

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE CRIANÇAS
E ADOLESCENTES COM CIRROSE: A
CONTRIBUIÇÃO DOS BIOMARCADORES**

TESE DE DOUTORADO

MARIA INÊS DE ALBUQUERQUE WILASCO

Porto Alegre, Brasil
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE CRIANÇAS
E ADOLESCENTES COM CIRROSE: A
CONTRIBUIÇÃO DOS BIOMARCADORES**

MARIA INÊS DE ALBUQUERQUE WILASCO

Orientadora: Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira

Coorientadora: Dra. Cristina Toscani Leal Dornelles

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

Porto Alegre, Brasil.
2015

CIP - Catalogação na Publicação

Wilasco, Maria Inês de Albuquerque

Avaliação nutricional de crianças e adolescentes com cirrose: a contribuição dos biomarcadores / Maria Inês de Albuquerque Wilasco. -- 2015.

121 f.

Orientador: Themis Reverbel da Silveira.

Coorientador: Cristina Toscani Leal Dornelles.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Atresia Biliar. 2. Cirrose. 3. Avaliação nutricional. 4. Pacientes pediátricos. I. Silveira, Themis Reverbel da, orient. II. Dornelles, Cristina Toscani Leal, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

09 / 12 / 2015

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Dr^a Raquel Borges Pinto
Hospital da Criança Conceição

Prof^a Dra^a Vera Lúcia Bosa
Departamento de nutrição - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a Dra^a Elza Daniel de Mello
Programa de Pós graduação em Saúde da Criança e do Adolescente
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*Dedico este trabalho aos meus filhos, **Melina e Rodrigo** e ao meu esposo **Julio**, que sempre me apoiaram, me compreenderam e demonstraram carinho nos momentos difíceis.*

*Aos meus pais, **João Rubens e Maria Myrtô**, que não mediram esforços para oportunizar os meus estudos e me ensinaram o valor do trabalho e da honestidade.*

AGRADECIMENTOS

- Ofereço meu principal agradecimento à minha orientadora, Professora Doutora **Themis Reverbel da Silveira**, por todo apoio, pelos ensinamentos, pelo incentivo, e, principalmente, pela força, jovialidade e paixão pela profissão. Não tenho palavras para expressar minha admiração e o meu agradecimento. Doutora Themis vou lembrar para sempre do seu carinho de mãe, que consegue ser rígida o suficiente para ensinar sem esquecer de ser carinhosa! Um exemplo de vida a ser seguido!
- À minha coorientadora Doutora **Cristina Leal Toscani Dornelles**, pela amizade, companheirismo e exemplo profissional. Obrigada por ter introduzido a pesquisa na minha vida!
- À amiga argentina e colega de laboratório, Doutora **Carolina Uribe-Cruz** pelo companheirismo, paciência e estímulo. Uma ajuda que enriqueceu de maneira ímpar meu crescimento acadêmico. Obrigada pelas discussões acadêmicas, pelos ensinamentos, pelo carinho e, principalmente, por me incentivar. Uma ajuda que nunca será esquecida!
- À amiga e colega de profissão **Daniele Santetti**, pela parceria e pela ajuda sem a qual este trabalho não poderia ter sido finalizado.
- A toda a equipe do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, **Ana Claudia Reis Schneider, Carolina Uribe-Cruz, Larisse Longo, Taís Ortiz Hammes, Jorge Luiz Santos, Laura Alencastro, Leila Fratta, Giovanna Weber, Jessica Ferrari, Raquel Ayres** pelas discussões acadêmicas, pela ajuda e pelo incentivo nos momentos difíceis.

- Aos pesquisadores do Laboratório de Psiquiatria Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial **Gabriel Fries** e **Bianca Pfanfensaler** pelas dosagens realizadas.
- Aos **professores e coordenadores do PPG-SCA** pelos ensinamentos e incentivo.
- A **Rosane Blanguer** pela presteza e eficiência em resolver situações inesperadas.
- Ao **CAPES, FIPE e PPG-SCA**, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.
- A **Ceres Oliveira e Prof. Mário Wagner**, pela competência com que realizaram a análise estatística.
- Aos **Doutores Rafael Lucyk Maurer, Ingrid Perry, Fernanda dos Santos de Oliveira e Graziella Rodrigues** pela gentileza de participarem da banca do meu exame de qualificação.
- Aos **professores Doutores Elza Daniel de Mello, Raquel Borges Pinto, Vera Bosa e Carlos Oscar Kieling** por terem aceitado participar da banca examinadora deste trabalho.
- A **todas as pessoas** que colaboraram com este trabalho e às quais involuntariamente eu possa ter esquecido de mencionar.

Quanto mais aprendo sei que há muito ainda a aprender...

(minha versão da célebre frase do filósofo Sócrates: “Só sei que nada sei”)

RESUMO

Introdução: Crianças e adolescentes com cirrose desenvolvem complicações nutricionais oriundas da anorexia, do hipermetabolismo e dos problemas decorrentes da diminuição da absorção. O estado nutricional e a gravidade da doença são mutuamente dependentes. Entretanto, a avaliação do estado nutricional destes pacientes é dificultada pela presença de edema e/ou ascite, organomegalias e distorção dos exames clínicos. Já foi demonstrado existir relação entre a Interleucina-6 (IL-6), o Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a Interleucina-10 (IL-10) e o Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) com o estado nutricional em geral, mas não em cirróticos por Atresia Biliar (AB).

Objetivos: Os objetivos desta tese foram: 1) Avaliar o estado nutricional de crianças e adolescentes com cirrose e comparar os resultados em dois momentos distintos. 2) Investigar e expressão de IL-6, o TNF- α , a IL-10 e sua associação com a gravidade da cirrose o estado nutricional em pacientes pediátricos por AB. 3) Estudar a expressão de BDNF e sua associação com a gravidade da cirrose e o estado nutricional em pacientes pediátricos por AB.

Pacientes e métodos: Foram utilizados dados de quatro bancos, de amostras já coletadas, de pesquisas clinico-epidemiológicas conduzidas com crianças e adolescentes no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os parâmetros para avaliar o estado nutricional das crianças com cirrose e controles foram: estatura para idade (E/I), dobra cutânea tricipital para idade (DCT/I), circunferência do braço para idade (CB/I) e índice de massa corporal para idade (IMC/I). A gravidade da doença foi avaliada pelos modelos PELD/MELD e escore Child-Pugh. Esta tese é composta de três artigos: 1) Foi realizado um estudo transversal e comparado o estado nutricional de pacientes pediátricos de duas series coletadas de 2003 a 2005 (n=31) e de 2010 a 2011 (n=36). 2) Os níveis de IL-6, TNF- α , IL-10 foram avaliados transversalmente no grupo cirrose (n=53) e no grupo controle (n=33) por citometria de fluxo e os resultados correlacionados com o estado nutricional e a gravidade da doença. Os níveis de BDNF foram dosados transversalmente no grupo cirrose (n=53) e no grupo controle (n=33) por ELISA e os resultados correlacionados com o

estado nutricional e a gravidade da doença.

Resultados: 1) Após aproximadamente uma década o percentual de desnutrição se manteve estável (22,6% *versus* 27,8%). 2) Os níveis de IL-6, TNF- α e IL-10 foram significativamente mais elevados no grupo cirrose quando comparado ao grupo controle. A gravidade da doença apresentou correlação direta com IL-6 e IL-10, e correlação inversa com E/I, CB/I, DCT/I. 3) Os níveis de BDNF foram mais baixos no grupo cirrose quando comparados ao grupo controle. Foi demonstrada correlação direta entre o BDNF com E/I e DCT/I, mas não houve correlação com a gravidade da doença.

Conclusões: O percentual de desnutrição e a gravidade da doença se mantiveram estáveis nas duas séries do HCPA, separadas por aproximadamente uma década. A IL-6, a IL-10 e o BDNF podem ser usados como biomarcadores coadjuvantes para avaliar o estado nutricional de criança e adolescentes com cirrose.

ABSTRACT

Introduction: Children and adolescents with cirrhosis carry nutritional complications resulting from anorexia, hypermetabolism and problems arising from the decreased absorption. The nutritional status and disease severity are dependent one each other. However, nutritional assessment of these patients is hindered by the presence of organomegaly, edema/ascites and by the complexity of interpreting laboratory parameters. It has been shown that there is a relationship between Interleukin-6 (IL-6), Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), IL-10 and Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with nutritional status generally, but not in cirrhosis due to Biliary Atresia (BA).

Objectives: The objectives of thesis were: 1) To evaluate the nutritional status of children and adolescents with cirrhosis and compare the results in two different moments. 2) To investigate the expression of IL-6, TNF- α , IL-10 and their association with nutritional status and cirrhosis severity in pediatric patients with BA. 3) To study the expression of BDNF and their association with nutritional status and cirrhosis severity in pediatric patients with BA.

Patients and methods: Four database were used of samples already collected from clinical and epidemiological research conducted with children and adolescents in Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The parameters for assessing children with cirrhosis and controls were standard deviation score for height-for-age ratio (SDS-H/A), standard deviation score for triceps skinfold thickness-for-age ratio (SDS-TSF/A), standard deviation score for mid upper arm circumference-for-age ratio (SDS-MUAC/A) and standard deviation score for body mass index-for-age ratio (SDS-BMI/A). The disease severity was evaluated by PELD/MELD models and Child-Pugh score. This thesis consists of three articles: 1) Cross-sectional study to compare the nutritional status of cirrhotic pediatric patients from two series collected from 2003 to 2005 (n=31) and from 2010 to 2011 (n=36). 2) The levels of IL-6, TNF- α and IL-10 in cirrhosis group (n=53) and control group (n=33) were cross-sectionally assessed by flow cytometry and the outcome related to nutritional status and disease severity. 3) The levels BDNF in cirrhosis group (n=53) and control group (n=33) were

cross-sectionally assessed by ELISA and the outcome related to nutritional status and disease severity.

Results: 1) After approximately a decade, the undernourishment percentage remains stable. 2) The levels of IL-6, o TNF- α , a IL-10 were significantly higher in cirrhosis group when compared to control group. IL-6 and IL-10 levels have shown a positive correlation with disease severity and an inverse correlation with SDS-H/A, SDS-TSF/A and SDS-MUAC/A. 3) The levels of BDNF were lower in cirrhosis group when compared to control group. BDNF showed a positive correlation with SDS-H/A e SDS-TSF/A, but did not correlate with disease severity.

Conclusions: The undernourishment percentage and the severity of the disease remained stable in the two series of HCPA, separated by about a decade. IL-6, IL-10 and BDNF can be used as a supporting biomarker to evaluate the nutritional status in children and adolescents with cirrhosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sistema Nervoso Central e homeostase energética em indivíduos eutróficos.....	20
Figura 2	Evolução do dano hepático para cirrose	25
Figura 3	Envolvimento de endotoxinas na formação de fibrose	29
Figura 4	Produção de IL-6 no fígado.....	31
Figura 5	Logística da unificação dos bancos de dados.....	48
Figura 6	Diagrama para classificação nutricional do grupo cirrose até cinco anos de idade	50
Figura 7	Diagrama para classificação nutricional do grupo cirrose com mais de cinco anos de idade.....	51
Figura 8	Diagrama para classificação nutricional do grupo controle	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação da gravidade da cirrose de acordo com o escore Child-Pugh.....	26
Quadro 2	Equação do modelo MELD	27
Quadro 3	Equação do modelo PELD	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Atresia biliar
ALT	Alanina aminotransferase
AMB/I	Área muscular do braço para idade
ANCOVA	Análise de covariância
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BIA	Bioimpedância
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CB/I	Circunferência do braço para idade
MUAC/A	<i>Mid-upper arm circumference for age</i>
CONEP	Comissão nacional de ética em pesquisa
DCT/I	Dobra cutânea tricipital para idade
TSF/A	<i>Triceps skinfold for age</i>
DEXA	Absorimetria de feixe duplo <i>Dual-energy X-ray absorptiometry</i>
DP	Desvio padrão
SD	<i>Standard deviation</i>
DRI	Ingestão dietética de referência <i>Dietary reference intake</i>
E/I	Estatura para idade
H/A	<i>Height for age</i>
EER	Requerimento energético estimado <i>Estimated energy requirement</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FA	Fosfatase alcalina
FIPE	Fundo de Incentivo a Pesquisa
GER	Gasto energético em repouso
GGT	Gama glutamil transpeptidase
GPPG	Grupo de pesquisa e pós-graduação
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IL-1	Interleucina-1 <i>Interleukin-1</i>
IL-10	Interleucina-10 <i>Interleukin-10</i>

IL-6	Interleucina-6 <i>Interleukin-6</i>
IMC/ BMI/A	Índice de massa corporal para idade <i>Body mass index for age</i>
INR	Índice internacional normalizado <i>International normalized ratio</i>
MELD	<i>Model for End-stage Liver Disease</i>
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B <i>Nuclear factor kappa B</i>
OMS WHO	Organização Mundial de Saúde <i>World Health Organization</i>
P/I W/A	Peso para idade <i>Weight-for-age</i>
PELD	<i>Pediatric End-stage Liver Disease</i>
PPG-SCA	Programa de pós-graduação em saúde da criança e do adolescente
RDA	Ingestão dietética recomendada <i>Recommended dietary allowances</i>
SDS	<i>Standard Deviation Score</i>
SDS-H/A	<i>Standard deviation score for height-for-age</i>
SDS-MUAC/A	<i>Standard deviation score for middle upper arm circumference-for-age</i>
SDS-TSF/A	<i>Standard deviation score for triceps skinfold-for-age</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa <i>Tumor necrosis alpha</i>
TP	Tempo de protrombina

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 SISTEMA QUE REGULA A HOMEOSTASE ENERGÉTICA	19
1.2 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL	22
1.2.1 Parâmetros antropométricos	23
1.2.1 Recomendação nutricional	24
1.3 CIRROSE	24
1.3.1 Atresia Biliar e sua evolução	28
1.3.2 Cirrose e inflamação	29
1.4 MOLÉCULAS DE SINALIZAÇÃO E SUA INFLUÊNCIA NO ESTADO NUTRICIONAL	30
1.4.1 Interleucina-6	30
1.4.2 Fator de necrose tumoral alfa	32
1.4.3 Interleucina-10	34
1.4.4 Fator neurotrófico derivado do cérebro	34
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40

4 HIPÓTESE	42
5 PACIENTES E MÉTODOS	44
5.1 DELINEAMENTO.....	44
5.2 AMOSTRA.....	44
5.3 VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	48
5.4 CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA CIRROSE.....	49
5.5 CLASSIFICAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL.....	49
5.5.1 Grupo cirrose.....	49
5.5.2 Grupo controle.....	50
5.6 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR.....	52
5.7 EXAMES LABORATORIAIS.....	52
5.8 ANÁLISE DAS CITOCINAS E BDNF.....	53
5.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	53
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
6 ARTIGO UM: Avaliação nutricional em crianças e adolescentes no Hospital.....	56
de Clínicas de Porto Alegre: estudo transversal de duas séries	
7 ARTIGO DOIS: IL-6, TNF- α , IL-10, and nutritional status in patients.....	72
with Biliary Atresia	
8 ARTIGO TRÊS: BDNF and nutritional status in children and adolescents.....	87
with cirrhosis due to Biliary Atresia	
9 CONCLUSÕES	100
10 CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
11 REFERÊNCIAS	105
12 ANEXOS	115
13 APÊNDICES	120

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os portadores de cirrose, especialmente as crianças e os adolescentes, desenvolvem complicações nutricionais oriundas da anorexia, do hipermetabolismo e dos problemas decorrentes da diminuição de absorção de nutrientes. Estas complicações podem evoluir para estágios muito avançados de desnutrição e são considerados importantes fatores prognósticos na evolução da cirrose (Dornelles *et al.*, 2010).

1.1 SISTEMA QUE REGULA A HOMEOSTASE ENERGÉTICA

A produção de energia pelo organismo envolve rotas complexas, delicadamente reguladas que levam à degradação dos nutrientes com este objetivo. Indivíduos saudáveis que apresentam peso e percentual de gordura corporal normais, geralmente, se mantêm estáveis por períodos longos. Esta estabilidade deve-se ao mecanismo denominado homeostase energética que equilibra a ingestão alimentar com o gasto energético (Schwartz *et al.*, 2000; Morton *et al.*, 2006).

O sistema que regula a homeostase energética, definido como um sistema onde sinais circulantes informam ao cérebro a disponibilidade de energia e em resposta o cérebro faz os ajustes através da ingestão alimentar para atingir um balanço energético adequado, foi inicialmente proposto por Kennedy na década de cinquenta (Kennedy, 1953). Este sistema atua através de um ‘*feedback* negativo de adiposidade’, ou seja, o sistema nervoso central (SNC) faz as correções necessárias para que o indivíduo se alimente adequadamente a partir da reserva de tecido adiposo. Além disso, o sistema que regula a homeostase energética

controla o gasto energético (Morton, Meek e Schwartz, 2014). Assim, O SNC integra sinais oriundos da reserva adiposa com sinais provenientes dos nutrientes para regular a ingestão alimentar e dessa forma manter o peso corporal e o tecido adiposo estáveis ao longo do tempo (fig 1).

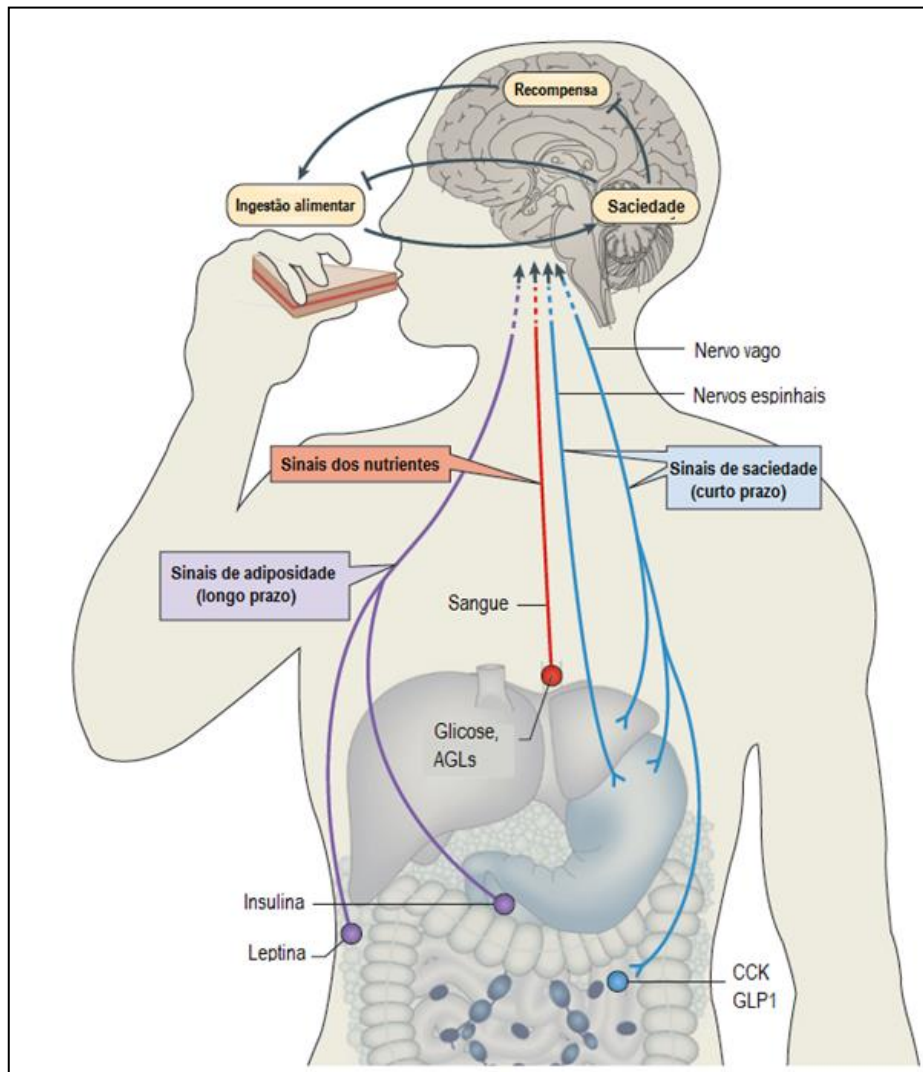


Figura 1 – Sistema Nervoso Central e homeostase energética em indivíduos eutróficos.

O SNC integra sinais da reserva adiposa com os relacionados ao consumo alimentar para regular a ingestão alimentar e o gasto energético de forma a manter estáveis as reservas energéticas ao longo do tempo. O balanço energético positivo induzido por superalimentação inibe as propriedades compensatórias do alimento e aumenta a saciedade induzida pela refeição levando à ingestão reduzida. Quando há privação de energia, as respostas adaptativas do SNC focam em aumentar as propriedades compensatórias do alimento e reduzir a resposta aos sinais de saciedade resultando em um consumo alimentar elevado até que as reservas adiposas estejam repletas. AGLs: ácidos graxos livres. CCK: Colecistoquinina. GLP1: *Glucagon-like peptide 1*.

FONTE: Modificado de Morton, e colaboradores, 2014 (Morton, Meek e Schwartz, 2014).

Ingestão alimentar reduzida é comum em estresse por diversas causas, como por exemplo, ao ser perseguido por um predador, em resposta ao trauma ou doença, após exposição a substâncias nocivas (Grossberg, Scarlett e Marks, 2010). Nestas situações a manutenção da reserva adiposa fica em segundo plano, assim, a anorexia se sobrepõe ao controle alimentar pelo sistema que regula a homeostase energética. É como se um botão “liga/desliga” fosse ligado para garantir que não haja alimentação até que a ameaça acabe. Assim, nessas situações onde ocorre estresse intenso, há predomínio da anorexia e, quando este é crônico, a perda de peso é inevitável (Morton, Meek e Schwartz, 2014).

A palavra "caquexia" é de origem grega, em que "kakos" significa "mau" e "hexis" significa "condição, estado", portanto "um estado debilitado da saúde". A diferença mais importante entre desnutrição e caquexia é a preferência por mobilização de gordura poupando o músculo esquelético, na primeira, enquanto que, na caquexia, há igual mobilização de gordura e tecido muscular (Delano e Moldawer, 2006). Em 2007, um grupo de cientistas com representantes da *Food and Drug Administration* se reuniram para estabelecer uma definição de caquexia, qual seja: ‘é uma síndrome metabólica complexa relacionada a uma doença de base e caracterizada por perda de massa muscular associada ou não a perda de tecido adiposo’. A característica principal da caquexia em crianças é a falha no crescimento, mas a perda de peso, a anorexia, a inflamação, a resistência à insulina e o aumento da degradação proteica muscular frequentemente estão presentes nesta condição (Evans *et al.*, 2008). Anorexia-caquexia em crianças e adolescentes com cirrose é considerada um importante fator prognóstico, capaz de influenciar a evolução clínica da cirrose na mesma proporção que outras complicações comuns, como a ascite e a encefalopatia. Além do mais, a caquexia é inversamente correlacionada com a sobrevida (Norman e Pirlich, 2008; Tsiaousi *et al.*, 2008).

Nos cirróticos vários fatores contribuem para a manutenção e o agravamento do estado de caquexia-anorexia. O estado hipermetabólico é uma causa comum de alto gasto energético,

estima-se que os cirróticos apresentem um gasto energético em repouso (GER) de aproximadamente 120% do valor esperado (Tsiaousi *et al.*, 2008). Frequentemente estes pacientes apresentam má absorção de nutrientes, especialmente lipídios, vitaminas e minerais (Kondrup, 2006; Tsiaousi *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2009). Alterações da motilidade intestinal podem, também, estar presentes e levar ao desenvolvimento de dispepsia funcional que agrava a anorexia existente (Gunnarsdottir *et al.*, 2003; Kalaitzakis *et al.*, 2006). Adicionalmente, a dificuldade de digestão e absorção de nutrientes em razão da hipertensão portal pode agravar estado nutricional (Plauth e Schütz, 2002). Citocinas pró-inflamatórias estão associadas com anorexia e participam do hipermetabolismo, do catabolismo proteico e da resistência à insulina (Delano e Moldawer, 2006).

1.2 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

A avaliação do estado nutricional pode ser feita através de vários métodos, sendo que a antropometria é amplamente utilizada pela facilidade de aplicação e baixo custo. Parâmetros antropométricos são largamente empregados como indicadores de vulnerabilidade para várias condições relacionadas à saúde e nutrição. No entanto, é importante que o avaliador tenha conhecimento que a população avaliada não apresenta nenhum fator que possa alterar ou distorcer as medidas obtidas (Who, 1995).

O sistema de escore-z ou desvio padrão (DP) expressa os valores antropométricos em números de escore-z ou DP ou abaixo ou acima da média ou mediana de referência para idade. Uma das vantagens do sistema é que cada criança terá um valor específico para sua idade que poderá ser submetido à análise estatística (Who, 1995).

No caso de crianças e adolescentes com cirrose, o peso é uma variável de fácil obtenção e útil para acompanhamento a curto prazo. No entanto, não é uma medida confiável para avaliação nutricional por não diferenciar líquidos de gordura e músculo (Young *et al.*,

2013). As medidas de dobra cutânea tricipital para idade (DCT/I), circunferência do braço para idade (CB/I) e estatura para idade (E/I) são melhores preditores de deficiência nutricional em crianças e adolescentes com cirrose do que o peso quando usado isoladamente (Sokol e Stall, 1990; Dornelles *et al.*, 2010). Existem muitos outros métodos para avaliação nutricional entre os quais podemos citar a análise por Bioimpedância (BIA), absorciometria de feixe duplo (DEXA) e a força do aperto de mão.

1.2.1 Parâmetros antropométricos

A E/I refere-se a um crescimento linear adequado em uma determinada idade e é um indicador útil para identificar processo prolongado de desnutrição ou a episódios repetidos de doença (Who, 2008). O peso para idade (P/I), em se tratando de crianças com cirrose, sofre influência do edema e/ou ascite e de organomegalias, costuma superestimar a classificação nutricional (Young *et al.*, 2013) e somente está disponível pela Organização Mundial de Saúde (OMS) até a idade de 10 anos. O índice de massa corporal para idade (IMC/I), por ser calculado com base no peso, também sofre interferência do edema e/ou ascite e organomegalia (Young *et al.*, 2013). Para doenças que são acompanhadas de retenção hídrica a CB/I parece fornecer uma avaliação nutricional mais precisa que o peso (Sokol e Stall, 1990). A DCT/I é uma medida especialmente útil para estimar a reserva de energia e, em crianças e adolescentes com cirrose, já demonstrou ser mais acurada do que o peso para avaliar a desnutrição (Sokol e Stall, 1990). A área muscular do braço para idade (AMB/I) é um indicador que reflete o ganho de peso (Bettler e Roberts, 2000), mas as tabelas estão disponíveis somente para idades superiores a dois anos (Frisancho, 2008), o que o torna de pouca utilidade para crianças com Atresia Biliar (AB), uma doença que acomete amplamente lactentes.

1.2.2 Recomendação nutricional

A terapia nutricional é de importância fundamental para crianças e adolescentes cirróticos, pois não só poderá ter a capacidade de recuperar o estado nutricional e permitir que obtenham crescimento e desenvolvimento adequados para idade como poderá prevenir complicações comuns à doença (Young *et al.*, 2013).

O registro alimentar é uma ferramenta útil para avaliar como a criança se alimenta no que se refere a energia, macro e micronutrientes. Assim, tão logo uma criança ou adolescente seja classificado como “risco nutricional” e registro alimentar mostrar ingestão insuficiente deve-se iniciar o suporte nutricional que de acordo com Nightingale e Ng deve ser agressivo (Nightingale e Ng, 2009; Young *et al.*, 2013).

A Ingestão Dietética de Referência (DRI) compreende um conjunto de recomendações e limites superiores de ingestão diária que servem para planejar e avaliar a dieta de indivíduos saudáveis (Dri, 2002), entre as recomendações podemos ressaltar a Ingestão Dietética Recomendada (RDA) que refere-se ao nível de ingestão diária da grande maioria (97 a 98%) dos indivíduos saudáveis de um determinado grupo e de mesmo gênero e estágio de vida (Rda, 1989).

O requerimento energético estimado (EER) é obtido através de equações que consideram o gasto energético, a idade, o sexo, o peso, a estatura e o nível de atividade física. Este método tem demonstrado ser útil tanto na prática clínica como em pesquisa (Gerrior, Juan e Basiotis, 2006). As necessidades energéticas de crianças e adolescentes com cirrose podem variar entre 130 a 150% do EER recomendado para DRI e RDA (Young *et al.*, 2013).

1.3 CIRROSE

A cirrose é identificada anatomicamente como um processo hepático difuso com fibrose e formação nodular. Caracteriza-se por ser uma alteração crônica no parênquima

hepático, que modifica sua estrutura e funcionamento associada a alterações na circulação portal. Dentro das alterações, podemos mencionar a ativação das células estreladas, as quais começam a liberar colágeno modificando a matriz extracelular (Ismail e Pinzani, 2011). À medida que a hepatopatia avança, ocorre uma alteração progressiva da arquitetura hepática com compressão de estruturas vasculares, o que ocasiona oferta irregular de nutrientes, oxigênio e metabólitos a diversas partes do fígado (fig 2). Esta alteração retarda o processamento de nutrientes, hormônios, drogas e toxinas, além de dificultar a produção de proteínas e outras substâncias metabolicamente ativas (Bémeur e Butterworth, 2014). A cirrose é uma das principais consequências das doenças hepatobiliares crônicas e representa o estágio final de várias doenças como a AB (Hardy e Kleinman, 2007).

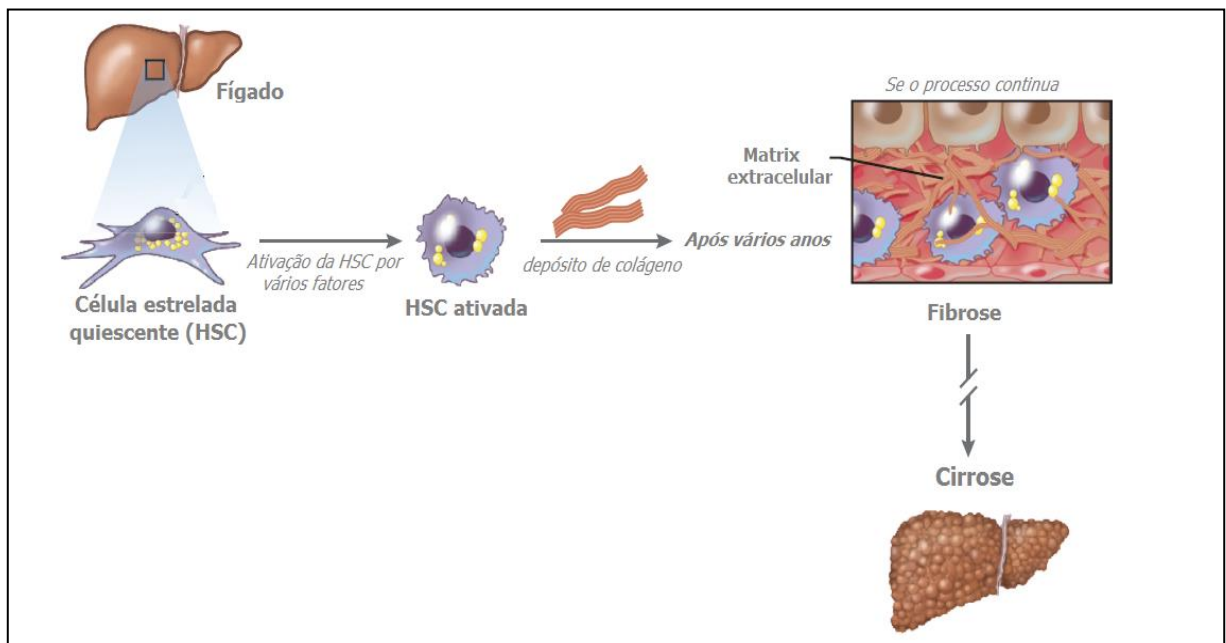


Figura 2 – Evolução do dano hepático para cirrose.

Fonte: Modificado de Ismail e Pinzani (Ismail e Pinzani, 2011).

Por muito tempo a cirrose foi considerada irreversível proporcionando tempo de vida limitado aos pacientes. Pode-se dizer que, atualmente este conceito mudou. Do ponto de vista patológico pode ser considerada uma enfermidade dinâmica com potencial de regressão a

partir da eliminação da causa (Ex: Hepatite por vírus B e C) (D'ambrosio *et al.*, 2012; Marcellin *et al.*, 2013). A cirrose resulta de grande número de doenças, em geral de longa duração, mas as causas variam dependendo de outros fatores tais como a idade e a prevalência de doenças em determinadas regiões. Apesar do grande número de entidades patológicas que podem evoluir para cirrose, muitas vezes não é possível definir a causa, sendo nestes casos, considerada “criptogênica”.

O fator etiológico mais preponderante de cirrose na faixa pediátrica é a AB e corresponde a causa mais comum de transplante hepático pediátrico. O transplante hepático é a única opção terapêutica efetiva para a cirrose (Sokol *et al.*, 2007), no entanto, algumas terapias medicamentosas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de reverter ou deter a progressão desse processo (Schuppan e Afdhal, 2008).

Para classificação da gravidade da cirrose o escore de Child-Pugh é amplamente utilizado na prática clínica. Sua aplicação é simples e baseia-se na soma de pontos obtidos após a avaliação de aspectos clínicos e laboratoriais (quadro 1). Considera-se doença de intensidade leve (Child-Pugh A) quando a soma de pontos é inferior a seis; de intensidade moderada (Child-Pugh B) quando a soma encontra-se entre sete e nove, e grave (Child-Pugh C) quando for superior a nove (Pugh *et al.*, 1973).

Quadro 1 – Classificação da gravidade da cirrose de acordo com o escore Child-Pugh

Avaliação clínica e bioquímica	Somar 01 ponto	Somar 02 pontos	Somar 03 pontos
Encefalopatia (grau)	Ausente	Discreta	Moderada/Grave
Ascite	Ausente	Discreta	Moderada/Grave
Bilirrubina (mg/dl)	1 – 2	2 – 3	> 3
Albumina (g/dl)	> 3,5	2,8 - 3,5	< 2,8
Prolongamento do tempo de protrombina (segundos)	1 – 4	4 – 6	> 6

Child-Pugh A (leve) < 6; Child-Pugh B (moderada) 7 – 9; Child-Pugh C (grave) > 9.

O *Model for End-stage Liver Disease* escore (MELD) foi desenvolvido para acompanhar o prognóstico de pacientes adultos que foram submetidos a anastomose portossistêmica intra-hepática transjugular. O cálculo é baseado nos valores de creatinina, bilirrubina e índice internacional normalizado (INR) e posteriormente foi aplicado em pacientes pré-transplante hepático demonstrando acurácia como preditor de mortalidade durante a permanência em lista de espera (Dooley *et al.*, 2011). Hoje em dia o MELD é amplamente utilizado como critério para alocação de fígado em pacientes a partir de 12 anos de idade. A equação para o cálculo do MELD está representada no quadro dois. Este modelo utiliza uma escala numérica cujos escores variam de seis a 40, quanto mais alto o escore, mais grave está a doença (Unos, 2005).

Quadro 2 – Equação para o escore MELD

$$\text{MELD} = 0,957 \times \text{Log} (\text{creatinina mg/dl}) + 0,378 \times \text{Log} (\text{bilirrubina total mg/dl}) \\ + 1,120 \times \text{Log} (\text{INR}) + 0,643$$

MELD: Model for End-stage Liver Disease. **INR:** International Normalized Ratio. **Log:** Logarítimo.
Fonte: (Unos, 2005)

O *Pediatric End-stage Liver Disease* escore (PELD) foi produzido como modelo específico para pacientes com doença hepática crônica até os 12 anos de idade. A equação para o cálculo do PELD está demonstrada no quadro três. Da mesma maneira que o MELD, quanto mais alto o valor mais grave está a doença.

Quadro 3 – Equação para o escore PELD

$$\text{PELD} = 0,48 \times \text{Log} (\text{bilirrubina total mg/dl}) + 1,857 \times \text{Log} (\text{INR}) - 0,687 \times \text{Log} (\text{albumina g/dl}) \\ + 0,436 (\text{paciente} < 12 \text{ meses. Caso o paciente houver sido incluído em lista de transplante} \\ \text{antes de 12 meses, este valor continua no cálculo até que ele alcance 24 meses de idade}). \\ + 0,667 (\text{se o paciente estiver abaixo de } - 2,00 \text{ DP do escore-z do P/I ou E/I})$$

PELD: Pediatric End-stage Liver Disease. **INR:** International Normalized Ratio. **Log:** Logarítimo.
DP: Desvio padrão. **P/I:** Peso para idade. **E/I:** Estatura para idade. **Fonte:** (Unos, 2005).

1.3.1 Atresia Biliar e sua evolução

A AB é uma colangiopatia inflamatória progressiva da infância que ocorre nas primeiras semanas de vida e se constitui em obstrução completa dos ductos que carregam a bile do fígado para o intestino (Mack e Sokol, 2005; Carvalho *et al.*, 2010). Há, com o passar do tempo, repercussão do processo destrutivo dos ductos biliares extra-hepáticos para os ductos biliares intra-hepáticos. Hipertensão porta e cirrose biliar secundária costumam ocorrer precocemente, e aos dois ou três meses de idade já podem estar presentes (Pinto, Schneider e Da Silveira, 2015).

Existem duas formas já identificadas de AB: a forma congênita ou fetal que corresponde de 10-20% dos casos e a forma perinatal ou adquirida que corresponde a 80-90%. Os recém-nascidos com AB fetal geralmente desenvolvem icterícia no nascimento e 15-30% dos pacientes apresentam envolvimento de anormalidades extra-hepáticas. Na forma adquirida a icterícia se desenvolve, geralmente, após o período de hiperbilirrubinemia fisiológica do recém-nascido e anormalidades congênicas são raras. O tratamento da AB é o reestabelecimento do fluxo biliar através de anastomose do intestino ao *porta hepatis*, conhecida como cirurgia de Kasai ou portoenterostomia (Kasai, 1983). Para o sucesso do tratamento cirúrgico, um ponto fundamental é a idade do paciente.

A drenagem biliar satisfatória é observada em até 80% daqueles submetidos a portoenterostomia precocemente (idade < 2 meses), enquanto essa taxa situa-se entre 10 a 20% nos lactentes operados com 4 meses de idade (Carvalho *et al.*, 2010). A restauração do fluxo biliar ocorre em proporção inversa à idade com a qual os pacientes são submetidos à cirurgia. Os pacientes não operados geralmente não sobrevivem além dos 18 – 24 meses. No entanto, mesmo após a realização da cirurgia a inflamação e a lesão hepática podem progredir levando a hipertensão portal e cirrose biliar secundária. A análise de tecido hepático pós portoenterostomia de pacientes com AB maiores de quatro anos de idade revelou que, apesar

de 83% dos pacientes não manifestarem mais icterícia, 100% destes apresentavam fibrose (Metavir > 2) ou cirrose (Lampela *et al.*, 2014). Em torno de 70 - 80% dos pacientes pós portoenterostomia serão candidatos a transplante hepático.

1.3.2 Cirrose e inflamação

No decorrer do processo de cirrose fenômenos patológicos ocorrem, tais como: anormalidades na microbiota e barreira intestinais e endotoxemia (Porowski *et al.*, 2015). Após o reconhecimento de produtos bacterianos pelos receptores CD14 dos monócitos, as citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a Interleucina-6 (IL-6) são liberadas na corrente sanguínea e participam ativamente da resposta contra a infecção. No entanto, a produção excessiva de TNF- α e IL-1b pode provocar “tormenta de citocinas”, e as concentrações plasmáticas elevadas de TNF- α , IL-1b e IL-6 estão associadas com taxas elevadas de mortalidade (Borrelli *et al.*, 1996) (fig 3).

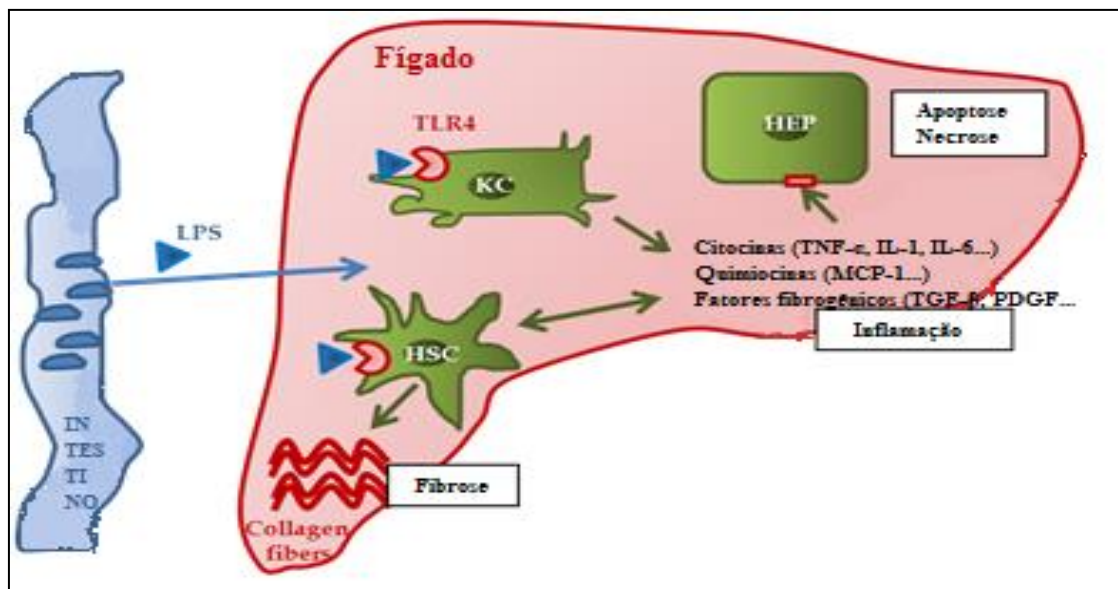


Figura 3 - Envolvimento de endotoxinas na formação de fibrose

As células de Kupffer são essenciais na resposta imune à endotoxina LPS via TLR4 que leva a produção de mediadores de inflamação, quimiocinas e fatores fibrogênicos que ativarão as células estreladas para produção de matriz extracelular (fibras de colágeno). **HEP**: Hepatócitos; **HSC**: Células estreladas; **KC**: Células de Kupffer; **LPS**: Lipopolissacarídeo; **TLR4**: receptor tipo toll 4; **TNF- α** : fator de necrose tumoral alfa; **IL-1**: interleucina 1; **IL-6**: Interleucina-6; **MCP1**: Proteína quimiotática de monócitos 1; **TGF- β** : Fator de transformação de crescimento beta; **PDGF**: Fator de crescimento derivado de plaquetas. Fonte: Modificado de Sergent *et al.* (Sergent e Lagadic-Gossman, 2012).

A Interleucina-10 (IL-10) é produzida por vários tipos de células: hepatócitos, células de Kupffer, células endoteliais sinusoidais, células estreladas e linfócitos (Wan *et al.*, 1997). Os níveis aumentam após a inflamação do fígado em diferentes condições, e está associada com certas funções protetoras durante a lesão hepática (Hammerich e Tacke, 2014). De acordo com Nelson e colaboradores, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória com efeito protetor também contra a fibrogênese hepática (Nelson *et al.*, 2000).

Girón-González e colaboradores demonstraram que a ativação do estado de inflamação crônica está presente em pacientes mesmo no estágio inicial de cirrose e que os efeitos das citocinas pró-inflamatórias poderia influenciar a história natural da cirrose, com maiores níveis séricos destas moléculas indicando um pior prognóstico. Neste trabalho os autores avaliaram os níveis séricos de TNF- α , de seus receptores solúveis I e II e de IL-6 em pacientes cirróticos, e encontraram níveis aumentados quando comparadas com os controles (Girón-González *et al.*, 2004).

1.4 MOLECULAS DE SINALIZAÇÃO E SUA INFLUÊNCIA NO ESTADO NUTRICIONAL

Estudos recentes demonstram que o estado nutricional é influenciado por moléculas de sinalização tais como as citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, neurotrofinas entre outras. (Braun e Marks, 2010; Grossberg, Scarlett e Marks, 2010; Mehta *et al.*, 2013).

Este trabalho tem foco no estudo de moléculas que participam da inflamação (IL-6, TNF- α e IL-10) e no fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que tem sido amplamente estudado por seu papel na homeostase energética (Rios, 2013).

1.4.1 Interleucina-6

A IL-6 é uma citocina com múltiplas funções que incluem a proliferação celular, sobrevivência, diferenciação e melhora da função celular em várias linhagens de células. Está

implicada na patogênese de processos patológicos associados à inflamação, alteração de imunidade, tumores, doenças neurológicas, entre outras (Hirano, Nakajima e Hibi, 1997; Hirano, Ishihara e Hibi, 2000; Kojima *et al.*, 2013). A IL-6 é um mediador chave na resposta de fase aguda e tem um papel central na restauração da função hepática normal após injúria (Taub, 2004; Michalopoulos, 2007).

Os níveis plasmáticos de IL-6 estão aumentados na Diabetes tipo 2 e correlacionam-se positivamente com IMC e com a concentração de ácidos graxos livres (Lazar, 2005). Aproximadamente um terço da IL-6 plasmática é atribuído a produção oriunda do tecido adiposo branco (Mohamed-Ali *et al.*, 1997). Acredita-se que após uma injúria hepática as células hepáticas imunes (células de Kupffer) produzam IL-6 para estimular a liberação de proteínas de fase aguda (Fig 4). Estas células são consideradas as produtoras hepáticas exclusivas de IL-6 que subsequentemente sinaliza os hepatócitos para liberar proteínas de fase aguda como auxílio ao dano hepático (Taub, 2004).

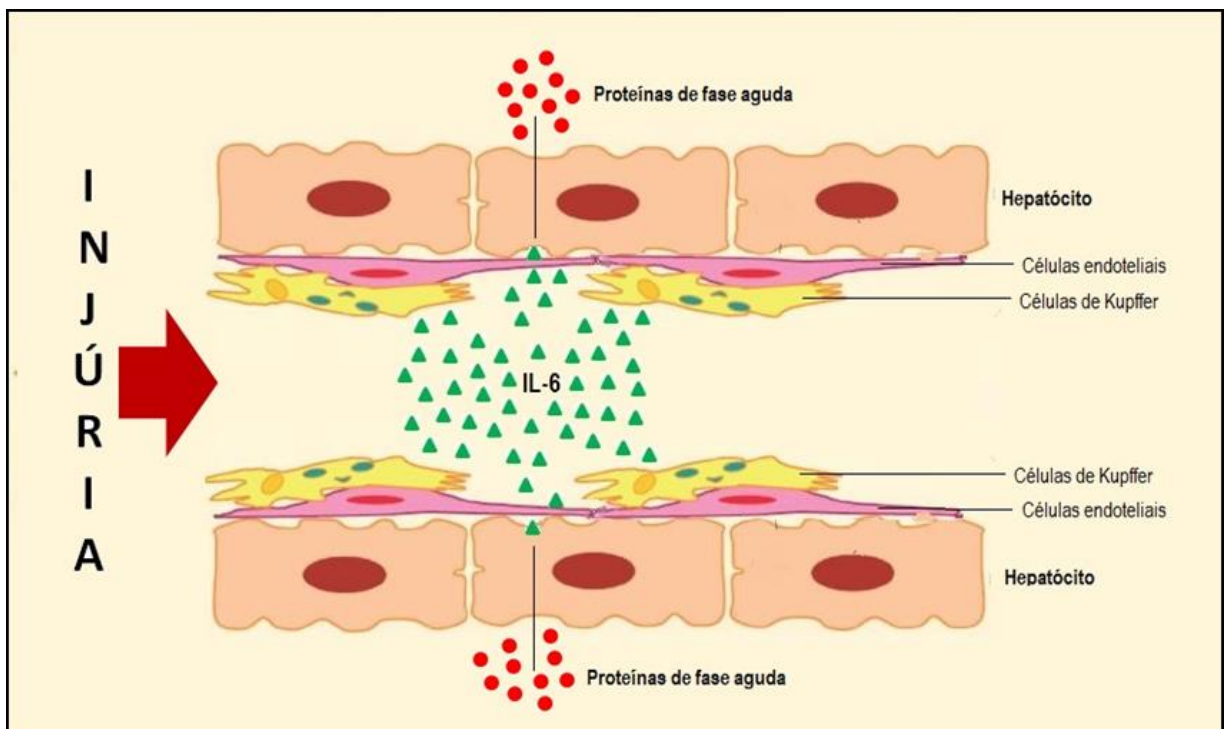


Figura 4 – Produção de IL-6 no fígado.

Após injúria hepática as células de Kupffer produzem IL-6 que estimula os hepatócitos a liberar proteínas de fase aguda para ajudar a reparar o dano hepático.

A ativação de IL-6 parece diminuir o apetite e consumo alimentar, aumentar a degradação muscular e participar do estado hipermetabólico em pacientes com câncer (Pfitzenmaier *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). O entendimento dos mecanismos patológicos que determinam a anorexia e perda muscular pode levar a novas formas de manejo da caquexia (Amitani *et al.*, 2013). Em pacientes com câncer, as citocinas inflamatórias induzem a degradação muscular mesmo quando há nutrição adequada. Assim, Onesti e Guttridge sugerem que a IL-6 é um importante contribuinte para a perda de massa muscular (Onesti e Guttridge, 2014). Em estudo recente do nosso grupo, foi demonstrada uma associação estatisticamente significativa entre o aumento da IL-6 e risco nutricional em pacientes pediátricos com hepatopatias crônicas de diversas causas (Santetti *et al.*, 2015).

O estado inflamatório contínuo que ocorre na cirrose promove respostas imunes adaptativas que alteram o padrão da sinalização das citocinas desencadeando a fibrose hepática (Fuster *et al.*, 2013; Fielding *et al.*, 2014). A IL-6 já demonstrou estar correlacionada com parâmetros laboratoriais e com a gravidade clínica em doenças hepáticas (Wunsch *et al.*, 2013).

1.4.2 Fator de necrose tumoral alfa

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória envolvida na resposta imune inata (Clark, 2007) e participa do controle da plasticidade e transmissão sináptica no SNC saudável modulando o tráfego de receptores ionotrópicos do glutamato (Olmos e Lladó, 2014). Em pacientes com cirrose, já foi descrita uma correlação significativa do TNF- α e seus receptores com o metabolismo energético anormal sugerindo que a ativação deste sistema contribui para a síndrome da anorexia-caquexia apresentada por estes pacientes (Shiraki *et al.*, 2010). O TNF- α é capaz de diminuir o apetite e, por conseguinte, o consumo de nutrientes. Assim,

pode-se dizer que esta citocina não é somente uma indutora do hipermetabolismo em pacientes com cirrose, mas também uma mediadora da anorexia (Plauth e Schütz, 2002).

No que se refere ao processo de fibrose hepática, as células de Kupffer ao sofrerem injúria crônica produzem aumento da atividade do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) com subsequente secreção de TNF- α que provoca a ativação das células estreladas. Essas células respondem a estes estímulos ampliando a resposta de fase aguda e ativando macrófagos (Lee e Friedman, 2011). O TNF- α pode ser considerado uma citocina indutora de diversos efeitos biológicos, tais como, proliferação celular, ativação metabólica, resposta inflamatória e morte celular (necrose ou apoptose) (Liedtke e Trautwein, 2012) e, por conseguinte, ser mediador da falência hepática.

Beutler e colaboradores foram os primeiros autores a descrever a relação entre TNF- α e caquexia (Beutler, Milsark e Cerami, 1985; Beutler e Cerami, 1988), estudos subsequentes demonstraram que animais tratados com TNF- α ou expostos a intervenções que aumentaram a taxa de TNF- α (ex: sepse, implante de tumor) perderam peso, massa muscular e apresentaram fraqueza muscular (Nawroth *et al.*, 1986; Beutler e Cerami, 1988). No trabalho já citado de Santetti e colaboradores os níveis de TNF- α não apresentaram associação estatisticamente significativa com o estado nutricional (Santetti *et al.*, 2015). Argiles e colaboradores, demonstraram que única administração de TNF- α em animais não causa caquexia. No entanto, doses repetidas têm efeito indutor inicial, mas o organismo desenvolve tolerância à citocina e os animais voltam a se alimentarem normalmente. Assim, para que o efeito da caquexia se mantenha são necessárias doses progressivamente maiores de TNF- α (Argilés *et al.*, 2005). Aceita-se então, que o TNF- α é capaz de diminuir o apetite e, por conseguinte o consumo alimentar. Pode-se dizer, portanto, que é uma citocina que impulsiona o hipermetabolismo e media a anorexia.

1.4.3 Interleucina-10

É reconhecido que a IL-10 possui propriedades anti-inflamatórias (Swiątek, 2012). Esta citocina é produzida por vários tipos de células e tem múltiplas funções imunoregulatórias (Shin *et al.*, 2003) resultando na supressão de respostas imunes e de atividades estimulatórias (Sabat *et al.*, 2010). Mas, tanto a deficiência como a superprodução de IL-10 podem desencadear lesões, ou seja, níveis baixos desta citocina podem resultar em aumento da atividade inflamatória e níveis elevados podem resultar em maior susceptibilidade a infecções virais ou câncer. Em muitas doenças ocorre uma disregulação imunológica resultante da variação dos níveis de IL-10 que estão associados ao polimorfismo desta citocina (Swiątek, 2012). Alguns autores já demonstraram que a associação entre alguns polimorfismos da IL-10 e níveis elevados desta citocinas podem ser desfavoráveis para o tratamento de pacientes com hepatite C (Shin *et al.*, 2003; Rigopoulou *et al.*, 2005). Monk e colaboradores (Monk e Woodward, 2009) estudaram camundongos desnutridos após desmame e encontraram níveis elevados de IL-10. Em publicação mais recente, Monk e colaboradores (Monk *et al.*, 2011), ao estudar a evolução do peso em camundongos após o desmame alimentados com diferentes dietas sugerem que a concentração elevada de IL-10 é dependente do metabolismo alterado que acompanha o déficit nutricional.

1.4.4 Fator neurotrófico derivado do cérebro

O BDNF é um membro da família das neurotrofinas (Cordeira e Rios, 2011). Esta neurotrofina está envolvida no crescimento, diferenciação, maturação, sobrevivência, plasticidade sináptica, aumento da neurotransmissão e regulação da sensibilidade de receptores dos neurônios. O BDNF exerce papéis significativos no sistema nervoso periférico (SNP) e no SNC. Além de efeitos diretamente nos neurônios executa funções essenciais para

a manutenção de processos comportamentais normais (Mcallister, 2001; Numakawa *et al.*, 2010).

A expressão de BDNF é, na maioria, confinada a neurônios e são poucas as áreas cerebrais nas quais não é detectado. Contudo, vários estudos demonstraram que o BDNF está também expresso em tecidos não neurogênicos tais como músculo esquelético (Kawamura *et al.*, 2005; Matthews *et al.*, 2009), ovário (Kawamura *et al.*, 2005), brônquios (Ricci *et al.*, 2004), entre outros (Yamamoto *et al.*, 1996).

Nos últimos anos as pesquisas identificaram sítios de ação do BDNF que regulam o balanço energético: o complexo vagal dorsal, o núcleo paraventricular, o núcleo ventromedial, a área ventral tegmental, a amígdala e, possivelmente, o hipocampo. Lapchak e Hefti

(Lapchak e Hefti, 1992; Yamamoto *et al.*, 1996) observaram que a administração intracerebroventricular crônica de BDNF preveniu o ganho de peso em ratos adultos. Na mesma linha de estudos, outros experimentos em modelo murino demonstraram participação do BDNF na homeostase energética (Wang, Bomberg, *et al.*, 2010; Wang, Godar, *et al.*, 2010). Cordeira e colaboradores (Cordeira *et al.*, 2010) demonstraram um envolvimento do BDNF na regulação do circuito neural que motiva comportamentos alimentares de busca-recompensa que inclui o consumo de alimentos palatáveis e já está bem estabelecido por seu papel na drogadição.

Outras evidências demonstram o papel do BDNF no balanço energético, uma vez que animais com expressão reduzida de BDNF desenvolvem hiperfagia, obesidade e resistência à insulina e leptina (Kernie, Liebl e Parada, 2000; Rios, 2014). Nonomura e colaboradores (Nonomura *et al.*, 2001) observaram que o BDNF intracerebroventricular independente da dose diminui a glicose sanguínea e aumenta o conteúdo de insulina pancreática em camundongos deficientes do receptor de leptina e isso é independente da ingestão alimentar. Assim, parece que o BDNF central melhora o gasto energético via Sistema Nervoso Simpático e aumenta a glicose em roedores obesos e diabéticos. Deve-se observar que o BDNF não afeta a glicemia sanguínea em ratos normoglicêmicos (Pelleymounter, Cullen e Wellman, 1995). O BDNF pode ter um papel no balanço energético e no controle da glicose (Mcnay *et al.*, 2012). É como se o BDNF alterasse a atividade relacionada ao consumo alimentar que em resposta regulasse a homeostase energética (Jo e Chua, 2013).

Conforme o exposto, as citocinas inflamatórias e o BDNF desempenham papel no controle do peso corporal e fazem parte deste delicado equilíbrio que é regulado pelo sistema homeostase energética. Assim, é factível que as moléculas de sinalização possam colaborar na avaliação nutricional de pacientes pediátricos com cirrose.

2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A avaliação do estado nutricional nos pacientes pediátricos com cirrose é de fundamental importância, uma vez que muitos apresentam desnutrição com deficiência de macro e micro nutrientes. Sabe-se que boas condições nutricionais diminuem as complicações na evolução da doença e facilitam a recuperação no pós-transplante hepático (Tsiaousi *et al.*, 2008). Entretanto, a avaliação do estado nutricional é dificultada pela presença de edema e/ou ascite e organomegalias e distorção dos exames clínicos (O'brien e Williams, 2008). Já foi demonstrado existir relação entre a IL-6, o TNF- α , a IL-10 e o BDNF com o estado nutricional. A *American Society for Parenteral & Enteral Nutrition (ASPEN)* sugere o uso de biomarcadores inflamatórios para avaliação de pacientes pediátricos com doenças crônicas (Mehta *et al.*, 2013). Este estudo se justifica pela necessidade de avaliar estas substâncias como possíveis biomarcadores que possam auxiliar a avaliação nutricional do paciente com cirrose.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar moléculas sinalizadoras como biomarcadores coadjuvantes para avaliar o estado nutricional de criança e adolescentes com cirrose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Avaliar o estado nutricional de crianças e adolescentes com cirrose e comparar os resultados em dois momentos distintos.
- 3.2.2 Investigar e expressão de IL-6, o TNF- α , a IL-10 e sua associação com a gravidade da cirrose o estado nutricional em pacientes pediátricos com AB.
- 3.2.3 Estudar a expressão de BDNF e sua associação com a gravidade da cirrose e o estado nutricional em pacientes pediátricos com AB.

4 HIPÓTESE

4 HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que a IL-6, o TNF- α , a IL-10 e o BDNF possam ser biomarcadores que auxiliem a avaliação do estado nutricional em pacientes com cirrose por AB.

5 PACIENTES E MÉTODOS

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO

Foi realizado um estudo transversal.

5.2 AMOSTRA

Foram utilizados dados de quatro bancos, de amostras já coletadas, de pesquisas clinico-epidemiológicas conduzidas com crianças e adolescentes no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA):

n° 03-395 “Avaliação de zinco plasmático em crianças e adolescentes com cirrose” (Schneider, 2006).

n° 06-457 “Comparação de Grelina, Leptina, Insulina e Glicose entre Crianças e Adolescentes Cirróticos e Hígidos” (Dornelles, 2010).

n° 11-0078 “Perfil Inflamatório e Estado Nutricional de Crianças e Adolescentes com Hepatopatia Crônica” (Santetti, 2013).

n° 06-458 “Concentração de Grelina, Leptina, Insulina e Glicose em Crianças Eutróficas Previamente Hígidas”, utilizado como grupo controle (Wilasco, 2010).

Os critérios de inclusão e exclusão do projeto 03-395 estão listados a seguir.

Critérios de inclusão:

- Idade entre três meses e 18 anos.
- Diagnóstico de cirrose obtido por histopatologia, ou na ausência desta, por exames laboratoriais, endoscópicos e/ou ultrassonográficos.

Critérios de exclusão:

- Suplementação de zinco ou cobre.
- Uso de anticoncepcional.
- Uso de lactulose.
- Gestante ou nutriz.
- Transfundidos que receberam hemoderivados até 30 dias da coleta.
- Presença de infecção ativa.
- Uso de antibiótico.
- Doença de Wilson.

Os critérios de inclusão e exclusão do projeto 06.457 estão listados a seguir.

Critérios de inclusão:

- Crianças e adolescentes de dois meses a 15 anos de idade.
- Cirrose confirmada através de histopatologia, ou na ausência desta, por exames laboratoriais, endoscópicos e/ou ultrassonográficos.

Critérios de exclusão:

- Concomitância de outras doenças crônicas (Ex: asma, diabetes, hipotireoidismo, etc.).
- Cirrose pós-transplante hepático.

- Infecção aguda ou febre de qualquer natureza no momento da coleta de sangue.
- Uso de antibiótico até 15 dias antes da coleta.
- Prematuridade.
- Uso de corticoide.

Os critérios de inclusão e exclusão do projeto 11-0078 estão listados a seguir.

Critérios de inclusão:

- Crianças e adolescentes de zero a 19 anos de idade.
- Diagnóstico de hepatopatia com e sem cirrose obtido através de histopatologia, ou na ausência desta, por exames laboratoriais, endoscópicos e/ou ultrassonográficos.

Critérios de exclusão:

- Concomitância de outras doenças crônicas (Ex: asma, diabetes, hipotireoidismo, etc.).
- Erros inatos do metabolismo.
- Infecção aguda ou febre de qualquer natureza no momento da coleta de sangue.
- Uso de antibiótico até 15 dias antes da coleta.

Os critérios de inclusão e exclusão do projeto 06.458 estão listados a seguir.

Critérios de inclusão:

- Crianças eutróficas e híginas com coleta de sangue programada para realização de pequenos procedimentos cirúrgicos ou revisões de saúde.

Critérios de exclusão:

- Prematuridade.

- Uso de medicação, à excessão de sulfato ferroso e polivitamínico em doses profiláticas.
- Dieta para perda de peso nos últimos 30 dias.
- Processo infeccioso nos últimos sete dias.
- Impossibilidade de realização de avaliação antropométrica.

Para o primeiro artigo desta tese foram utilizados os bancos *03-395 e 11-0078*. Dos pacientes alocados para estas pesquisas foram excluídos os que não apresentavam cirrose, os que tinham cirrose de etiologia autoimune e participação simultânea do mesmo paciente nos dois bancos de dados (exclusão de um dos bancos de dados).

Para o segundo e o terceiro artigo foram utilizados os bancos *06-457, 11-0078 e 06-458*. Nestes artigos, para os dois primeiros bancos foram aplicados os seguintes critérios de exclusão: causa da cirrose diferente de AB e participação simultânea do mesmo paciente nos dois bancos de dados (exclusão de um dos bancos de dados).

Foi realizada uma busca no terceiro banco de dados para realizar o pareamento por sexo e idade. Admitiu-se uma variação percentual de no máximo 20% entre as idades dos cirróticos e controles. Para o cálculo da variação percentual utilizou-se a seguinte fórmula: $((Ico - Ici) \div Ici \times 100)$, onde Ico é a idade do controle e Ici é a idade do cirrótico. Ao final do pareamento ficaram 33 controles pareados por sexo e idade (APÊNDICE 1).

Todos os participantes e seus responsáveis, arrolados nos três bancos de dados, possuíam assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) onde constava que o sangue poderia ser armazenado por até cinco anos e pesquisas poderiam ser realizadas após aprovação do comitê de ética do Hospital (ANEXOS 1, 2, 3). Todas as amostras de soro estavam armazenadas a -80°C .

O banco de dados final ficou constituído por 53 cirróticos por AB e 33 controles pareados por sexo e idade. A figura 5 mostra a logística da unificação dos bancos de dados.

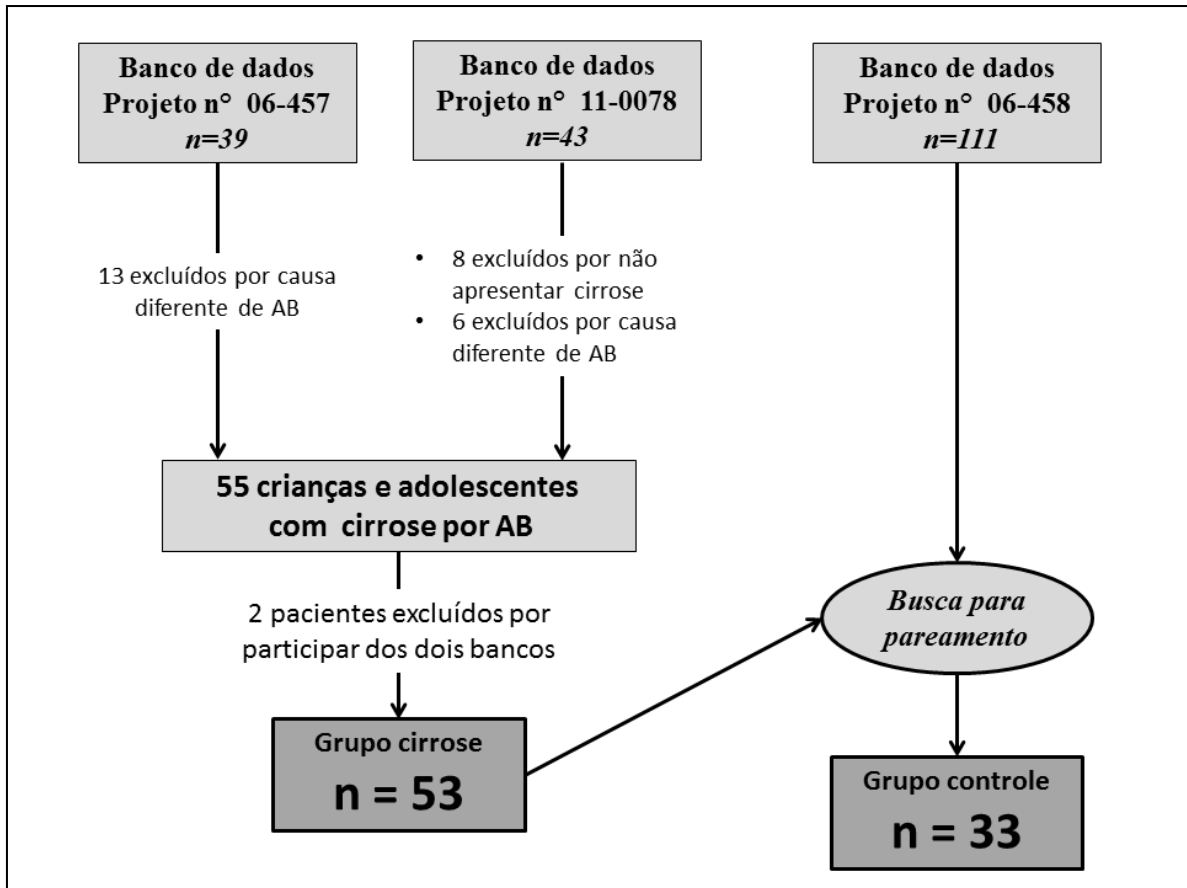


Figura 5 – Logística da unificação dos bancos de dados
AB: Atresia Biliar

5.3 VARIÁVEIS ESTUDADAS

Idade: em meses e anos.

Gênero: masculino ou feminino.

Exames laboratoriais: Aspartato aminotransferase (AST) (U/L), alanina aminotransferase (ALT) (U/L), fosfatase alcalina (FA) (U/L), gama glutamil transpeptidase GGT (U/L), bilirrubina total (BT) (mg/dL), bilirrubina direta (BD) (mg/dL), creatinina (mg/dL), albumina (g/dL), hemoglobina (g/dl) e hematócrito (%).

Parâmetros antropométricos: E/I (escore-z), IMC/I (escore-z), CB/I (escore-z), DCT/I (escore-z).

Moléculas de sinalização: IL-6 (pg/mL), TNF- α (pg/mL), IL-10 (pg/mL), BDNF (pg/mL).

- Classificação nutricional do grupo cirrose: E/I, DCT/I e CB/I.

- Classificação nutricional do grupo controle: E/I, IMC/I, DCT/I e CB/I.
- **Gravidade da cirrose:** Child-Pugh, MELD, PELD.
- **Cálculo nutricional:** Calorias por dia, calorias por quilograma, percentual de calorias do EER e gramas de proteínas por quilograma.

5.4 CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA CIRROSE

Os pacientes foram classificados utilizando o score de Child-Pugh e MELD e PELD para a gravidade da cirrose. Este score tem os seguintes parâmetros

Child-Pugh A (doença leve) – soma de pontos < 6

Child-Pugh B (doença moderada) – soma de pontos ≥ 6 e ≤ 9

Child-Pugh C (doença grave) – soma de pontos > 9

PELD e MELD – Foi considerado o ponto de corte de 15 para a gravidade moderada a grave em ambos os modelos (Unos, 2014).

5.5 CLASSIFICAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

Para classificação do estado nutricional foi utilizado o sistema de escore-z de acordo com WHO Standards (Who, 2006) e Reference (Who, 2007). Para calcular os dados de antropometria entre as crianças até cinco anos de idade foi utilizado o programa WHO Anthro software, version 3.0 (Who, 2009a) enquanto que entre as crianças maiores de cinco anos e os adolescentes, os dados foram calculados no WHO AnthroPlus software (Who, 2009b). Os valores de dobras cutâneas e circunferência do braço foram classificados através do programa Frisancho Anthropometric Standards (Frisancho, 2008).

5.5.1 Grupo cirrose

Para a classificação nutricional do grupo cirrose foi utilizado os parâmetros antropométricos E/I e DCT/I e confirmadas pela CB/I. Quando houve discrepância entre os

dois parâmetros utilizados para a classificação de desnutrição (E/I e DCT/I) utilizou-se o índice que apresentava valor inferior. As figuras 6 e 7 mostram os diagramas utilizados para a classificação nutricional do grupo cirrose estratificados por idade. Os valores seguem as referências recomendadas pela OMS.

5.5.2 Grupo controle

A classificação nutricional dos controles foi realizada com base nos parâmetros E/I e IMC/I e confirmada pelos parâmetros CB/I e DCT/I. A figura 8 mostra o diagrama utilizado para a classificação nutricional dos controles. Os valores seguem as referências recomendadas pela OMS.

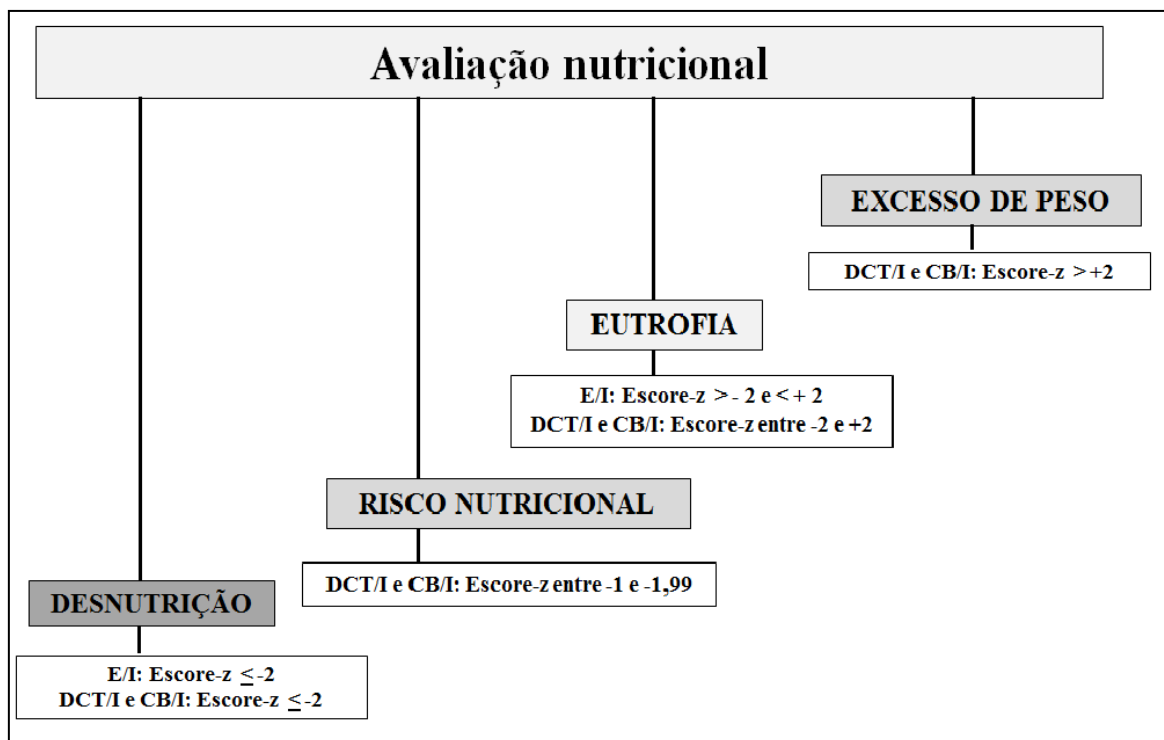


Figura 6 – Diagrama para classificação nutricional do grupo cirrose até cinco anos de idade. E/I: estatura para idade; CB/I: circunferência do braço para idade; DCT/I: dobra cutânea triceptal para idade.

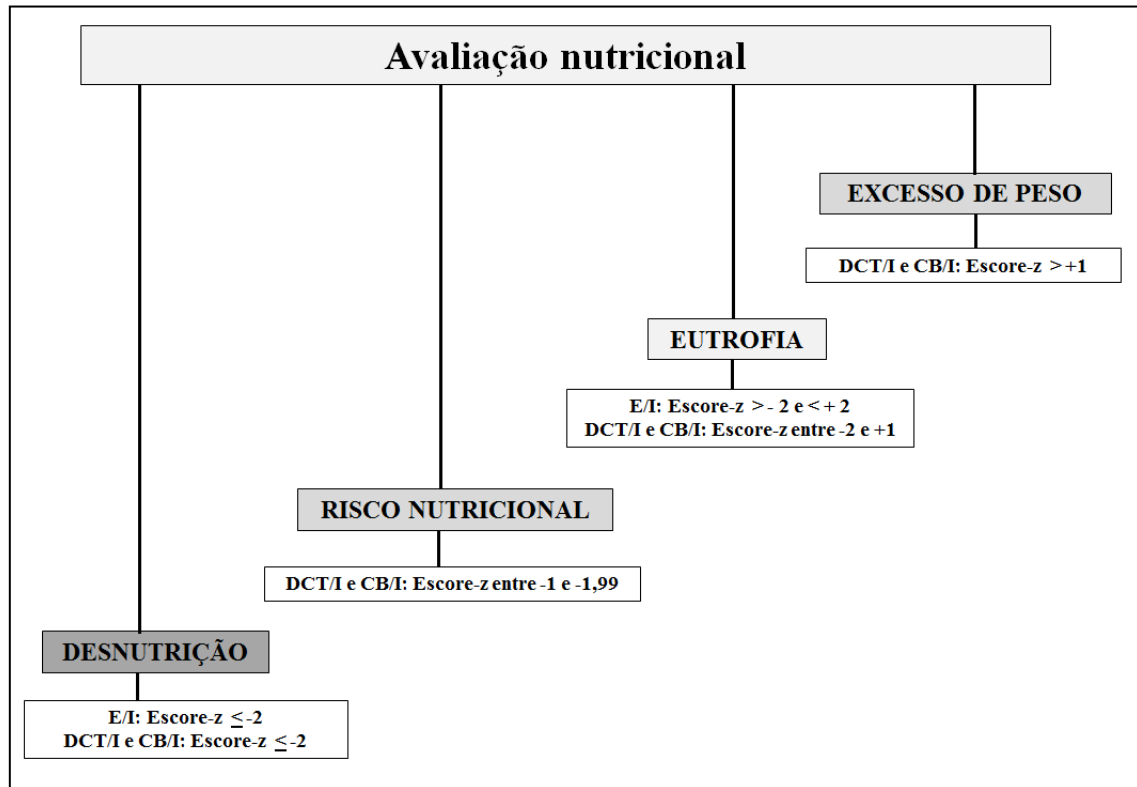


Figura 7 - Diagrama para classificação nutricional do grupo cirrose com mais de cinco anos de idade. E/I: estatura para idade; CB/I: circunferência do braço para idade; DCT/I: dobra cutânea triptical para idade.

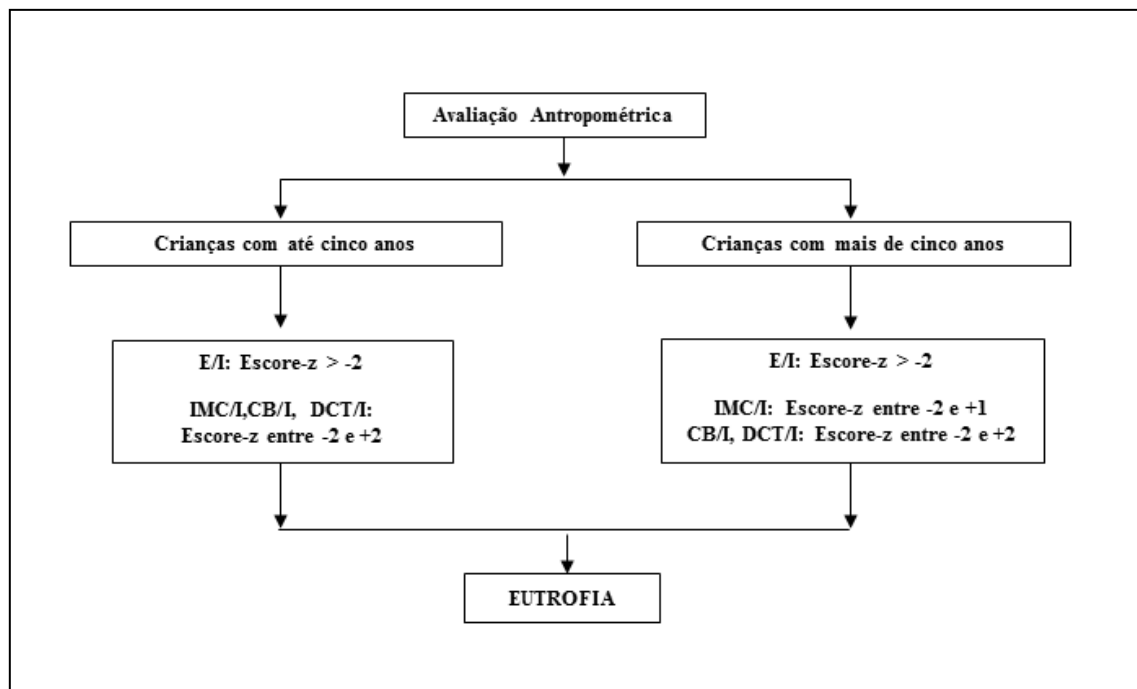


Figura 8 – Diagrama para classificação nutricional do grupo controle.

E/I: estatura para idade; IMC/I: índice de massa corporal para idade; CB/I: circunferência do braço para idade; DCT/I: dobra cutânea triptical para idade.

5.6 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

Todos os participantes do grupo cirrose possuíam registro alimentar preenchido por três dias, sendo dois dias da semana não consecutivos e um dia do fim de semana. O cálculo nutricional do registro alimentar foi realizado no programa Nutwin – Sistema de Apoio à Decisão em Nutrição da Escola Paulista de Medicina (versão 2.5). Após o cálculo foi feita uma média aritmética dos valores encontrados nos três dias. As quantidades dos nutrientes foram expressas em valores brutos (g/dia), em gramas por quilograma de peso corporal ou percentual da recomendação dietética. O EER foi utilizado para comparar o consumo alimentar levando em conta a idade, o peso e a estatura como é o recomendado pela DRI e pela RDA (Rda, 1989; Dri, 2002). Anorexia foi definida quando a ingestão diária foi inferior a 80% do EER (Dornelles *et al.*, 2013). Para uma análise mais rigorosa dos dados nutricionais os pacientes do grupo cirrose foram divididos em quatro faixas etárias: 0-24, 25-60, 61-120 e maiores que 120 meses.

As crianças e adolescentes que foram recrutadas para o grupo controle eram pacientes que pertenciam a vários ambulatórios e, portanto, não tinham vínculo com a equipe de Gastroenterologia e Hepatologia Pediátrica. Assim, não foi possível solicitar registro alimentar para estes pacientes que eram avaliados em uma única consulta.

5.7 EXAMES LABORATORIAIS

Os exames clínicos foram realizados durante a rotina assistencial do ambulatório de gastroenterologia pediátrica do HCPA. No grupo cirrose foram avaliados os seguintes exames: AST, ALT, FA, GGT, TP, INR, albumina, hemoglobina, hematócrito bilirrubinas e creatinina. No grupo controle, como já tinham sido selecionadas crianças e adolescentes sem doença previa, foi avaliado apenas o hemograma para verificar se o paciente não apresentava anemia.

5.8 ANÁLISE DAS CITOCINAS E BDNF

As análises das citocinas e do BDNF foram realizadas no Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia e no Laboratório de Psiquiatria Molecular, ambos do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todas as citocinas foram quantificadas por citometria de fluxo e o BDNF por ELISA. Seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante.

IL-6 (pg/ml): Foi utilizado o kit *Cytometric Bead Assay Human IL-6 Flex Set (Bead A7)* (BD Biosciences, EUA).

TNF- α (pg/ml): Foi utilizado o kit *Cytometric Bead Assay Human TNF- α Flex Set (Bead C4)* (BD Biosciences, EUA).

L-10 (pg/ml): Foi utilizado o kit *Cytometric Bead Assay Human IL-10 Flex Set (Bead B7)* (BD Biosciences, EUA).

BDNF (pg/ml) – Foi utilizado o kit *CYT306 Chemikine Brain Derived Neurotrophic Factor Sandwich ELISA* (Millipore, USA).

5.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa elaborado para o desenvolvimento deste estudo foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA, conforme consta na Resolução do Projeto nº 10-0474. Os pesquisadores envolvidos no projeto assinaram um termo de compromisso para utilização de amostras biológicas e informações associadas (ANEXO 4).

O estudo foi realizado de acordo com as diretrizes sobre pesquisas envolvendo seres humanos, estabelecida pela Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012). Está inscrito na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o número FR-380970 e no Certificado de apresentação para apreciação ética (CAAE) sob o número 0317.0.001.000-10.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada dupla digitação para assegurar melhor qualidade dos dados armazenados com a utilização do programa Microsoft Excel, versão 2010. O programa utilizado para análise estatística foi o SPSS, versão 18.0 (Chicago, IL).

As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (percentis 25 e 75), conforme apresentassem ou não distribuição normal. A normalidade das variáveis foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis categóricas foram utilizadas as frequências absolutas (n) e relativas (%).

Para a comparação das variáveis assimétricas foram empregados os testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. As variáveis com distribuição normal foram comparadas pelo teste *t* de Student e pela Análise de Variâncias (ANOVA). Os testes Qui-quadrado de Pearson em conjunto com a análise dos resíduos ajustados foram usados para comparações de taxa de prevalência entre os grupos. As associações entre as variáveis contínuas foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson ou de Spearman, conforme a distribuição apresentada (simétrica ou assimétrica).

As variáveis que obtiveram valores de $P < 0,20$ nas análises realizadas foram incluídas no modelo de regressão linear múltipla para cada um dos desfechos, sendo que, para aqueles que não apresentavam distribuição normal, foi adotada a transformação logarítmica total. O método de estimação do modelo foi o de *backward*.

Para controlar os fatores confundidores entre as citocinas e os parâmetros nutricionais foi realizada a análise de covariância (ANCOVA). Para tal, os parâmetros nutricionais foram divididos em tercis e transformações logarítmicas nas citocinas foram aplicadas para utilização do teste paramétrico. A raiz do eta quadrado foi utilizada para estimar o tamanho do efeito e interpretada de acordo com a escala do coeficiente de Pearson (Field, 2009).

O limiar de significância foi estabelecido em 5%.

6 ARTIGO UM

AVALIAÇÃO NUTRICIONAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM CIRROSE NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE: ESTUDO TRANSVERSAL DE DUAS SÉRIES

M.I.A Wilasco; A.C.R Schneider; D.Santetti; C.Uribe-Cruz; C.T.L.Dornelles; H.S.Goldani; T.R.Silveira.

A ser submetido na revista Biomedical Research

**Avaliação nutricional em crianças e adolescentes com cirrose
no Hospital de Clínicas de Porto Alegre: estudo transversal de duas séries**

**Nutritional assessment in children and adolescents with cirrhosis in
Hospital de Clínicas de Porto Alegre: cross-sectional study of two series**

Avaliação nutricional em pacientes pediátricos com cirrose

Maria Inês de A. Wilasco ^{a,b}; Ana Claudia Reis Schneider ^{a,c}; Daniele Santetti ^d; Carolina Uribe-Cruz ^{a,c}; Cristina Toscani Leal Dornelles ^e; Helena Sueno Goldani ^{b,c,e}; Themis Reverbel da Silveira ^{a,b,c}

^aLaboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEGH), Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CP/HCPA). Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre-RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente (PPG-SCA). Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). Ramiro Barcelos 2400, CEP 90035-903, Porto Alegre-RS, Brasil.

^cPrograma de Pós-graduação em Gastroenterologia e Hepatologia. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). Ramiro Barcelos 2400, CEP 90035-903, Porto Alegre-RS, Brasil.

^dFaculdade de Nutrição – Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS). Av. Unisinos, 950, CEP 93.022-000, São Leopoldo - RS, Brasil.

^eDepartamento de Pediatria - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (PED/HCPA). Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre-RS, Brasil.

CORRESPONDING AUTHOR:

Maria Inês A. Wilasco. (M.I.A. Wilasco)

Pesquisadora no Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre-RS, Brasil.

Telefone: 51 33598847. Fax: 51 33598183.

E-mail address: ineswilasco@gmail.com

PALAVRAS CHAVES

Avaliação nutricional, criança, adolescente, cirrose.

KEYWORDS

Nutritional assessment, child, adolescent, liver cirrhosis.

RESUMO EM PORTUGUÊS

Introdução: A cirrose caracteriza-se por uma alteração crônica do parênquima hepático e crianças e adolescentes cirróticos desenvolvem desnutrição frequentemente. A adequada intervenção nutricional requer uma minuciosa avaliação do estado.

Objetivos: Comparar os resultados da avaliação nutricional de crianças e adolescentes cirróticos em dois momentos distintos e confrontar estes resultados com dados da literatura.

Métodos: Foram utilizados bancos de dados oriundos de duas pesquisas conduzidas com pacientes pediátricos com cirrose atendidos no HCPA. Após a aplicação de critérios de inclusão e exclusão 67 crianças e adolescentes foram avaliadas em duas séries com intervalo de aproximadamente uma década entre elas. As duas séries tiveram as variáveis antropométricas estatura para idade (E/I) e dobra cutânea tricípital para idade (DCT/I), avaliadas de acordo com os padrões da OMS. A gravidade da doença foi avaliada pelos modelos PELD/MELD. O limiar de significância foi estabelecido em 5%. Estes dados foram confrontados com os resultados de outros estudos.

Resultados: Os resultados da avaliação do estado nutricional dos pacientes nas duas séries não mostraram diferença estatisticamente significativa. Na série um 22,6% dos pacientes apresentaram desnutrição e 27,8% na série dois ($P=0,955$). Dos cinco estudos encontrados na literatura quatro apresentaram valores bem mais elevados que nas séries do HCPA (40 – 50%).

Conclusões: Podemos concluir que nas duas séries do HCPA, separadas por aproximadamente uma década, o percentual de desnutrição e a gravidade se mantiveram estáveis. A comparação dos nossos dados com outros centros revelou que o cuidado nutricional é de extrema importância no tratamento de crianças e adolescentes com cirrose.

ABSTRACT IN ENGLISH

Introduction: Cirrhosis is characterized by chronic alteration of the hepatic parenchyma; children and adolescents frequently develop undernourishment. An appropriate nutritional intervention requires a thorough assessment of nutritional status.

Objectives: Compare the nutritional assessment of children and adolescents in two different moments and compare the results with literature data.

Methods: Two databases from studies conducted with pediatric cirrhosis' carriers attended in HCPA were used. After applying inclusion and exclusion criteria 67 children and adolescents were assessed in two series with a range of approximately a decade. Both series had standard deviation score for height-for-age (SDS-H/A), standard deviation score for triceps skinfold-for-age (SDS-TSF/A) and standard deviation score for mid-upper arm circumference-for-age (SDS-MUAC/A) calculated according WHO standards. Disease severity was evaluated by PELD/MELD models. Results were considered significant at $P < 0.05$. These data were compared with the results of other studies.

Results: The results of nutritional status assessment in both series did not show difference statistically significant difference. In the first series 22.6% of patients were undernourished while 27.8% in the second one ($P=0.955$). Of the five studies found in the literature four had much higher values in the HCPA series (40 – 50%).

Conclusions: We can conclude that in both series of HCPA, separated for about a decade, the percentage of malnutrition and severity remained stable. Comparison of our data with other centers revealed that nutritional care is of paramount importance in the treatment of children and adolescents with cirrhosis.

INTRODUÇÃO

A cirrose é identificada anatomopatologicamente como um processo hepático difuso com fibrose e formação nodular, representando o estágio final de grande parte das doenças hepáticas (1, 2). Caracteriza-se por alteração crônica do parênquima hepático, alterando sua estrutura, o funcionamento dos hepatócitos e a circulação portal. À medida que a cirrose avança, a desestruturação progressiva da arquitetura hepática ocasiona a compressão de estruturas vasculares e biliares, gerando oferta irregular de nutrientes, oxigênio e metabólitos a diversas partes do fígado e perpetuando a lesão hepática (3). Considerando que no fígado são realizados o metabolismo e armazenamento de proteínas, carboidratos, lipídios e de diversas vitaminas e microelementos, a cirrose afeta dramaticamente o estado nutricional do paciente hepatopata (1). A desnutrição é reconhecida como um importante fator prognóstico que pode influenciar a evolução clínica destes pacientes (4) e está associada com maior morbi-mortalidade nos períodos pré e pós-transplante (5).

A infância e a adolescência são fases de crescimento e desenvolvimento intensos, portanto pacientes pediátricos precisam ter seu estado nutricional constantemente monitorado e o risco nutricional prontamente identificado. Nas crianças e adolescentes com cirrose, ao se detectar ingestão alimentar insuficiente, sugere-se iniciar uma cuidadosa e permanente terapia nutricional. Young e colaboradores (2013) sugerem que estes pacientes apresentam necessidades energéticas aumentadas em torno de 120 a 150% do Requerimento Energético Estimado (EER) (6). Fórmulas contendo triglicerídios de cadeia média podem ser utilizadas objetivando aumento da absorção de lipídios, principalmente nos casos de colestase grave. A suplementação diária de vitaminas lipossolúveis também deve ser administrada (6). Crianças e adolescentes em risco nutricional que não respondem a terapia nutricional oral inicia-se dieta por sonda nasoenteral, como reposição ou em substituição à alimentação por via oral. Nos casos em que ocorre intolerância a volumes maiores ou presença de vômitos pode ser utilizada dieta enteral com bomba de infusão de forma contínua (noturna, diurna ou ambas).

O Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) é um centro de referência em assistência às crianças e adolescentes com doença hepática crônica, os quais são encaminhados para tratamento e/ou avaliação para transplante hepático infantil (THI). O manejo clínico realizado pela equipe do HCPA é intervir nutricionalmente tão logo seja identificado risco nutricional do paciente (7, 8). Os objetivos deste estudo foram: a) comparar os bancos de dados relativos aos resultados de avaliações nutricionais de pacientes pediátricos cirróticos, acompanhados pela Unidade de Gastroenterologia e Hepatologia Pediátrica do HCPA, em dois períodos distintos. b) comparar estes dados com outros centros de atendimento a pacientes pediátricos hepatopatas.

MÉTODOS

Amostra

Foram utilizados dois bancos de dados oriundos de pesquisas conduzidas com crianças com doença hepática crônica no HCPA. O primeiro banco fez parte do estudo “Avaliação nos níveis plasmáticos de zinco em crianças e adolescentes com cirrose” aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do HCPA sob o número 03-395, realizado no período de 2003 a 2005 (9). Neste estudo foi realizada avaliação nutricional de 36 crianças e adolescentes, com idades entre três meses a 18 anos, seguiu a referência do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention – National Center for Health and Statistics*)(10) e Frisancho (11). O segundo banco fez parte do estudo “Perfil nutricional e de atividade inflamatória em crianças e adolescentes com hepatopatia crônica” aprovado pelo CEP do HCPA sob o número 11-0078, conduzido entre 2011-2012 (12). Neste estudo, a avaliação nutricional de 43 crianças e adolescentes com hepatopatia crônica, com idades entre três meses a 19 anos, seguiu o padrão de referência da Organização Mundial de Saúde (OMS) (13, 14) e Frisancho (15).

Setenta e nove crianças e adolescentes constituíam os dois bancos de dados. Após a unificação dos dois bancos, as crianças que pertenciam aos dois foram excluídas de um deles. O critério de inclusão para o presente estudo foi diagnóstico estabelecido de cirrose e o critério de exclusão foi cirrose de fator etiológico autoimune. No final foram avaliadas 67 crianças, sendo 31 do primeiro banco e 36 do segundo. De acordo com os períodos das avaliações nutricionais, os grupos foram denominados: série 1 (2003- 2005) e série 2 (2012 – 2013).

Os critérios de inclusão e exclusão utilizados no projeto 03-395 são descritos a seguir. Critérios de inclusão: crianças de três meses a 18 anos com diagnóstico estabelecido de cirrose. Critérios de exclusão: uso de suplemento contendo zinco ou cobre, uso de anticoncepcional oral, uso de lactulona, gestante ou lactante, transfusão de sangue até um mês da coleta de sangue, infecção ativa, uso de antibiótico e diagnóstico de Doença de Wilson.

Os critérios de inclusão e exclusão do projeto 11-0078 são os que seguem. Critérios de inclusão: crianças e adolescentes de zero a 19 anos com hepatopatia ou cirrose. Critérios de exclusão: presença de infecção aguda, febre, uso de antibiótico até 15 dias da coleta, diagnóstico de erros inatos do metabolismo e concomitância de outras doenças crônicas.

Classificação nutricional

Os dados de antropometria foram recalculados utilizando o padrão da OMS de 2006 e de 2007 (13, 14) e para os dados de perimetria, nas crianças maiores de 5 anos, seguiu-se as referências de Frisancho (15).

As faixas para classificação nutricional ficaram definidas como desnutrição, risco nutricional, eutrofia e excesso de peso que englobou as faixas risco para sobrepeso (nas crianças menores de cinco anos), sobrepeso e obesidade. Para a classificação de desnutrição e eutrofia foram utilizados os parâmetros estatura para idade (E/I) e dobra cutânea tricipital para

idade (DCT/I) confirmada pela circunferência do braço para idade (CB/I). Para a classificação de risco nutricional e excesso de peso foram utilizados os parâmetros DCT/I e CB/I. Havendo discrepância entre valores utilizou-se o valor menor. O índice de massa corporal para idade (IMC/I) não foi utilizado para a classificação nutricional para minimizar uma possível influência de edema/ascite e organomegalias. O diagrama utilizado para a classificação nutricional está demonstrado na figura 1.

Gravidade da cirrose

Nos dois bancos de dados a gravidade da cirrose foi determinada pelos modelos MELD (*Model for End-stage Liver Disease*) e PELD (*Pediatric End-stage Liver Disease*). O modelo PELD é utilizado para crianças com até 12 anos de idade e o MELD para crianças maiores de 12 anos e adultos. Estes modelos utilizam equações específicas que refletem a gravidade da doença, quanto mais alto o escore alcançado, mais grave está a doença (16). O ponto de corte adotado foi o de 15 (17).

Comparação com outros centros

Para realizar a comparação da avaliação nutricional com outros centros foi efetuada uma busca em bases de dados eletrônicos por estudos com data igual ou posterior a 2003 (primeira série de dados do HCPA). Os estudos deveriam ter adotado pelo menos uma das variáveis utilizadas no HCPA para classificação nutricional (E/I e/ou DCT/I). A gravidade da doença deveria ter sido avaliada pelos modelos PELD/MELD.

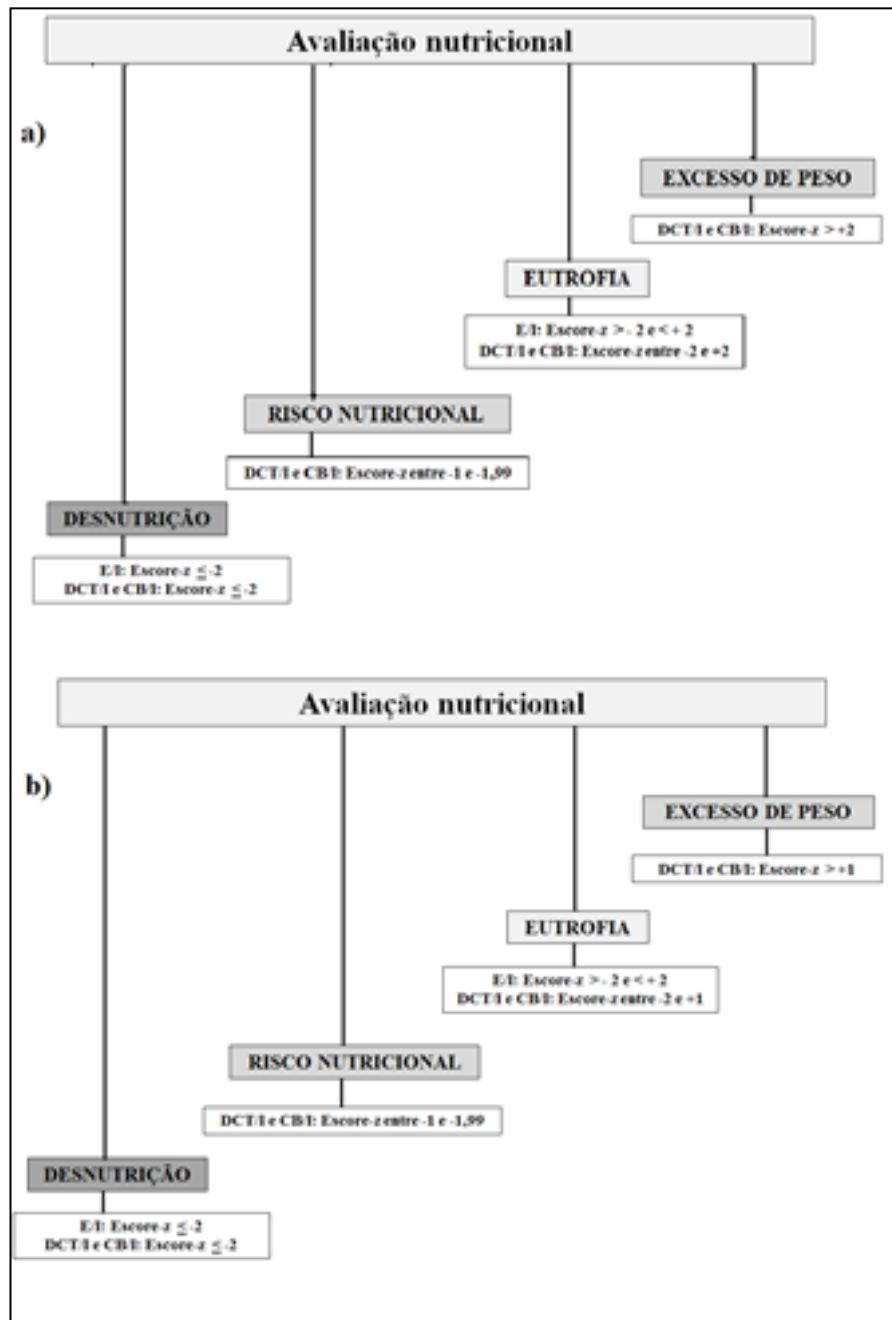


Figura 1 Avaliação nutricional. - **a)** Crianças até cinco anos. **b)** Crianças maiores que cinco anos. **E/I:** Estatura para idade. **DCT/I:** Dobra cutânea tricéptica para idade. **a)** Excesso de peso: risco para sobrepeso + sobrepeso + obesidade. **b)** Excesso de peso: sobrepeso + obesidade.

Análise estatística

Os resultados estão expressos como número absoluto (%), média \pm DP ou mediana e amplitude interquartilica (P25-75) a depender da distribuição. A normalidade da distribuição foi verificada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram

comparadas pelo teste t de Student. As variáveis assimétricas foram analisadas pelo teste Kruskal-Wallis. Os testes Qui-quadrado de Pearson em conjunto com o exato de Fisher foram usados para comparações de taxa de prevalência entre os grupos. Para todas as análises o limiar de significância foi estabelecido em 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Os dados demográficos e clínicos dos pacientes estão descritos na tabela 1 e a significância encontra-se indicada. Nesta tabela pode ser observado que não há variação importante no perfil demográfico dos pacientes avaliados nas duas séries de dados, excetuando-se os fatores etiológicos.

Tabela 1 – Dados clínicos, demográficos e etiológicos

Variáveis	Série 1 (n=31)	Série 2 (n=36)	P
Idade (meses)	71 (38 a 121)	66,5 (18 a 115)	0,593*
Sexo – n(%)			1,000**
Masculino	12 (38,7)	15 (41,7)	
Feminino	19 (61,3)	21 (58,3)	
Peld – n(%)			1,000***
<15	20 (83,3)	24 (85,7)	
≥ 15	4 (16,7)	4 (14,3)	
Meld – n (%)			1,000***
< 15	7 (100)	7 (87,5)	
≥ 15	0 (0,0)	1 (12,5)	
Fatores etiológicos			
Atresia Biliar	15 (48,4)	27 (75,0)	
Def. Alfa 1 antitripsina	1 (3,2)	3 (8,3)	
Fibrose hepática congênita	2 (6,5)	1 (2,8)	
Histiocitose	1 (3,2)	0 (0,0)	
Hepatite por Citomegalovirus	0 (0,0)	1 (2,8)	
Criptogênica	12 (38,7)	4 (11,1)	

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste qui-quadrado de Pearson; *** Teste exato de Fisher.

Os resultados da avaliação do estado nutricional dos pacientes das séries 1 e 2 estão descritos na tabela 2. Pode-se notar que pela classificação do escore que indica desnutrição ($Z \leq - 2,00$), entre as duas séries, não existe diferença estatística significativa.

Tabela 2 – Resultados da avaliação do estado nutricional de ambas as séries

Variáveis	Série 1		Série 2		P†
	n	n (%)	n	n (%)	
E/I	31		36		0,122
≤ -2,00		3 (9,7)		8 (22,2)	
-1,99 a -1,01		10 (32,3)		14 (38,9)	
-1,00 a +1,00		18 (58,1)		12 (33,3)	
+1,01 a +1,99		0 (0,0)		2 (5,6)	
≥ +2,00		0 (0,0)		0 (0,0)	
CB/I	31		36		0,547
≤ -2,00		4 (12,9)		4 (11,1)	
-1,99 a -1,01		8 (25,8)		15 (41,7)	
-1,00 a +1,00		17 (54,8)		14 (38,9)	
+1,01 a +1,99		2 (6,5)		2 (5,6)	
≥ +2,00		0 (0,0)		1 (2,8)	
DCT/I	31		36		0,796
≤ -2,00		4 (12,9)		4 (11,1)	
-1,99 a -1,01		6 (19,4)		9 (25,0)	
-1,00 a +1,00		19 (61,3)		21 (58,3)	
+1,01 a +1,99		1 (3,2)		2 (5,6)	
≥ +2,00		1 (3,2)		0 (0,0)	
Estado Nutricional (E/I e DCT/I)**	31		36		0,955
Desnutrição		7 (22,6)		10 (27,8)	
Risco nutricional		3 (9,7)		4 (11,1)	
Eutrofia		20 (64,5)		21 (58,3)	
Acima do peso #		1 (3,2)		1 (2,8)	

† Teste qui-quadrado de Pearson; # Acima do peso: Risco sobrepeso/sobrepeso/obesidade. **E/I**: Estatura para idade. **CB/I**: Circunferência do braço para idade. **DCT/I**: Dobra cutânea tricípital para idade.

A busca na literatura revelou cinco estudos passíveis de comparação com o presente, dois brasileiros e três internacionais (Hurtado e colaboradores, Baran e colaboradores, Sullivan e colaboradores, Zamberlan e colaboradores, Neto e colaboradores). Estes estudos utilizaram para a classificação do estado nutricional E/I e/ou DCT/I e para classificação da gravidade da doença os modelos PELD e/ou MELD. Dos cinco estudos, quatro apresentaram percentuais de desnutrição bem mais elevados que nas duas séries do HCPA (40 – 50%). (tabela 3).

Tabela 3 - Comparação entre os resultados da avaliação nutricional obtidos no HCPA e em diversos centros.

Autor/ano	Local	Parâmetros Nutricionais (escore $z \leq -2$)	Tamanho da amostra	Gravidade da doença	% de desnutrição da amostra
Presente estudo	HCPA - RS	E/I e DCT/I	Série 1 = 31	Série 1 MELD: 6,57±2,19 PELD: 6,08 ±7,84	Série1=22,6%
			Série 2 = 36	Série 2 MELD: 4,75±6,04 PELD: 6,29±8,61	Série 2 = 27,8%
Hurtado e colaboradores. /2007 (18)	Guadalajara - México	E/I	N=79	PELD: 5,0±11,4	44,3%
Sullivan e colaboradores. /2010 (19)	Colorado – EUA	E/I e DCT/I	N=14	PELD: 10,7±1,8	21%
Baran e colaboradores. /2011 (20)	Esmirna - Turquia	E/I	N=80	PELD: 23,7±14,7	43,7%
Zamberlan e colaboradores. /2012 (21)	Fac. Medicina USP - SP	E/I e DCT/I	N=60	PELD/MELD: 24*	≈ 50%
Neto e colaboradores. /2012 (22)	Hosp. Sírio-libanês - SP	E/I	N=413	PELD: 15,7±10,1	40%

Dados expressos como número absoluto, percentual e média ± desvio padrão. **HCPA**: Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **PELD**: *Pediatric End-stage Liver Disease*. **MELD**: *Model for End-stage Liver Disease*. **E/I**: Estatura para idade. **DCT/I**: Dobra cutânea tricípital para idade. *Os autores não mostraram valores de desvio padrão e apresentaram uma média para PELD e MELD, sugerindo que os dois modelos foram agrupados para realização do cálculo.

DISCUSSÃO

Na prática clínica, a antropometria é o método isolado mais utilizado para o diagnóstico nutricional, pela facilidade de execução, inocuidade e baixo custo, além da obtenção rápida dos resultados. Em cirróticos, a presença de retenção hídrica e organomegalias fazem do peso corporal um marcador não confiável para avaliação do estado nutricional, portanto o acompanhamento do crescimento linear a longo prazo é fundamental (23). O parâmetro E/I indica a presença de comprometimento nutricional de longa duração, que acarreta ganho estatural menor do que o esperado para idade (5). A retomada do crescimento pode ser alcançada com orientação nutricional adequada ou após o transplante hepático (24, 25). Os parâmetros antropométricos E/I e DCT/I são mais confiáveis para a determinação do estado nutricional de pacientes hepatopatas (6, 26). As mensurações DCT/I e

circunferência do braço CB/I, são úteis para avaliar as reservas corporais de gordura e proteínas e são capazes de detectar precocemente as alterações no estado nutricional dos hepatopatas pediátricos (19, 27, 28). Devido aos danos hepáticos, os pacientes com cirrose podem desenvolver desnutrição, que é caracterizada por depleção de gordura e de massa muscular. Mattar e colaboradores estimaram que a desnutrição grave afeta aproximadamente 60% das crianças com doença hepática crônica (29).

A gravidade da doença influencia de maneira importante o estado nutricional. Por outro lado, a melhora no estado nutricional poderá beneficiar a condição clínica dos pacientes (30). Nas duas séries deste estudo os resultados da DCT/I e CB/I com $\text{score-z} \leq -2,00$ foram semelhantes e não demonstraram diferença significativa (Tabela 2). A gravidade da doença e o estado nutricional são mutuamente dependentes. Nossos resultados demonstraram não haver diferença no percentual de desnutrição nas duas séries no período de aproximadamente uma década. Além do mais, a gravidade da cirrose permaneceu estável com escores muito próximos. Estes resultados podem ser devidos ao fato do HCPA ser um centro de referência em tratamento para hepatopatas. Os pacientes são encaminhados precocemente e mantêm um tratamento especializado com equipe multiprofissional o que, acreditamos, retarda o avançar da doença. Os pacientes alocados para as duas séries eram, na maioria, ambulatoriais.

Podemos sugerir que a intervenção nutricional precoce seja um fator que contribui para a manutenção deste percentual ao longo do tempo. É sabido que a intervenção nutricional precoce é um fator crucial para melhorar o prognóstico de cirróticos no pré e pós transplante hepático (2, 25). Nos pacientes atendidos na Unidade de Gastroenterologia e Hepatologia Pediátrica do HCPA, atenção especial é dada às mudanças em depósitos de massa muscular e gordura corporal, que refletem aspectos importantes do estado nutricional do paciente. Após o diagnóstico de cirrose, a equipe de nutricionista realiza a avaliação e, em conjunto com a equipe multiprofissional da Unidade, elabora a prescrição nutricional individualizada. Este

entrosamento permite que o paciente receba um cuidado mais abrangente nos aspectos nutricionais e clínicos.

Conforme já referido, encontramos cinco estudos nos quais foram avaliadas crianças e adolescentes com doença hepática crônica, onde foram utilizados os mesmos parâmetros que no nosso estudo (Tabela 3). Hurtado-Lopéz e colaboradores (2007) (18) estudaram crianças e adolescentes cirróticos, com média de idade de 72,6 meses e demonstraram haver correlação entre os testes de função hepática e os indicadores antropométricos, refletindo a estreita relação entre o agravamento dos danos hepáticos e o estado nutricional. Eles mostraram um escore de gravidade baixo (semelhante ao nosso estudo), no entanto, o percentual de desnutrição encontrado foi praticamente o dobro dos resultados encontrados nas duas séries avaliadas no HCPA.

Dois estudos, o de Baran e colaboradores (2011) e o Zamberlan e colaboradores (2012), onde foram avaliados pacientes pediátricos portadores de cirrose no pré e pós transplante hepático, encontraram percentuais de desnutrição também mais altos do que os obtidos nas duas séries do HCPA (20, 21). Segundo o resultado de Baran e colaboradores 43,7% dos pacientes estavam desnutridos na avaliação do pré-transplante hepático. Já o segundo estudo mostrou prevalência de 50% de desnutrição. Pode-se observar nestes estudos que os escores de gravidade estão bem mais elevados que os encontrados nas duas séries do HCPA demonstrando um estado clínico bem mais comprometido (tabela 3).

Neto e colaboradores (2012) estudaram em 430 pacientes pediátricos os fatores associados com a sobrevivência do paciente e do enxerto após o transplante hepático. (22). Os autores encontraram um percentual de 40% de pacientes desnutridos (escore-z < -2,00) segundo o índice E/I tratando-se, portanto, de pacientes bastante comprometidos com uma média de PELD de 15,7.

Todos os resultados encontrados nas duas séries avaliadas no HCPA foram próximos aos encontrados por Sullivan e colaboradores (2012) (19). Este estudo é uma coorte retrospectiva de pacientes com atresia biliar e avaliou o impacto da suplementação por nutrição parenteral. Vários subgrupos foram revisados e dos 22 pacientes sem nutrição parenteral, 14 tiveram a DCT/I avaliada, sendo encontrado percentual de desnutrição de 21%. Este estudo parece ser o mais similar ao nosso tanto no que se refere a gravidade da doença como ao percentual de desnutrição da amostra.

Podemos concluir que nas duas séries do HCPA, separadas por aproximadamente uma década, o percentual de desnutrição e a gravidade se mantiveram estáveis. A comparação dos nossos dados com outros centros revelou que o cuidado nutricional é de extrema importância no tratamento de crianças e adolescentes com cirrose.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer o apoio e a ajuda fornecida pelo departamento de pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo programa de pós graduação em Saúde da Criança e do Adolescente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e pelo Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) e Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPG-SCA/UFRGS).

REFERÊNCIAS:

1. Bémeur C, Butterworth RF. Nutrition in the management of cirrhosis and its neurological complications. J Clin Exp Hepatol. 2014;4(2):141-50.

2. Pinto RB, Schneider AC, da Silveira TR. Cirrhosis in children and adolescents: An overview. *World J Hepatol.* 2015;7(3):392-405.
3. Hardy S, Kleinman RE. Cirrhosis and chronic liver failure. 3rd ed. Suchy F, Sokol RJ, Balistreri WF, editors. Cambridge: Cambridge University Press 2007.
4. Tsiaousi ET, Hatzitolios AI, Trygonis SK, Savopoulos CG. Malnutrition in end stage liver disease: recommendations and nutritional support. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(4):527-33.
5. Sultan MI, Leon CD, Biank VF. Role of nutrition in pediatric chronic liver disease. *Nutr Clin Pract.* 2011;26(4):401-8.
6. Young S, Kwarta E, Azzam R, Sentongo T. Nutrition assessment and support in children with end-stage liver disease. *Nutr Clin Pract.* 2013;28(3):317-29.
7. Dornelles CT, Goldani HA, Wilasco MI, Maurer RL, Kieling CO, Porowski M, et al. Ghrelin, leptin and insulin in cirrhotic children and adolescents: relationship with cirrhosis severity and nutritional status. *Regul Pept.* 2013;180:26-32.
8. Dornelles CLT, Wilasco MIA, T.O. H, Vieira SMG, Goldani HAS, Silveira TR. Terapia Nutricional em Crianças e Adolescentes com Cirrose: Uma Visão Atual. *Rev HCPA [Internet].* 2010.
9. Schneider ACR. Avaliação de Zinco Plasmático em Crianças e Adolescentes com Cirrose. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
10. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, al. e. 2000 CDC growth charts for the United States: Methods and development. National Center for Health Statistics. *Vital Health Stat*2002.
11. Frisancho AR. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr.* 1981;34(11):2540-5.
12. Santetti D. Perfil inflamatório e estado nutricional de crianças e adolescentes com hepatopatia crônica. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); 2013.
13. WHO. Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization; 2006.
14. WHO. Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Head circumference-for-age, arm circumference-for-age, triceps skinfold-for-age and subscapular skinfold-for-age: Methods and development. . World Health Organization; 2007.
15. Frisancho AR. Anthropometric standards: an interactive nutritional reference of body composition for children and adults. Michigan: Ann Arbor The University of Michigan Press 2008.
16. UNOS. United Network for Organ Sharing. Allocation of livers – proposed amendment UNOS policy 3.6 – approved by OPTN/UNOS Board of Directors 2005.
17. UNOS. Questions and Answers for transplant candidates about the Liver allocation. Richmond, VA.: United Network for Organ Sharing; 2014.
18. Hurtado-López EF, Larrosa-Haro A, Vásquez-Garibay EM, Macías-Rosales R, Troyo-Sanromán R, Bojórquez-Ramos MC. Liver function test results predict nutritional status evaluated by arm anthropometric indicators. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;45(4):451-7.

19. Sullivan JS, Sundaram SS, Pan Z, Sokol RJ. Parenteral nutrition supplementation in biliary atresia patients listed for liver transplantation. *Liver Transpl.* 2012;18(1):120-8.
20. Baran M, Cakir M, Unal F, Tunggor G, Yuksekkaya HA, Arikan C, et al. Evaluation of growth after liver transplantation in Turkish children. *Dig Dis Sci.* 2011;56(11):3343-9.
21. Zamberlan P, Leone C, Tannuri U, Carvalho WB, Delgado AF. Nutritional risk and anthropometric evaluation in pediatric liver transplantation. *Clinics (Sao Paulo).* 2012;67(12):1387-92.
22. Neto JS, Pugliese R, Fonseca EA, Vincenzi R, Pugliese V, Candido H, et al. Four hundred thirty consecutive pediatric living donor liver transplants: variables associated with posttransplant patient and graft survival. *Liver Transpl.* 2012;18(5):577-84.
23. Nightingale S, Ng VL. Optimizing nutritional management in children with chronic liver disease. *Pediatr Clin North Am.* 2009;56(5):1161-83.
24. Ferreira CT, Vieira SM, Silveira TR. [Liver transplantation]. *J Pediatr (Rio J).* 2000;76 Suppl 1:S198-208.
25. DeRusso PA, Ye W, Shepherd R, Haber BA, Shneider BL, Whittington PF, et al. Growth failure and outcomes in infants with biliary atresia: a report from the Biliary Atresia Research Consortium. *Hepatology.* 2007;46(5):1632-8.
26. Sokol RJ, Stall C. Anthropometric evaluation of children with chronic liver disease. *Am J Clin Nutr.* 1990;52(2):203-8.
27. Schneider AC, Pinto RB, Silveira TR. [Nutritional risk and malnutrition determination by anthropometry in cirrhotic children and adolescents]. *Arq Gastroenterol.* 2007;44(4):345-9.
28. Squires RH, Ng V, Romero R, Ekong U, Hardikar W, Emre S, et al. Evaluation of the pediatric patient for liver transplantation: 2014 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American Society of Transplantation and the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *Hepatology.* 2014;60(1):362-98.
29. Mattar RH, Azevedo RA, Speridião PG, Fagundes Neto U, Morais MB. [Nutritional status and intestinal iron absorption in children with chronic hepatic disease with and without cholestasis]. *J Pediatr (Rio J).* 2005;81(4):317-24.
30. Kondrup J. Nutrition in end stage liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006;20(3):547-60.

7 ARTIGO DOIS

IL-6, TNF- α , IL-10, AND NUTRITIONAL STATUS IN PATIENTS WITH BILIARY ATRESIA

M.I.A. Wilasco; C. Uribe-Cruz; D. Santetti; B. Fries; G.R.; Dornelles; T.R. Silveira

Em revisão na revista Cytokine

IL-6, TNF- α , IL-10, AND NUTRITIONAL STATUS

IN PATIENTS WITH BILIARY ATRESIA

Maria Ines A. Wilasco^{a,b}; Carolina Uribe-Cruz^{a,c}; Daniele Santetti^d;
Gabriel Rodrigo Fries^e; Cristina T. L. Dornelles^f; Themis R. da Silveira^{a,b,c}

^a Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil.

^b Graduate Program in Child and Adolescent Health. School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil.

^c Graduate Program in Gastroenterology. School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil.

^d School of Nutrition, Universidade do Vale do Rio dos Sinos. Av. Unisinos, 950, São Leopoldo, RS 93022-000, Brazil.

^e Laboratory of Molecular Psychiatry, Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil.

^f Department of Pediatrics, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (PED/HCPA). Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil.

Corresponding author:

Maria Inês A. Wilasco (M.I.A. Wilasco)

Experimental Laboratory of Gastroenterology – Reserch center - Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Address: Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil.

Phone number: + 55 51 33598847. Fax number: + 55 51 33598183.

E-mail address: ineswilasco@gmail.com

Authorship:

M.I.A. Wilasco was responsible for conducting the study, analyzing data and drafting the manuscript.

C. Uribe-Cruz contributed to study design and manuscript revision.

D. Santetti participated in data collection.

C. Dorneles assisted with data collection and study design.

G.R. Pfaffenseller assisted with laboratory assays.

T.R. Silveira contributed to the design and execution of the study, and revised final approval of the version to be submitted.

Highlights:

Biliary atresia is the main cause of cirrhosis in early childhood.

Children with cirrhosis are at high risk of developing nutritional complications.

Assessment of nutritional status in children with cirrhosis is particularly challenging.

IL-6 and IL-10 are candidate as a supporting biomarker of nutritional assessment.

Keywords: IL-6, TNF- α , IL-10, Nutritional status, Cirrhosis, Biliary atresia.

1. Introduction

Biliary atresia (BA) is an idiopathic cholangiopathy of childhood characterized by complete obstruction of the bile ducts. Progressive inflammation and fibrosis lead to secondary biliary cirrhosis in the majority of patients [1]. Cirrhosis, which represents the end stage of many liver diseases, is identified histopathologically as a diffuse process of hepatic fibrosis and nodule formation [2, 3]. As cirrhosis advances, there is progressive disorganization of the normal architecture of the liver, which leads to compression of vascular and biliary structures and, consequently, to an irregular supply of nutrients, oxygen, and metabolites [4]. These changes affect energy synthesis and metabolism, with an impact on the nutritional status of patients with liver disease [5]. Indeed, malnutrition is recognized as a factor associated with increased morbidity and mortality in the pre- and post-liver transplantation periods [6]. Children and adolescents with chronic liver disease have increased energy needs, corresponding to 120–150% of their Estimated Energy Requirement (EER) [7, 8].

Cytokines and growth factors are known to play an important role in cirrhosis. IL-6 is a key mediator of the acute phase response in liver disease [9] and has been associated with worsening nutritional status in chronically ill patients [10]. TNF- α is considered a proinflammatory cytokine, and is involved in the innate immune response [11]. In patients with cirrhosis, a significant association of TNF- α and its receptors with energy metabolism has been described, suggesting that activation of the TNF- α system contributes to the anorexia-cachexia syndrome seen in these patients [12]. Conversely, IL-10 is a cytokine with anti-inflammatory properties; and its expression in BA is controversial [13, 14].

Nutritional assessment of patients with cirrhosis is hindered by the presence of organomegaly and edema and by the complexity of interpreting laboratory parameters commonly used to evaluate nutrition, which are rendered abnormal by liver disease [15].

The objective of the present study is to evaluate whether associations exist between IL-6, TNF- α , IL-10, and nutritional status in patients with cirrhosis secondary to BA.

2. Patients and methods

From December 2006 through December 2011, 53 children with cirrhosis secondary to BA and 33 healthy, well-nourished, sex- and age-matched controls were recruited at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Participant age ranged from 4 months to 17 years. All underwent assessment of nutritional status and completed a questionnaire designed to collect clinical, dietary and demographic data. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The study follows the norms of Resolution 466/12 that rules research on humans. The CAEE number is 0317.0.001.000-10. Informed and written consent was obtained from the parents or legal guardians of all participating children and adolescents.

2.1. Cirrhosis group

The diagnosis of AB was established during Kasai portoenterostomy, whereas the diagnosis of cirrhosis was established by means of clinical, laboratory, endoscopic, and/or histologic findings. The exclusion criteria were presence of other disease (chronic or acute) and steroid therapy.

All participants received vitamins A, D, E, and K, minerals, antacids, and proton pump inhibitors if necessary as part of the standard of care.

The severity of cirrhosis was evaluated by means of the Child-Pugh score [16]. Patients with mild disease were categorized in class “A”, those with moderate disease in class “B”, and those with severe disease in class “C”. In the interest of uniformity, categories B and C were pooled, thus leaving two classes: “A”, corresponding to mild disease, and “B + C” for moderate-to-severe disease.

2.2. Control group

All participants allocated to the control group were healthy, well-nourished children and adolescents scheduled to undergo blood collection for well-child checks or minor surgical procedures (e.g., excision of benign nevus, surgery to correct inguinal hernia and hypospadias). The exclusion criteria were: preterm birth, presence of any other conditions (chronic or acute), a restrictive diet, and medication use (except iron and vitamins at prophylactic doses).

2.3. Assessment of nutritional status and dietary intakes

In both groups, nutritional status was assessed by means of anthropometric measurements, obtained as described in the WHO Training Course on Child Growth Assessment [17]. Nutritional status was classified using Standard Deviation Scores (SDS), in accordance with the WHO Standards [18] and Reference [19]. As weight is an unreliable parameter for nutritional assessment in patients with cirrhosis, due to the presence of edema and organomegaly, the parameters used for nutritional status classification were height-for-age (H/A), triceps skinfold thickness-for-age (TSF/A) and mid-upper arm circumference-for-age (MUAC/A). The Body Mass Index-for-age (BMI/A) parameter was used to classify controls as well-nourished (data not shown). The same parameters used for individual nutritional status assessment in cirrhosis group were used to compare the results of assessment between groups. The WHO Anthro software, version 3.0 [20], was used to calculate anthropometric data for children under 5, whereas those of children over 5 and adolescents were calculated in the WHO AnthroPlus [21] and Frisancho Anthropometric Standards [22] software suites.

Participants' habitual diets were evaluated by means of a 3-day dietary recall (two nonconsecutive weekdays and one weekend day). All records were calculated in the Nutwin (version 2.5) computer program. After calculating mean dietary intake over the 3 days

recorded, the Estimated Energy Requirement (EER) was determined, taking into account patient age, height, and weight, pursuant to Dietary Reference Intake (DRI) [23] and Recommended Dietary Allowance (RDA) [24] recommendations.

2.4. Cytokine quantitation

Blood samples were collected between 8:00 a.m. and 12:00 p.m., with participants fasted for at least 3 hours. Serum was immediately centrifuged for 10 min at 1000 g (4°C) and stored at -80°C for later analysis.

Quantitation of IL-6, IL-10, and TNF- α in serum was performed in duplicate by Cytometric Bead Array flow cytometry, in accordance with the manufacturer protocol (BD Biosciences, USA).

2.5. Statistical analysis

Variables are expressed as mean \pm SD or median (interquartile range [IQR]) as appropriate for distribution. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normality of data distribution. Normally distributed variables were compared by means of analysis of variance (ANOVA) and Student's *t*-test. Asymmetrically distributed variables were analyzed by means of the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* tests respectively. Pearson's chi-square test and adjusted residuals were used for between-group comparisons of prevalence. Spearman coefficients were used to test for correlation. Analysis of covariance (ANCOVA) was used to control for confounding factors between cytokines and nutritional parameters. To this end, nutritional parameters were stratified into tertiles and cytokine levels were log-transformed to enable use of a parametric test. The square root of eta squared was used to estimate effect size and interpreted on the scale of Pearson's [25]. The significance level was set at 5% for all analyses.

3. Results

3.1. General characteristics

There were no significant between-group differences in age or sex. Levels of the studied cytokines were significantly higher in the cirrhosis group than in controls. Most patients were classified as Child-Pugh “A” (Table 1).

Table 1 – General characteristics of patients and controls

Characteristics	Cirrhosis group (n=53)	Control group (n=33)	P
Age (months)	23.6 (8.4 to 87.5)	28.6 (16.0 to 89.5)	0.647*
Sex			0.780**
Male	18 (34.0)	13 (39.4)	
Female	35 (66.0)	20 (60.6)	
IL-6 (pg/mL)	2.40 (0.98 to 6.03)	0.24 (0.18 to 0.56)	<0.001*
TNF- α (pg/mL)	0.21 (0.13 to 0.44)	0.14 (0.12 to 0.16)	0.007*
IL-10 (pg/mL)	0.65 (0.36 to 1.79)	0.36 (0.56 to 0.53)	0.004*
Child-Pugh score			
A	31 (58.5)		
B + C	22 (41.5)		

Data expressed as n (%), median (interquartile range). * Mann-Whitney *U*-test; ** chi-square test.

3.2. Nutritional status

Nutritional assessment was based on the SDS-H/A and SDS-TSF/A parameters and confirmed by SDS-MUAC/I. The nutritional parameters of interest and the results of nutritional assessment are shown in Table 2. For assessment of dietary intake by means of EER(%), participants were divided into four age ranges: 0-2, 2-5, 5-10, and >10 years. The median (interquartile range) EER(%) for each age group was 122 (97-162), 106 (85-128), 88 (77-105), and 81 (63-95). Nutritional assessment revealed that most patients in the cirrhosis group were well-nourished (69.2%).

Table 2 – Nutritional parameters and assessment

Characteristics	Cirrhosis group		Control group		P†
	n	n (%)	n	n (%)	
SDS-H/A	53		33		< 0.001
≤ -2.00		16 (30.2)*		0 (0.0)	
-1.99 to -1.01		17 (32.1)*		2 (6.1)	
-1.00 to +1.00		18 (34.0)		23 (69.7)*	
+1.00 to +1.99		2 (3.8)		6 (18.2)*	
≥ +2.00		0 (0.0)		2 (6.1)	
SDS-MUAC/A	52**		33		<0.001
≤ -2.00		11 (21.1)*		0 (0.0)	
-1.99 to -1.01		14 (26.9)*		0 (0.0)	
-1.00 to +1.00		21 (40.4)		31 (93.9)*	
+1.00 to +1.99		5 (9.6)		2 (6.1)	
≥ +2.00		1 (1.9)		0 (0.0)	
SDS-TSF/A	52**		33		0.002
≤ -2.00		9 (17.3)*		0 (0.0)	
-1.99 to -1.01		11 (21.2)*		1 (3.0)	
-1.00 to +1.00		28 (53.8)		30 (90.9)*	
+1.00 to +1.99		4 (7.7)		2 (6.1)	
≥ +2.00		0 (0.0)		0 (0.0)	
Nutritional classification (SDS-H/A and SDS-TSF/A)#	52**		33		0.002
Undernourished		15 (28.8)*		0 (0.0)	
Well-nourished		36 (69.2)		33 (100)*	
Overweight		1 (1.9)		0 (0.0)	

SDS-H/A: standard deviation score of height-for-age; **SDS-MUAC/A:** standard deviation score of mid-upper arm circumference-for-age; **SDS-TSF/A:** standard deviation score of triceps skinfold thickness-for-age. *Association significant at 5% according to adjusted residuals test. † Chi-square test (categorical variables) and Student's t- test (continuous variables). # The lowest of the two values was used for nutritional classification. **One patient had a standard deviation score below -0.01 SD and was excluded from the sample.

3.3. Correlation of severity of cirrhosis with cytokine levels and nutritional parameters

The Child-Pugh score was used to correlate cytokine levels with the severity of cirrhosis. Correlations were classified according to the Spearman coefficient as weak (<0.3), moderate (0.3-0.59), strong (0.6-0.89), or very strong (>0.9).

Child-Pugh scores and Spearman coefficients were also used to determine whether correlations existed between nutritional parameters and disease severity. All nutritional parameters of interest correlated moderately with disease severity, as shown in Table 3.

Table 3 – Correlation of disease severity with cytokines and nutritional parameters (Spearman coefficient)

Characteristics	Child-Pugh score	P
	r_s	
IL-6	0.45	0.001
TNF- α	0.10	0.478
IL-10	0.41	0.002
SDS-H/A	-0.47	<0.001
SDS-MUAC/A	-0.45	0.001
SDS-TSF/A	-0.43	0.002

IL-6: Interleukin-6. **IL-10:** Interleukin-10. **TNF- α :** Tumor necrosis factor alpha. **SDS-H/A:** Standard Deviation Score of height-for-age. **SDS-MUAC/A:** Standard Deviation Score of mid-upper arm circumference-for-age. **SDS-TSF/A:** Standard Deviation Score of triceps skinfold thickness-for-age. r_s : Spearman coefficient.

3.4. Correlation between cytokines and nutritional parameters

Spearman coefficients revealed a moderate, inverse, statistically significant correlation of the nutritional parameters of interest with IL-6 and IL-10 (Table 4).

Table 4 – Correlation between cytokines and nutritional parameters (Spearman coefficient)

Characteristics	IL-6	IL-10	TNF- α
	r_s (p-value)	r_s (p-value)	r_s (p-value)
SDS-H/A	-0.493 (<0.001)	-0.476 (<0.001)	-0.083 (0.555)
SDS-MUAC/A	-0.320 (0.022)	-0.363 (0.008)	-0.129 (0.362)
SDS-TSF/A	-0.503 (<0.001)	-0.388 (0.004)	-0.161 (0.253)

SDS-H/A: Standard Deviation Score of height-for-age. **SDS-MUAC/A:** Standard Deviation Score of mid-upper arm circumference-for-age. **SDS-TSF/A:** Standard Deviation Score of triceps skinfold thickness-for-age. r_s : Spearman coefficient.

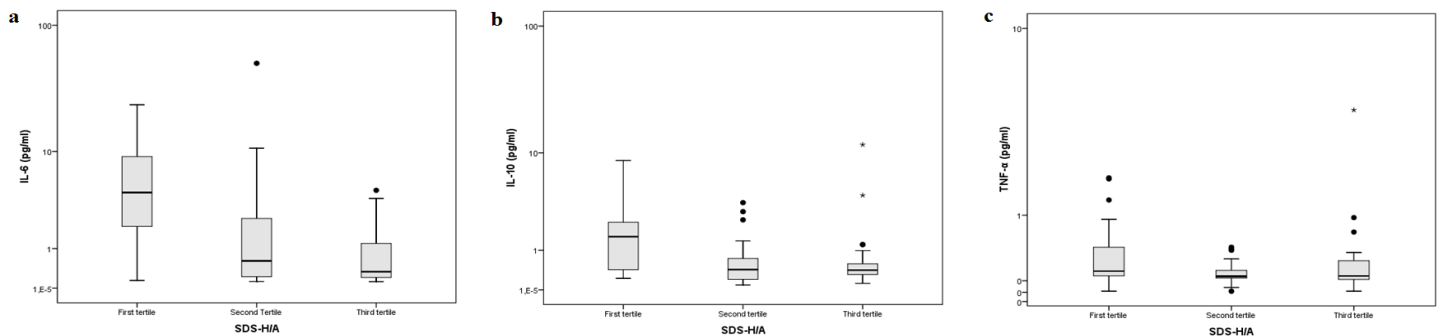
To control for potential confounders, analysis of covariance (ANCOVA) was performed to detect whether these factors remained independently associated with cytokines. Of the three nutritional parameters assessed, only SDS-H/A remained associated with cytokines after adjustment for Child-Pugh score, age, and EER(%). To better understand this association, SDS-H/A was stratified into tertiles. The results are shown in Table 6. Children classified into the first and second tertiles exhibited higher levels of IL-6 and IL-10 than did those classified into the third tertile. Cytokine levels per tertile are shown in Figure 1.

According to eta-squared values, SDS-H/A explained 15.4% and 19.7% of variability in IL-6 and IL-10 levels respectively, whereas TNF- α explained only 3.6% (no statistical significance).

Table 5 – Strength of association between tertiles of Standard Deviation Score of height-for-age and cytokines, according to analysis of covariance (ANCOVA).

Characteristics	Total sample Median (interquartile range)	Eta squared	Partial Correlation	P _{adjusted} *	Comparisons between tertiles P _{adjusted} **
IL-6 (SDS-H/A)		0.154	-0.392	0.023	
1 st tertile (-3.22 to -1.24)	4.36 (1.62-10.05)				0.007
2 nd tertile (-1.23 to +0.20)	0.62 (0.22-2.40)				0.034
3 rd tertile (+0.21 to +1.79)	0.34 (0.20-1.56)				-
IL-10 (SDS-H/A)		0.197	-0.444	0.007	
1 st tertile (-3.22 to -1.24)	1.54 (0.41-2.28)				0.026
2 nd tertile (-1.23 to +0.20)	0.43 (0.18-0.74)				0.044
3 rd tertile (+0.21 to +1.79)	0.41 (0.30-0.59)				-
TNF- α (SDS-H/A)		0.036	-0.190	0.438	
1 st tertile (-3.22 to -1.24)	0.20 (0.14-0.53)				0.379
2 nd tertile (-1.23 to +0.20)	0.15 (0.13-0.24)				0.753
3 rd tertile (+0.21 to +1.79)	0.15 (0.11-0.33)				-

SDS-H/A: Standard Deviation Score of height-for-age. *Adjusted by Child-Pugh score, age, and Estimated Energy Requirement percent; ** With reference to the third tertile.



H/A: Standard Deviation Score of height-for-age. The line inside the box represents the median. The upper and lower limits of the box represent the 25th and 75th percentiles, respectively. Upper and lower error bars represent the minimum and maximum values of the sample. The asterisks and circles represent outliers.

4. Discussion

The American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (ASPEN) recently published a document redefining pediatric malnutrition, which suggested the inclusion of proinflammatory cytokines as adjuvants in nutritional assessment [26]. IL-6 is a cytokine that reflects the inflammatory status of patients with chronic liver disease, and may be a potential marker of disease progression [27-29]. In the present sample, higher levels of IL-6 were found in patients as compared with controls (2.40 vs. 0.24 pg/mL, $P < 0.001$), and a moderate correlation was observed between IL-6 and disease severity ($r_s = 0.45$). In recent publication our group already showed an association between IL-6 and nutritional status in children and adolescents with chronic liver disease. We compared pediatric patients in nutritional risk to

those well-nourished and the IL-6 values were higher in the first group (7.12 pg/ml *versus* 1.63 pg/ml; $P=0.02$) [30]. Although that sample differs from the present one because this is constituted only of cirrhosis due to BA, the results are similar demonstrating a relationship between nutritional status and IL-6. El-Faramawy et al. [1] evaluated IL-6 in a sample of younger children (age 17.8 ± 4.8 months) and found values very similar to our own. Kobayashi et al. [31] assessed IL-6 in older children (age 12.5 ± 3.4 years) and classified liver function by severity and age. They demonstrated that the cytokine was higher in patients with more severe disease across all age ranges. Therefore, our results confirm the role of IL-6 as a possible supporting biomarker of severity of cirrhosis in children with cirrhosis secondary to BA.

TNF- α is considered a proinflammatory cytokine [11]. In adults patients with cancer it has been shown to reduce appetite and food intake [32]. Despite cirrhosis group have exhibited higher values of TNF- α than control group ($P=0.004$), our findings did not reveal correlation in this cytokine and disease severity ($P=0.478$), nor any anthropometric parameter. The same results were demonstrated by Santetti et al. [30]. In an adult sample, Shiraki et al. [12] found higher values in cirrhotic patients as compared with controls ($P<0.001$), as well as in patients with more severe disease ($P<0.001$). Our results may be explained by the fact that our sample was largely composed of patients with cirrhosis Child-Pugh A and to the low prevalence of malnutrition (28.3%).

According to Nelson et al., IL-10 is an anti-inflammatory cytokine with a protective effect against hepatic fibrogenesis [33] and plays a major role in regulation of the immune response. Both deficiency and overproduction of this cytokine may lead to changes. Variation in levels may be associated with polymorphisms in the gene that encodes IL-10 [34]. Narayanaswamy et al. measured this cytokine in patients with BA who had undergone portoenterostomy and found no significant difference in levels as compared to those of

healthy controls ($P=0.8$); however, these levels were higher than those found in cholestatic controls ($P=0.05$) [13]. In our sample, the level of this cytokine were higher in cirrhotic patients than in healthy controls (0.65 vs. 0.36 pg/mL, $P=0.004$), and showed a moderate correlation with disease severity ($r_s=0.41$). Conversely, Jian et al. [14] and Wu et al. [35] evaluated IL-10 in patients who had undergone portoenterostomy and found no significant difference between patients and controls.

In our patients, anthropometric assessment findings correlated with disease severity (Table 3). Our findings are similar to those reported by Hurtado-López, Saron, Elkabbany et al., who compared TSF/A with disease severity in children with chronic liver disease and found that the degree of deterioration in liver function was closely related to nutritional status [36-38]. Our data reflect the fact that disease severity leads to deterioration of nutritional status; this, in turn, worsens patient clinical condition. Therefore, it is essential that nutritional interventions be implemented as soon as nutritional risk is identified in patients with BA.

We agree with Mehta et al., who suggested that IL-6 may serve as a marker of worsening nutritional status in patients with chronic disease [10]. Shiraki et al. suggested that activation of TNF- α leads to abnormal metabolism, which contributes to the malnutrition process in adults with cirrhosis [12]. Our findings demonstrated a moderate correlation of height with IL-6 and IL-10 (Table 5). After dividing SDS-H/A measurements into tertiles and comparing IL-6 and IL-10 values in each tertile, we found significant differences in the first and second tertiles as compared with the third tertile, which demonstrates that, the greater the impairment in nutritional status (as represented by height-for-age), the higher the levels of IL-6 and IL-10 (Table 5).

Monk et al. [39] found high IL-10 levels in a weaned mouse model of malnutrition. In a more recent publication, Monk et al. [40] studied progression of body

weight in weaned mice fed different diets; their findings suggest that high IL-10 levels are dependent on the altered metabolism that occurs with nutritional deficits. In practice, our results demonstrate that greater stunting of growth is associated with higher levels of IL-6 and IL-10, and, as height is an indicator of malnutrition in the pediatric population, one may conclude that higher IL-6 and IL-10 concentrations are associated with worse malnutrition. These results confirm the role of IL-6 as an indicator of worsening nutritional status, and suggest that IL-10 levels can also serve as a red flag of an attempt by body to overcome the attendant inflammatory status that occurs with deterioration of nutritional status.

In short, we suggest that, in patients with cirrhosis secondary to BA, IL-6 could be used as a supporting biomarker of deficient nutritional status and elevated IL-10 levels could be used as an early-stage supporting biomarker of deteriorating nutritional status.

5. Acknowledgements:

The authors would like to acknowledge the support and help provided by Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology and Laboratory of Molecular Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

6. Funding Source:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE), Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente (PPG-SCA), and Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

7. Conflict of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

8. References

[1] El-Faramawy AA, El-Shazly LB, Abbass AA, Ismail HA. Serum IL-6 and IL-8 in infants with biliary atresia in comparison to intrahepatic cholestasis. *Trop Gastroenterol.* 2011;32:50-5.

- [2] Pinto RB, Schneider AC, da Silveira TR. Cirrhosis in children and adolescents: An overview. *World J Hepatol.* 2015;7:392-405.
- [3] Bémour C, Butterworth RF. Nutrition in the management of cirrhosis and its neurological complications. *J Clin Exp Hepatol.* 2014;4:141-50.
- [4] Hardy S, Kleinman RE. Cirrhosis and chronic liver failure. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press 2007.
- [5] Leonis MA, Balistreri WF. Evaluation and management of end-stage liver disease in children. *Gastroenterology.* 2008;134:1741-51.
- [6] Sultan MI, Leon CD, Biank VF. Role of nutrition in pediatric chronic liver disease. *Nutr Clin Pract.* 2011;26:401-8.
- [7] Greer R, Lehnert M, Lewindon P, Cleghorn GJ, Shepherd RW. Body composition and components of energy expenditure in children with end-stage liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;36:358-63.
- [8] Baker A, Stevenson R, Dhawan A, Goncalves I, Socha P, Sokal E. Guidelines for nutritional care for infants with cholestatic liver disease before liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 2007;11:825-34.
- [9] Kang LI, Mars WM, Michalopoulos GK. Signals and cells involved in regulating liver regeneration. *Cells.* 2012;1:1261-92.
- [10] Mehta NM, Duggan CP. Nutritional deficiencies during critical illness. *Pediatr Clin North Am.* 2009;56:1143-60.
- [11] Clark IA. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18:335-43.
- [12] Shiraki M, Terakura Y, Iwasa J, Shimizu M, Miwa Y, Murakami N, et al. Elevated serum tumor necrosis factor-alpha and soluble tumor necrosis factor receptors correlate with aberrant energy metabolism in liver cirrhosis. *Nutrition.* 2010;26:269-75.
- [13] Narayanaswamy B, Gonde C, Tredger JM, Hussain M, Vergani D, Davenport M. Serial circulating markers of inflammation in biliary atresia--evolution of the post-operative inflammatory process. *Hepatology.* 2007;46:180-7.
- [14] Jian ZH, Wang LC, Lin CC, Wang J. The correlation between plasma cytokine levels in jaundice-free children with biliary atresia. *World J Pediatr.* 2015.
- [15] Young S, Kwarta E, Azzam R, Sentongo T. Nutrition assessment and support in children with end-stage liver disease. *Nutr Clin Pract.* 2013;28:317-29.
- [16] Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg.* 1973;60:646-9.
- [17] WHO. World Health Organization. Training Course on Child Growth Assessment. Geneva: World Health Organization; 2008.
- [18] WHO. Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization; 2006.
- [19] WHO. Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Head circumference-for-age, arm circumference-for-age, triceps skinfold-for-age and subscapular skinfold-for-age: Methods and development. . World Health Organization; 2007.
- [20] WHO. Anthro for personal computers, version 3, 2009: Software for assessing growth and development of the world's children. Geneva: World Health Organisation; 2009.
- [21] WHO. AnthroPlus for personal computers Manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents. Geneva: World Health Organisation; 2009.
- [22] Frisancho AR. Anthropometric standards: an interactive nutritional reference of body composition for children and adults. Michigan: Ann Arbor The University of Michigan Press 2008.
- [23] DRI. Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. Dietary reference intake for energy, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Food and Nutrition Board. Washington, DC: National Academy Press; 2002.
- [24] RDA. National Research Council. Recommended dietary allowances. 10th ed ed. Washington, D.C.: National Academy Press; 1989. p. 205-11.
- [25] Field A. Discovering statistics using SPSS. 3a ed. Thousand Oaks, CA.: Sage; 2009.

- [26] Mehta NM, Corkins MR, Lyman B, Malone A, Goday PS, Carney LN, et al. Defining pediatric malnutrition: a paradigm shift toward etiology-related definitions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2013;37:460-81.
- [27] Fuster D, Tsui JI, Cheng DM, Quinn EK, Armah KA, Nunes D, et al. Interleukin-6 is associated with noninvasive markers of liver fibrosis in HIV-infected patients with alcohol problems. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013;29:1110-6.
- [28] Fielding CA, Jones GW, McLoughlin RM, McLeod L, Hammond VJ, Uceda J, et al. Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. *Immunity.* 2014;40:40-50.
- [29] Wunsch E, Koziarska D, Milkiewicz M, Naprawa G, Nowacki P, Hartleb M, et al. In patients with liver cirrhosis, proinflammatory interleukins correlate with health-related quality of life irrespective of minimal hepatic encephalopathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2013;25:1402-7.
- [30] Santetti D, de Albuquerque Wilasco MI, Dornelles CT, Werlang IC, Fontella FU, Kieling CO, et al. Serum proinflammatory cytokines and nutritional status in pediatric chronic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2015;21:8927-34.
- [31] Kobayashi H, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T. Levels of circulating antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist and proinflammatory cytokines at different stages of biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 2002;37:1038-41.
- [32] Argilés JM, Busquets S, Felipe A, López-Soriano FJ. Molecular mechanisms involved in muscle wasting in cancer and ageing: cachexia versus sarcopenia. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:1084-104.
- [33] Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology.* 2000;118:655-60.
- [34] Świątek BJ. Is interleukin-10 gene polymorphism a predictive marker in HCV infection? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012;23:47-59.
- [35] Wu JF, Kao PC, Chen HL, Lai HS, Hsu HY, Chang MH, et al. A high serum interleukin-12p40 level prior to Kasai surgery predict a favourable outcome in children with biliary atresia. *Liver Int.* 2012;32:1557-63.
- [36] Hurtado-López EF, Larrosa-Haro A, Vásquez-Garibay EM, Macías-Rosales R, Troyo-Sanromán R, Bojórquez-Ramos MC. Liver function test results predict nutritional status evaluated by arm anthropometric indicators. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;45:451-7.
- [37] Saron ML, Godoy HT, Hessel G. Nutritional status of patients with biliary atresia and autoimmune hepatitis related to serum levels of vitamins A, D and E. *Arq Gastroenterol.* 2009;46:62-8.
- [38] Elkabbany ZA, Hamza RT, Mahmoud NH. Assessment of serum acylated ghrelin in children and adolescents with chronic liver diseases: relation to nutritional status. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:560516.
- [39] Monk JM, Woodward B. Elevated blood interleukin-10 levels and undiminished systemic interleukin-10 production rate prevail throughout acute protein-energy malnutrition in the weanling mouse. *Cytokine.* 2009;47:126-31.
- [40] Monk JM, Steevens TA, Hillyer LM, Woodward B. Constitutive, but not challenge-induced, interleukin-10 production is robust in acute pre-pubescent protein and energy deficits: new support for the tolerance hypothesis of malnutrition-associated immune depression based on cytokine production in vivo. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8:117-35.

8 ARTIGO TRÊS

BDNF AND NUTRITIONAL STATUS IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH CIRRHOSIS DUE TO BILIARY ATRESIA

M.I.A. Wilasco; C. Uribe-Cruz; D. Santetti; B. Pfaffenseller; C.T.L. Dornelles; T.R. Silveira

Em revisão na revista Annals of Nutrition and Metabolism

BDNF AND NUTRITIONAL STATUS IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH CIRRHOSIS DUE TO BILIARY ATRESIA

Maria Ines A. Wilasco^{a,b}; Carolina Uribe-Cruz^{a,c}; Daniele Santetti^d; Bianca Pfaffenseller^e; Cristina T. L. Dornelles^f; Themis R. da Silveira^{a,b,c}

^a Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology, Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil.

^b Graduate Program in Child and Adolescent Health. School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil.

^c Graduate Program in Gastroenterology. School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil.

^d School of Nutrition, Universidade do Vale do Rio dos Sinos. Av. Unisinos, 950, São Leopoldo, RS 93022-000, Brazil.

^e Laboratory of Molecular Psychiatry, Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil.

^f Department of Pediatrics, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (PED/HCPA). Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil.

Corresponding author:

Maria Inês A. Wilasco. Experimental Laboratory of Gastroenterology – Reserch center - Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Address: Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre-RS, Brazil. Phone number: + 55 51 33598847. Fax number: + 55 51 33598183. E-mail address: ineswilasco@gmail.com

Keyword: BDNF, Nutritional Status, Cirrhosis and Biliary Atresia

ABSTRACT

Background: Nutritional status in patients with cirrhosis is difficult to be properly assessed. Considering the relationship between BDNF with energy homeostasis, the main aim of this study is to evaluate the concentration of BDNF in children and adolescents with cirrhosis due to Biliary Atresia (BA) and correlate with nutritional status. **Methods:** 53 children and adolescents with cirrhosis due to Biliary Atresia and 33 healthy controls were enrolled in this study. Nutritional status was evaluated through anthropometric parameters and serum BDNF was measured by ELISA. Spearman coefficient was used to evaluate correlation between variables. **Results:** In cirrhosis group 28.8% were undernourished and in control group 100% were well-nourished. BDNF median values for the control and cirrhosis group were 28.5 pg/ml versus 9.0 pg/ml, respectively. BDNF was positively associated with both Standard Deviation Score for height-for-age ratio and Standard Deviation Score for triceps skinfold thickness-for-age ratio. **Conclusions:** Considering the association between BDNF and nutritional parameters in patients with cirrhosis, it may be a sensitive indicator of nutritional status in children and adolescents with chronic liver disease. Further studies must be conduct to clarify the role of BDNF in this population.

INTRODUCTION

Biliary atresia (BA) is a progressive, inflammatory cholangiopathy of infancy which leads to the obliteration of extrahepatic bile ducts [1, 2]. Although Kasai portoenterostomy may restore bile flow, the inflammation and injury continue to progress at a variable rates, leading to biliary cirrhosis in the majority of children, regardless of surgical intervention. As a result, patients with BA generally require liver transplantation [3].

BA is the main cause of cirrhosis in early childhood [4]. Children with cirrhosis are at high risk of developing nutritional deficiency, and severely malnourished infants with end-stage liver disease are at increased risk of pre and post-liver transplantation morbidity and mortality [5, 6]. The mechanisms of undernourishment and anorexia in cirrhosis are not completely understood. However, patients with cirrhosis are known to have both low energy intake and increased basal energy expenditure, which have been found to contribute to a hypermetabolic state [6, 7].

The nutritional assessment of children with cirrhosis is complicated by the presence of fluid retention, hepatomegaly and splenomegaly, all of which can distort anthropometric measurements. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is involved in food intake and weight control and contributes to the regulation of orexigenic and anorexigenic pathways. This neurotrophin also controls food intake behaviors through its effects on the energy homeostasis network [8]. BDNF acts as a satiety factor in the adult human brain, and its expression in the ventromedial hypothalamic nucleus and ventral tegmental area are essential for the adequate control of food intake [9].

Considering the relationship between BDNF and energy homeostasis, the main aim of this study was to evaluate BDNF concentrations in children and adolescents with cirrhosis due to BA and correlate with nutritional status.

METHODS

Patients

Eighty six children and adolescents aged 0-17 years were assessed between December/2006 and December/2011. All patients underwent nutritional assessments and were administered a demographic and clinical questionnaire. Children and adolescents of both groups are public hospital patients and therefore belong to the same socioeconomic status. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The study follows the norms of Resolution 466/12 that rules research on

humans. The CAEE number is 0317.0.001.000-10. Informed and written consent was obtained from the parents or legal guardians of all participating children and adolescents.

Fifty three participants with cirrhosis due to BA were enrolled. Inclusion criteria for this group were a diagnosis of BA made during surgery (Kasai operation) and a diagnosis of cirrhosis establish by clinical, laboratory, endoscopic and/or histological findings. Exclusion criteria for this group were the presence of any other chronic disease, current acute infection and hepatic encephalopathy. Patients received regular treatment with vitamin A, D, E, K, antacids, proton pump inhibitors, depending on individual requirements. No patients were on steroid treatment. The severity of liver disease was assessed according to the Child-Pugh classification, where category A corresponds to less severe disease, category B suggests moderate disease, and category C is indicative of more severe disease [10]. Subjects 12 years old or younger were also assessed by Pediatric End Stage Liver Disease (PELD) scores, while older participants were evaluated through Model for End-stage Liver Disease (MELD) scores. In both cases, higher values are indicative of more severe disease [11].

Due to the control group were matched by sex and age only 33 healthy well-nourished were recruited. Children scheduled for blood sampling as part of routine medical checkups or as a standard procedure prior to eligible minimal surgeries (such as excision of benign nevus or surgical correction of inguinal hernia and hypospadias) were enrolled. Exclusion criteria for this group were: premature birth, chronic or acute diseases, current dietary restrictions diet and use of medication except for prophylactic iron or oral vitamins.

Laboratory tests

Blood samples were collected between 08:00 and 12:00 a.m. after a fasting of at least 3 hours. Serum was immediately separated by centrifugation for 10 minutes at 1000g (4°C), and then stored at -80°C until subsequent analysis.

Serum samples were analyzed for the following parameters: creatinine, total bilirubin, conjugated bilirubin, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, alanine transaminase, gamma-glutamyl transferase, albumin, hematocrit and hemoglobin.

Serum BDNF was measured in duplicate using a commercial ELISA kit, according to manufacturer instructions (Millipore, USA).

Nutritional evaluation

Anthropometry was measured by one of the researchers according to procedures outlined in the WHO Training Course on Child Growth Assessment [12]. The following parameters were measured: height-for-age (H/A), mid upper arm circumference-for-age (MUAC/A) and triceps skinfold thickness-for-age (TSF/A). Standard Deviation Score (SDS)

was used for each of these values using WHO Standards [13] and Reference [14]. The WHO Anthro software, version 3.0 was used for the assessment of children under 5 years of age [13], while the WHO AnthroPlus software was used for children older than 5 years [14]. The Frisancho Anthropometric Standards were used to calculate SDS-MUAC/A and SDS-TSF/A for children older than 5 years [15].

Weight was considered an unreliable measure of nutritional status due the occasional presence of fluid retention in cirrhotic patients. Thus, the nutritional status of patients with cirrhosis was assessed as the lowest value of SDS-H/A and SDS-TSF/A and confirmed by SDS-MUAC/A. Undernourishment was established when SDS-H/A or SDS-TSF/A was \leq 2.00 SD for all ages. Well-nourishment was considered when SDS-H/A or SDS-TSF/A was between -1.99 and $+2.00$ for children under 60 months; between -1.99 and $+1.00$ for those older than 60 months. Overweight was established when SDS-H/A or SDS-TSF/A was above $+2.00$ for children under 60 months and above $+1.00$ for those older. When there was discrepancy between variables it was used the lowest value.

To evaluate nutritional status in control group were used SDS-H/A, SDS-BMI/A, SDS-MUAC/A and SDS-TSF/A. Adequate height was considered when SDS-H/A was ≥ 2.00 SD for all ages. Well-nourishment was established when SDS-BMI/A, SDS-MUAC/A and SDS-TSF/A were between -1.99 and $+2.00$ for children under 60 months; between -1.99 and $+1.00$ for those older than 60 months.

Dietary assessment

The patient's usual diet was assessed by a 3-day dietary-record (two non-consecutive weekdays and one-weekend day). Records were analyzed using Nutwin software (version 2.5). Data intake was expressed in crude amounts (g/day), in grams per kilogram of body and percent of dietary recommendation. Estimated Energy Requirement (EER) was used to compare food consumption, considering each subject's age, height and weight following as reference the Dietary Reference Intakes (DRI) [16] and Recommended Dietary Allowances (RDA) [17]. Our criteria to evaluate anorexia were daily food intake below 80% of EER, because reflect a food consumption less than 66% of the lower limit recommended to children with cirrhosis [18]. To better evaluate nutritional variables, patients were divided into four age groups: 0-24, 25-60, 61-120 and older than 120 months.

Statistical analysis

Variables were expressed as mean \pm SD or median and interquartile range (25th and 75th centiles), depending on their distribution. Normality of distribution was checked by the Kolmogorov-Smirnov test. Normally distributed variables were compared using Student's t

test and ANOVA. Asymmetrically-distributed variables were analyzed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests. Chi-square and Fisher's exact tests were used, whenever appropriate, for between-group comparisons of prevalence rates. Correlations between continuous and ordinal variables were assessed by Pearson or Spearman correlation coefficients, respectively. Linearity was tested and logarithm adjustment was performed. Backward multiple linear regression analysis was used to evaluate the association between BDNF and other biochemical and anthropometric parameters. Results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Demographic and clinical characteristics, and dietary assessment

The demographic and clinical characteristics of patients and controls are shown in Table 1. Age was expressed as median (25th-75th percentiles). Participant age ranged from 2-211 months in the cirrhosis group, and 4-162 months in the control group.

The average severity of cirrhosis patients was considered mild, since more than half of patients were classified as Child-Pugh A. Ten patients received PELD scores greater than 15 while all patients received MELD scores below 15.

Table 1 - Clinical and demographic characteristics

Characteristics	Cirrhosis group (n=53)	Control group (n=33)	P
Age (months)	23.6 (8.4-87.5)	28.6 (16.0-89.5)	0.647 †
Sex (male)	18 (34.0)	13 (39.4)	0.780 ††
Platelets (10 ³ /μL)	125 (90-197)	304 (247-361)	< 0.001 †††
Glucose (mg/dL) (n=25 / 33)*			
Insulin (μUI/ml) (n=25 / 33)*			
HOMA-IR (n=25 / 33)*			
Child-Pugh score			
A	31(58.5)		
B	16 (30.2)		
C	6 (11.3)		
PELD (n=46)			
< 15	36 (78.3)		
≥ 15	10 (21.7)		
MELD (n=7)			
< 15	7 (100)		
≥ 15	0 (0.0)		

PELD: Pediatric End Stage Liver Disease. MELD: Model for End-stage Liver Disease. HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment of insulin resistance. Age expressed as median (25th-75th percentiles). Sex, Child-Pugh scores, PELD scores and MELD scores are expressed as total number (%). † Mann-Whitney U-test. †† Chi-square test. ††† Student t-test. *n=25 in cirrhosis group; n=33 in control group.

The hospital policy is to intervene as soon as identified nutritional risk using, preferably, oral feeding. After analyzing the 3-day dietary-record, patients who do not reach

the minimum target of 120% of the recommended individual needs receive supplement. Those who do not support the energy needs orally receive enteral supplementation and those who cannot feed themselves receive exclusive enteral nutrition. Fifty patients were in oral feeding (33.9% of patients were supplemented by hypercaloric formula); two patients were in enteral feeding and one in both (oral and enteral feeding).

Biochemical analysis

All biochemical parameters were altered in the cirrhosis group, except for albumin levels. Biochemical results presented as median (25th – 75th percentiles) were as follows: Total bilirubin 2.0 mg/dL (0.6 – 9.4); conjugated Bilirubin 1.0 mg/dL (0.2 – 7.3); alkaline phosphatase 518 U/L (295 – 695); aspartate aminotransferase 113 U/L (65.5 – 198.5); alanine transaminase 84 U/L (42.5 – 143.0); gamma-glutamyl transferase 191 U/L (63 – 334). Albumin, hematocrit, hemoglobin and creatinine levels, presented as mean \pm (SD), were as follows: 3.71 g/dL \pm 0.63; 34.0 % \pm 5.2; 11.3 g/dL \pm 1.9; 0.34 mg/dL \pm 0.10, respectively.

Correlation between cirrhosis severity and biochemical results

In order to include the total sample in data analysis, Child-Pugh scores were used to evaluate correlations between cirrhosis severity and biochemical results. Correlations under 0.3 were considered weak, those between 0.3 to 0.59 were categorized as moderate, coefficients from 0.6 to 0.89 were indicative of strong correlations, and any values equal or above 0.9 were considered very strong. The results of correlations between cirrhosis severity and laboratory tests are shown in table 2.

After linear regression analysis the only characteristic that remained was albumin ($\beta=0.449$; $P=0.002$).

Table 2 – Correlation between Child-Pugh and laboratory tests

Biochemical data	Correlation rs	P
Alkaline phosphatase	0.479	<0.001
Aspartate aminotransferase	0.563	<0.001
Alanine transaminase	0.432	0.001
Hematocrit	-0.614	<0.001
Hemoglobin	-0.639	<0.001

rs: Spearman coefficient. Correlations < 0.3 were considered weak; 0.3 to 0.59, were considered moderate; 0.6 to 0.89 were considered strong, and those >0.9, very strong.

Nutritional evaluation

The age groups contained 27, 8, 11 and 7 patients respectively, and the prevalence of anorexia per group was as follows: 6/27 (24.0%), 4/8 (50.0%), 6/11 (54.5%) and 5/7 (83.3%). All four groups showed adequate protein intake according to the mean 3-day dietary-record:

3.07g/kg \pm 1.28, 3.00 g/kg \pm 1.23, 2.10 g/kg \pm 0.48 and 1.36 g/kg \pm 0.38. Energy intake levels (as % EER) were 138 \pm (60.1), 121 \pm (69.8), 93 \pm (15.1) and 79 \pm (19.5) in each of the four age groups, respectively. The oldest patients showed low energy intake, and percent EER was positively correlated with cirrhosis severity (rs=0.427; P=0.002).

Anthropometric data are show in table 3. Patient nutritional status was calculated based on SDS-H/A and SDS-TSF/A values, also presented in table 3. Only 15/52 patients were classified as malnourished.

Table 3 – Nutritional assessment based on anthropometric data

Characteristics	Cirrhosis group		Control group		P†
	n	n (%)	n	n (%)	
SDS-H/A	53		33		< 0.001
≤ -2.00		16 (30.2)*		0 (0.0)	
-1.99 to -1.01		17 (32.1)*		2 (6.1)	
-1.00 to +1.00		18 (34.0)		23 (69.7)*	
+1.00 to +1.99		2 (3.8)		6 (18.2)*	
≥ +2.00		0 (0.0)		2 (6.1)	
SDS-MUAC/A	52**		33		<0.001
≤ -2.00		11 (21.1)*		0 (0.0)	
-1.99 to -1.01		14 (26.9)*		0 (0.0)	
-1.00 to +1.00		21 (40.4)		31 (93.9)*	
+1.00 to +1.99		5 (9.6)		2 (6.1)	
≥ +2.00		1 (1.9)		0 (0.0)	
SDS-TSF/A	52**		33		0.002
≤ -2.00		9 (17.3)*		0 (0.0)	
-1.99 to -1.01		11 (21.2)*		1 (3.0)	
-1.00 to +1.00		28 (53.8)		30 (90.9)*	
+1.00 to +1.99		4 (7.7)		2 (6.1)	
≥ +2.00		0 (0.0)		0 (0.0)	
Nutritional Classification (SDS-H/A and SDS-TSF/A)#	52**		33		0.002
Undernourished		15 (28.8)*		0 (0.0)	
Well-nourished		36 (69.2)		33 (100)*	
Overweight		1 (1.9)		0 (0.0)	

SDS-H/A: standard deviation score for height-for-age; **SDS-MUAC/A:** standard deviation score for mid upper arm circumference-for-age; **SDS-TSF/A:** standard deviation score for triceps skinfold thickness-for-age. *Association significant at 5% according to adjusted residuals test. † Chi-square test (categorical variables) and Student's T- test (continuous variables). # the lowest of the two values was used for nutritional classification. **One patient showed standard deviation score below -0.01 SD and was excluded from the sample.

Serum BDNF concentration and correlations between nutritional evaluation

Serum BDNF concentrations were significantly lower in patients with cirrhosis as compared to controls (P=0.001) (Fig. 1). Median values for the control and cirrhosis groups were 28.5pg/ml (22.1-35.1) versus 9.0 pg/ml (4.3-20.1), respectively. BDNF was not significantly correlated with cirrhosis severity (rs= -0.161; P=0.251).

BDNF showed a weak positive correlation with SDS-H/A ($r_s=0.299$) (figure 2a) and a moderate positive correlation with SDS-TSF/A ($r_s=0.346$) (figure 2b). SDS-MUAC/A were not significantly correlated with BDNF ($r_s=0.093$ $P=0.625$).

DISCUSSION

The nutritional status of children with cirrhosis is difficult to be properly assessed due to fluid retention and organomegaly. The hospital policy on nutritional status is to intervene as soon as nutritional risk is identified. The early nutritional intervention associated with the low percentage of severe cases in the sample may explain why the number of malnourished children in our sample was lower than that reported in other similar investigations. Our study demonstrates 28.8% of malnutrition while others who evaluated the nutritional status in a similar way as Saron *et al*, Baran *et al* and Zamberlan *et al* showed percentages between 40 and 50% [19-21].

Bilirubin levels were above the upper limit described in reference values as is common in patients with BA [22, 23]. Albumin values were within the normal range, reflecting the fact that only a small percentage of patients were severely ill and/or malnourished [22, 24]. Hematocrit and hemoglobin levels were lower in cirrhosis patients than in controls, demonstrating a relationship between these parameters and clinical status. Blood BDNF proteins are stored in platelets [25], platelet count is often low in both cirrhosis and BA [26]. We found platelets count significantly lower in cirrhosis group when compared to the control group. Thus, we consider this result as expected.

The nutritional status of patients with cirrhosis was evaluated based on the lowest of SDS-H/A or SDS-TSF/A, since SDS-BMI/A is not a reliable measure in patients susceptible to fluid retention, and both SDS-H/A and SDS-TSF/A have been shown to be sensitive measures of undernourishment [6]. All anthropometric parameters were significantly lower in cirrhotic patients than in controls (table 3). According to our criteria for anorexia, it was more prevalent in older patients, despite the fact that the nutritional status of younger children is usually poorer [18]. This finding may be attributable to parental participation in the dietary control of younger patients. Percent EER showed a positive correlation with disease severity. This finding may be attributable to the nutritional interventions received by more severely ill patients. Sicker children may be prescribed higher calorie intakes in an attempt to improve their general condition.

Currently, BDNF is recognized for its role in energy homeostasis. This neurotrophin is known to interact with important pathways involved in energy expenditure and food intake,

and has therefore been increasingly investigated in weight control and nutrition research [8, 9, 27]. BDNF actions in metabolism have been currently investigated [8, 9, 27], so it is feasible that cirrhosis, a disease which affects an important metabolic site like liver must be investigated. An electronic database search revealed no comparative studies of BDNF and cirrhosis and/or BA. The main finding of the present study was a decreased concentration of BDNF in patients with cirrhosis due to BA (9.0 pg/ml) as compared to controls (28.5 pg/ml), possibly as a result of liver damage and subsequent effects on energy homeostasis. BDNF is expressed in many of the tissues involved in energy homeostasis (adipose tissue, muscles and liver), so that any damage to these sites might influence its actions on glucose metabolism [28, 29], energy expenditure [29] and food intake [28]. BDNF is involved in several complex processes and its expression is reduced by both stress and inflammation [30]. Inflammation associated with a poor nutritional status may result in decreased values of leptin in cirrhotic children [31], which associated with insulin resistance may lead to decreased BDNF values [32].

SDS-H/A and SDS-TSF/A were positively correlated with BDNF levels in patients with cirrhosis. These findings demonstrated that lower BDNF concentration more undernourished the subject (as defined by low SDS-H/A and/or SDS-TSF/A). BMI is not a good indicator of nutritional status in cirrhosis. However, some authors have identified inverse correlations between BDNF and BMI in subjects without end stage liver disease [8, 27]. BDNF deficiency may decrease satiety and lead to hyperphagia, resulting in the accumulation of body fat [33], according to these findings, Krabbe *et al.* have found low levels of BDNF in subjects with obesity and type 2 diabetes [34]. However, it is important to note that patients with diabetes show decreased BDNF levels regardless of obesity, suggesting that this neurotrophin may regulate obesity and insulin resistance by its actions on different mechanisms [35]. Knowledge regarding these pathways is important for the study of cirrhosis, since patients with this condition often exhibit alterations in glucose metabolism and develop insulin resistance. Although BDNF is known to be an important metabolic regulator with hypoglycemic properties related to weight control, its specific mechanisms of action are still not fully understood [8].

The major strength of our study was the uniformity of the cirrhosis group, made by our strict sample selection. Although limitations such as the wide age range should also be noted, we do not believe our findings were influenced by this issue, since nutritional assessments were done by SDS for age.

In conclusion, we found patients with cirrhosis to exhibit a lower concentration of BDNF than controls, and identified a positive correlation between BDNF levels, SDS-H/A and SDS-TSF/A. In light of its association with nutritional parameters in patients with less severe cirrhosis, BDNF may be a supporting biomarker of nutritional status in children and adolescents with chronic liver disease. However, these results should be interpreted with caution. Moreover, further studies must be performed to clarify the role of BDNF in this population.

ACKNOWLEDGEMENTS:

The authors would like to acknowledge the support and help provided by Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Experimental Laboratory of Gastroenterology and Hepatology and Laboratory of Molecular Psychiatry.

FUNDING SOURCE

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE), Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente (PPG-SCA) and Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare none conflict of interest.

AUTHORSHIP

M.I.A. Wilasco was responsible for conducting the study, analyzing data and drafting the manuscript; C. Uribe-Cruz contributed to study design and manuscript revision; D. Santetti participated in data collection; C. Dorneles helped with data collection and analysis. B. Pfaffenseller helped in laboratory assays; T.R. Silveira contributed to the design and execution of the study, and revised the final draft of the manuscript.

REFERENCES:

- 1 Mack CL, Sokol RJ: Unraveling the pathogenesis and etiology of biliary atresia. *Pediatr Res* 2005;57:87R-94R.
- 2 Santos JL, Carvalho E, Bezerra JA: Advances in biliary atresia: From patient care to research. *Braz J Med Biol Res* 2010;43:522-527.
- 3 Sokol RJ, Shepherd RW, Superina R, Bezerra JA, Robuck P, Hoofnagle JH: Screening and outcomes in biliary atresia: Summary of a national institutes of health workshop. *Hepatology* 2007;46:566-581.

- 4 Balistreri WF: Pediatric hepatology. A half-century of progress. *Clin Liver Dis* 2000;4:191-210.
- 5 Baker A, Stevenson R, Dhawan A, Goncalves I, Socha P, Sokal E: Guidelines for nutritional care for infants with cholestatic liver disease before liver transplantation. *Pediatr Transplant* 2007;11:825-834.
- 6 Nightingale S, Ng VL: Optimizing nutritional management in children with chronic liver disease. *Pediatr Clin North Am* 2009;56:1161-1183.
- 7 O'Brien A, Williams R: Nutrition in end-stage liver disease: Principles and practice. *Gastroenterology* 2008;134:1729-1740.
- 8 Rosas-Vargas H, Martínez-Ezquerro JD, Bienvenu T: Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity. *Arch Med Res* 2011;42:482-494.
- 9 Rios M: Bdnf and the central control of feeding: Accidental bystander or essential player? *Trends Neurosci* 2013;36:83-90.
- 10 Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R: Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60:646-649.
- 11 UNOS: United network for organ sharing. Allocation of livers – proposed amendment unos policy 3.6 – approved by optn/unos board of directors 2005,
- 12 WHO: World health organization. Training course on child growth assessment. Geneva, World Health Organization, 2008,
- 13 WHO: Anthro for personal computers, version 3, 2009: Software for assessing growth and development of the world's children. Geneva, World Health Organisation, 2009,
- 14 WHO: Anthroplus for personal computers manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents. Geneva, World Health Organisation, 2009,
- 15 Frisancho AR: Anthropometric standards: An interactive nutritional reference of body composition for children and adults. Michigan, Ann Arbor The University of Michigan Press 2008.
- 16 DRI: Food and nutrition board. Institute of medicine. Dietary reference intake for energy, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Food and nutrition board Washington, DC, National Academy Press, 2002,
- 17 RDA: National research council. Recommended dietary allowances. Washington, D.C., National Academy Press, 1989, pp 205-211.
- 18 Young S, Kwarta E, Azzam R, Sentongo T: Nutrition assessment and support in children with end-stage liver disease. *Nutr Clin Pract* 2013;28:317-329.
- 19 Saron ML, Godoy HT, Hessel G: Nutritional status of patients with biliary atresia and autoimmune hepatitis related to serum levels of vitamins a, d and e. *Arq Gastroenterol* 2009;46:62-68.
- 20 Baran M, Cakir M, Unal F, Tumgor G, Yuksekkaya HA, Arikan C, Kilic M, Aydogdu S: Evaluation of growth after liver transplantation in turkish children. *Dig Dis Sci* 2011;56:3343-3349.
- 21 Zamberlan P, Leone C, Tannuri U, Carvalho WB, Delgado AF: Nutritional risk and anthropometric evaluation in pediatric liver transplantation. *Clinics (Sao Paulo)* 2012;67:1387-1392.
- 22 El-Faramawy AA, El-Shazly LB, Abbass AA, Ismail HA: Serum il-6 and il-8 in infants with biliary atresia in comparison to intrahepatic cholestasis. *Trop Gastroenterol* 2011;32:50-55.
- 23 El-Guindi MA, Sira MM, Sira AM, Salem TA, El-Abd OL, Konsowa HA, El-Azab DS, Allam AA: Design and validation of a diagnostic score for biliary atresia. *J Hepatol* 2014;61:116-123.
- 24 Honsawek S, Chongsrisawat V, Vejchapipat P, Thawornsuk N, Tangkijvanich P, Poovorawan Y: Serum interleukin-8 in children with biliary atresia: Relationship with disease stage and biochemical parameters. *Pediatr Surg Int* 2005;21:73-77.
- 25 Türck P, Frizzo ME: Riluzole stimulates bdnf release from human platelets. *Biomed Res Int* 2015;2015:189307.
- 26 Kurokawa T, Zheng YW, Ohkohchi N: Novel functions of platelets in the liver. *J Gastroenterol Hepatol* 2015
- 27 Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C: The lighter side of bdnf. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;300:R1053-1069.
- 28 Yamanaka M, Itakura Y, Ono-Kishino M, Tsuchida A, Nakagawa T, Taiji M: Intermittent administration of brain-derived neurotrophic factor (bdnf) ameliorates glucose metabolism and prevents pancreatic exhaustion in diabetic mice. *J Biosci Bioeng* 2008;105:395-402.

- 29 Yamanaka M, Tsuchida A, Nakagawa T, Nonomura T, Ono-Kishino M, Sugaru E, Noguchi H, Taiji M: Brain-derived neurotrophic factor enhances glucose utilization in peripheral tissues of diabetic mice. *Diabetes Obes Metab* 2007;9:59-64.
- 30 Mondelli V, Cattaneo A, Belvederi Murri M, Di Forti M, Handley R, Hepgul N, Miorelli A, Navari S, Papadopoulos AS, Aitchison KJ, Morgan C, Murray RM, Dazzan P, Pariante CM: Stress and inflammation reduce brain-derived neurotrophic factor expression in first-episode psychosis: A pathway to smaller hippocampal volume. *J Clin Psychiatry* 2011;72:1677-1684.
- 31 Dornelles CT, Goldani HA, Wilasco MI, Maurer RL, Kieling CO, Porowski M, Ferreira CT, Santos JL, Vieira SM, Silveira TR: Ghrelin, leptin and insulin in cirrhotic children and adolescents: Relationship with cirrhosis severity and nutritional status. *Regul Pept* 2013;180:26-32.
- 32 Meek TH, Wisse BE, Thaler JP, Guyenet SJ, Matsen ME, Fischer JD, Taborsky GJ, Schwartz MW, Morton GJ: Bdnf action in the brain attenuates diabetic hyperglycemia via insulin-independent inhibition of hepatic glucose production. *Diabetes* 2013;62:1512-1518.
- 33 Fox EA, Byerly MS: A mechanism underlying mature-onset obesity: Evidence from the hyperphagic phenotype of brain-derived neurotrophic factor mutants. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R994-1004.
- 34 Krabbe KS, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Rasmussen P, Erikstrup C, Fischer CP, Lindegaard B, Petersen AM, Taudorf S, Secher NH, Pilegaard H, Bruunsgaard H, Pedersen BK: Brain-derived neurotrophic factor (bdnf) and type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007;50:431-438.
- 35 Pedersen BK, Pedersen M, Krabbe KS, Bruunsgaard H, Matthews VB, Febbraio MA: Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals. *Exp Physiol* 2009;94:1153-1160.

9 CONCLUSÕES

9 CONCLUSÕES

A partir dos objetivos deste estudo, podemos concluir:

- O estado nutricional e a gravidade da cirrose nas crianças e adolescentes atendidas no HCPA se mantém estáveis ao longo de aproximadamente uma década.
- A expressão sérica de IL-6, TNF- α e IL-10 foi mais elevada no grupo cirrose quando comparados ao grupo controle.
- Existiu uma correlação inversa entre as citocinas IL-6 e IL-10 e os parâmetros nutricionais.
- O grupo cirrose expressou menos BDNF que o grupo controle.
- O BDNF sérico dos pacientes do grupo cirrose apresentou correlação direta com os parâmetros nutricionais.

Assim podemos sugerir que a IL-6, a IL-10 e o BDNF podem contribuir como biomarcadores coadjuvantes para a avaliação do estado nutricional de crianças e adolescentes com cirrose por AB.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É amplamente conhecido que um estado nutricional adequado melhora a sobrevida e diminui as complicações nos hepatopatas, no entanto, grande parte destes pacientes apresenta consumo de nutrientes bem inferiores ao recomendado (Mattar *et al.*, 2005). Além do mais a desnutrição em crianças com doença hepática crônica nem sempre é simples de identificar (Tsiaousi *et al.*, 2008). Medidas que utilizam peso corporal podem superestimar o estado nutricional. Avaliações seriadas de dobra tricípital e circunferência do braço estimam o percentual de gordura e a massa muscular. Em presença de desnutrição estas medidas diminuem antes do peso e parecem sofrer menos influência do edema do que medidas de tronco e membros inferiores (Nightingale e Ng, 2009). Quanto mais grave está a doença, mais susceptível é o paciente ao desenvolvimento da desnutrição, em contrapartida, a melhora do estado nutricional acarreta uma melhoria nas condições clínicas do paciente (Kondrup, 2006).

No primeiro artigo avaliamos o estado nutricional de crianças e adolescentes com cirrose atendidos no HCPA. De forma predominante, o perfil dos pacientes nas duas séries avaliadas era de cirrose leve e este perfil se manteve no período de aproximadamente uma década. Podemos dizer que, considerando-se o estado nutricional e a gravidade da doença, foram encontrados baixos percentuais de desnutrição e de risco nutricional nas duas séries avaliadas. Estes resultados podem ser o efeito da intervenção nutricional comumente utilizada no HCPA.

No segundo artigo desta tese abordamos a eventual contribuição das citocinas em relação à doença hepática e ao estado nutricional. Nossos dados demonstraram que a expressão sérica de IL-6, TNF- α e IL-10 se encontrou aumentada no grupo cirrose quando comparada ao grupo controle. Encontramos, também, correlação direta moderada entre IL-6, IL-10 e a gravidade da doença, no entanto, não observamos uma correlação estatisticamente significativa com o TNF- α . A reduzida gravidade dos pacientes, o baixo percentual de

desnutrição da amostra e/ou o TNF- α ser um marcador sujeito a interferências de vários fatores podem justificar este achado. Após a ANCOVA, com intuito de detectar se os parâmetros antropométricos permaneciam independentemente associados com as citocinas, apenas a E/I, se manteve correlacionada. Para melhor entendimento desta relação, quanto mais comprometida a estatura das crianças e adolescentes, mais elevados são os níveis de IL-6 e IL-10 e, sendo a estatura um indicador utilizado para avaliar desnutrição nesta população, podemos concluir que quanto mais desnutridas maior a concentração de IL-6 e IL-10. Conforme os valores do eta-squared, a E/I explica 15,4% e 19,7% da variabilidade dos níveis de IL-6 e IL-10, respectivamente, enquanto que, para o TNF- α , este percentual é de, apenas, 3,6% e não apresentou significância estatística.

No terceiro artigo, estudamos o BDNF que, nos últimos tempos, tem se mostrado importante no estado nutricional, a ponto de ficar conhecido por sua participação na homeostase energética (Rios, 2014). Nós encontramos uma expressão sérica diminuída de BDNF no grupo cirrose, quando comparada ao grupo controle. Este achado pode ser atribuído aos danos à estrutura hepática, comum na cirrose, que podem levar à alteração da homeostase energética (Mondelli *et al.*, 2011). Encontramos, também, correlação positiva entre parâmetros nutricionais (E/I e a DCT/I) e o BDNF, demonstrando a estreita relação que existe entre o BDNF e o estado nutricional prejudicado.

Em resumo, a avaliação do estado nutricional de pacientes pediátricos com cirrose por AB poderá ser beneficiada pela contribuição dos biomarcadores IL-6, IL-10 e BDNF.

11 REFERÊNCIAS

11 REFERÊNCIAS

- AMITANI, M. et al. Control of food intake and muscle wasting in cachexia. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 10, p. 2179-85, Oct 2013. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23911307> >.
- ARGILÉS, J. M. et al. Molecular mechanisms involved in muscle wasting in cancer and ageing: cachexia versus sarcopenia. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 5, p. 1084-104, May 2005. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15743680> >.
- BETTLER, J.; ROBERTS, K. E. Nutrition assessment of the critically ill child. **AACN Clin Issues**, v. 11, n. 4, p. 498-506, Nov 2000. ISSN 1079-0713. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11288414> >.
- BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin, cachexia, and shock. **Annu Rev Med**, v. 39, p. 75-83, 1988. ISSN 0066-4219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3285792> >.
- BEUTLER, B. A.; MILSARK, I. W.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. **J Immunol**, v. 135, n. 6, p. 3972-7, Dec 1985. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999236> >.
- BORRELLI, E. et al. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. **Crit Care Med**, v. 24, n. 3, p. 392-7, Mar 1996. ISSN 0090-3493. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8625625> >.
- BRAUN, T. P.; MARKS, D. L. Pathophysiology and treatment of inflammatory anorexia in chronic disease. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 1, n. 2, p. 135-145, Dec 2010. ISSN 2190-5991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21475703> >.
- BÉMEUR, C.; BUTTERWORTH, R. F. Nutrition in the management of cirrhosis and its neurological complications. **J Clin Exp Hepatol**, v. 4, n. 2, p. 141-50, Jun 2014. ISSN 0973-6883. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755550> >.
- CARVALHO, E. et al. Biliary atresia: the Brazilian experience. **J Pediatr (Rio J)**, v. 86, n. 6, p. 473-9, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 1678-4782. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21140036> >.
- CLARK, I. A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 18, n. 3-4, p. 335-43, 2007 Jun-Aug 2007. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17493863> >.
- CORDEIRA, J.; RIOS, M. Weighing in the role of BDNF in the central control of eating behavior. **Mol Neurobiol**, v. 44, n. 3, p. 441-8, Dec 2011. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22012072> >.
- CORDEIRA, J. W. et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates hedonic feeding by acting on the mesolimbic dopamine system. **J Neurosci**, v. 30, n. 7, p. 2533-41, Feb 2010. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164338> >.
- D'AMBROSIO, R. et al. A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis. **Hepatology**, v. 56, n. 2, p. 532-43, Aug 2012. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271347> >.

DELANO, M. J.; MOLDAWER, L. L. The origins of cachexia in acute and chronic inflammatory diseases. **Nutr Clin Pract**, v. 21, n. 1, p. 68-81, Feb 2006. ISSN 0884-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16439772> >.

DOOLEY, J. S. et al. **Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System**. 12. Oxford, UK: Wiley Blackwell Ltda, 2011. 771.

DORNELLES, C. L. T. et al. **Terapia Nutricional em Crianças e Adolescentes com Cirrose: Uma Visão Atual**. Rev HCPA. Porto Alegre 2010.

DORNELLES, C. T. et al. Ghrelin, leptin and insulin in cirrhotic children and adolescents: relationship with cirrhosis severity and nutritional status. **Regul Pept**, v. 180, p. 26-32, Jan 2013. ISSN 1873-1686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23142314> >.

DORNELLES, C. T. L. **Comparação de grelina, leptina, insulina e glicose entre crianças e adolescentes cirróticos e hígidos**. 2010. 160 (Doutorado). Programa de pós graduação em saúde da criança e do adolescente (PPG-SCA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre.

DRI. **Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. Dietary reference intake for energy, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Food and Nutrition Board**. Washington, DC: National Academy Press 2002.

EVANS, W. J. et al. Cachexia: a new definition. **Clin Nutr**, v. 27, n. 6, p. 793-9, Dec 2008. ISSN 1532-1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18718696> >.

FIELD, A. **Discovering statistics using SPSS**. 3a. Thousand Oaks, CA.: Sage, 2009. 952.

FIELDING, C. A. et al. Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 40-50, Jan 2014. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412616> >.

FRISANCHO, A. R. **Anthropometric standards: an interactive nutritional reference of body composition for children and adults**. Michigan: Ann Arbor The University of Michigan Press 2008.

FUSTER, D. et al. Interleukin-6 is associated with noninvasive markers of liver fibrosis in HIV-infected patients with alcohol problems. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 29, n. 8, p. 1110-6, Aug 2013. ISSN 1931-8405. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23601055> >.

GERRIOR, S.; JUAN, W.; BASIOTIS, P. An easy approach to calculating estimated energy requirements. **Prev Chronic Dis**, v. 3, n. 4, p. A129, Oct 2006. ISSN 1545-1151. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978504> >.

GIRÓN-GONZÁLEZ, J. A. et al. Implication of inflammation-related cytokines in the natural history of liver cirrhosis. **Liver Int**, v. 24, n. 5, p. 437-45, Oct 2004. ISSN 1478-3223. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15482340> >.

GROSSBERG, A. J.; SCARLETT, J. M.; MARKS, D. L. Hypothalamic mechanisms in cachexia. **Physiol Behav**, v. 100, n. 5, p. 478-89, Jul 2010. ISSN 1873-507X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20346963> >.

GUNNARSDOTTIR, S. A. et al. Small intestinal motility disturbances and bacterial overgrowth in patients with liver cirrhosis and portal hypertension. **Am J Gastroenterol**, v. 98, n. 6, p. 1362-70, Jun 2003. ISSN 0002-9270. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818282> >.

HAMMERICH, L.; TACKE, F. Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. **Clin Exp Gastroenterol**, v. 7, p. 297-306, 2014. ISSN 1178-7023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25214799> >.

HARDY, S.; KLEINMAN, R. E. **Cirrhosis and chronic liver failure**. 3rd. Cambridge: Cambridge University Press 2007.

HIRANO, T.; ISHIHARA, K.; HIBI, M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. **Oncogene**, v. 19, n. 21, p. 2548-56, May 2000. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10851053> >.

HIRANO, T.; NAKAJIMA, K.; HIBI, M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 8, n. 4, p. 241-52, Dec 1997. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620640> >.

ISMAIL, M. H.; PINZANI, M. Reversal of hepatic fibrosis: pathophysiological basis of antifibrotic therapies. **Hepat Med**, v. 3, p. 69-80, 2011. ISSN 1179-1535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24367223> >.

JO, Y. H.; CHUA, S. C. The brain-liver connection between BDNF and glucose control. **Diabetes**, v. 62, n. 5, p. 1367-8, May 2013. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23613551> >.

KALAITZAKIS, E. et al. Gastrointestinal symptoms in patients with liver cirrhosis: associations with nutritional status and health-related quality of life. **Scand J Gastroenterol**, v. 41, n. 12, p. 1464-72, Dec 2006. ISSN 0036-5521. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17101578> >.

KASAI, M. Advances in treatment of biliary atresia. **Jpn J Surg**, v. 13, n. 4, p. 265-76, Jul 1983. ISSN 0047-1909. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6358590> >.

KAWAMURA, K. et al. Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 26, p. 9206-11, Jun 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15967989> >.

KENNEDY, G. C. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 140, n. 901, p. 578-96, Jan 1953. ISSN 0080-4649. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13027283> >.

KERNIE, S. G.; LIEBL, D. J.; PARADA, L. F. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. **EMBO J**, v. 19, n. 6, p. 1290-300, Mar 2000. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716929> >.

KOJIMA, H. et al. IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. **JAKSTAT**, v. 2, n. 4, p. e25763, Oct 2013. ISSN 2162-3988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24416650> >.

KONDRUP, J. Nutrition in end stage liver disease. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 20, n. 3, p. 547-60, 2006. ISSN 1521-6918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16782528> >.

LAMPELA, H. et al. Native liver histology after successful portoenterostomy in biliary atresia. **J Clin Gastroenterol**, v. 48, n. 8, p. 721-8, Sep 2014. ISSN 1539-2031. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275708> >.

LAPCHAK, P. A.; HEFTI, F. BDNF and NGF treatment in lesioned rats: effects on cholinergic function and weight gain. **Neuroreport**, v. 3, n. 5, p. 405-8, May 1992. ISSN 0959-4965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1633277> >.

LAZAR, M. A. How obesity causes diabetes: not a tall tale. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 373-5, Jan 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15662001> >.

LEE, B. N. et al. A cytokine-based neuroimmunologic mechanism of cancer-related symptoms. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 5, p. 279-92, 2004. ISSN 1021-7401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15316238> >.

LEE, U. E.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 25, n. 2, p. 195-206, Apr 2011. ISSN 1532-1916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21497738> >.

LIEDTKE, C.; TRAUTWEIN, C. The role of TNF and Fas dependent signaling in animal models of inflammatory liver injury and liver cancer. **Eur J Cell Biol**, v. 91, n. 6-7, p. 582-9, 2012 Jun-Jul 2012. ISSN 1618-1298. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22153863> >.

MACK, C. L.; SOKOL, R. J. Unraveling the pathogenesis and etiology of biliary atresia. **Pediatr Res**, v. 57, n. 5 Pt 2, p. 87R-94R, May 2005. ISSN 0031-3998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15817506> >.

MARCELLIN, P. et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. **Lancet**, v. 381, n. 9865, p. 468-75, Feb 2013. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23234725> >.

MATTAR, R. H. et al. [Nutritional status and intestinal iron absorption in children with chronic hepatic disease with and without cholestasis]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 81, n. 4, p. 317-24, 2005 Jul-Aug 2005. ISSN 0021-7557. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16106317> >.

MATTHEWS, V. B. et al. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. **Diabetologia**, v. 52, n. 7, p. 1409-18, Jul 2009. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19387610> >.

MCALLISTER, A. K. Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. **Cell Mol Life Sci**, v. 58, n. 8, p. 1054-60, Jul 2001. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11529498> >.

MCNAY, D. E. et al. Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 1, p. 142-52, Jan 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201680> >.

MEHTA, N. M. et al. Defining pediatric malnutrition: a paradigm shift toward etiology-related definitions. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 37, n. 4, p. 460-81, Jul 2013. ISSN 0148-6071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23528324> >.

MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration. **J Cell Physiol**, v. 213, n. 2, p. 286-300, Nov 2007. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17559071> >.

MOHAMED-ALI, V. et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 12, p. 4196-200, Dec 1997. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398739> >.

MONDELLI, V. et al. Stress and inflammation reduce brain-derived neurotrophic factor expression in first-episode psychosis: a pathway to smaller hippocampal volume. **J Clin Psychiatry**, v. 72, n. 12, p. 1677-84, Dec 2011. ISSN 1555-2101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21672499> >.

MONK, J. M. et al. Constitutive, but not challenge-induced, interleukin-10 production is robust in acute pre-pubescent protein and energy deficits: new support for the tolerance hypothesis of malnutrition-associated immune depression based on cytokine production in vivo. **Int J Environ Res Public Health**, v. 8, n. 1, p. 117-35, Jan 2011. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21318019> >.

MONK, J. M.; WOODWARD, B. Elevated blood interleukin-10 levels and undiminished systemic interleukin-10 production rate prevail throughout acute protein-energy malnutrition in the weanling mouse. **Cytokine**, v. 47, n. 2, p. 126-31, Aug 2009. ISSN 1096-0023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19541500> >.

MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289-95, Sep 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988703> >.

MORTON, G. J.; MEEK, T. H.; SCHWARTZ, M. W. Neurobiology of food intake in health and disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 15, n. 6, p. 367-78, Jun 2014. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840801> >.

NAWROTH, P. P. et al. Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. **J Exp Med**, v. 163, n. 6, p. 1363-75, Jun 1986. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3011946> >.

NELSON, D. R. et al. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. **Gastroenterology**, v. 118, n. 4, p. 655-60, Apr 2000. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10734016> >.

NIGHTINGALE, S.; NG, V. L. Optimizing nutritional management in children with chronic liver disease. **Pediatr Clin North Am**, v. 56, n. 5, p. 1161-83, Oct 2009. ISSN 1557-8240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19931069> >.

NONOMURA, T. et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy expenditure through the central nervous system in obese diabetic mice. **Int J Exp Diabetes Res**, v. 2, n. 3, p. 201-9, 2001. ISSN 1560-4284. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369708> >.

NORMAN, K.; PIRLICH, M. Gastrointestinal tract in liver disease: which organ is sick? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 11, n. 5, p. 613-9, Sep 2008. ISSN 1363-1950. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18685458> >.

NUMAKAWA, T. et al. BDNF function and intracellular signaling in neurons. **Histol Histopathol**, v. 25, n. 2, p. 237-58, Feb 2010. ISSN 1699-5848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20017110> >.

O'BRIEN, A.; WILLIAMS, R. Nutrition in end-stage liver disease: principles and practice. **Gastroenterology**, v. 134, n. 6, p. 1729-40, May 2008. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18471550> >.

OLMOS, G.; LLADÓ, J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 861231, 2014. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24966471> >.

ONESTI, J. K.; GUTTRIDGE, D. C. Inflammation based regulation of cancer cachexia. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 168407, 2014. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24877061> >.

PELLEYMOUNTER, M. A.; CULLEN, M. J.; WELLMAN, C. L. Characteristics of BDNF-induced weight loss. **Exp Neurol**, v. 131, n. 2, p. 229-38, Feb 1995. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7534721> >.

PFITZENMAIER, J. et al. Elevation of cytokine levels in cachectic patients with prostate carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 5, p. 1211-6, Mar 2003. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12599227> >.

PINTO, R. B.; SCHNEIDER, A. C.; DA SILVEIRA, T. R. Cirrhosis in children and adolescents: An overview. **World J Hepatol**, v. 7, n. 3, p. 392-405, Mar 2015. ISSN 1948-5182. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848466> >.

PLAUTH, M.; SCHÜTZ, E. T. Cachexia in liver cirrhosis. **Int J Cardiol**, v. 85, n. 1, p. 83-7, Sep 2002. ISSN 0167-5273. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163212> >.

POROWSKI, D. et al. Liver Failure Impairs the Intrahepatic Elimination of Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor-Alpha, Hepatocyte Growth Factor, and Transforming Growth Factor-Beta. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 934065, 2015. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26090463> >.

PUGH, R. N. et al. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. **Br J Surg**, v. 60, n. 8, p. 646-9, Aug 1973. ISSN 0007-1323. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4541913> >.

RDA. **National Research Council. Recommended dietary allowances**. Washington, D.C.: National Academy Press: 205-11 p. 1989.

RICCI, A. et al. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 30, n. 1, p. 12-9, Jan 2004. ISSN 1044-1549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12791675> >.

RIGOPOULOU, E. I. et al. Blocking of interleukin-10 receptor--a novel approach to stimulate T-helper cell type 1 responses to hepatitis C virus. **Clin Immunol**, v. 117, n. 1, p. 57-64, Oct 2005. ISSN 1521-6616. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006191> >.

RIOS, M. BDNF and the central control of feeding: accidental bystander or essential player? **Trends Neurosci**, v. 36, n. 2, p. 83-90, Feb 2013. ISSN 1878-108X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333344> >.

_____. Neurotrophins and the regulation of energy balance and body weight. **Handb Exp Pharmacol**, v. 220, p. 283-307, 2014. ISSN 0171-2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24668477> >.

SABAT, R. et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, n. 5, p. 331-44, Oct 2010. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115385> >.

SANTETTI, D. **Perfil inflamatório e estado nutricional de crianças e adolescentes com hepatopatia crônica**. 2013. 118 (Mestrado). Programa de pós graduação em saúde da criança e do adolescente (PPG-SCA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre.

SANTETTI, D. et al. Serum proinflammatory cytokines and nutritional status in pediatric chronic liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 29, p. 8927-34, Aug 2015. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26269683> >.

SCHNEIDER, A. C. et al. Low plasma zinc concentrations in pediatric patients with cirrhosis. **J Pediatr (Rio J)**, v. 85, n. 4, p. 359-64, 2009 Jul-Aug 2009. ISSN 1678-4782. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668912> >.

SCHNEIDER, A. C. R. **Avaliação de Zinco Plasmático em Crianças e Adolescentes com Cirrose**. 2006. 117 (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SCHUPPAN, D.; AFDHAL, N. H. Liver cirrhosis. **Lancet**, v. 371, n. 9615, p. 838-51, Mar 2008. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18328931> >.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-71, Apr 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766253> >.

SERGEANT, O. D.-A., FATIHA.; LAGADIC-GOSSMANN, D. Up-to-Date Insight About Membrane Remodeling as a Mechanism of Action for Ethanol-Induced Liver Toxicity. In: SHIMIZU, D. I. (Ed.). **Trends in Alcoholic Liver Disease Research - Clinical and Scientific Aspects**. China: InTech, v.1 2012. cap. 9, p.159-178.

SHIN, H. D. et al. Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 8, p. 901-6, Apr 2003. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668613> >.

SHIRAKI, M. et al. Elevated serum tumor necrosis factor-alpha and soluble tumor necrosis factor receptors correlate with aberrant energy metabolism in liver cirrhosis. **Nutrition**, v. 26, n. 3, p. 269-75, Mar 2010. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19695831> >.

SOKOL, R. J. et al. Screening and outcomes in biliary atresia: summary of a National Institutes of Health workshop. **Hepatology**, v. 46, n. 2, p. 566-81, Aug 2007. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17661405> >.

SOKOL, R. J.; STALL, C. Anthropometric evaluation of children with chronic liver disease. **Am J Clin Nutr**, v. 52, n. 2, p. 203-8, Aug 1990. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2375285> >.

SWIĄTEK, B. J. Is interleukin-10 gene polymorphism a predictive marker in HCV infection? **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 23, n. 1-2, p. 47-59, 2012 Feb-Apr 2012. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22390924> >.

TAUB, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 10, p. 836-47, Oct 2004. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15459664> >.

TSIAOUSHI, E. T. et al. Malnutrition in end stage liver disease: recommendations and nutritional support. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 23, n. 4, p. 527-33, Apr 2008. ISSN 1440-1746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18397483> >.

UNOS. **United Network for Organ Sharing. Allocation of livers – proposed amendment UNOS policy 3.6 – approved by OPTN/UNOS Board of Directors 2005**.

_____. **Questions and Answers for transplant candidates about the Liver allocation.** Richmond, VA.: United Network for Organ Sharing 2014.

WAN, S. et al. Hepatic release of interleukin-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients. **Am Heart J**, v. 133, n. 3, p. 335-9, Mar 1997. ISSN 0002-8703. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9060803> >.

WANG, C. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hypothalamic ventromedial nucleus increases energy expenditure. **Brain Res**, v. 1336, p. 66-77, Jun 2010. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20398635> >.

_____. Chronic administration of brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus reverses obesity induced by high-fat diet. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 5, p. R1320-32, May 2010. ISSN 1522-1490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164202> >.

WHO. Expert Committee. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. In: ORGANIZATION, W. H. (Ed.). **WHO Technical Reports Series.** Geneva, 1995.

_____. **Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development.** Geneva: World Health Organization 2006.

_____. **Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Head circumference-for-age, arm circumference-for-age, triceps skinfold-for-age and subscapular skinfold-for-age: Methods and development.** : World Health Organization 2007.

_____. **World Health Organization. Training Course on Child Growth Assessment.** Geneva: WHO 2008.

_____. Anthro for personal computers, version 3, 2009: Software for assessing growth and development of the world's children., Geneva, 2009a. Disponível em: < <http://www.who.int/childgrowth/software/en/> >.

_____. AnthroPlus for personal computers Manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents., Geneva, 2009b. Disponível em: < <http://www.who.int/growthref/tools/en/> >.

WILASCO, M. I. A. **Concentração de grelina, leptina, insulina e glicose em crianças eutróficas previamente hípidas.** 2010. 161 (Mestrado). Programa de pós graduação em saúde da criança e do adolescente (PPG-SCA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre.

WUNSCH, E. et al. In patients with liver cirrhosis, proinflammatory interleukins correlate with health-related quality of life irrespective of minimal hepatic encephalopathy. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 25, n. 12, p. 1402-7, Dec 2013. ISSN 1473-5687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24025977> >.

YAMAMOTO, M. et al. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. **Neurochem Res**, v. 21, n. 8, p. 929-38, Aug 1996. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895847> >.

YOUNG, S. et al. Nutrition assessment and support in children with end-stage liver disease. **Nutr Clin Pract**, v. 28, n. 3, p. 317-29, Jun 2013. ISSN 1941-2452. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466471>>.

12 ANEXOS

ANEXO 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido (projeto 06-457)

Termo de consentimento livre e esclarecido

Nome do estudo : Avaliação dos níveis plasmáticos de grelina e leptina em crianças com cirrose.

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS

Pesquisadores responsáveis: Dra. Themis Reverbel da Silveira (51-2101 8350) e Nutricionista Cristina Toscani Leal Dornelles (51-84213130)

1. Justificativa e objetivo deste estudo:

A GRELINA é um hormônio que aumenta o apetite e a LEPTINA diminui o apetite.

As crianças com cirrose apresentam pouco apetite, com ganho de peso e crescimento insuficientes. Pelo exame de sangue podemos saber se esses hormônios estão diminuídos ou não no organismo.

A proposta deste estudo é medir no sangue a quantidade dos hormônios envolvidos na fome, classificar o estado nutricional e a quantidade de alimentos que a criança está comendo.

2. Procedimento:

Serão coletados 2 ml de sangue para dosagem dos hormônios, das crianças com cirrose, em acompanhamento no Serviço de Pediatria/Unidade de Gastroenterologia, que necessitarão fazer coleta de sangue para o seu devido tratamento ou revisão de saúde. Não será realizada coleta adicional. Serão realizadas medidas de peso e comprimento ou estatura, circunferência do braço, prega cutânea tricóptica e prega subescapular. Será solicitado também o preenchimento de um registro de tudo o que a criança comer e beber durante 3 dias, para ser calculado.

3. Possíveis riscos e desconfortos:

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

4. Possíveis benefícios deste estudo:

O entendimento dos hormônios que agem no controle da fome em cirróticos poderão, no futuro, beneficiar outras crianças em situações semelhantes à de meu (minha) filho(a) atuando na prevenção da desnutrição.

5. Direito de desistência:

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

6. Confidencialidade:

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

7. Perguntas:

Uma das pesquisadoras discutiu as informações e ofereceu-se para responder perguntas e/ou dúvidas. No decorrer do estudo, poderei contactá-la no fone: 51-2101 7611.

8. Consentimento:

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

() sim () não

ASSINATURA DO(A) RESPONSÁVEL PELA CRIANÇA: _____

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

Assinatura do investigador responsável: _____

Porto Alegre, ____/____/____

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

19 / 10 / 06

v 06457

19/10/2006

06457

ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido (projeto 11-0048)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

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

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

1. Justificativa e Objetivo do estudo:

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

2. Procedimento:

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

3. Possíveis riscos e desconfortos:

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

4. Possíveis benefícios deste estudo:

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

5. Direito de desistência:

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

6. Confidencialidade:

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

7. Perguntas:

Na existência de dúvidas com relação à participação do estudo, o contato com os pesquisadores se dará pelo fone 51 991 70299 e 51 3359 8293, 10º andar. Serviço de Pediatria do HCPA. Outras dúvidas deverão ser dirigidas ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA através do telefone 51 33597640, 2º andar.

8. Consentimento:

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

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

() sim () não

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

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

Assinatura do investigador responsável: _____

Data: ____/____/____

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

19/10/2011
11.0048

MF

ANEXO 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido (projeto 06-458)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome do estudo

Níveis plasmáticos de grelina e leptina em crianças eutróficas de 2 meses a 10 anos.

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Pesquisadores responsáveis: Dra. Themis Reverbel da Silveira e Nutricionista Maria Inês de Albuquerque Wilasco

Telefones para contato: Dra. Themis (51-21018350) e Nutricionista Maria Inês (51- 98081209)

1. Justificativa e objetivo deste estudo:

A GRELINA é um hormônio que aumenta o apetite e a LEPTINA diminui o apetite. Pelo exame de sangue podemos saber se esses hormônios estão diminuídos ou não no organismo.

A proposta deste estudo é medir no sangue a quantidade dos hormônios envolvidos na fome, verificar peso, comprimento ou estatura, circunferência do braço, prega cutânea triциptal e subescapular.

2. Procedimento:

Será coletado 2 ml de sangue para dosagem dos hormônios das crianças em acompanhamento ambulatorial do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que necessitarão fazer coleta de sangue para o seu devido tratamento ou revisão de saúde. Não será realizada coleta adicional. Também será verificado peso, comprimento ou estatura, circunferência do braço, prega cutânea triциptal e prega subescapular.

3. Possíveis riscos e desconfortos:

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

4. Possíveis benefícios deste estudo:

O entendimento dos hormônios que agem no controle da fome poderão, no futuro, beneficiar outros indivíduos, atuando na prevenção da desnutrição e obesidade.

5. Direito de desistência:

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

6. Confidencialidade:

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

7. Perguntas:

Uma das pesquisadoras responsável discutiu as informações e ofereceu-se para responder perguntas e/ou dúvidas. No decorrer do estudo, poderei contatá-la no fone: 2101 7611.

8. Consentimento:

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa.

Autorizo o armazenamento do sangue coletado por até 5 anos.

Só serão realizadas outras pesquisas, após aprovação da Comissão de Ética e Pesquisa.

()SIM ()NÃO

ASSINATURA DO(A) RESPONSÁVEL PELA CRIANÇA: _____

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

Assinatura do investigador responsável: _____

Porto Alegre, ____/____/____

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

20/10/06

v 06458

18 OUT. 2005

Recibido
Nº 06458

ANEXO 4 – Termo de compromisso de utilização de amostras biológicas



Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

**Termo de Compromisso para Utilização de
Material Biológico e Informações Associadas**

Título do Projeto

**BIOMARCADORES DA SÍNDROME NA ANOREXIA-CAQUEXIA
EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM CIRROSE E
CONTROLES SAUDÁVEIS**

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos materiais biológicos estão mantidos em biorepositórios, bem como de suas respectivas informações associadas, contidas em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 20 de outubro de 2010.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Maria Inês de Albuquerque Wilasco	
Themis Reverbel da Silveira	
Clarissa Severino Gama	
Cristina Toscani Leal Dornelles	
Rafael Lucyk Maurer	
Juliana Silveira Andrade	

13 APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Pareamento entre os grupos

GRUPO CIRROSE										GRUPO CONTROLE			
ID	PAR	SEXO	IDADE (meses)	Δ%	ID	PAR	SEXO	IDADE (meses)	Δ%	ID	PARES	SEXO	IDADE (meses)
14C	200	F	11	-18,1	16D	52	F	110	-0,9	13	125C - 36D	F	95
35C	57	F	7	0,0	19D	179	F	153	3,9	18	193C - 35D	F	71
46C	137	M	20	20,0	20D	129	M	18	0,0	20	38D - 44D	F	4
48C	172	M	82	2,4	22D	182	M	7	14,3	52	133C - 16D	F	109
51C	188	F	51	-1,9	23D	82	F	32	0,0	55	72C	M	111
72C	55	M	113	-1,8	28D	238	F	7	14,3	57	35C - 211C	F	7
77C	163	M	9	-11,1	29D	80	M	55	1,8	80	29D	M	56
84C	150	F	24	-16,7	30D	189	F	15	6,7	82	23D	F	32
117C	146	F	5	20,0	31D	188	F	53	-5,7	83	33D	F	117
125C	13	F	96	-1,0	33D	83	F	113	3,5	86	39D	M	149
132C	179	F	158	0,6	34D	116	F	8	12,5	99	5D	F	150
133C	52	F	102	6,9	35D	18	F	67	5,9	116	9D - 34D	F	9
157C	200	F	7	20,0	36D	13	F	87	9,2	129	20D - 46D	M	18
161C	171	M	22	18,2	38D	20	F	4	0,0	137	46C - 197C	M	24
168C	163	M	9	-11,1	39D	86	M	144	3,5	146	117C - 213C	F	6
174C	147	F	20	-10,0	40D	164	F	211	16,7	147	174C - 202C	F	18
190C	184	M	7	-14,3	41D	232	F	60	1,7	150	84C	F	20
193C	18	F	70	1,4	42D	172	M	88	-4,6	155	201C - 12D	M	162
197C	137	M	22	9,1	44D	20	F	3	14,3	163	77C - 168C	M	8
199C	238	F	8	0,0	46D	129	M	17	5,9	164	40D	M	168
201C	155	M	178	-8,9						171	161C - 6D	M	26
202C	147	F	18	0,0						172	48C - 42D	M	84
211C	57	F	6	16,7						179	132C - 19D	F	159
213C	146	F	6	0,0						182	219C - 22D	M	8
219C	182	M	8	0,0						184	190C	M	6
2D	196	F	29	0,0						188	51C - 31D	F	50
5D	99	F	144	4,17						189	30D	F	16
6D	171	M	32	-18,8						196	2D	F	29
7D	206	F	18	0,0						200	14C - 157C	F	9
9D	116	F	9	0,0						206	7D	F	18
11D	232	F	66	-7,6						207	14D	F	47
12D	155	M	173	-6,4						232	11D - 41D	F	61
14D	207	F	45	-4,4						238	199C - 28D	F	8

Δ%: Variação percentual em meses de vida.

APÊNDICE 2 – Artigos publicados em coautoria durante o período do Doutorado

SANTETTI, D.; WILASCO, M.I.A.; DORNELLES; C.T.L; *et al.* Serum proinflammatory cytokines and nutritional status in pediatric chronic liver disease. *World J Gastroenterol*, v. 21, n. 29, p. 8927-34, Aug 2015. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26269683> >.

ANDRADE, J.S; WILASCO, M.I.A.; DORNELLES; C.T.L; *et al.* Serum levels of Brain-derived neurotrophic factor and cytokines and duration of breastfeeding in children and adolescents. *Clin Biomed Res*, v. 34 (1), p. 53-59, 2015. ISSN 2357-9730. Disponível em: < <http://seer.ufrgs.br/index.php/hcpa/issue/view/2297> >.