todos os pacientes apresentaram concentrações normais de magnésio: média de  $2,36 \pm 0,52 \text{ mg/dl}$  ( $0,95 \pm 0,21 \mu\text{mol/l}$ ). Seis pacientes (18,7%) tinham concentrações séricas de fósforo elevadas, sendo a média e desvio padrão de  $6,23 \pm 3,43 \text{ mg/dl}$  ( $1,99 \pm 1,09 \mu\text{mol/l}$ ).

TABELA V

Concentrações séricas de cálcio (corrigidas pela concentração sérica de albumina),  
fósforo e magnésio

Pacientes	Cálcio		Fósforo		Magnésio	
	$\mu\text{mol/l}$ (VR=2,02 a 2,5)	(mg/dl) (VR=8,10 a 10,4)	$\mu\text{mol/l}$ (VR=1,3 a 2,6)	(mg/dl) (VR=4,0 a 7,0)	$\mu\text{mol/l}$ (VR=0,77 a 1,025)	(mg/dl) (VR=1,0 a 2,5)
1	2,3	10,9	1,1	3,5	0,9	2,3
2	2,4	9,6	1,6	5,0	0,7	1,8
3	2,6	10,3	1,3	4,0	0,8	2,0
4	2,2	8,8	1,2	3,3	0,8	2,0
5	2,6	10,3	1,6	5,1	0,9	2,2
6	2,8	11,3	2,7	8,3	0,8	1,9
7	2,7	10,9	1,9	5,8	0,6	1,5
8	2,3	9,2	2,7	8,3	1,0	2,5
9	2,6	10,3	1,8	5,7	0,8	2,0
10	2,4	9,4	1,3	4,2	0,7	1,8
11	2,5	10,0	1,6	5,0	1,0	2,5
12	2,5	10,1	1,6	4,9	0,9	2,3
13	2,8	11,3	1,3	4,0	1,0	2,5
14	2,3	9,0	1,4	4,2	1,1	2,7
15	2,5	9,8	1,4	4,5	1,0	2,4
16	2,9	11,5	1,4	4,5	0,7	1,8
17	2,8	11,4	2,2	6,9	1,0	2,6
18	2,4	9,8	1,4	4,5	1,7	1,8
19	2,5	9,9	1,8	5,5	0,9	2,2
20	2,9	11,4	1,5	4,7	0,6	1,5
21	2,2	8,7	5,8	17,8	1,3	3,3
22	2,4	9,6	1,6	5,1	0,9	2,3

... continuação da tabela V

Pacientes	Cálcio		Fósforo		Magnésio	
	$\mu\text{mol/l}$ (VR=2,02 a 2,5)	(mg/dl) (VR=8,10 a 10,4)	$\mu\text{mol/L}$ (VR=1,3 a 2,6)	(mg/dl) (VR=4,0 a 7,0)	$\mu\text{mol/L}$ (VR=0,77 a 1,025)	(mg/dl) (VR=1,0 a 2,5)
23	5,5	10,5	5,5	16,8	1,2	3,0
24	2,6	10,36	1,9	5,9	0,9	2,3
25	1,5	6,0	1,7	5,3	0,8	2,2
26	2,5	10,12	2,1	6,5	1,4	3,5
27	2,3	9,34	2,1	6,4	1,2	3,0
28	2,2	8,7	1,8	5,5	1,2	3,0
29	2,9	7,56	1,3	4,0	0,8	2,0
30	2,8	11,1	2,5	7,5	1,2	3,0
31	2,6	2,15	1,0	3,2	1,0	2,5
32	2,5	10,14	4,2	12,8	1,2	3,0

VR = valor de referência

A avaliação nutricional dos pacientes identifica 37,5% (12/32) e 28% (9/32) como desnutridos pelo *escore Z*, para os parâmetros estatura/comprimento/idade e peso/idade, respectivamente, não havendo desnutridos quando se ajusta o peso para altura. De acordo com o critério de Gomez, 40,7% dos pacientes são eutróficos (13/32); 28,1% (9/32) são desnutridos de grau I; 28,1%, desnutridos de grau II e 3,1 (1/32) são desnutridos de grau III. Segundo Waterlow, 46,87% dos pacientes apresentavam desnutrição progressa, 28,1%, desnutrição crônica, 18,8% eram eutróficos e 6,2% apresentavam desnutrição atual. Estes dados são mostrados nas tabelas VI, VII e VIII e anexo IV.

**TABELA VI**

**Distribuição dos pacientes em relação ao estado nutricional de acordo com o *escore Z***

Estado nutricional	Escore Z		
	P/A	P/I	A/I
Eutróficos	32	23	20
Desnutridos	0	9	12
Total	32	32	32

**TABELA VII**

**Distribuição dos pacientes em relação ao estado nutricional de acordo com o critério de Gomez**

Estado nutricional	Nº de pacientes	Porcentagem
Eutróficos	13	40,7
Desnutrição Grau I	9	28,1
Desnutrição Grau II	9	28,1
Desnutrição Grau III	1	3,1
Total	32	100,0

**TABELA VIII**

**Distribuição dos pacientes em relação ao estado nutricional de acordo com os critérios de Waterlow**

Estado nutricional	Nº de pacientes	Porcentagem
Eutrófico	6	18,8%
Desnutrição atual	2	6,2%
Desnutrição pregressa	15	46,9%
Desnutrição crônica	9	28,1%
Total	32	100,0%

## 7.2. Estudo bioquímico

### 7.2.1. Determinação da atividade da fosfatase alcalina total

A atividade da fosfatase alcalina total foi determinada em todos os pacientes e em 16 indivíduos normais. Os resultados variaram entre 333 U/l a 2080 U/l no grupo de pacientes, sendo a média de  $1014,7 \pm 241,1$  U/l e 152,0 U/l a 412,0 U/l no grupo controle, sendo a média de  $260,8 \pm 70,3$  U/l. Foi estatisticamente significativa a diferença entre os grupos ( $p < 0,0001$ ), como mostra a tabela IX. Comparação entre valores de fosfatase alcalina encontrados e valores da literatura (Meits, 1977), mostra forte correlação entre estes, como pode ser visto na tabela X.

**TABELA IX**

**Comparação entre os valores médios de atividades de fosfatase alcalina total nos grupos de pacientes e indivíduos normais (teste U de Mann-Whitney)**

<b>Grupos estudados</b>	<b>Média de atividade de fosfatase alcalina total (U/l)</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Nível de significância</b>
pacientes	1014,7	241,1	$p < 0,0001$
controles	260,8	70,3	

TABELA X

**Atividade de fosfatase alcalina total: correlação entre resultados fornecidos pela literatura (Meites, 1977) e resultados observados neste estudo em relação a faixa etária**

Faixa etária	Atividade de fosfatase alcalina total		Coeficientes de correlação (Spearman)
	Meites, 1977	Este estudo, 1995	
1a — 2a	415,0	369,0	0,8
2a — 5a	341,0	280,7	
5a — 7a	341,0	248,0	
13a — 15a	332,0	329,0	
> 18 a	126,0	177,0	

## 7.2.2. Determinação da fosfatase alcalina esquelética

### 7.2.2.1. Método da precipitação por lectina

A atividade da fosfatase alcalina esquelética pelo método da precipitação da lectina de germe de trigo foi determinada em 23 pacientes e 10 controles. Os pacientes apresentaram atividades da enzima entre 76,1 e 1306,8 U/l, com média e desvio padrão iguais a  $404,3 \pm 270,4$  U/l, respectivamente. Nos controles, os valores encontrados estavam entre 65,0 U/l e 260,0 U/l, sendo a média de

122,5  $\pm$  83,3 U/l. Houve diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,0001$ ), como ilustra as tabelas XI, XII e XIII.

**TABELA XI**

**Resultados das atividades enzimáticas da fosfatase alcalina total (fosfataseemia) e fosfatase alcalina esquelética (método de precipitação por lectina) em 23 pacientes com colestase crônica**

<b>Pacientes</b>	<b>Fosfataseemia alcalina ( U/l)</b>	<b>Fosfatase alcalina esquelética Método da lectina (precipitação) % fosfataseemia</b>
1	1001,0	431,0 (43,0%)
2	550,0	329,9 (59,9%)
3	911,0	514,2 (56,4%)
4	432,0	141,3 (32,7%)
5	692,0	271,8 (39,2%)
6	1001,0	695,0 (69,0%)
7	775,0	546,0 (78,0%)
8	1064,0	773,0 (73,0%)
9	421,0	246,0 (58,0%)
10	333,0	176,0 (53,0%)
11	475,0	428,0 (90,2%)
12	599,0	446,0 (77,0%)
13	2080,0	1306,8 (62,8%)
14	555,0	212,6 (38,3%)
15	912,0	496,0 (54,0%)
16	612,0	281,7 (46,0%)
17	527,0	428,0 (81,0%)
18	620,0	480,0 (77,0%)
19	838,8	95,6 (11,4%)
20	424,5	76,1 (17,9%)
21	781,5	359,0 (45,9%)
30	419,5	146,0 (34,8%)
32	700,7	343,0 (48,9%)

TABELA XII

**Resultados da atividade de fosfatase alcalina total (fosfatase) e fosfatase alcalina esquelética (método de precipitação por lectina) em 10 crianças e adolescentes normais (controles)**

<b>Controles</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Fosfatase (U/l)</b>	<b>Fosfatase alcalina esquelética Método de precipitação por lectina % fosfatase</b>
1	6,0	248,0	125,0 (50,4%)
4	3,0	258,0	106,5 (41,1%)
9	2,0	233,0	157,3 (67,5%)
10	3,0	236,0	163,6 (69,0%)
11	3,5	258,0	202,2 (78,0%)
12	4,5	240,0	138,0 (57,0%)
13	4,6	276,0	260,0 (94,0%)
14	1,8	169,0	101,0 (59,7%)
15	3,0	245,0	190,0 (77,5%)
16	3,0	224,0	65,0 (25,0%)

TABELA XIII

**Comparação entre os valores médios de atividades de fosfatase alcalina esquelética (método da precipitação por lectina de germe de trigo) nos grupos de pacientes e controles (teste U de Mann-Whitney)**

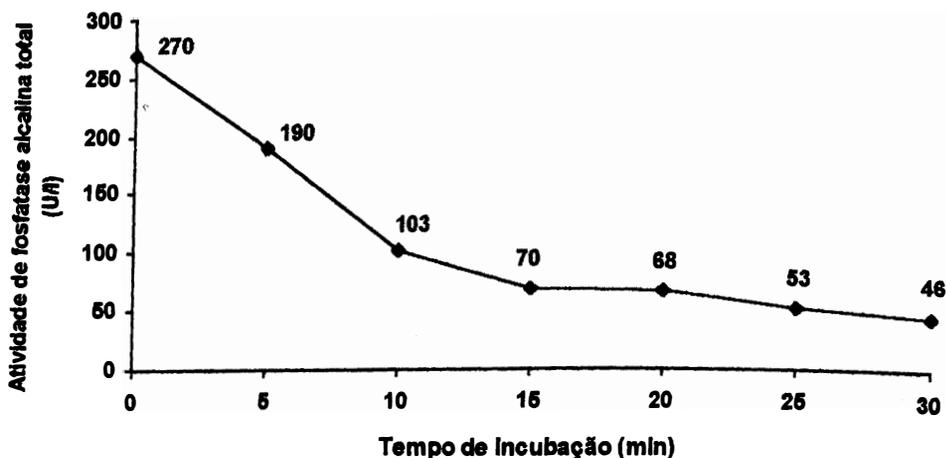
<b>Grupos estudados</b>	<b>Média de atividade da fosfatase alcalina esquelética (U/l)</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Nível de significância (p)</b>
pacientes	404,3	270,4	p < 0,0001
controles	122,4	83,3	

Em termos percentuais, a fosfatase alcalina esquelética determinada por este método, correspondeu de 11,4% a 90,2% da fosfatase, sendo a média de 54,4% para os pacientes. Nos controles, estes valores foram de 31,2% a 94,0%, com média igual a  $63,7\% \pm 24,15\%$ , sendo não significativa esta diferença.

#### **7.2.2.2. Método da inativação pelo calor**

Os resultados obtidos pela análise da curva de inativação da fosfatase alcalina realizada nas condições do laboratório, mostra um platô de inativação aos 15 minutos de incubação das amostras a 56°C, como pode ser visto na

figura 9. Deste modo, a atividade da fosfatase alcalina esquelética por este método foi medida após incubação dos soros a 10 e 15 minutos.



**Figura 9: Curva de inativação térmica da fosfatase alcalina total em 6 diferentes tempos de incubação das amostras a 56°C: soros de crianças e adolescentes normais**

Trinta e dois pacientes e 16 indivíduos normais foram estudados. Após incubação por 10 minutos, a atividade da fração esquelética da fosfatase alcalina variou de 186,0 U/l a 1623,0 U/l, nos pacientes, sendo a média de  $578,3 \pm 284,4$  U/l. Os resultados nos controles mostravam valores entre 96,0 U/l e 311,0 U/l, com média de  $196,0 \pm 62,4$  U/l. A inativação por incubação aos 15 minutos, mostrou atividades entre 153,0 U/l a 1910,0 U/l, sendo a média de  $598,86 \pm 332,6$  U/l, nos pacientes. Atividades entre 109,0 U/l e 351,0 U/l foram observadas nos

controles, com média igual a  $204,6 \pm 65,2$  U/l. Diferenças significativas foram encontradas entre os grupos nos diferentes tempos de inativação, como mostra as tabelas XIV, XV, XVI e XVII ( $p < 0,0001$ ).

**TABELA XIV**

**Resultados das atividades de fosfatase alcalina total (fosfatase) e fosfatase alcalina esquelética (método de inativação pelo calor) em 23 pacientes com colestase crônica**

Pacientes	Fosfatase alcalina (U/l)	Fosfatase alcalina esquelética(U/l)	
		Método da inativação pelo calor (10min) % fosfatase	Método da inativação pelo calor (15 min) % fosfatase
1	1001,0	816,0 (81,5%)	933,5 (93,0%)
2	550,0	465,0 (84,5%)	523,0 (95,0%)
3	911,0	796,0 (87,3%)	820,5 (90,0%)
4	432,0	384,0 (89,0%)	413,0 (96,0%)
5	692,0	582,5 (84,0%)	644,0 (93,0%)
6	1001,0	760,0 (76,0%)	643,0 (64,0%)
7	775,0	638,0 (82,0%)	621,0 (80,0%)
8	1064,0	856,0 (80,0%)	804,0 (76,0%)
9	421,0	238,0 (56,0%)	200,0 (47,5%)
10	333,0	186,0 (50,0%)	153,0 (46,0%)
11	475,0	415,0 (87,0%)	392,0 (82,0%)
12	599,0	535,0 (89,0%)	466,0 (77,0%)
13	2080,0	1623,0 (78,0%)	1910,0 (92,2%)
14	555,0	309,0 (56,0%)	288,0 (52,0%)
15	912,0	748,0 (82,0%)	832,0 (91,0%)
16	612,0	568,0 (92,8%)	605,0 (98,8%)
17	527,0	489,0 (92,8%)	446,5 (85,0%)
18	620,0	476,0 (76,8%)	500,0 (80,0%)
19	838,8	654,8 (78,0%)	768,0 (91,0%)
20	424,5	357,0 (84,0%)	386,0 (90,9%)
21	781,5	601,0 (76,9%)	320,5 (41,0%)
30	419,5	296,0 (70,5%)	156,0 (37,1%)
32	700,7	202,7 (28,9%)	390,7 (55,7%)

TABELA XV

**Atividades de fosfatase alcalina total (fosfataseemia) e fosfatase alcalina esquelética (método da inativação pelo calor) em 16 crianças e adolescentes normais (controles)**

Controles	Idade (anos)	Fosfataseemia (U/l)	Fosfatase alcalina esquelética	
			Método de inativação pelo calor (10 min)	Método de inativação pelo calor 15 min
1	6,0	248,0	166,0 (67,0%)	172,0 (69,0%)
2	4,0	412,0	311,0 (75,0%)	351,0 (85,0%)
3	3,0	378,0	280,0 (74,0%)	294,0 (78,0%)
4	3,0	258,0	190,0 (74,0%)	197,0 (76,0%)
5	15,0	329,0	277,0 (84,0%)	276,0 (83,8%)
6	21,0	202,0	115,0 (57,0%)	128,0 (63,0%)
7	20,0	152,0	96,0 (63,0%)	109,0 (71,7%)
8	2,0	327,0	157,0 (48,0%)	187,0 (57,0%)
9	2,0	233,0	205,0 (87,8%)	200,0 (85,8%)
10	3,0	236,0	218,0 (92,0%)	220,0 (93,0%)
11	3,5	258,0	240,0 (93,0%)	255,0 (98,0%)
12	4,5	240,0	165,0 (68,0%)	167,7 (69,0%)
13	4,6	276,0	230,0 (83,0%)	236,0 (85,5%)
14	1,8	369,0	240,0 (65,0%)	252,0 (68,3%)
15	3,0	245,0	206,0 (84,0%)	200,0 (81,6%)
16	3,0	224,0	128,0 (57,0%)	123,0 (54,9%)

TABELA XVI

**Comparação entre os valores médios de atividades de fosfatase alcalina esquelética nos grupos de pacientes e indivíduos normais (controles)**

<b>Grupos estudados</b>	<b>Média de atividade da fosfatase alcalina (10 min)</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Média de atividade da fosfatase alcalina (15 min)</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Nível de significância</b>
pacientes	578,3	284,4	598,8	332,6	p < 0,0001
controles	196,0	62,4	204,6	65,2	

Os percentuais médios da fosfatase alcalina esquelética em pacientes e controles, determinada pelo método da inativação pelo calor aos 10 e 15 minutos de incubação em relação à fosfatasemia foram, respectivamente 71,3 % e 70,5% e 72,2% e 74,8%; sem significância estatística ( $p=0,48$ ). Os valores extremos encontrados à inativação por 10 minutos foram de 28,0% a 92,0%, nos primeiros e 48,0% a 87,0 % nos controles. À incubação por 15 minutos mostrou valores entre 35,5% e 98,8%, nos pacientes e 48,0 a 87,8% nos controles.

### **7.2.2.3. Correlação entre os métodos**

Na tabela XVII são apresentados os valores das atividades de fosfatase alcalina esquelética pelos métodos de precipitação e inativação aos 10 e 15 minutos e os respectivos coeficientes de correlação, sendo observada forte

correlação entre os métodos de inativação pelo calor nos diferentes tempos estudados ( $r=0,98$ ;  $p<0,0001$ ). Quando se analisam as correlações entre o método da precipitação por lectina e os métodos de inativação pelo calor, observa-se que o método da inativação por incubação a 10 minutos é o que melhor se relaciona com a precipitação ( $r=0,74$ ;  $p<0,0001$ ).

**TABELA XVII**

**Estudo de correlação entre os métodos bioquímicos estudados para determinação da atividade da fosfatase alcalina esquelética**

<b>Variáveis estudadas</b>	<b>Coefficiente de Correlação (Spearman)</b>	<b>Nível de significância (p)</b>
Método da inativação pelo calor aos 10 e 15 min de incubação a 56°C	0,98	$p < 0,0001$
Método da inativação pelo calor aos 10 min de incubação a 56°C/método da precipitação por lectina	0,74	$p < 0,0001$
Método da inativação pelo calor aos 15 min de incubação a 56°C/método da precipitação por lectina	0,62	$p < 0,003$

### 7.2.2.4. Estudo da exatidão dos métodos

Para testar a exatidão dos métodos foram estudados quatro soros de pacientes adultos com doença de Paget, acompanhados no setor de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo determinadas as atividades de fosfatase alcalina total e esquelética pelos métodos da precipitação e da inativação pelo calor aos 10 e 15 minutos.

Os resultados são mostrados na tabela XVIII. As médias de fosfatasemia alcalina e sua fração esquelética pelos métodos da precipitação, inativação pelo calor aos 10 e 15 minutos, foram respectivamente  $628,0 \pm 302,7$  U/l;  $260,0 \pm 94,1$  U/l;  $625,5 \pm 301,2$  U/l;  $617,7 \pm 305,2$  U/l.

**TABELA XVIII**

**Estudo da exatidão dos métodos: atividade de fosfatase alcalina total (fosfatasemia) e fosfatase alcalina esquelética em 4 pacientes adultos com doença de Paget**

Pacientes	Fosfatasemia (U/l)	Fosfatase alcalina esquelética		
		Método da inativação pelo calor - 10 min (% fosfatasemia)	Método de inativação pelo calor - 15 min (% fosfatasemia)	Método de precipitação por lectina (% fosfatasemia)
1	228,0	215,0 (94,2)	200,0 (87,7)	184,0 (80,7)
2	900,0	886,0 (98,4)	850,0 (94,4)	384,0 (42,6)
3	564,0	500,0 (88,6)	500,0 (88,6)	283,0 (50,2)
4	820,0	800,0 (97,5)	810,0 (98,7)	190,0 (23,2)

O método da inativação mostrou que em média 95% da atividade da fosfatase corresponde a fração esquelética da fosfatase alcalina quando aos 10 minutos de incubação e 92,9%, quando aos 15 minutos de incubação a 56°. A técnica da precipitação por lectina “recuperou” em média somente 42,6% da fosfatase esquelética presente nas amostras.

#### **7.2.2.5. Reprodutibilidade dos métodos**

Os resultados relativos à reprodutibilidade dos métodos são mostrados na tabela XIX. O coeficiente de variação observado foi de 8,6% para o método da fosfatase alcalina; 4,5% e 8,1% para o método da inativação pelo calor aos 10 e 15 minutos de incubação, respectivamente e de 14,9% para o método da precipitação por lectina.

TABELA XIX

## Reprodutibilidade dos métodos

	Fosfatase alcalina (U/l)	Fosfatase alcalina esquelética (U/l)		
		Método do calor (10min)	Método do calor (15min)	Método da precipitação por lectina
Determinação: 1	362,5	300,0	315,0	128,9
2	360,2	269,7	287,0	192,9
3	354,2	307,8	319,8	127,9
4	386,1	240,9	250,2	144,4
5	335,2	313,0	317,0	155,9
6	298,9	317,0	313,2	143,9
7	354,3	314,0	319,2	133,4
8	290,6	311,4	253,4	-
9	348,7	321,2	316,0	-
10	369,1	315,4	313,4	-
Média (U/l):	345,9	307,6	330,3	146,7
Desvio Padrão(U/l):	29,9	14,0	27,3	22,7
C.V.*	8,6	4,5	8,1	14,9

\* C.V. = coeficiente de variação (desvio padrão / média x 100)

O método da inativação pelo calor aos 10 minutos, de acordo com nossos resultados, é o que apresenta melhor precisão e exatidão. Deste modo,

procedemos ao estudo das correlações entre fosfatase alcalina esquelética determinada por este método e as demais variáveis de interesse.

### 7.2.3. Correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e avaliação nutricional de acordo com escore Z e classificação de Gomez e Waterlow

Não houve relação estatisticamente significativa entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e valores de escore Z para peso/idade e comprimento ou altura/idade, como mostra a tabela XX.

**TABELA XX**

**Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e avaliação nutricional segundo o escore Z (teste U de Mann Whitney)**

Estado nutricional	Escore Z	
	P/I (nº de pac.)	A/I (nº de pac.)
Eutróficos	23	9
Desnutridos	9	12
Nível de significância	0,52 (NS*)	0,90 (NS*)

\* NS = não significativo

Quando se analisa o critério de Gomez, também não se observa significância estatística entre atividade de enzima e estado nutricional, como pode ser visto na tabela XXI.

Para fins de análise estatística, classificamos os pacientes em nutridos ou desnutridos segundo os critérios de Waterlow e nenhuma relação significativa foi observada. O estudo da relação entre os diferentes estágios de desnutrição propostos por Waterlow e a forma esquelética da fosfatase alcalina também não mostra significância estatística, como pode ser visto nas tabelas XXII e XXIII.

**TABELA XXI**

**Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e avaliação nutricional segundo o critério de Gomez (teste U de Mann-Whitney)**

<b>Estágio nutricional</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Nível de significância</b>
Eutróficos	13	0,58 (NS*)
Desnutrição Grau I	9	
Desnutrição Grau II	9	
Desnutrição Grau III	1	

\*NS = não significativo

**TABELA XXII**

**Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e estado nutricional segundo a classificação de Waterlow (teste U de Mann-Whitney)**

<b>Estado nutricional</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Nível de significância</b>
Desnutrido	26	0,13 (NS*)
Eutrófico	6	
Total	32	

\* NS = não significativo

**TABELA XXIII**

**Estudo de correlação entre atividade da fosfatase alcalina esquelética e estágios de desnutrição segundo os critérios de Waterlow (teste U de Mann-Whitney)**

<b>Estágio de desnutrição</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Nível de significância</b>
Desn. atual	2	0,27 (NS*)
Desn. progressa	15	
Desn. crônica	9	
Total	26	

\*NS = não significativo

#### **7.2.4. Correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética, tempo de colestase e provas de “função” hepática**

Como pode ser visto na tabela XXIV, não foi observada relação significativa entre atividade de fosfatase alcalina esquelética, tempo de colestase, e atividades de aminotransferases, gama glutamiltransferase, 5' nucleotidase, concentrações de albumina, bilirrubinas total e direta e valores do tempo de protrombina.

TABELA XXIV

Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética,  
tempo de colestase e provas de "função" hepática

Variáveis estudadas	Coefficiente de correlação (Spearman)	Nível de significância (p)
Tempo de colestase	0,08	0,67 N.S*
Concentração de bilirrubina total	0,11	0,54 N.S
Concentração de bilirrubina direta	0,08	0,66 N.S.
Atividade de alamino-aminotransferase	-0,15	0,42 N.S
Atividade de aspartato-aminotransferase	-0,36	0,07 N.S
Atividade de gama glutamiltransferase	0,06	0,72 N.S
Atividade de 5'-nucleotidase	0,19	0,29 N.S
Concentração de albumina	0,05	0,78 N.S
Tempo de protrombina	0,07	0,71 N.S

\* N.S = não significativo

### 7.2.5. Correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio

Não foi encontrada correlação significativa entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e concentrações séricas de cálcio ( $r= 0,12$ ;  $p=0,49$ ); fósforo ( $r= 0,11$ ;  $p=0,53$ ) e magnésio ( $r= 0,08$ ;  $p= 0,65$ ), como ilustrado da tabela XXV.

**TABELA XXV**

**Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e concentrações séricas de cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg)**

Variáveis estudadas	Coefficiente de correlação (Spearman)	Nível de significância (p)
Concentração sérica de Ca	0,12	0,49 N.S *
Concentração sérica de P	0,11	0,53 N.S
Concentração sérica de Mg	0,08	0,65 N.S

\* N.S = não significativo

### 7.3. Estudo radiológico: densitometria óssea em crianças e adolescentes com colestase crônica

A tabela de Thomas e colaboradores (1991), utilizada para comparação destes resultados, determina os valores normais para densidade óssea utilizando os parâmetros sexo, idade, peso e estatura. No presente estudo, análise de

regressão múltipla para peso, estatura e densidade óssea não mostra significância estatística ( $p=0,96$  e  $p=0,10$  no sexo feminino e  $p=0,95$  e  $p=0,50$  no sexo masculino, respectivamente), ao contrário do que se observa quando se aplica este mesmo tratamento estatístico para os parâmetros densidade óssea, idade e sexo ( $p < 0,02$  para sexo feminino e  $p < 0,03$ , para sexo masculino), como pode se perceber nas tabelas XXVI e XXVII. Deste modo foram excluídos peso e estatura e os resultados desta pesquisa foram analisados comparando-se os valores de densidade óssea observados com os valores de referência sugeridos por esta tabela para cada idade e sexo.

Houve uma correlação estatisticamente significativa entre densidade óssea mineral e estágio de puberdade (tabela XXVIII).

#### TABELA XXVI

**Análise de regressão múltipla para verificação da influência do peso, estatura e idade sobre a densidade óssea mineral ( $\text{g/cm}^2$ ) em pacientes do sexo feminino**

<b>Variáveis estudadas</b>	<b>Coefficiente da regressão (<math>\beta</math>)</b>	<b>Nível de significância (p)</b>
Peso	0,04208	0,95 (N.S)*
Estatura	1,57757	0,10 (N.S)
Idade	0,84730	< 0,002

N.S = não significativo

**TABELA XXVII**

**Análise de regressão múltipla para verificação da influência do peso, estatura e idade sobre a densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) em pacientes do sexo masculino**

<b>Variáveis estudadas</b>	<b>Coefficiente da regressão (<math>\beta</math>)</b>	<b>Nível de significância (p)</b>
Peso	0,03254	0,95 (N.S)*
Estatura	0,57402	0,50(N.S)
Idade	0,86201	< 0,003

N.S = não significativo

**TABELA XXVIII**

**Estudo de correlação entre densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) e estágios de puberdade, determinado pela idade cronológica**

**(teste U de Mann-Whitney)**

<b>Estado de Puberdade</b>	<b>Nº de Pacientes</b>	<b>Nível de Significância (p)</b>
Pré - púberes	14	
Púberes	6	0,0004
Total	20	

As tabelas XXIX e XXX e as figuras 10 e 11 ilustram os resultados de densidade óssea mineral verificados para cada sexo, comparando-os com os limites inferiores de referência admitidos por Thomas e colaboradores (1991). Observamos que em todos os casos a densidade óssea mineral esteve abaixo destes valores, sendo estatisticamente significativa as diferenças entre o grupo de pacientes e controles ( $p=0,003$ ).

**TABELA XXIX**

**Comparação entre valores de densidade óssea mineral ( $\text{g/cm}^2$ ) observados em pacientes do sexo feminino e os respectivos valores normais para idade**

<b>Pacientes</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Densidade óssea observada (<math>\text{g/cm}^2</math>)</b>	<b>Densidade óssea esperada (<math>\text{g/cm}^2</math>)*</b>
1	9,0	0,4160	0,7843 - 0,8849
4	12,9	0,618	1,0152 - 1,1012
5	12,6	0,844	1,0152 - 1,1012
7	6,9	0,364	0,6742 - 0,8038
8	5,3	0,4430	0,5644 - 0,7368
12	7,6	0,6490	0,7262 - 0,8414
18	7,6	0,463	0,7262 - 0,8414
20	3,0	0,366	0,4468 - 0,6772

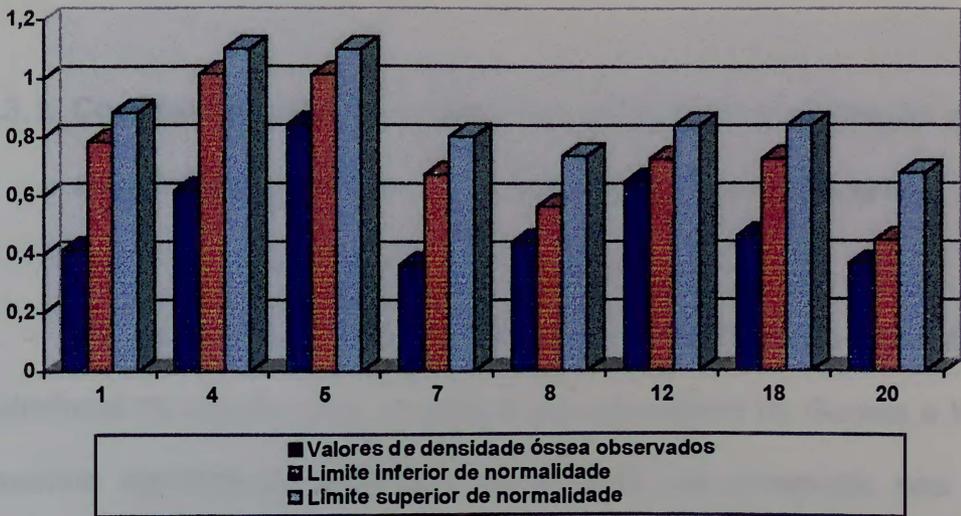
\* Thomas e colaboradores (1991)

**TABELA XXX**

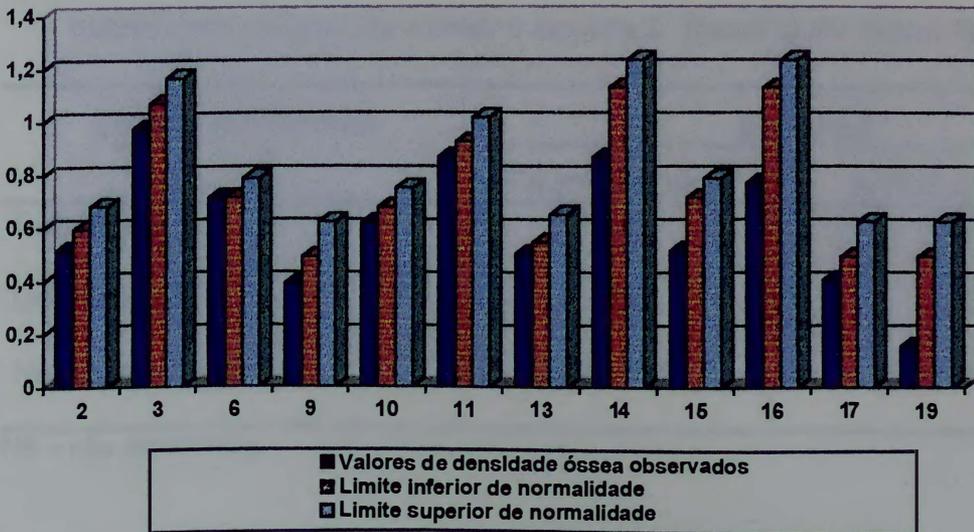
**Comparação entre valores de densidade óssea mineral (g/cm<sup>2</sup>) observados em pacientes do sexo masculino e os respectivos valores normais para idade**

<b>Pacientes</b>	<b>Idade(anos)</b>	<b>Densidade óssea observada ( g/cm2)</b>	<b>Densidade óssea esperada (g/cm2)*</b>
2	5,5	0,5170	0,5958 - 0,6816
3	15,7	0,9750	1,0694 - 1,1662
6	8,4	0,7130	0,7135 - 0,7863
9	3,0	0,3900	0,4914 - 0,6222
10	6,8	0,6190	0,6773 - 0,7501
11	13,3	0,8670	0,9239 - 1,0155
13	3,8	0,5040	0,5474 - 0,6510
14	18,0	0,8660	1,1276 - 1,2328
15	8,0	0,5160	0,7135 - 0,7863
16	18,0	0,7690	1,1276 - 1,2328
17	3,5	0,4030	0,4914 - 0,6222
19	3,0	0,1540	0,4914 - 0,6222

\* Thomas e colaboradores (1991)



**Figura 10: Comparação entre valores de densidade óssea mineral (g/cm<sup>2</sup>) observados em pacientes do sexo feminino e os respectivos valores normais, segundo Thomas e colaboradores (1991)**



**Figura 11: Comparação entre valores de densidade óssea mineral (g/cm<sup>2</sup>) observados em pacientes do sexo masculino e os respectivos valores normais, segundo Thomas e colaboradores (1991)**

### 7.3.1. Correlação entre densidade óssea mineral e avaliação nutricional de acordo com o escore Z e critérios de Gomez e Waterlow

Os estudos de correlação entre densidade óssea mineral e avaliação nutricional de acordo com o escore Z ou os critérios de Gomez e Waterlow, não mostram significância estatística como pode ser observado nas tabelas XXX, XXXI, XXXII e XXXIII.

**TABELA XXXI**

**Estudo de correlação entre densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) e avaliação nutricional de acordo como o escore Z (teste U de Mann Whitney)**

Estado nutricional	Escore Z	
	P/I (nº de pac.)	A/I (nº de pac.)
Eutróficos	14	10
Desnutridos	6	10
Nível de significância	0,270 (NS*)	0,633(NS*)

\* NS = não significativo

Para fins de análise estatística, classificamos os pacientes em nutridos ou desnutridos segundo os critérios de Waterlow e nenhuma relação significativa foi observada. O estudo da relação entre os diferentes estágios de desnutrição propostos por Waterlow e a forma esquelética da fosfatase alcalina também não mostra significância estatística, como pode ser visto nas tabelas XXII e XXIII.

**TABELA XXI**

**Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e avaliação nutricional segundo o critério de Gomez (teste U de Mann-Whitney)**

<b>Estágio nutricional</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Nível de significância</b>
Eutróficos	13	0,58 (NS*)
Desnutrição Grau I	9	
Desnutrição Grau II	9	
Desnutrição Grau III	1	

\*NS = não significativo

**TABELA XXII**

**Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e estado nutricional segundo a classificação de Waterlow (teste U de Mann-Whitney)**

<b>Estado nutricional</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Nível de significância</b>
Desnutrido	26	0,13 (NS*)
Eutrófico	6	
Total	32	

\* NS = não significativo

**TABELA XXIII**

**Estudo de correlação entre atividade da fosfatase alcalina esquelética e estágios de desnutrição segundo os critérios de Waterlow**

**(teste U de Mann-Whitney)**

<b>Estágio de desnutrição</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Nível de significância</b>
Desn. atual	2	0,27 (NS*)
Desn. progressa	15	
Desn. crônica	9	
Total	26	

\*NS = não significativo

#### **7.2.4. Correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética, tempo de colestase e provas de “função” hepática**

Como pode ser visto na tabela XXIV, não foi observada relação significativa entre atividade de fosfatase alcalina esquelética, tempo de colestase, e atividades de aminotransferases, gama glutamiltransferase, 5' nucleotidase, concentrações de albumina, bilirrubinas total e direta e valores do tempo de protrombina.

TABELA XXIV

Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética,  
tempo de colestase e provas de "função" hepática

Variáveis estudadas	Coefficiente de correlação (Spearman)	Nível de significância (p)
Tempo de colestase	0,08	0,67 N.S*
Concentração de bilirrubina total	0,11	0,54 N.S
Concentração de bilirrubina direta	0,08	0,66 N.S.
Atividade de alamino-aminotransferase	-0,15	0,42 N.S
Atividade de aspartato-aminotransferase	-0,36	0,07 N.S
Atividade de gama glutamiltransferase	0,06	0,72 N.S
Atividade de 5'-nucleotidase	0,19	0,29 N.S
Concentração de albumina	0,05	0,78 N.S
Tempo de protrombina	0,07	0,71 N.S

\* N.S = não significativo

### 7.2.5. Correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio

Não foi encontrada correlação significativa entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e concentrações séricas de cálcio ( $r= 0,12$ ;  $p=0,49$ ); fósforo ( $r= 0,11$ ;  $p=0,53$ ) e magnésio ( $r= 0,08$ ;  $p= 0,65$ ), como ilustrado da tabela XXV.

**TABELA XXV**

**Estudo de correlação entre atividade de fosfatase alcalina esquelética e concentrações séricas de cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg)**

Variáveis estudadas	Coefficiente de correlação (Spearman)	Nível de significância (p)
Concentração sérica de Ca	0,12	0,49 N.S *
Concentração sérica de P	0,11	0,53 N.S
Concentração sérica de Mg	0,08	0,65 N.S

\* N.S = não significativo

### 7.3. Estudo radiológico: densitometria óssea em crianças e adolescentes com colestase crônica

A tabela de Thomas e colaboradores (1991), utilizada para comparação destes resultados, determina os valores normais para densidade óssea utilizando os parâmetros sexo, idade, peso e estatura. No presente estudo, análise de

regressão múltipla para peso, estatura e densidade óssea não mostra significância estatística ( $p=0,96$  e  $p=0,10$  no sexo feminino e  $p=0,95$  e  $p=0,50$  no sexo masculino, respectivamente), ao contrário do que se observa quando se aplica este mesmo tratamento estatístico para os parâmetros densidade óssea, idade e sexo ( $p < 0,02$  para sexo feminino e  $p < 0,03$ , para sexo masculino), como pode se perceber nas tabelas XXVI e XXVII. Deste modo foram excluídos peso e estatura e os resultados desta pesquisa foram analisados comparando-se os valores de densidade óssea observados com os valores de referência sugeridos por esta tabela para cada idade e sexo.

Houve uma correlação estatisticamente significativa entre densidade óssea mineral e estágio de puberdade (tabela XXVIII).

### TABELA XXVI

**Análise de regressão múltipla para verificação da influência do peso, estatura e idade sobre a densidade óssea mineral ( $\text{g/cm}^2$ ) em pacientes do sexo feminino**

<b>Variáveis estudadas</b>	<b>Coefficiente da regressão (<math>\beta</math>)</b>	<b>Nível de significância (p)</b>
Peso	0,04208	0,95 (N.S)*
Estatura	1,57757	0,10 (N.S)
Idade	0,84730	< 0,002

N.S = não significativo

**TABELA XXVII**

**Análise de regressão múltipla para verificação da influência do peso, estatura e idade sobre a densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) em pacientes do sexo masculino**

<b>Variáveis estudadas</b>	<b>Coefficiente da regressão (<math>\beta</math>)</b>	<b>Nível de significância (p)</b>
Peso	0,03254	0,95 (N.S)*
Estatura	0,57402	0,50(N.S)
Idade	0,86201	< 0,003

N.S = não significativo

**TABELA XXVIII**

**Estudo de correlação entre densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) e estágios de puberdade, determinado pela idade cronológica**

**(teste U de Mann-Whitney)**

<b>Estado de Puberdade</b>	<b>Nº de Pacientes</b>	<b>Nível de Significância (p)</b>
Pré - púberes	14	0,0004
Púberes	6	
Total	20	

As tabelas XXIX e XXX e as figuras 10 e 11 ilustram os resultados de densidade óssea mineral verificados para cada sexo, comparando-os com os limites inferiores de referência admitidos por Thomas e colaboradores (1991). Observamos que em todos os casos a densidade óssea mineral esteve abaixo destes valores, sendo estatisticamente significativa as diferenças entre o grupo de pacientes e controles ( $p=0,003$ ).

**TABELA XXIX**

**Comparação entre valores de densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) observados em pacientes do sexo feminino e os respectivos valores normais para idade**

<b>Pacientes</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Densidade óssea observada (<math>\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>Densidade óssea esperada (<math>\text{g}/\text{cm}^2</math>)*</b>
1	9,0	0,4160	0,7843 - 0,8849
4	12,9	0,618	1,0152 - 1,1012
5	12,6	0,844	1,0152 - 1,1012
7	6,9	0,364	0,6742 - 0,8038
8	5,3	0,4430	0,5644 - 0,7368
12	7,6	0,6490	0,7262 - 0,8414
18	7,6	0,463	0,7262 - 0,8414
20	3,0	0,366	0,4468 - 0,6772

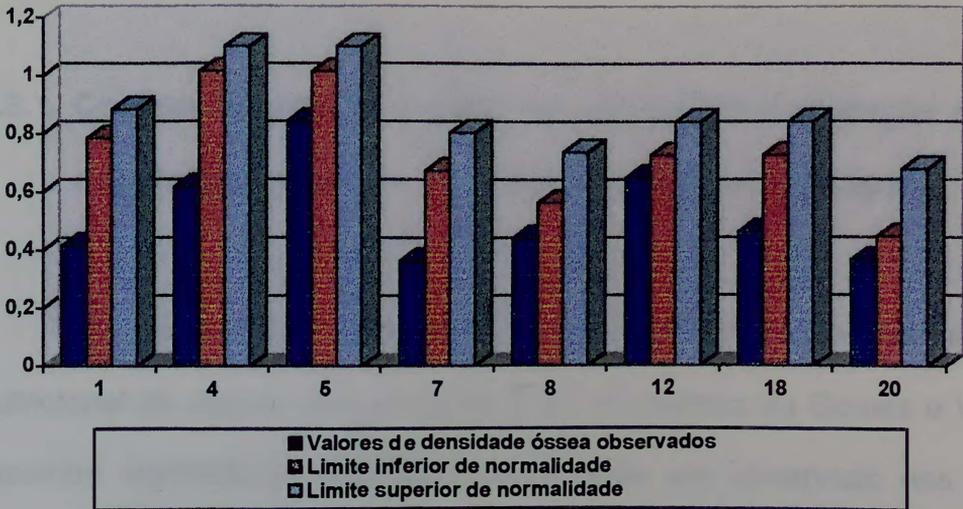
\* Thomas e colaboradores (1991)

**TABELA XXX**

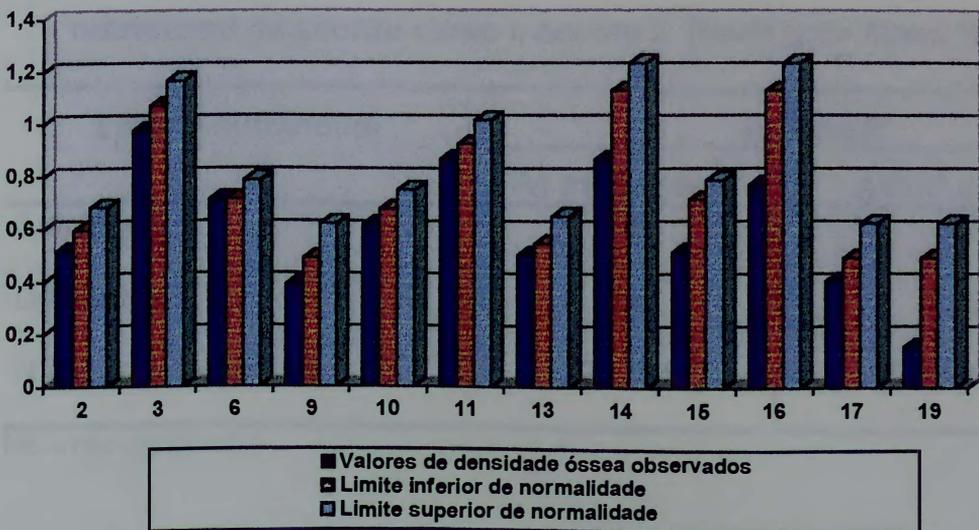
**Comparação entre valores de densidade óssea mineral (g/cm<sup>2</sup>) observados em pacientes do sexo masculino e os respectivos valores normais para idade**

<b>Pacientes</b>	<b>Idade(anos)</b>	<b>Densidade óssea observada ( g/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Densidade óssea esperada (g/cm<sup>2</sup>)*</b>
2	5,5	0,5170	0,5958 - 0,6816
3	15,7	0,9750	1,0694 - 1,1662
6	8,4	0,7130	0,7135 - 0,7863
9	3,0	0,3900	0,4914 - 0,6222
10	6,8	0,6190	0,6773 - 0,7501
11	13,3	0,8670	0,9239 - 1,0155
13	3,8	0,5040	0,5474 - 0,6510
14	18,0	0,8660	1,1276 - 1,2328
15	8,0	0,5160	0,7135 - 0,7863
16	18,0	0,7690	1,1276 - 1,2328
17	3,5	0,4030	0,4914 - 0,6222
19	3,0	0,1540	0,4914 - 0,6222

\* Thomas e colaboradores (1991)



**Figura 10: Comparação entre valores de densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) observados em pacientes do sexo feminino e os respectivos valores normais, segundo Thomas e colaboradores (1991)**



**Figura 11: Comparação entre valores de densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) observados em pacientes do sexo masculino e os respectivos valores normais, segundo Thomas e colaboradores (1991)**

### 7.3.1. Correlação entre densidade óssea mineral e avaliação nutricional de acordo com o escore Z e critérios de Gomez e Waterlow

Os estudos de correlação entre densidade óssea mineral e avaliação nutricional de acordo com o escore Z ou os critérios de Gomez e Waterlow, não mostram significância estatística como pode ser observado nas tabelas XXX, XXXI, XXXII e XXXIII.

**TABELA XXXI**

**Estudo de correlação entre densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) e avaliação nutricional de acordo como o escore Z (teste U de Mann Whitney)**

Estado nutricional	Escore Z	
	P/I (nº de pac.)	A/I (nº de pac.)
Eutróficos	14	10
Desnutridos	6	10
Nível de significância	0,270 (NS*)	0,633(NS*)

\* NS = não significativo

**TABELA XXXII**

**Estudo de correlação entre densidade óssea mineral (g/cm<sup>2</sup>) e avaliação nutricional de acordo com o critério de Gomez (teste U de Mann-Whitney)**

<b>Estágio nutricional</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Nível de significância</b>
Eutróficos	9	0,432 (NS*)
Desn. Grau I	5	
Desn. Grau II	4	
Desn. Grau III	2	

\*NS = não significativo

**TABELA XXXIII**

**Estudo de correlação entre densidade óssea mineral (g/cm<sup>2</sup>) e estado nutricional segundo os critérios de Waterlow (teste U de Mann-Whitney)**

<b>Estado nutricional</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Nível de significância</b>
Eutrófico	5	0,331 (NS*)
Desnutrido	15	
Total	20	

\* NS = não significativo

TABELA XXXIV

**Estudo de correlação entre densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) e estágios de desnutrição segundo os critérios de Waterlow (teste U de Mann-Whitney)**

<b>Estágio de desnutrição</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Nível de significância</b>
Desn. atual	1	0,317 (NS*)
Desn. progressa	7	
Desn. crônica	7	
Total	15	

\*NS = não significativo

### **7.3.2. Correlação entre densidade óssea mineral, tempo de colestase e provas de “função” hepática**

Não foram observadas relações significativas entre valores de densidade óssea mineral, tempo de colestase e atividades de aminotransferases, gama glutamiltransferase, 5' nucleotidase, concentrações séricas de albumina, bilirrubinas total e direta e valores de tempo de protrombina, como indicado na tabela XXXI ( $r=0,01$ ;  $p=0,47$ ).

TABELA XXXV

**Estudo de correlação entre densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ), tempo de colestase e provas de “função” hepática**

<b>Variáveis estudadas</b>	<b>Coefficiente de correlação (Spearman)</b>	<b>Nível de significância (p)</b>
Tempo de colestase	0,15	0,47 N.S *
Concentração de bilirrubina total	- 0,03	0,45 N.S
Concentração de bilirrubina direta	- 0,19	0,21 N.S
Atividade de alanino-aminotransferase	0,32	0,09 N.S
Atividade de aspartato-aminotransferase	0,23	0,17 N.S
Atividade de gama glutamiltransferase	0,31	0,09 N.S
Atividade de 5' nucleotidase	0,19	0,22 N.S
Concentração sérica de albumina	0,06	0,39 N.S
Valor de tempo de protrombina	0,24	0,15 N.S

\* N.S = não significativo

### **7.3.3. Correlação entre densidade óssea mineral e atividades de fosfatase alcalina total e fosfatase alcalina esquelética**

Os coeficientes de correlação e os níveis de significância para as relações entre estas variáveis são mostrados na tabela XXXVI. Relação significativa não foi observada entre densidade óssea e fosfatasemia ( $r=0,01$ ;  $p=0,48$ ). O mesmo ocorreu com o estudo dos parâmetros densidade óssea e fração esquelética da

fosfatase alcalina, determinada pelo método da inativação pelo calor ( $r=0,13$ ;  $p=0,29$ ).

**TABELA XXXVI**

**Estudo de correlação entre densidade óssea mineral ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) e atividades de fosfatase alcalina total e esquelética**

<b>Variáveis estudadas</b>	<b>Coefficiente de correlação (Spearman)</b>	<b>Nível de significância (p)</b>
Atividade de fosfatase alcalina total	0,01	0,48 N.S *
Atividade de fosfatase alcalina esquelética	0,13	0,29 N.S

\* N.S = não significativo

#### **7.3.4. Correlação entre densidade óssea mineral e concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio**

As concentrações séricas destes minerais também não mostraram correlações com os valores de densidade óssea encontrados neste estudo, estando os respectivos valores de significância indicados na tabela XXXVII.

**TABELA XXXVII**

**Estudo de correlação entre densidade óssea mineral (g/cm<sup>2</sup>) e concentrações séricas de cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg)**

<b>Variáveis estudadas</b>	<b>Coefficiente de correlação (Spearman)</b>	<b>Nível de significância (p)</b>
Concentração de Ca	- 0,13	0,30 N.S *
Concentração de P	- 0,31	0,09 N.S
Concentração de Mg	0,19	0,20 N.S

\* N.S = não significativo

## **8. DISCUSSÃO**

- 8.1. Pacientes: características demográficas, antropométricas e clínico-laboratoriais**
- 8.2. Estudo bioquímico**
  - 8.2.1. Atividade da fosfatase alcalina total**
  - 8.2.2. Atividade da fosfatase alcalina esquelética**
    - 8.2.2.1. Considerações metodológicas**
    - 8.2.2.2. Considerações clínicas**
- 8.3. Estudo radiológico: densitometria óssea em crianças e adolescentes com colestase crônica**
  - 8.3.1. Considerações metodológicas**
  - 8.3.2. Considerações clínicas**
- 8.4. Osteopenia e hiperfosfatemia alcalina esquelética em crianças e adolescentes com colestase crônica**

## **8. DISCUSSÃO**

### **8.1. Pacientes: características demográficas, antropométricas e clínico-laboratoriais**

Todos os pacientes elegíveis para o estudo permaneceram até sua conclusão, não havendo exclusões ou perdas.

#### **Características demográficas:**

Chesney e colaboradores, em 1985 sugeriram existir significativa diferença na aquisição de massa óssea na raça negra (Chesney e colaboradores, 1985). Os estudos de Southard e colaboradores, entretanto, não conseguiram demonstrar estas diferenças e atualmente não existe consenso sobre a influência deste caráter na determinação da massa óssea, pelo menos no que se refere ao grupo de crianças e adolescentes (Gilsanz e colaboradores, 1988; Shoutard e colaboradores, 1991). Nossa amostra de pacientes constitui-se exclusivamente de pacientes caucasóides, como a maioria dos estudos referentes à determinação da massa óssea em crianças e adolescentes.

Osteodistrofia hepática é uma situação mais freqüentemente estudada em adultos do que em crianças e adolescentes. Acreditava-se ser uma condição mais comum em quadros de no mínimo dois anos de colestase (Sherlock, 1988) e

atualmente esta exigência não mais se observa (Sherlock, 1993).

A faixa etária envolvida no presente estudo é muito semelhante àquela referida nos raros estudos pediátricos. Um dos mais antigos data da década de 1970 e envolvia principalmente lactentes (Kobayashi e colaboradores, 1974). Mais recentemente, tem-se estudado tanto crianças maiores quanto adolescentes, como pode ser apreciado no quadro 9. Estas características talvez ressaltem a existência de um novo pensamento a respeito da osteopenia colestática.

#### **Características antropométricas:**

As medidas convencionais de avaliação nutricional tais como peso, peso ajustado pela altura ou comprimento, prega cutânea e determinação dos níveis séricos de proteínas quando usados para estimar a nutrição em hepatopatas crônicos, podem ser inapropriadas. Retenção hídrica, freqüentemente observada nestes pacientes e evidenciada pela presença de ascite e edema periférico mascaram a perda de massa músculo-protéica e aumentam estas medidas, particularmente em lactentes e pacientes sedentários. A concentração de proteínas séricas também não fornecem uma visão real do estado nutricional, desde que muitas das proteínas têm sua síntese prejudicada pela disfunção do fígado, resposta metabólica ao stress e alterações na sua distribuição também relacionadas à retenção hídrica (Shepherd, 1994). Bucuvalas e colaboradores, estudando crianças e adolescentes com colestase crônica e osteopenia utilizaram como parâmetros de avaliação nutricional a altura, a prega tricpital e a

**Quadro 9: Estudos relacionados a osteodistrofia hepática em pediatria:  
distribuição dos pacientes por idade e sexo**

<b>Autor (ano)</b>	<b>Faixa etária estudada (anos)</b>	<b>Número de pacientes estudados</b>	<b>Distribuição por sexo (M/F)</b>	<b>Diagnóstico (nº pacientes)</b>
Heubi (1989)	4,5 - 19,5	12	0,27	Atresia biliar extra- hepática (0) Ductopenia (3) Doença metabólica (3) Outros ( 5 )
Bucuvalas (1990)	4,9 - 16,8	9	0,28	Atresia biliar extra- hepática (2) Ductopenia (6) Doença metabólica (1) Outros (0)
Argao (1993)	0,16 - 20,0	56	0,70	Atresia biliar extra- hepática (38) Ductopenia (16) Doença metabólica (1) Outros (1)
Argao (1994)	0,5 - 1,7	9	0,80	Atresia biliar extra- hepática (8) Ductopenia (0) Doença metabólica (1) Outros (0)
Este estudo (1995)	0,5 - 18,0	32	1,75	Atresia biliar extra- hepática (14) Ductopenia (3) Doença metabólica (2) Outros (13)

circunferência muscular do braço. A maior prevalência de desnutrição foi observada quando da análise da altura (Bucuvalas e colaboradores, 1990).

Neste estudo, houve diferença nos resultados da avaliação antropométrica, quando foram utilizados os critérios de escore Z, Gomez e Waterlow (tabela VI, VII e VIII). A padronização da altura ou comprimento/idade pelo escore Z, mostra que aproximadamente 38% dos nossos pacientes poderiam ser considerados desnutridos. Estas cifras diminuem para 28% quando se analisa o parâmetro peso/idade e não se observa desnutrição para a relação peso/altura. A maior prevalência de eutróficos (40,6%) é observada quando se aplica o critério de Gomez e somente um paciente foi classificado como desnutrido de grau III (paciente nº 16). A utilização do peso como único parâmetro de avaliação nutricional, provavelmente é o responsável tanto por estes resultados quanto pela subclassificação dos pacientes nos diversos graus de desnutrição. Hepatoesplenomegalia, como já referido, é comum a todos os pacientes. Retenção hídrica foi observada em um dos paciente classificados como eutróficos (paciente nº 8), dois dos pacientes classificados como desnutridos de grau I (pacientes nº 14 e 31) e em três dos desnutridos de grau II. De acordo com os critérios de Waterlow, cerca da metade dos pacientes (47%) apresentava desnutrição pregressa. Como se sabe, para este autor o comprometimento da altura/idade é um indicador de desnutrição passada, quadro esperado nesta amostra de pacientes, constituída na sua maioria por atresia biliar extra-hepática. Esta classificação parece mais fidedigna do que a precedente uma vez que considera além do peso, a altura ou o comprimento como parâmetro de avaliação.

Dentre os métodos de avaliação nutricional utilizados neste estudo, o escore Z expressa melhor os desvios da população de referência do que a porcentagem da média, utilizada por Gomez e Waterlow. No entanto, é um critério excessivamente rígido que identifica como desnutridos somente pacientes com formas moderadas e graves de desnutrição. Esta característica do método limita sua valorização desde que uma das metas do hepatologista pediátrico é a intervenção nutricional pronta e precoce.

#### **Características clínico-laboratoriais:**

Conforme já referido, todos os pacientes apresentavam características clínico-laboratoriais compatíveis com colestase crônica. A ausência de dor óssea ou fraturas está de acordo com o caráter silencioso desta situação, embora dor óssea seja um sintoma de difícil avaliação em lactentes.

Os trinta pacientes que vinham em uso oral de vitaminas lipossolúveis o faziam em doses adequadas para colestase crônica (Sokol, 1993). Nenhum paciente usava vitaminas parenterais ou vitamina E solúvel em meio aquoso, devido a não disponibilidade de vitamina D e E isoladas no nosso meio. Todos os pacientes ingeriam leite em doses adequadas para idade e trinta pacientes usavam cerca de 108 mg de cálcio adicionais, o que está de acordo com o preconizado para o estado de deficiência (Sokol, 1993). Dos dois pacientes restantes, um recebia subdoses de vitaminas lipossolúveis e o outro encontrava-se sem suplementações quaisquer. Estes entraram neste estudo quando da sua primeira visita ao ambulatório. Quando corrigimos os valores de cálcio de acordo

com as concentrações séricas de albumina, observamos três casos de hipocalcemia. A prevalência desta, varia de 0% a 20%, de acordo com a literatura revisada (Argao e colaboradores, 1994; Bucuvalas e colaboradores, 1990; Heubi e colaboradores, 1989; Kobayashi e colaboradores, 1974). As maiores cifras, entretanto referem-se a amostras de pequenos números de pacientes (Argao e colaboradores, 1994; Bucuvalas e colaboradores, 1990). No mínimo dois mecanismos parecem estar envolvidos na absorção intestinal de cálcio; um dependente e outro independente de vitamina D (Lemann, 1993). Ambos relacionam-se diretamente à ingestão do mineral, sua disponibilidade para absorção e à concentração sérica da vitamina D. Em pacientes colestáticos com ingestão adequada de cálcio, o mecanismo de transporte intestinal independente de vitamina D parece ser suficiente para manter a absorção normal (Bucuvalas e colaboradores, 1990), o que pode explicar os resultados encontrados neste estudo e nos precedentes.

No presente estudo, hiperfosfatemia foi observada em seis casos, sem que os pacientes apresentassem características clínicas sugestivas. Alterações nas concentrações séricas de fósforo, não foram observados em nenhum dos estudos revisados por nós. Em condições associadas com aumento do catabolismo, ocorre transporte transcelular de fósforo da célula para o espaço extracelular (Hruska & Rolnick, 1993). Os seis pacientes citados estavam hospitalizados e o provável estado de hipercatabolismo talvez pudesse explicar estes resultados.

## 8.2. Estudo bioquímico

### 8.2.1. Atividade da fosfatase alcalina total

Os valores obtidos nesse estudo para o grupo de crianças e adolescentes normais, mostram resultados concordantes com a literatura ( $r=0,80$ ), como pode ser observado na tabela X.

Hiperfosfatasemia alcalina foi observada por nós em todos os casos, sendo significativamente diferente do controle, o que está também de acordo com a literatura (Argao e colaboradores, 1994; Heubi e colaboradores, 1993; Kobayashi e colaboradores, 1974).

No fígado, a fosfatase alcalina é encontrada na superfície sinusoidal do hepatócito e nos microvilos do canalículo biliar. Prejuízo da secreção e excreção biliar de fosfatase alcalina resultam em aumento da atividade sérica de fosfatase alcalina de origem hepática, sendo esse menos significativo na doença hepatocelular não associada a obstrução biliar (Rosalki, 1976). Na colestase crônica observa-se tanto regurgitação da enzima para a circulação via sinusóides, como aumento da síntese nos canalículos biliares (Sherlock, 1993). A relação estatisticamente significativa encontrada no presente estudo (tabela XXXVIII) entre atividades de 5'-nucleotidase, gama glutamiltransferase (enzimas de distribuição hepática similar a fosfatase alcalina) e fosfatase alcalina sugere que o aumento da atividade sérica dessa enzima poderá estar diretamente relacionada à colestase. A análise mais acurada destes estudos, nos mostra, entretanto, que a relação não é suficientemente alta ( $r=0,42$  e  $r=0,45$ , respectivamente), para

concluirmos sobre a maior contribuição da fração hepática da fosfatase alcalina na atividade total da enzima. Isto nos faz supor a existência de outro fator além da colestase, atuando sobre os nossos resultados.

**TABELA XXXVIII**

**Correlação entre atividade de fosfatase alcalina total (fosfatasemia) e as variáveis tempo de colestase e provas de "função" hepática**

<b>Variáveis estudadas</b>	<b>Coefficiente da regressão (<math>\beta</math>)</b>	<b>Nível de significância (p)</b>
Tempo de colestase	- 0,007	0,97 (N.S)*
Concentração de bilirrubina total	0,189	0,30 (N.S)
Concentração de bilirrubina direta	0,169	0,35 (N.S)
Atividade de alanino-aminotransferase	- 0,218	0,23 (N.S)
Atividade de aspartato-aminotransferase	- 0,387	0,03
Atividade de gama glutamiltransferase	0,449	0,01
Atividade de 5' nucleotidase	0,418	0,02
Concentração de albumina	0,108	0,56 (N.S)
Valor do tempo de protrombina	- 0,086	0,64 (N.S)

\* N.S = não significativo

Como já mencionado, os primeiros estudos referentes à fosfatase alcalina estabeleceram uma forte relação entre atividade desta enzima no soro e aumento de atividade osteoblástica. As atividades mais altas de fosfatase alcalina são encontradas na doença de Paget, no raquitismo e na osteomalácia. As alterações ósseas na doença de Paget consistem em reabsorção irregular, submineralização da matriz óssea e fibrose celular. Osteoclastos e osteoblastos são abundantes nas regiões afetadas e atividade dos últimos é, presumivelmente, a causa da hiperfosfatasemia alcalina (Moss, 1976). A doença de Paget juvenil tem início em torno dos três anos de idade e manifesta-se pelo aparecimento de deformidades ósseas características e dor óssea importante (Chesney, 1987). Nenhum dos pacientes estudados apresenta características sugestivas de doença de Paget juvenil. No raquitismo e osteomalácia, o aumento da atividade osteoblástica está possivelmente relacionado a um processo de *feedback* positivo que tenta estimular a calcificação da matriz (Moss, 1976). Não é incomum se observar pacientes com raquitismo ou osteomalácia sem manifestações clínicas típicas.

A hiperfosfatasemia alcalina nos pacientes por nós estudados pode ser o resultado tanto da presença de colestase *per se* como o risco que esta impõe à formação óssea. A esteatorréia e a má absorção de vitamina D são lugar comum na colestase crônica e freqüentemente atribuíveis a osteodistrofia hepática. Os estudos que avaliam apenas a atividade sérica total da fosfatase alcalina, deste modo, não esclarecem a etiologia da hiperfosfatasemia alcalina observada. A presença de doenças óssea e colestática concomitantes pode, entretanto, ser sugerida. A comprovação destas suposições não é possível sem o estudo das

frações enzimáticas.

### **8.2.1. Atividade da fosfatase alcalina esquelética**

Estudamos a atividade da fosfatase alcalina esquelética nos soros dos pacientes e em 16 indivíduos saudáveis. Dois métodos de determinação foram realizados e posteriormente comparados.

#### **8.2.2.1. Considerações metodológicas**

##### **Método da precipitação por lectina de germe de trigo:**

As lectinas são proteínas que reagem com certas estruturas de carboidratos, ligando-se a estas. A lectina de germe de trigo reage tanto com a N-acetil glicosamina como com o ácido N-acetilneuramínico (Behr & Barnet, 1986). A fosfatase alcalina, como se sabe é uma glicoproteína, sendo as formas hepática e esquelética produtos de um único gene estrutural, como já mencionado. As suas modificações pós-translacionais estão possivelmente relacionadas às suas cadeias de carboidratos e à presença de distintas glicosiltransferases localizadas em suas membranas que modificam a molécula enzimática e fornecem especificidades tissulares (Behr & Barnet, 1986). Deste modo, a forma esquelética da fosfatase alcalina é precipitada por esta proteína enquanto a hepatobiliar e a placentária não o são - este é o fundamento do método da precipitação por lectina para determinação da fosfatase alcalina esquelética descrito por Rosalki e colaboradores (1984). Estes autores estudaram

soros de indivíduos saudáveis, indivíduos com doença hepatobiliar, doença de Paget e gestantes, e demonstraram que o método era de fácil execução, tinha boa correlação com a clínica e boa reprodutibilidade (coeficiente de variação = 5,1%). Behr e colaboradores encontraram resultados semelhantes, ressaltando no entanto, o aparecimento de resultados falso positivos nos casos de hepatite aguda (Behr & Barnet, 1986). Na nossa experiência, o método da precipitação por lectina foi um método bastante laborioso. Os estudos de precisão mostram que o método foi pouco preciso, com baixa reprodutibilidade (coeficiente de variação >10%). Quando testado nos soros de pacientes com doença de Paget se identificou somente 42,6% da fosfatase alcalina total como fosfatase alcalina esquelética. Isto sugere baixa exatidão do método. Resultados semelhantes aos nossos foram descritos por Farley e colaboradores e Gonchoroff e colaboradores (Farley e colaboradores, 1994; Gonchoroff, Branum & O'Brien, 1989). Os primeiros observaram que o método da precipitação por lectina foi o que mostrou menor recuperação e especificidade, não sendo capaz de identificar a fosfatase alcalina esquelética presente nos soros de Paget ou osteossarcoma (Farley e colaboradores, 1994). Gonchoroff e colaboradores tratando soros de Paget com lectina de germe de trigo da mesma procedência da utilizada por nós e submetendo-os posteriormente à cromatografia em gel de agarose, não conseguiram diferenciar as formas hepática e esquelética da fosfatase alcalina (Gonchoroff, Branun & O'Brien, 1989). Estes dois estudos sugerem que a pouca exatidão deste método pode ser explicada pela existência de uma afinidade intermediária e similar entre estas formas de fosfatase alcalina e a lectina desde que a fosfatase alcalina esquelética possui cinco sítios possíveis de

glicosilação, alguns destes provavelmente comuns a fosfatase alcalina hepática (Gonchoroff, Branun & O'Brien, 1989; Farley e colaboradores, 1994). Esta pode ser a explicação para os resultados falso positivos encontrados por Behr & Barnet (1989). Falso positivos também podem fazer parte dos nossos resultados.

Em resumo, o método da precipitação por lectina de germe de trigo para determinação da atividade da fosfatase alcalina esquelética é, na nossa experiência, um método oneroso, cuja pouca precisão e exatidão não justificam o seu uso rotineiro.

#### **Método da inativação pelo calor:**

Em baixas temperaturas, as reações enzimáticas aumentam exponencialmente a cada aumento de temperatura de modo que a cada aumento de 10°C observa-se uma duplicação da atividade enzimática. Em temperaturas muito altas, as enzimas desnaturam e perdem sua atividade. O que determina a temperatura de desnaturação enzimática são o tempo de exposição a altas temperaturas e as características moleculares de cada enzima. Este fato fundamenta a separação das formas hepática e esquelética da fosfatase alcalina pela inativação térmica (Farley e colaboradores, 1994). De fato, estudos de Moss e colaboradores demonstraram que sob condições comparáveis de aquecimento (10 min de aquecimento a 56°C) a fosfatase alcalina esquelética perde sua atividade mais rapidamente do que a enzima hepática (Moss & Whitby, 1975). Algumas críticas têm sido feitas ao método da inativação pelo calor. A maioria refere-se à complexidade e à pouca sensibilidade do método relacionadas às variações de temperatura e de pH a que está sujeito (Moss, 1976; Panighari e

colaboradores, 1994; Rosalki & Ying Foo, 1984).

Conhecemos um único estudo no qual o pH foi controlado (Farley e colaboradores, 1994). Estes autores adicionaram  $\text{NaHCO}_3$  às amostras antes do aquecimento. Segundo D. Moss, profundo conhecedor do método, a única maneira de controlar o pH seria adicionando tampões nos soros, mas este procedimento afetaria a acurácia da atividade enzimática residual, não se justificando, portanto, o uso rotineiro destas substâncias. Não controlamos o pH das amostras ao aquecimento, mas estabelecemos controles precisos da temperatura e do tempo de incubação. Realizamos, então, uma curva de inativação da fosfatase alcalina e encontramos resultados semelhantes aos descritos por Moss & Whitby (1975). Encontramos dois pontos de declive nesta curva, possivelmente relacionados a dois tempos de inativação da enzima. A utilização de dois tempos de incubação é também sugerida por Whitaker, Whitby & Moss para minimizar variações quantitativas de estabilidade térmica da enzima. O declive da curva observado aos 15 minutos de incubação é explicado por estes autores como o início da inativação da fosfatase alcalina hepática que se soma à inativação da fosfatase alcalina esquelética (Whitaker, Whitby & Moss, 1977). Encontramos uma boa correlação entre os tempos 10 e 15 minutos. Isto talvez reflita a pouca inativação da forma hepática neste tempo, havendo ainda preponderância da inativação da forma esquelética. O coeficiente de variação do nosso procedimento encontra-se em concordância com aqueles preconizados na literatura, para este método (Valenzuela e colaboradores, 1987).

Com relação aos estudos de precisão e exatidão, na nossa experiência este método é bastante preciso aos 10 minutos de incubação (coeficiente de

variação < 5%) e exato tanto aos 10 minutos de incubação a 56°C quanto aos 15 minutos. Quanto à exatidão, nossos resultados são semelhantes àqueles de Farley e colaboradores, sendo o método capaz de identificar, em média, 90% da fosfatase alcalina esquelética presente nos soros de pacientes com doença de Paget (Farley e colaboradores, 1994). Estes autores compararam este método com o imunorradiométrico que utiliza anticorpos monoclonais (considerado o melhor método atualmente disponível para determinação desta enzima) e encontraram forte correlação entre este e o método da inativação pelo calor ( $r=0,83$ ). Moderada correlação foi observada quando o método imunológico foi comparado à precipitação por lectina ( $r= 0,63$ ).

Em conclusão, o método da inativação pelo calor nos parece simples, não oneroso, facilmente realizado em qualquer laboratório de análises clínicas e superior ao método da precipitação por lectina.

#### **8.2.2.2. Considerações clínicas**

Elevação da atividade da enzima foi observada em todos os pacientes, em relação aos controles. A fosfatase alcalina esquelética está localizada na membrana do osteoblasto é liberada para circulação por um mecanismo vesicular não totalmente esclarecido (Delmas, 1993; Risteli & Risteli, 1993). Parece estar envolvida na clivagem extracelular de pirofosfato, um potente inibidor da deposição de fosfato de cálcio (Risteli & Risteli, 1993). Sua atividade sérica é proporcional à formação de colágeno e geralmente correlaciona-se bem com o crescimento ósseo e com doenças ósseas metabólicas de alto e baixo *turnover*

(Farley e colaboradores, 1994; Risteli & Risteli, 1993). Para determinação da atividade da fosfatase alcalina esquelética, utilizamos o método da inativação pelo calor aos 10 minutos de incubação a 56°C.

A diferença significativa encontrada por nós entre controles e pacientes, sugere estar o aumento da atividade da enzima relacionado à presença de doença óssea metabólica nos últimos. Sabe-se que em indivíduos com doença crônica associada a retardo do crescimento, a atividade da fosfatase alcalina tende a ser menor do que o seu controle saudável, na ausência de raquitismo ou osteomalácia (Moss, 1976).

Para alguns autores, a principal causa da osteodistrofia hepática poderá estar relacionada a disfunção osteoblástica (Diamond e colaboradores, 1989; Hodgson, Diekson & Wahner, 1985; Rao, 1993; Sherlock, 1993). Hodgson e colaboradores sugerem ser esta disfunção celular causada por retenção sanguínea de substâncias tóxicas associadas à colestase crônica (Hodgson, Diekson & Wahner, 1985). Poucos estudos tentaram correlacionar em adultos osteodistrofia hepática com marcadores da função e atividade osteoblásticas. Apenas osteocalcina foi estudada encontrando-se diminuída em todos os casos e invariavelmente relacionada à osteopenia (Diamond e colaboradores, 1989; Fonseca e colaboradores, 1989; Hodgson, Diekson & Wahner, 1985). A interpretação correta das concentrações séricas de osteocalcina contudo, requer a exclusão de fatores capazes de interferir nos resultados tais como horário da coleta da amostra a ser examinada e múltiplos descongelamentos (Tohmé e colaboradores, 1991). A atividade da fosfatase alcalina esquelética não é apreciada por nenhum dos estudos conhecidos por nós, ao contrário da atividade

total da enzima. Kobayashi e colaboradores, por exemplo, encontraram atividades elevadas de fosfatase alcalina total em grande parte dos casos de atresia biliar extra-hepática, sendo o aumento mais significativo nos pacientes com raquitismo e/ou osteoporose diagnosticados por raios X convencional (Kobayashi e colaboradores, 1974). Hiperfosfatemia alcalina também foi muito freqüente nos estudos em adultos e em 65% (7/9) e 83% (5/6) das crianças e adolescentes estudadas por Argao e colaboradores e Heubi e colaboradores, respectivamente (Argao e colaboradores, 1994; Heubi e colaboradores, 1989). Não foram descritos estudos de correlação entre atividade total da enzima e grau de osteopenia. De fato, nenhuma conclusão pode ser tirada com relação ao comportamento desta enzima, nestes casos, uma vez que a atividade total pode tanto refletir colestase isolada como disfunção osteoblástica ou ambas. Nossos resultados sugerem a existência de aumento de atividade de osteoblastos em todos os casos. Entretanto, não podemos relacionar este aumento às variáveis estudadas: presença de “disfunção” hepática, grau de colestase, atividades séricas de enzimas hepáticas, concentrações séricas de bilirrubinas, albumina, valores de tempo de protrombina, duração da colestase e parâmetros antropométricos como indicam os estudos de correlação (tabelas XX, XXI, XXII, XXIII e XXIV). Concentrações de cálcio, fósforo e magnésio também não mostraram correlação com atividade desta enzima, como costuma ser observado nos casos clássicos de raquitismo, osteomalácia ou osteoporose juvenil (tabela XXV). Talvez a realização de provas mais sensíveis de função hepática ou a determinação das concentrações séricas de ácidos biliares, pudessem explicar nossos resultados. Em uma das mais recentes publicações relacionadas à osteodistrofia hepática,

Hay (1995) continua se referindo a osteopenia colestática como uma condição de etiologia desconhecida. No que se refere a osteocalcina, com exceção dos estudos de Diamond e colaboradores (1989) nenhum outro encontrou quaisquer correlações entre os níveis séricos desta proteína e parâmetros bioquímicos de colestase ou “função” hepática, comportando-se a osteocalcina de maneira similar a fosfatase alcalina estudada por nós. Os pacientes estudados por Diamond e colaboradores (1989) não pertenciam a um grupo homogêneo, havendo entre eles portadores de doença alcóolica do fígado e hemocromatose, ambos com outros possíveis efeitos sobre a função osteoblástica (álcool e ferro), capazes de interferir nos seus resultados. O estudo histomorfométrico destes pacientes mostrou que o número e integridade dos osteoblastos estão preservados (Hodgson, Diekson & Wahner, 1985; Fonseca e colaboradores, 1989), sugerindo disfunção celular.

Osteocalcina e fosfatase alcalina esquelética têm funções semelhantes sobre a mineralização óssea, mas atuam de modos diferentes. A osteocalcina é principalmente incorporada à matriz óssea, sendo uma pequena fração liberada para circulação, que pode, então, ser medida por radioimunoensaio (Delmas, 1993). Podemos supor que na doença óssea metabólica, maiores concentrações de osteocalcina se mantenham incorporadas à matriz, o que pode ser responsável pela queda dos níveis séricos observados por alguns autores, admitindo-se que estes estudos tenham controlado os possíveis fatores de interferência nos resultados. A fosfatase alcalina esquelética é liberada pelo osteoblasto, atua no meio extracelular, sendo posteriormente incorporada à circulação. Acreditamos, como sugerido por Moss, que o aumento da atividade da

fosfatase alcalina esquelética na doença óssea seja um mecanismo de estímulo à mineralização óssea (Moss, 1976). Se ocorre estímulo à mineralização e esta ainda assim mantém-se deficiente, acreditamos que fatores celulares locais, atuando sobre a formação óssea possam ter um importante papel na osteodistrofia hepática. Alguns deles estão alterados em casos de colestase e diretamente relacionados ao metabolismo hepático, como são o IGF I, IGF II, estrógenos e andrógenos (Bucuvalas e colaboradores, 1993; Masson, 1994). Não realizamos nenhuma prova quantitativa de função hepática que possa apoiar esta suposição, mas é fato que o transplante hepático foi, até o momento, o único tratamento efetivo para osteodistrofia hepática (Argao e colaboradores, 1994).

### **8.3. Estudo radiológico: Densitometria óssea em crianças e adolescentes com colestase crônica**

#### **8.3.1. Considerações metodológicas**

Os raros estudos existentes na literatura internacional referentes a osteodistrofia hepática em crianças e adolescentes, mostra uma prevalência de osteopenia que varia de 59% a 100% (quadro 10), ressaltando-se que a maior prevalência foi observada em estudos envolvendo pequeno número de pacientes (Argao, Speker & Heubi, 1983; Argao e colaboradores, 1994; Bucuvalas e colaboradores, 1990; Heubi e colaboradores, 1989; Kobayashi e colaboradores, 1974). Encontramos prevalência de 100% de osteopenia, estudando 20 indivíduos e a alta sensibilidade do método utilizado por nós, pode explicar

nossos resultados. O estudo mais antigo do qual temos conhecimento teve o diagnóstico de osteopenia baseado em avaliação radiológica convencional e foi o que encontrou menor prevalência (Kobayashi e colaboradores, 1974). O estudo radiológico convencional para avaliação de osteopenia encontra-se em desuso, devido a sua pouca especificidade e a dificuldades de interpretação. Seu valor para detecção de osteopenia já foi discutido previamente, mas vale ressaltar que o método tem restrições mesmo sobre rigorosa padronização, como verificou Garton e colaboradores (1994). Estes autores padronizaram o diagnóstico de osteopenia pelo escore de Saville, que gradua a osteopenia, objetivamente, em quatro classes e encontraram uma moderada concordância intraobservador e fraca concordância interobservador (Garton e colaboradores, 1994). Na publicação de Kobayashi e colaboradores (1974), não há relato sobre padronização do diagnóstico radiológico, mas o método por si só pode explicar a relativa baixa prevalência de osteopenia encontrada por estes autores.

Todos os outros estudos conhecidos utilizaram a densitometria de fótons simples para avaliação da densidade óssea mineral. Como já salientado, este é pouco sensível para avaliação do osso trabecular, que é o osso de interesse no estudo da doença óssea metabólica. Talvez a existência de valores de referência para a faixa etária pediátrica, tenha motivado sua utilização.

Medidas de densidade óssea da coluna vertebral estão linear e fortemente correlacionadas quando utilizadas técnicas com fonte de raios X ou radionuclídeo, desde que os aparelhos sejam da mesma procedência (Warner, 1989). Baseados neste conhecimento, procuramos solucionar a falta de valores de referência para o método da densitometria de dupla emissão com fontes de raios X, utilizando

para controle os valores obtidos a partir da utilização da densitometria de dupla emissão com fonte de radionuclídeo, que era a única capaz de fornecer valores para menores de 5 anos (Thomas e colaboradores, 1991).

**Quadro 10: Estudos relacionados a osteodistrofia hepática em pediatria: prevalência de osteopenia**

<b>Autor (ano)</b>	<b>nº de pacientes estudados</b>	<b>Método de determinação da massa ossea</b>	<b>Prevalência de osteopenia</b>
Kobayashi e colaboradores (1974)	54	raios X convencional	59%
Heubi e colaboradores (1989)	6	densitometria de fótons simples	100%
Bucuvalas e colaboradores (1990)	9	densitometria de fótons simples	89%
Argao e colaboradores (1993)	56	densitometria de fótons simples	83%
Argao e colaboradores (1994)	9	densitometria de fótons simples	100%
Este estudo (1995)	20	densitometria de dupla emissão fonte de raios X	100%

### 8.3.2. Considerações clínicas

A densidade óssea mineral é influenciada por inúmeros fatores que incluem estados nutricional e hormonal, *background* genético, atividade física, doenças sistêmicas e uso de drogas (Boujour e colaboradores, 1991; Chatuverdi e colaboradores, 1993; Genant, Gluer & Lotz, 1994; Gilsanz e colaboradores, 1988; Gunnes, 1994; Henderson, 1991; Rubin e colaboradores, 1993; Rubinacci e colaboradores, 1993; Southard e colaboradores, 1991; Tsukara e colaboradores, 1992). Todos concordam que o parâmetro idade está fortemente relacionado com a densidade óssea mineral. Quanto aos outros parâmetros, os resultados são conflitantes. Segundo Southard e colaboradores, idade, peso e maturidade sexual estão diretamente relacionados à massa óssea, não sendo os outros parâmetros de valor (Southard e colaboradores, 1991). Para Gilsanz e colaboradores, quando os pacientes são controlados para estágio de puberdade, nenhuma relação pode ser encontrada entre densidade óssea mineral, peso, estatura, superfície corpórea, índice de massa corporal, idade e sexo (Gilsanz e colaboradores, 1988). Chatuverdi e colaboradores, estudando crianças indianas com desnutrição de graus variáveis, encontrou osteopenia em todos os graus de desnutrição, significativamente relacionadas nos grupos de 2-5 anos e 11-14 anos, mas sem relação nos grupos de 6-10 anos (Chatuverdi e colaboradores, 1993).

No presente estudo, a densidade óssea mineral esteve fortemente

influenciada pela idade e puberdade (tabelas XXVII e XXVIII), como sugerem a maioria dos autores, não se observando relação significativa com peso ou com a estatura/comprimento isolados. A não correlação com peso, apesar de apoiada pela literatura, pode também ser explicada pelo significado irreal que esta medida antropométrica tem em pacientes com hepatopatia crônica e que foi previamente discutida. A estatura é uma medida menos influenciada pela hepatopatia crônica, a não ser nos casos de Síndrome de Alagille, mas a relação não se modifica quando estes pacientes são retirados da análise estatística, estando nossos resultados também em concordância com a literatura. Também não foram observadas quaisquer correlações entre densidade óssea minearal e a grau de desnutrição avaliados de acordo com os parâmetro de escore Z, e critérios de Gomez e Waterlow (tabelas XXI, XXXII, XXXIII e XXXIV). O estudo de Bucuvalas e colaboradores também sugere não haver relação entre parâmetros nutricionais e densidade óssea mineral em crianças e adolescentes com colestase crônica (Bucuvalas e colaboradores, 1990).

Quando estudamos estatisticamente as correlações entre densidade óssea mineral e as variáveis provas de “função” hepática, atividade de fosfatase alcalina esquelética, tempo de colestase e concentrações de cálcio, fósforo e magnésio, também não observamos relação significativa. Nossos resultados estão em concordância com os estudos conhecidos por nós nesta faixa etária. Argao e colaboradores não encontraram quaisquer relações entre densidade óssea mineral e concentrações séricas de bilirrubina direta (Argao e colaboradores, 1994). Bucuvalas e colaboradores, também não conseguiram encontrar correlação entre osteopenia e concentrações séricas de cálcio (Bucuvalas e

colaboradores, 1990), sendo o mesmo observado por Heubi e colaboradores (Heubi e colaboradores, 1989). Kobayashi e colaboradores, ao contrário de nós, encontraram forte correlação entre osteopenia e concentrações de cálcio, fósforo e magnésio (Kobayashi e colaboradores, 1974), mas, a exemplo de nós, não encontraram relação entre aquela e parâmetros de “função” hepática. Kobayashi e colaboradores provavelmente, identificaram casos mais severos de osteopenia, relacionados a raquitismo clássico. Os estudos na população adulta, já exaustivamente citados, também concordam com a não-existência de correlação entre densidade óssea mineral, “função” hepática e tempo de colestase.

Entendemos que osteopenia e elevação da atividade da fosfatase alcalina esquelética são comuns nos pacientes de 6 meses a 18 anos estudados e refletem provavelmente, uma alta prevalência de osteodistrofia hepática. A elucidação do mecanismo exato desta situação, requer, como sugere Hay (1995), um maior entendimento do metabolismo ósseo normal que deverá envolver o estudo de fatores locais de formação óssea e cultura de osteoblastos.

#### **8.4. Osteopenia e hiperfosfatemia alcalina esquelética em crianças e adolescentes com colestase crônica**

Experiência clínica e laboratorial sugerem que o desenvolvimento e manutenção dos ossos normais dependem parcialmente de uma função hepática normal (Mason, 1994). Isto não é surpreendente em vista do papel central que o fígado desempenha no metabolismo sistêmico, atuando em diversos mecanismos que variam desde a biodisponibilidade de nutrientes essenciais, a síntese e o

metabolismo hormonais até a secreção e excreção de sais biliares (Christiansen e colaboradores, 1982). A osteodistrofia hepática não está relacionada a um tipo particular de doença hepática. Ela pode ser observada tanto em doenças primariamente parenquimatosas associadas ou não à icterícia (cirrose criptogênica, deficiência de  $\alpha_1$  anti-tripsina) quanto em situações clinicamente relacionadas à colestase (atresia biliar extra-hepática, cisto de colédoco). O efeito da doença crônica do fígado sobre o metabolismo ósseo cria uma situação na qual, forças opostas são geradas favorecendo e ao mesmo tempo se opondo à manutenção da densidade óssea. A diminuição da densidade óssea mineral observada em todos os pacientes estudados poderá ilustrar estas suposições.

Classicamente o padrão histológico da osteodistrofia hepática refere-se à existência de osteoporose, raquitismo ou osteomalácia, como já discutido. Entretanto, existem alusões a um outro tipo de lesão que mostra características tanto de osteoporose quanto de osteomalácia (Mason, 1994). Este fato é de especial importância neste estudo. A análise criteriosa tanto do estudo bioquímico quanto do estudo radiológico nos coloca frente a características de ambas as situações. Diminuição da densidade óssea mineral poderá caracterizar quaisquer dos tipos histopatológicos mencionados. No entanto, achados de osteopenia à densitometria óssea estão melhor relacionados à osteoporose, como pode ser visto no quadro 5. Calcemia e fosfatemia normais, como observado na maioria dos nossos pacientes, também pode ser uma característica de osteoporose, uma vez que nesta condição o osso é qualitativamente normal. Na osteomalácia, as concentrações séricas destes minerais só têm valor se estão abaixo dos valores de referência. Por outro lado, atividade elevada de fosfatase alcalina esquelética

está mais freqüentemente associada a osteomalácia ou a raquitismo. Na experiência de Peach e colaboradores, a atividade da fosfatase alcalina parece ser o teste bioquímico isolado mais sensível para detectar osteomalácia (Peach e colaboradores, 1982). Até então, nenhum estudo envolvendo crianças e adolescentes foi capaz de sugerir a histopatologia da osteopenia colestática. A falta de resposta ao tratamento com vitamina D parenteral, por sua vez, já tornava pouco provável a presença de osteomalácia ou raquitismo puros (Sokol, 1993).

A ausência de biópsia óssea só nos permite especular. A concomitância de achados radiológicos e bioquímicos comuns tanto à osteoporose quanto à osteomalácia, verificados no presente estudo, parece sugerir a presença de uma lesão que combine ambas as características.

## **9. CONCLUSÕES**

## **9 - CONCLUSÕES**

- 1 - Hiperfosfataseemia alcalina esquelética foi observada em 97% dos pacientes estudados, sendo significativa a diferença entre as médias de atividade desta enzima em pacientes e controles.**
  
- 2 - O método da precipitação por lectina de germe de trigo para determinação da atividade da fosfatase alcalina esquelética mostrou baixas exatidão e precisão (coeficiente de variação > 10%).**
  
- 3 - O método da inativação pelo calor à incubação das amostras a 56°C mostrou altas exatidão e reprodutibilidade (coeficiente de variação < 10%).**
  
- 4 - Não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre atividade da fosfatase alcalina determinada pelo método da inativação pelo calor aos 10 minutos de incubação a 56°C, e avaliação nutricional de acordo com o score Z e os critérios de Gomez e Waterlow.**
  
- 5 - Nenhuma correlação estatisticamente significativa foi observada entre atividade da fosfatase alcalina esquelética determinada pelo método da inativação pelo calor aos 10 minutos de incubação a 56°C e “função”**

hepática, concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio.

- 6 - Diminuição da densidade óssea mineral, determinada por densitometria óssea de dupla emissão fonte de raios X, foi observada em todos os pacientes.
- 7 - Não houve correlação estatisticamente significativa entre densidade óssea mineral, e avaliação nutricional de acordo com o escore Z e os critérios de Gomez e Waterlow.
- 8 - Não houve correlação estatisticamente significativa entre densidade óssea mineral e testes de “função” hepática, atividade de fosfatase alcalina esquelética e concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen JR, Humphries IRJ, Waters DL et al . Decreased bone mineral density in children with phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 419-22.
- Alvarez F, Landrieu P, Feo C et al . Vitamin E deficiency is responsible for neurologic abnormalities in cholestatic children. *J Pediatr* 1985; 107: 422-5.
- Amadee - Manesme O, Luzeau R, Wittpenn JR et al. Impression cytology detects subclinical vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr*,1988; 47: 875-8.
- Argao EA, Balistreri W, Hollis BW et al . Effect of orthotopic liver transplantation on bone mineral content and serum vitamin D metabolites in infants and children with chronic cholestasis. *Hepatology* 1994; 20: 598-603.
- Argao EA , Specker BL, Heubi JE. Bone mineral content in infants and children in chronic cholestatic liver disease. *Pediatrics* 1993; 91:1151-4.
- Azria M. The value of biomarkers in detecting alterations in bone metabolism. *Calcif Tissue Int* 1989; 45: 7-11.
- Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone. In: Favus MJ (ed). *Primer on metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven, 1993: 3-9.
- Bataille P, Achard JM, Fournier A et al. Diet, vitamin D and vertebral mineral density in hypercalciuric calcium stone formers. *Kidney Int* 1991; 39:1193-5.
- Behr W, Barnert J. Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat germ lectin: A simplified method and its clinical plausibility . *Clin Chem* 1986; 32: 1960-6.
- Bikle DD. Regulation of bone mineral homeostasis: an integrated view. In: Favus MJ (ed). *Primers on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven,1993: 76-80.
- Boujour J-P, Theintz G, Buchs B et al. Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 555-63.

- Brunton JA, Bayley HS, Atkinson SA. Validation and application of dual-energy X ray absorptiometry to measure bone mass and bone composition in small infants. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 839-45.
- Bucuvalas JC, Heubi JE, Specker B et al. Calcium absorption in bone disease associated with chronic cholestasis during childhood. *Hepatology* 1990; 12:1200-5.
- Bucuvalas JC, Horn JA, Carlsson L et al. Growth hormone insensitivity associated with elevated circulating growth hormone-binding protein in children with Alagille Syndrome and short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:1477-82.
- Canalis E. Regulation of bone remodeling. In: Favus MJ (ed). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven, 1993:33 -7.
- Chatuverdi A, Garg OP, Choudhary B. et al. Bone mineral content in normal and malnourished children. *Indian Pediatr* 1993; 30:489-94.
- Chesney RW, Dabbagh S, Uehling DT et al. The importance of early treatment of renal bone disease in children. *Kidney Int* 1985; 28:75-8.
- Chesney RW. *Metabolic Bone Disease*. In: Nelson WE, Behrman RE, Vaughan VC. *Textbook of Pediatrics*. 30<sup>a</sup>. ed. Philadelphia: Saunders, 1987:1375-81.
- Chesney RW. Requirements and upper limits of vitamin D intake in the term neonate, infant and older child. *J Pediatr* 1990; 116: 159-66.
- Chestnut III CH. Métodos no invasivos de medición de la masa ósea. In: Avioli, LV. *El síndrome osteoporótico*. 2<sup>a</sup>. ed. Madrid: CEA, 1989: 25-34.
- Christiansen C, Christiansen MS, Larsen N-E et al. Pathophysiological mechanisms of estrogen effect on bone metabolism: dose - response relationships in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55: 1124-30.
- Compston JE. Hepatic osteodystrophy: vitamin D metabolism in patients with liver disease. *Gut* 1986; 27: 1073-90.
- Deftos LJ. Calcitonin. In: Favus MJ (ed). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven, 1993; 70-6.
- Delmas PD. Biochemical marker of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. *Endoc Metab North Am* 1990; 19: 1-20.
- Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover I: Theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. *Am J Med* 1993; 95:115-65.

- Delmas PD. Markers of bone formation and resorption. In: Favus MJ (ed). *Primers on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven, 1993; 108-11.
- Delmas PD, Garnero, P. Assesment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endoc Metab* 1993; 77: 1046-53.
- Demers LM. Recent advances in biochemical markers of bone turnover. *Clin Chem* 1994; 40: 1994-5.
- DePriester JA, Cole TJ, Bishop NJ. Bone growth and mineralisation in children aged 4 to 10 years. *Bone and Mineral* 1991; 12: 57-65.
- Desmet VJ. Pathology of paediatric cholestasis. In: Lentz M, Reichen J. *Paediatric cholestasis: novel approaches to treatment*. United Kingdom: Kluwer, 1993: 55-73.
- Diamond TH, Stiel D, Lunzer M et al. Hepatic osteodistrophy: static and dynamic bone histomorfometry and serum bone Gla-protein in 80 patients with chronic liver disease. *Gastroenterology* 1989; 96: 213-21.
- Diamond TH, Stiel D, Mason R et al . Serum vitamin D metabolities are not responsible for low turnover osteoporosis in chronic liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 69: 1234-9.
- Di Dio R, Barbério JC, Pradel MG. Osteocalcina. *Rev Ass Med Brasil* 1994; 225-7.
- Duda RJ, O'brien JF, Katzmann JA et al. Concurrent assays of circulating bone Gla-protein and bone alkaline phosphatase: effects of sex, age and metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:951-7.
- Erling S. Pathophysiology of cholestasis. In: Lentz M, Reichen J. *Paediatric cholestasis: novel approach to treatment*. United Kingdom: Kluwer, 1993; 49-54.
- Farley JR, Hall SL, Hacas D et al. Quantification of skeletal alkaline phosphatase in osteoporotic serum by wheat germ agglutin precipitation, heat inactivation and a two-site immunoradiometric assay. *Clin Chem* 1994; 40: 1749-56.
- Fiat JAC; Mendonça LMC. In: Sandoz (ed). *Métodos de Avaliação de Osteoporose*. São Paulo: Sandoz, 1993: 9, 25 e 31.
- Fonseca V, Epstein O, Gill, DS et al. Hyperparathyroidism and low serum osteocalcin despite vitamin D replacement in primary biliary cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 873-7.
- Garton MJ, Robertson EM, Gilbert FJ et al. Can radiologists detect osteopenia on plain radiographs? *Clin Radiol* 1994; 49: 118-22.

- Genant HK, Gluer C-C, Lotz JC. Gender differences in bone density, skeletal geometry and fracture biomechanics. *Radiology* 1994; 190: 636-40.
- Gerok W. Physiology of bile formation. In: Lentz M, Reichen J. Paediatric cholestasis: novel approach to treatment. United Kingdom: Kluwer, 1993:3-19.
- Gilsanz V, Gibbens D, Roe TF et al. Vertebral bone density in children: effect of puberty. *Radiology* 1988; 166: 847-50.
- Gilsanz V, Boechat MI, Roe TF et al. Gender differences in vertebral body sizes in children and adolescents. *Radiology* 1994; 190: 673-7.
- Glastre C, Brailon P, David L et al. Measurement of bone mineral content of the lumbar spine by dual energy X-ray absorptiometry in normal children: correlations with growth parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 1330-3.
- Gonchoroff DG, Branun EL, O'Brien JF. Alkaline phosphatase isoenzymes of liver and bone are incompletely resolved by wheat-germ lectin affinity chromatography. *Clin Chem* 1989; 35: 29-32.
- Guañabens N, Parés A, delRio, L *et al* . Sodium fluoride prevents bone loss in primary biliary cirrhosis. *J Hepatology* 1992; 15: 345-9.
- Gunnes M. Bone mineral density in the cortical and trabecular distal forearm in healthy children and adolescents. *Acta Paediatr* 1994; 83: 463-7.
- Hahn, TJ, Halstead LR, Baran DT. Effects of short term glucocorticoid administration on intestinal calcium absorption and circulating vitamin D metabolites concentrations in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 52: 111-5.
- Hay JE. Bone disease in cholestatic liver disease. *Gastroenterology* 1995; 108: 276-83.
- Henderson RC. Assessment of bone mineral content in children. *J Paediatr Orthop* 1991; 11: 314-7.
- Herlong HF, Recker RR, Haddrey WC. Bone disease in primary biliary cirrhosis: histologic features and response to 25-hydroxyvitamin D. *Gastroenterology* 1982; 83: 103-8.
- Heubi JE, Hollis BW, Specker B et al . Bone disease in chronic childhood cholestasis. Vitamin D metabolism absorption and metabolism. *Hepatology* 1989; 9: 258-64.
- Hodgson SF, Dickson ER, Wahner HW. Bone loss and reduced osteoblast function in primary biliary cirrhosis. *Ann Int Med* 1985; 103: 855-60.

- Hoffman AF. The enterohepatic circulation of bile acids in cholestasis. In: Lentz M, Reichen J. Paediatric cholestasis: novel approach to treatment. United Kingdom: Kluwer, 1993: 105-17.
- Høiset A, Alho A, Husby T. Assessment of bone mineral content in the internal bone volume. *Acta Radiol* 1991; 32: 69-73.
- Hruska KA, Rolnick F. Hyperphosphatemia and hypophosphatemia. In: Favus MJ (ed). *Primers on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven, 1993; 213-9.
- Jane C, Dickson ER, Bonde S et al. Hiperbilirrubinemia inhibits osteoblast proliferation: role of bilirubin in the development of cholestatic osteoporosis. *J. Bone Mineral Research*; 1992, 7: 598.
- Johnston CC, Slemenda CW, Melton LJ. Clinical use of bone densitometry. *N Engl J Med*. 1991; 18:1405-9.
- Kaplan MM, Elta GH, Furie B et al. Fat-soluble vitamin nutriture in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1988; 95: 787-92.
- Kattwinkel J, Taussig LM, Staland BE et al. The effects of age on alkaline phosphatase and other serologic liver function tests in normal subjects and patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1973; 82: 234-42.
- Kleerekoper M, Avioli LA. Evaluation and treatment of postmenopausal osteoporosis. In: Favus MJ (ed). *Primers on the metabolic bone diseases and disorders of mineral disorders*. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven, 1993; 223-9.
- Klein GL. Nutritional rickets and osteomalacia. In: Favus MJ (ed). *Primers on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven, 1993; 264-8.
- Kobayashi A, Kaway S, Utsunomiya T et al. Bone disease in infants and children with hepatobiliary disease. *Arch Dis Child* 1974; 49: 641-6.
- Koo WWK, Succop PA, Bornschein RJ et al. Serum vitamin D metabolites and bone mineralisation in young children with chronic low to moderate lead exposure. *Pediatrics* 1991; 87: 680-7.
- Kroger H, Kotaniemi A, Vaênio P et al. Bone densitometry of the spine and femur in children by dual-energy X-ray absorptiometry. *Bone and Mineral* 1992; 17:75-85.
- Kronenberg HM. Parathyroid Hormone: Mechanism of action. In: Favus MJ (ed). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven, 1993: 85-95.

- Lemann JJ. Intestinal absorption of calcium, magnesium and phosphorus. In: Favus MJ (ed). Primers on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven, 1993: 46-54.
- Mason JB. Hepatobiliary influences on the skeletal system. In: Arias M. The liver: Biology and pathobiology. 3<sup>a</sup>. ed. New York: Raven, 1994; 1257-66.
- Mawer BA, Klass MJ, Warners W et al. Metabolism of vitamin D in patients with primary biliary cirrhosis and alcoholic liver disease. Clin Sci 1985; 69: 561-70.
- McKenna MJ, Hamilton TA, Sussman HH. Comparison of human alkaline phosphatase isoenzyme: structural evidence for three protein classes. Biochem J 1979; 181: 67-73.
- McLaren SD. Protein energy malnutrition (DEM): classification, pathogenesis, prevalence and prevention. In: McLaren SD, Burman D (eds). Textbook of Paediatric Nutrition. Edinburgh: Livingstone; 1982: 105-13.
- Meits S. Alkaline Phosphatase. In: Meits S. Pediatric Clinical Chemistry. Washington: Copyright, 1977: 22-6.
- Miller JZ, Siemenda CW, Meaney FJ et al. The relationship of bone mineral density and anthropometric variables in healthy male and female children. Bone and Mineral 1991; 14:137-52.
- Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. Clin Chem 1982; 28: 2007-16.
- Moss DW. Enzyme tests in diseases of bone In: The principles and practice of diagnostic enzymology. 1<sup>a</sup>. edição. London: Edward Arnold, 1976; 399-422.
- Moss DW, Whitby LG. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. Clin Chem Acta 1975; 61: 63-71.
- Moss DW, Whitby LG. Analysis of heat inactivation curves of alkaline phosphatase isoenzymes in serum. Clin Chem 1975; 59: 361-7.
- Mowat AP. Hepatitis and cholestasis in infancy: intrahepatic disorders. In: Mowat AP. Liver disorders in childhood. 2<sup>a</sup>. ed. London: Butterworth, 1987:37-71
- Mowat AP. Hepatitis and cholestasis in infancy: intrahepatic disorders. In: Mowat AP. Liver disorders in childhood. 3<sup>a</sup>. ed. London: Butterworth, 1994: 43-78
- Mundy GR. Bone resorbing cells. In: Favus MJ (ed). Primer on the Metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven, 1993: 25-31.
- Naveh Y, Berant M. Assessment of liver size in normal infants and children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1984; 3: 346-8.

- NCHS GROWTH CURVES FOR CHILDREN: Birth - 18 Years United States. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service-National Center for Health Statistics. Hyattsville, 1977.
- Norman AW, Henry LH. Vitamin D: metabolism and mechanism of action. In: Favus MJ (ed). Primers on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven,1993; 63-70.
- Panigrahi K, Delmas PD, Singer F et al. Characteristics of two-site immunoradiometric assay for human skeletal alkaline phosphatase in serum. Clin Chem 1994; 40: 822-8.
- Peach H, Compston JE, Vedi S et al. Value of plasma calcium, phosphate and alkaline phosphate measurement in the diagnosis of histological osteomalacia. J Clin Pathol 1982; 35: 625-30.
- Petitclerc C. Quantitative fractionation of alkaline phosphatase isoenzymes according to their thermostability. Clin Chem 1976; 22: 42-8.
- Puzas EJ. The Osteoblast. In: Favus MJ (ed). Primer on the Metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven,1993:15-20.
- Poznanski AK. Radiologic evaluation of bone mineral in children. In: Favus MJ (ed). Primers on the bone metabolic diseases and disorders of mineral metabolism. 2<sup>a</sup>. ed. New York: Raven,1993; 115-29.
- Porayko HK, Whesner RH, Hay JE et al. Bone disease in liver transplant recipients: incidence, timing and risk factors. Transp Proceedings 1991; 23:1462-5.
- Randolph-Habecker J, Lott JA, Tesi RJ. Alkaline phosphatase isoforms in serum after liver allograft surgery. Clin Chem 1994; 40: 1272-7.
- Rao SD. Metabolic bone disease in gastrointestinal and biliary disorders. In: Favus MJ (ed). Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 2<sup>a</sup>. New York : Murray J Favus,1993:268-73.
- Reed JS, Meredith SC, Nemchavsky BA et al. Bone disease in primary biliary cirrhosis: reversal to osteomalacia with oral 25 - hydroxyvitamin D. Gastroenterology 1980; 78: 512-7.
- Reichen J; Ross FJ, Zimmermann H. Functional considerations in the assesment of therapy of chronic cholestasis diseases. In: Lentz M, Reichen J. Paediatric cholestasis: novel approach to treatment. United Kingdom: Kluwer, 1993: 119-25.
- Risteli L, Risteli J. Biochemical markers of bone metabolism. Ann Int Med 1993; 25: 116-21.

- Roe TF, Mora S, Costin G et al. Vertebral bone density in insulin-dependent diabetic children. *Metabolism* 1991; 40: 967-71.
- Rosalki SB. Enzyme tests in diseases of the liver and hepatobiliary tract. In: Wilkinson JH. *The principles and practice of diagnostic enzymology*. London: Edward Arnold, 1976; 303-6.
- Rosalki SB, Ying Foo A. Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clin Chem* 1984; 1182-6.
- Rubin K, Schirduan V, Gendrean P et al. Predictors of axial and peripheral bone mineral density in healthy children and adolescents with special attention to the role of puberty. *J Pediatr* 1993; 123: 863-70.
- Rubinacci A, Sirtari P, Moro G et al. Is there an impact of birth weight and early life nutrition on bone mineral content in preterm born infants and children? *Acta Pediatr* 1993; 82: 711-3.
- Salle BL, Glorieux FH. Assessment of bone mineral content in infants: the new age. *Acta Pediatr* 1993; 82: 709-10.
- Seargeant LE, Stinson RA. Evidence that three structural genes code for human alkaline phosphatases. *Nature (London)* 1979; 281: 152-4.
- Sherlock S. Colestase. In: Sherlock S. *Doenças do Fígado e do Sistema Biliar*. 7ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988; 202-5.
- Sherlock S. Colestasis. In: Sherlock S, Dolley D. *Diseases of the Liver and the Biliary System*. 9ª. ed. Oxford: Blackwell, 1993; 221-4.
- Shepherd RW. Nutritional support of the child with chronic liver disease. In Suchy FJ: *Liver disease in children*: St Louis: Copyright, 1994; 393-5.
- Siqueira AJS, Barbosa EDSF, Azevedo AMP et al. Técnica simples para identificar a origem da atividade da fosfatase alcalina no soro com o emprego da uréia como inibidor seletivo. *Laes & Haes* 1995; 92: 961-01.
- Silveira TR, Guedes ALP. Icterícia colestática neonatal. In: Penna F, Wheba J, Fagundes Neto, U. *Gastroenterologia Pediátrica*. Rio de Janeiro: Medsi, 1990: 465-85.
- Sokol RJ. Vitamin deficiency and replacement in childhood cholestasis. In: Lentz M, Reichen J. *Paediatric cholestasis: novel approaches to treatment*. United Kingdom: Kluwer, 1993: 289-304.
- Southard RN, Morris JD, Mahan JD et al. Bone mass in healthy children: measurement with quantitative DXA. *Radiology* 1991; 179: 735-8.

- Stallings VA, Oddleifson NW, Negrini BY et al. Bone mineral content and dietary calcium intake in children prescribed a low-lactose diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutri* 1994; 8: 440-5.
- Suchy, FJ. Bile formation: mechanisms and development. In Suchy FJ: *Liver disease in children*. St Louis: Copyright, 1994: 268-74.
- Teitelbaum LS. Distúrbios ósseos metabólicos e não tumorais. In: Anderson DW, Kissane JM. *Patologia Clínica*. 7ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1982: 1552-602.
- Termine JD. Bone matrix proteins and the mineralization process. In: Favus MJ (ed). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2ª. ed. New York. Raven, 1993: 21-5.
- Thomas KA, Cook SD, Bennet JT et al. Femoral neck and lumbar spine bone mineral densities in a normal population 3-20 years of age. *J Pediatr Orthop* 1991; 11: 48-58.
- Tohmé JF, Seibel MJ, Silveberg SJ et al. Biochemical markers of bone metabolism. *Z Rheumatol* 1991; 50: 133-41.
- Trivedi P, Mieli-Vergani G, Mowat AP. Cholestasis in infancy and childhood: an overview. In: Lentz M, Reichen J. *Paediatric Cholestasis: novel approaches to treatment*. United Kingdom: Kluwer, 1993: 129-38.
- Tsukara H, Sudo M, Umezaki M et al. Dual-energy x-ray absorptiometry in the lumbar spine, proximal femur and distal radius in children. *Pediatr Radiol* 1992; 22: 560-2.
- Valdimarsson T, Toss G, Lofman O et al. Bone mineral density in coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 457-61.
- Valenzuela GJ, Munson LA, Farley JR et al. Time-dependent changes in bone, placental, intestinal and hepatic alkaline phosphatase activities in serum during human pregnancy. *Clin Chem* 1981; 27: 2002-7.
- Wahner HW. Measurements of bone mass and bone density. *Endoc Metab Clin North Am* 1989; 18: 995-1012.
- Waterlow JC, Buzina R, Keller W et al. The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of 10 years. *Bulletin of the World Health Organization* 1977; 55: 489-98.
- Whitaker KB, Whitby LG, Moss DW. Activities of bone and liver alkaline phosphatases in serum in health and disease. *Clin Chem Acta* 1977; 80: 209-20.

Whittington PF, Balistreri WF. Liver transplantation in pediatrics: indications, contraindications and pretransplant management. *J Pediatr* 1991; 118: 169-77.

# **ANEXOS**

## ANEXO I

### Protocolo de avaliação clínico-laboratorial por ocasião do estudo radiológico

Nome do paciente: .....

RG: .....

Data de Nascimento: .....

Data do Exame: .....

Idade (anos): ..... Sexo: .....

Diagnóstico: .....

Tempo de colestase (anos): .....

Uso de Medicamentos:

Fenobarbital?	( ) S	( ) N
Rifampicina?	( ) S	( ) N
Carbamazepina?	( ) S	( ) N
Ác. Ursodexosólico?	( ) S	( ) N
Corticosteróide?	( ) S	( ) N

#### Suplementação de cálcio e vitaminas:

a) Vitamina A? ( ) S ( ) N

Especialidade: .....  
Via de Administração: .....  
Dose: .....

b) Vitamina K ? ( ) S ( ) N

Especialidade: .....  
Via de Administração: .....  
Dose: .....

c) Vitamina E? ( ) S ( ) N

Especialidade: .....

Via de administração: .....

Dose: .....

d) Vitamina D? ( ) S ( ) N

Especialidade: .....

Via de administração: .....

Dose: .....

### Características Clínicas:

Icterícia? ( ) S ( ) N

Colúria? ( ) S ( ) N

Prurido? ( ) S ( ) N

Acolia? ( ) S ( ) N

Hepatomegalia? ( ) S ( ) N

Esplenomegalia? ( ) S ( ) N

Ascite? ( ) S ( ) N

Edema Periférico? ( ) S ( ) N

Deformidades Ósseas? ( ) S ( ) N

Dor Óssea? ( ) S ( ) N

Fratura? ( ) S ( ) N

### Avaliação do Estado Nutricional:

Peso (g): .....

Altura (cm): .....

Peso ideal para idade (g): ..... % Peso/ Idade: .....

Altura ideal para idade (cm): ..... % Alt/Idade: .....

Peso/Altura: .....

Valores do escore Z : Peso Z: ..... Altura Z: ..... P/A Z: .....

Classificação de Gomez : .....

Classificação de Waterlow: .....

### **Avaliação Laboratorial:**

a) Ca (mg/dl): ..... P (mg/dl): ..... Mg (mg/dl): .....

b) Glicemia (mg/dl): .....

c) Uréia (mg/dl): ..... Creatinina: .....

d) AST (UI): ..... ALT (UI): ..... BT(mg/dl): ..... BD (mg/dl): .....

$\gamma$ GT (UI): ..... 5' N (UI): ..... Albumina (g/dl):..... TP (seg):.....

e) Fosf. Alcalina Total (UI): .....

Fosf. Alcalina Esquelética (UI): Mét. Lectina: At. Absoluta: .....

At. Percentual: .....

Mét. Calor (10 m): At. Absoluta: .....

At. Percentual: .....

Mét. Calor (15 m): At. Absoluta: .....

At. Percentual: .....

### **Avaliação Radiológica:**

Densidade óssea mineral ( $\text{g/cm}^2$ ): .....

Valor inferior de normalidade ( $\text{g/cm}^2$ ):.....

Valor superior de normalidade ( $\text{g/cm}^2$ ):.....

## ANEXO II

**Valores de densidade óssea mineral (g/cm<sup>2</sup>) da coluna lombar,  
segundo Thomas e colaboradores<sup>(\*)</sup>**

<b>Idade</b>	<b>Altura</b>	<b>Peso</b>	<b>Limite Inferior</b>	<b>Valor Preditivo</b>	<b>Valor Superior</b>
<b>Masculino</b>					
3	94,9	14,62	0,4914	0,5568	0,6222
4	102,9	16,69	0,5474	0,5992	0,6510
5	109,9	18,67	0,5958	0,6387	0,6816
6	116,1	20,69	0,6376	0,6759	0,7142
7	121,7	22,85	0,6773	0,7137	0,7501
8	127,0	25,30	0,7135	0,7499	0,7863
9	132,2	28,13	0,7502	0,7874	0,8246
10	137,5	31,44	0,7896	0,8291	0,8686
11	143,3	35,30	0,8306	0,8705	0,9104
12	149,7	39,78	0,8760	0,9189	0,9618
13	156,5	44,95	0,9239	0,9697	1,0155
14	163,1	50,77	0,9743	1,0202	1,0663
15	169,0	56,71	1,0239	1,0711	1,1183
16	173,5	62,10	1,0694	1,1178	1,1662
17	176,2	66,31	1,1046	1,1530	1,2014
18	176,8	66,88	1,1276	1,1802	1,2328
19	177,2	70,66	1,1414	1,2021	1,2628
20	177,4	71,89	1,1506	1,2219	1,2932
<b>Feminino</b>					
3	94,1	14,10	0,4468	0,5620	0,6772
4	101,6	15,96	0,5121	0,6097	0,7073
5	108,4	17,66	0,5644	0,6506	0,7368
6	114,6	19,52	0,6212	0,6950	0,7688
7	120,6	21,84	0,6742	0,7390	0,8038
8	126,4	24,84	0,7262	0,7838	0,8414
9	132,2	28,46	0,7853	0,8351	0,8849
10	138,3	32,55	0,8452	0,8886	0,9320
11	144,8	36,95	0,9062	0,9466	0,9870
12	151,5	41,53	0,9626	1,0050	1,0474
13	157,1	46,10	1,0152	1,0582	1,1012
14	160,4	50,28	1,0626	1,1034	1,1442
15	161,8	53,68	1,1015	1,1415	1,1815
16	162,4	55,89	1,1249	1,1675	1,2101
17	163,1	56,69	1,1385	1,1891	1,2397
18	164,7	56,62	1,1446	1,2060	1,2674
19	163,0	57,24	1,1434	1,2206	1,2978
20	163,2	57,22	1,1421	1,2351	1,3281

Fonte: Thomas e colaboradores, 1991

### ANEXO III

#### Características demográficas e clínicas individuais dos pacientes

Caso	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Tempo de colestase (anos)	Hepatoespleno -megalia	Icterícia	Colúria	Acolia	Prurido	Ascite	Edema	Deformidade Óssea	Dor óssea
1	9,0	F	Cirrose Criptogênica	0,8	sim	sim	sim	não	sim	não	não	não	não
2	5,5	M	Atresia Biliar Extra-Hepática	1,0	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não
3	15,7	M	Síndrome de Alagille	15,0	sim	sim	sim	não	sim	não	não	não	não
4	12,9	F	Cirrose Criptogênica	4,0	sim	sim	sim	não	sim	não	não	não	não
5	12,6	F	Síndrome de Alagille	12,0	sim	sim	sim	não	sim	não	não	não	não
6	8,4	M	Síndrome de Alagille	8,0	sim	sim	sim	não	sim	não	não	não	não
7	6,9	F	Colestase Idiopática	7,0	sim	sim	sim	não	sim	não	não	não	não
8	5,3	F	Atresia Biliar Extra-Hepática	5,0	sim	sim	sim	sim	não	sim	sim	não	não
9	3,0	M	Def. $\alpha_1$ Anti-tripsina	0,3	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não
10	6,8	M	Atresia Biliar Extra-Hepática	0,3	sim	sim	sim	sim	sim	não	não	não	não
11	13,3	M	Hep. Crôn. Ativa Auto-imune	0,5	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não
12	7,6	F	Cirrose Criptogênica	4,0	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não
13	3,8	M	Atresia Biliar Extra-Hepática	0,3	sim	sim	sim	sim	sim	não	não	não	não
14	18,0	M	Cirrose Criptogênica	1,5	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	não
15	8,0	M	Hepatite A	0,5	sim	sim	sim	sim	sim	não	não	não	não
16	18,0	M	Cirrose Criptogênica	4,0	sim	sim	sim	não	sim	não	não	não	não
17	3,5	M	Colestase Idiopática	0,3	sim	sim	sim	sim	sim	não	não	não	não
18	7,6	F	Atresia Biliar Extra-Hepática	1,0	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não
19	3,0	M	Atresia Biliar Extra-Hepática	3,0	sim	sim	sim	sim	sim	não	não	sim	não
20	3,0	F	Colestase Idiopática	2,5	sim	sim	não	sim	sim	não	não	não	não

... continuação do Anexo III

Caso	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Tempo de colestase (anos)	Hepatoesplenomegalia	Icterícia	Colúria	Acolia	Prurido	Ascite	Edema	Deformidade Óssea	Dor óssea
21	0,9	M	Atresia Biliar Extra-Hepática	0,9	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não
22	1,0	M	Atresia Biliar Extra-Hepática	1,0	sim	sim	sim	não	não	sim	sim	não	não
23	0,5	M	Def. $\alpha_1$ Anti-tripsina	0,6	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não
24	1,0	M	Atresia Biliar Extra-Hepática	1,0	sim	sim	sim	não	sim	não	não	não	não
25	0,5	F	Atresia Biliar Extra-Hepática	0,5	sim	sim	sim	não	sim	não	não	não	não
26	0,9	M	Cisto de Colédoco	0,7	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não
27	2,3	M	Cirrose Criptogênica	0,5	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não
28	0,6	M	Cirrose Criptogênica	0,6	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não
29	0,8	M	Atresia Biliar Extra-Hepática	0,8	sim	sim	sim	sim	não	não	não	não	não
30	0,9	M	Atresia Biliar Extra-Hepática	0,8	sim	sim	sim	não	sim	não	não	não	não
31	0,8	F	Atresia Biliar Extra-Hepática	0,9	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	não
32	1,1	F	Atresia Biliar Extra-Hepática	1,0	sim	sim	sim	sim	não	sim	sim	não	não

## ANEXO IV

### Avaliação nutricional segundo o escore Z e critérios de Gomez e Waterlow

Caso	Peso (g)	Altura (cm)	Escore Z		Gomez	Waterlow
			P Z	Alt Z		
1	18000	112,0	-2,4	-3,6	D.C II	D.C
2	18100	106,5	-0,7	-1,4	Eutrófico	D.P
3	48000	151,5	-1,5	-2,8	D.C I	D. P
4	38100	144,5	-0,9	-1,4	Eutrófico	D.P
5	35000	155,0	-1,2	+0,5	D.C I	Eutrófico
6	18000	110,0	-2,3	-4,2	D.C III	D.C
7	14700	107,0	-2,6	-3,3	D.C II	D.C
8	18000	107,0	-0,1	-1,6	Eutrófico	Eutrófico
9	12350	89,5	-1,5	-1,4	D.C I	D.P
10	21000	116,0	-0,6	-2,0	Eutrófico	D.P
11	49500	162,0	+0,4	+0,4	Eutrófico	Eutrófico
12	27600	128,0	+1,3	+0,6	Eutrófico	D.P
13	18500	109,0	+1,0	+1,9	Eutrófico	Eutrófico
14	52900	162,0	-1,8	-2,3	D.C I	D. C
15	22000	123,5	-1,0	-1,6	D.C I	D. A
16	40500	151,0	-3,2	-2,3	D.C III	D.C
17	18000	103,0	+1,8	-3,9	Eutrófico	Eutrófico
18	19900	112,0	-1,2	-3,1	Eutrófico	D.P
19	10400	84,0	-2,8	-2,8	D.C II	D.C
20	10000	82,0	-2,7	-3,2	D.C II	D.C
21	8410	73,0	-1,5	-0,7	D.C I	D.A
22	8750	72,0	-1,7	-1,9	D.C I	D.P
23	7100	69,0	-2,1	-1,2	D.C II	D.P
24	10200	76,5	+0,8	-1,2	Eutrófico	D.P
25	6130	62,5	+0,2	-1,6	D.C II	D.P
26	7830	69,0	-1,8	-1,3	D.C II	D.P
27	12000	87,5	-1,7	-1,9	Eutrófico	D.P
28	7900	67,0	+0,6	-0,3	Eutrófico	D.A
29	6480	64,0	-3,4	-0,7	D.C II	D.P
30	6170	62,0	-2,7	-4,5	D.C II	D.P
31	7960	68,5	-1,2	-2,4	D.C I	D.C
32	8650	73,0	-1,3	-2,5	D.C I	D.P

D.C = Desnutrição crônica;  
 D.C I = Desnutrição crônica grau I;  
 D.C II = Desnutrição crônica grau II;  
 D.C III = Desnutrição crônica grau III;  
 D.P = Desnutrição pregressa;  
 D.A = Desnutrição atual

## ANEXO V

Valores individuais de glicemia, concentrações séricas de uréia e creatinina

Caso	Glicemia (g/dL)	Uréia (g/dL)	Creatinina (g/dL)
1	85,0	19,0	0,4
2	120,0	20,0	0,6
3	80,0	18,0	0,4
4	100,0	19,0	0,7
5	72,0	23,0	0,6
6	80,0	27,0	0,5
7	100,0	20,0	0,6
8	95,0	20,0	0,6
9	95,0	18,0	0,3
10	106,0	24,0	0,4
11	92,0	20,0	0,4
12	75,0	28,0	0,7
13	98,0	21,0	0,4
14	104,0	36,0	0,4
15	80,0	26,0	0,5
16	76,0	20,0	0,5
17	70,0	20,0	0,5
18	80,0	26,0	0,4
19	87,0	15,0	0,7
20	96,0	23,0	0,3
21	70,0	15,0	0,8
22	96,0	14,0	0,8
23	78,0	18,0	0,3
24	95,0	11,0	0,3
25	85,0	14,0	0,2
26	91,0	20,0	0,2
27	90,0	25,0	0,2
28	82,0	30,0	0,4
29	70,0	18,0	0,4
30	88,0	27,0	0,7
31	70,0	15,0	0,2
32	78,0	20,0	0,7