

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Avaliação de Parâmetros Neuropsicológicos,
Marcadores Periféricos de Alterações Gliais e
Estresse Oxidativo em Crianças Portadoras de Cirrose.**

Luciana Ribeiro

Tese de Doutorado

Orientador Prof. Dr. Flávio Kapczinski

2004

Ficha Catalográfica

Catálogo-na-Publicação

R484 Ribeiro, Luciana
Avaliação de parâmetros neuropsicológicos, marcadores periféricos de alterações gliais e estresse oxidativo em crianças portadoras de cirrose / Luciana Ribeiro ; orientador: Flávio Kapczinski. – 2004.
104 f.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

1. Cirrose hepática 2. Criança 3. Encefalopatia porto-sistêmica 4. Estresse oxidativo 5. Marcadores biológicos 6. Proteína ácida fibrilar da glia 7. Proteínas S100 8. Testes neuropsicológicos I. Kapczinski, Flávio Pereira II. Título

CDD 618.923624
NLM WI 725

(Bibliotecária responsável: Viviane Castanho - CRB-10/1130)

Agradecimentos

Prof. Flávio Kapczinski, meu orientador, pelos ensinamentos, estímulo e confiança dedicados a mim ao longo do período do meu doutorado.

Prof^a. Miriam Salvador e Ana Cristina Andreazza do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, pela análise cuidadosa das amostras, mas principalmente, pela inestimável disponibilidade para discutir os resultados.

Prof. Diogo O. Souza e Prof. Luis Valmor Cruz Portela do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela participação ativa nas discussões sobre os resultados, sugestões e análise de amostras.

Prof^a. Sandra Vieira e Prof^a. Themis R. da Silveira da Unidade de Gastroenterologia Pediátrica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela fundamental disponibilidade em compartilhar o acesso a seus pacientes.

Dr. Daniel Bocchese Nora do Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo difícil e demorado trabalho de avaliação clínica e neurológica dos casos e controles, bem como pela realização dos exames eletrofisiológicos.

Prof^a. Cleonice Bosa e Francesca Di Napoli do Instituto de Psicologia, Departamento de Psicologia do Desenvolvimento, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela cuidadosa avaliação psicológica dos casos e controles e pela presença constante nas discussões dos resultados.

A minha família, por acreditarem em mim e estarem sempre presentes.

Ao meu marido, João Vicente, pelo constante incentivo à busca de meus objetivos.

Índice

1. Introdução	6
2. Revisão da Literatura	9
2.1. Cirrose em Crianças	9
2.2. Encefalopatia porto-sistêmica	10
2.2.1. Apresentação clínica	12
2.2.2. Neuropatologia	13
2.2.3. Fatores etiológicos	14
2.2.4. Barreira hematencefálica	15
2.2.5. Alterações metabólicas	15
2.2.6. Níveis de amônia	16
2.2.7. Alterações no metabolismo de aminoácidos	17
2.2.8. Outras neurotoxinas	17
2.2.9. Proteína S100B e encefalopatia porto-sistêmica	18
2.2.10. Alterações na neurotransmissão	19
2.2.11. Diagnóstico da encefalopatia porto-sistêmica	19
2.2.11.1 Potenciais evocados	21
2.2.11.2 Eletroencefalograma	23
2.2.11.3 Testes psicométricos	23
2.3. Estresse Oxidativo	24
2.3.1. Propriedades do O ₂ e restrição pelo spin	25
2.3.2. Espécies reativas de oxigênio (ROS)	27
2.3.3. Peroxidação lipídica	29

2.3.4. Defesas antioxidantes	30
2.4. Estresse Oxidativo e Cirrose	32
2.5. Bibliografia	35
3. Objetivos	42
4. Fontes de financiamento	43
5. Artigo em Inglês	44
6. Artigo em Português	69
7. Anexos	94

1. Introdução

A cirrose é uma lesão do fígado definida histologicamente, caracterizada por um dano difuso e regeneração dos hepatócitos, um aumento do tecido conjuntivo (fibrose), e desorganização da arquitetura lobular e vascular. A encefalopatia porto-sistêmica é uma complicação freqüente da cirrose. Sua patogênese não está plenamente elucidada, embora exista consenso sobre a importância das neurotoxinas, em especial da amônia (Hazell & Butterworth, 1999). Em cérebros de pacientes cirróticos os neurônios encontram-se morfológicamente normais, mas os astrócitos mostram sinais da degeneração Alzheimer tipo II, com aumento do núcleo, marginação periférica da cromatina e nucléolo proeminente.

As alterações funcionais da encefalopatia porto-sistêmica (EPS) incluem modificações na permeabilidade da barreira hematencefálica, mudanças no metabolismo energético cerebral, um aumento do tono gabaérgico e alterações em vários sistemas neurotransmissores e seus receptores (Jalan et al, 2003; Albrecht & Jones, 1999). O fato de que alterações Alzheimer tipo II podem ser induzidas experimentalmente, em culturas de astrócitos, pela exposição à amônia, trouxe a idéia de que a EPS seria uma desordem de células gliais, sendo a alteração neuronal uma conseqüência (Häussinger et al, 2000).

A encefalopatia porto-sistêmica latente (EPSL) é uma síndrome na qual pacientes com doença hepática crônica apresentam anormalidades

neuropsicológicas ou eletroencefalográficas na ausência de alterações clínicas óbvias, mentais ou neurológicas. Nas duas últimas décadas a área de diagnóstico da EPSL tem sido intensamente pesquisada (Saxena et al, 2002). Os testes diagnósticos empregados para a detecção da EPSL são as medidas neuropsicológicas e eletrofisiológicas. Os defeitos mais precoces no estado mental são detectados por testagens neuropsicológicas. Todavia, esses testes são sabidamente influenciados pela idade, educação, nível sociocultural e pela repetição das testagens (Weissenborn et al, 1998). Testes eletrofisiológicos, eletroencefalogramas e potenciais evocados têm sido usados para identificar casos de encefalopatia porto-sistêmica latente (Nora et al, 2000). Dados comparando a relativa sensibilidade dos métodos eletrofisiológicos com as avaliações psicológicas para detecção de encefalopatia porto-sistêmica latente são inconclusivos (Sandford et al, 1988; Amodio et al, 1996). Existe evidência de que a EPSL afeta a qualidade de vida dos pacientes (Groeneweg et al, 1998), e, desse modo, necessita ser detectada e tratada.

O estresse oxidativo é definido como um estado de níveis mais altos de espécies reativas de oxigênio (ROS, e.g., O_2^- , OH^* , $ONOO^-$) do que das defesas celulares antioxidantes. A geração de ROS é proeminente pois a essas são geradas durante o metabolismo aeróbico. Em condições normais as ROS são eliminadas por defesas celulares antioxidantes enzimáticas (e.g., superóxido dismutase e catalase) e não enzimáticas (GSH e ácido úrico) e por antioxidantes encontrados na dieta tais como as vitaminas A, E e C. Se não removidas de maneira efetiva as ROS podem causar dano celular oxidativo

como, por exemplo, peroxidação das membranas lipídicas bem como dano as proteínas e DNA (Halliwell & Gutteridge, 2000; Mahadik et al., 2001).

Aumento do estresse oxidativo tem sido associado com doença hepática (Aboutwerat et al, 2003). Em consonância a hiperamoniemia, uma alteração bioquímica comum induzida pela insuficiência hepática crônica, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio superóxido e diminui a atividade de diversas enzimas antioxidantes no cérebro (Hazell, 1999). Além disso, pacientes com cirrose alcoólica descompensada têm um aumento na produção de ROS pelos neutrófilos não acompanhada por qualquer elevação nas atividades da glutathione peroxidase e da catalase. O tecido cerebral parece mais sensível ao estresse oxidativo, o qual resulta em dano neurológico causado pela doença hepática (Mahadik et al., 2001).

A S100B é uma proteína produzida e liberada pelos astrócitos, sua especificidade pode ser usada para identificar o envolvimento de tipos diferentes de células nervosas em condições patológicas. É considerada um marcador periférico de função glial. Seus níveis estão aumentados no líquido e/ou no sangue em danos agudos e crônicos do sistema nervoso central (SNC) (Portela et al, 2002; Schmidt et al., 2004; Donato, 2001). Aumentos na S100B podem refletir tanto um dano glial quanto uma gama de reações astrocitárias ao dano neuronal (Donato, 2001).

2. Revisão da Literatura

2.1. Cirrose em Crianças

A cirrose é uma lesão do fígado definida histologicamente, caracterizada por um dano difuso e regeneração dos hepatócitos, um aumento do tecido conjuntivo (fibrose), e desorganização da arquitetura lobular e vascular. Na aparência pode ser macro ou micronodular o que pode variar de uma área do fígado para outra, mas tipicamente, todo fígado está acometido. E é a alteração vascular que leva a um aumento da resistência ao fluxo sanguíneo, produzindo a hipertensão portal e suas conseqüências.

Muitas doenças hepáticas podem levar a cirrose. Em crianças, as duas formas mais comuns de cirrose são a pós-necrótica e a biliar – com causas, sintomas e tratamentos diferentes. As duas formas podem levar a insuficiência hepática e morte (Sokol & Narkewicks, 2003).

Na população pediátrica, a cirrose pós-necrótica é freqüentemente resultado de doenças agudas ou crônicas do fígado (p.ex. hepatite neonatal idiopática de células gigantes; hepatites virais; hepatites auto-imunes; hepatites induzidas por drogas) ou de alguns erros inatos do metabolismo (p.ex. síndrome de Alagille; deficiência de α 1-antitripsina; doença de Gaucher). A evolução da cirrose pode ser insidiosa, sem fase icterica visível. No momento do diagnóstico de cirrose a doença hepática de base pode estar ativa, com as provas de função hepática alteradas, ou pode estar inativa, com as provas de função hepática normais. A maioria dos casos de cirrose biliar resulta de

anormalidades congênitas dos dutos biliares (atresia biliar, cisto do colédoco, estenose do dito comum), tumores das vias biliares, doença de Caroli, doença de Byler, colangite esclerosante primária, hipoplasia da via biliar intra-hepática, e fibrose cística. Eventualmente, a cirrose pode advir de reações de hipersensibilidade a algumas drogas, como a fenitoína. Infestação por parasitas (*Fasciola*, *Ascaris*) pode ser a causa em crianças que vivem em zonas endêmicas (Lebental, 1996).

As complicações mais freqüentes da cirrose nas crianças incluem problemas nutricionais progressivos, alterações hormonais, o desenvolvimento de hipertensão portal e suas complicações, e encefalopatia porto-sistêmica. O hepatocarcinoma ocorre com maior freqüência em fígados cirróticos, em especial em pacientes com a forma crônica da tirosinemia hereditária ou após hepatites B e C de longa duração (Sokol & Narkewicks, 2003).

Até o momento, não existe tratamento comprovado para a cirrose, mas quando uma condição tratável ou um agente agressor são identificados, a progressão da doença pode ser alterada (Wiesner et al, 2001). Sendo assim, o diagnóstico precoce da doença e de suas complicações é fundamental para a melhoria da qualidade de vida do paciente e para evitar, ou postergar, danos futuros.

2.2. Encefalopatia porto-sistêmica

A encefalopatia porto-sistêmica (EPS) é uma síndrome multifatorial que é caracterizada por depressão do sistema nervoso central. Os sintomas são

progressivos e, nos casos mais graves, podem ocorrer alteração da consciência e coma. As causas da EPS são agrupadas em dois grupos: vasculares e parenquimatosas. As causas vasculares incluem uma série de condições patológicas em que metabólitos tóxicos são acumulados devido a um desvio vascular no fígado. Um exemplo de doença vascular “pura” é o *shunt* porto-cava congênito. As causas parenquimatosas de EPS incluem situações em que o suprimento sanguíneo do fígado é normal, mas o número de hepatócitos ativos está diminuído. Um exemplo de EPS parenquimatosa é a insuficiência hepática aguda devido à overdose de acetaminofeno. A maioria dos pacientes tem algum grau de insuficiência parenquimatosa associada a rearranjos vasculares (Albrecht, 1999).

Mais comumente a EPS aparece como complicação de doença crônica hepatocelular, que é consequência freqüente de cirrose alcoólica e hepatite crônica. Os precipitantes de insuficiência hepática aguda incluem hepatite viral aguda e overdose por drogas. Precipitantes comuns de EPS em pacientes com cirrose incluem aumento do influxo nitrogênio intestinal devido ao aumento da ingestão protéica, constipação ou sangramento gastrointestinal (freqüentemente proveniente de varizes esofágicas) (Rikkers et al, 1978). Outros precipitantes incluem diarréia, vômitos, hipóxia, anemia, hipotensão, hipoglicemia, desidratação, distúrbios hidroeletrólíticos ou ácido-básicos e procedimentos cirúrgicos. Drogas sedativas como benzodiazepínicos, barbituratos e morfina podem desencadear EPS. Quando algum destes fatores causa o episódio de EPS o tratamento freqüentemente é direcionado ao fator precipitante. Entretanto, EPS também pode se apresentar como uma condição crônica, sem

um precipitante claro. A EPS crônica é uma variante da síndrome, mais leve, que ocorre em pacientes com doença parenquimatosa do fígado e algum grau de derivação porto-sistêmica.

Pacientes com doença hepática crônica que não apresentam claramente a síndrome de EPS mas mostram algum grau de disfunção em testes psicológicos são agrupados na categoria de EPS latente ou subclínica. O tratamento convencional da insuficiência hepática (lactulose, restrições dietéticas) pode reverter os défices cognitivos na EPS latente (Jalan, 2003).

2.2.1. Apresentação Clínica

Freqüentemente os primeiros sintomas de EPS não são detectáveis com um exame clínico convencional, mas podem ser aparentes para familiares e amigos. Estes sintomas incluem alterações de personalidade refletindo uma disfunção de lobo frontal, como euforia, irritabilidade e apatia. Um decréscimo na velocidade verbal e resposta motora podem ocorrer, indo para uma redução dos movimentos espontâneos, olhar fixo e perseveração nos estágios mais graves. Outra manifestação comum no início da síndrome é a hipersônia, que pode evoluir para alteração do ciclo sono-vigília. Défices intelectuais podem aparecer, sendo detectados por testes psicológicos de orientação no tempo, espaço e pessoa, memória recente, subtrações seriais, escrita, desenho e reconhecimento espacial.

Em casos mais avançados sintomas neurológicos emergem. Estes sintomas incluem asterixis, aumento da intensidade dos reflexos, rigidez muscular,

clonus de tornozelo, fasciculação, marcha atáxica, posturas de descerebração, expressões faciais bizarras, sinal de Babinski, convulsões e coma (Hazell, 1999).

2.2.2. Neuropatologia

Há relatos de atrofia cerebral em tomografias de pacientes com EPS crônica e recorrente. Estes estudos incluem pacientes alcoolistas e, portanto, não fica claro se estas alterações são decorrentes do abuso de álcool ou da recorrência de EPS. Estudos com pacientes hepatopatas crônicos não-alcoolistas sem EPS grave indicam a presença de edema cerebral e atrofia cortical. Estas alterações morfológicas foram correlacionadas com escores de testes psicológicos e provas de função hepática. Os achados destes estudos indicam fortemente que a disfunção hepática pode levar a atrofia cortical. Entretanto, o exato mecanismo pelo qual a disfunção hepática produz a lesão neuronal ainda é desconhecido. Estas alterações morfológicas estão possivelmente envolvidas na gênese de alguns sintomas da EPS que não são reversíveis com o tratamento clínico ou transplante hepático. Como a perda neuronal não é responsável por todos os sintomas da síndrome, a maioria dos défices na performance cognitiva pode ser reversível com o transplante hepático e a EPS latente revertida com o tratamento clínico. Aparentemente as alterações metabólicas que causam a EPS induzem alguma neurotoxicidade, que em longo prazo podem causar perda neuronal (Haussinger et al, 2000).

O exame histológico de cérebros de pacientes cirróticos crônicos freqüentemente mostra astrocitose Alzheimer tipo II no córtex, putâmen, globo

pálido e cerebelo. Outro achado, nestes pacientes, é o aumento de receptores benzodiazepínicos periféricos (Basile et al, 1991).

2.2.3. Fatores etiológicos

O principal fator etiológico da EPS parece ser o acúmulo de substâncias neurotóxicas na circulação sistêmica. Em circunstâncias normais, estes compostos neurotóxicos são absorvidos pelo intestino e tirados da circulação sistêmica pelo fígado. Quando a função hepática está seriamente afetada, estes compostos ganham acesso direto à circulação, e passando pela barreira hematencefálica podem acumular no sistema nervoso central. Existem evidências de diversos mecanismos pelos quais estas toxinas poderiam prejudicar a função neuronal na EPS (Albrecht et al, 1999). Estes mecanismos incluem diminuição da atividade elétrica neuronal devido à ocupação de receptores cerebrais, inibição de bombas iônicas e inibição do metabolismo oxidativo neuronal. A maioria das substâncias neurotóxicas acumuladas na EPS são, provavelmente, metabólitos produzidos por bactérias entéricas. Muitas neurotoxinas implicadas foram isoladas em pacientes e modelos animais de EPS (Bengtsson et al, 1985; Cascino et al, 1982). Ainda não é sabido quais toxinas estão mais firmemente correlacionadas com a gravidade dos sintomas da EPS. Além dos níveis anormais de substâncias tóxicas, alterações na barreira hematencefálica podem ainda ser um fator contribuinte na gênese da EPS.

2.2.4. Barreira hematencefálica (BHE)

É possível que a falência hepática possa induzir a alterações na permeabilidade da BHE. Algumas das substâncias acumuladas na insuficiência hepática, como a amônia, metil-octanoato, mercaptanos, fenol ou dehidrocolato podem aumentar a permeabilidade da BHE por vários mecanismos. Estes mecanismos incluem uma ação deficitária das enzimas envolvidas na regulação do fluxo sanguíneo transcilar, mudanças na função dos sistemas de transporte gliais e um aumento na fluidez da membrana (Goldstein, 1984). Existem evidências que a permeabilidade da BHE está aumentada para moléculas polares (como os aminoácidos) na EPS. Porém, existem evidências sugerindo que o aumento de permeabilidade é não-específico, incluindo substância polares e apolares (Zaki et al, 1983). Estes achados de aumento de permeabilidade da BHE são mais consistentes em casos de falência hepática fulminante. Existem poucas evidências em relação a estes aspectos na doença hepática crônica.

2.2.5. Alterações metabólicas

Há relatos de concentrações elevadas de substâncias potencialmente tóxicas na EPS. Estes achados levaram a várias teorias sobre a gênese dos sintomas da EPS. Até hoje, nenhuma destas teorias foi aprovada ou desaprovada conclusivamente. Devido à vasta gama de alterações metabólicas e sintomas múltiplos na EPS é muito provável que a etiologia desta síndrome seja multifatorial (Hazell & Butterwoth, 1999).

2.2.6. Níveis de amônia

Esta é a mais antiga teoria que indica uma causa metabólica para a EPS. A amônia é certamente neurotóxica e as evidências sugerem que a EPS pode resultar em parte devido aos níveis aumentados desta molécula (Rikkens et al, 1978). Os intestinos são a maior fonte de amônia, onde é gerada pela degradação de aminas, aminoácidos e uréia por bactérias entéricas. Na insuficiência hepática, a amônia produzida pelos intestinos desvia do fígado chegando à circulação sistêmica em altas concentrações. A disfunção do fígado também reduz a conversão de amônia e glutamina em uréia, pelo ciclo da uréia de Krebs-Hensleit, o que resulta num acúmulo ainda maior desse metabólito. Vários estudos mostraram que o aumento dos níveis de amônia inativam a bomba iônica que transporta ativamente o cloro para fora da célula. O resultado deste bloqueio do canal de cloro é a diminuição da efetividade da inibição pós-sináptica, o que leva ao aumento da excitação neuronal podendo gerar hiper-reflexia e convulsões. Aumentos ainda maiores de amônia diminuem a formação de potenciais pós-sinápticos o que produz um bloqueio pré-sináptico e depressão geral do sistema nervoso central. Hiperamoniemia também induz a alterações deletérias na atividade da Na/K ATPase, do ciclo do ácido tricarboxílico e da rota da glicólise. Entretanto, os níveis séricos de amônia não se correlacionam com a gravidade da EPS, o que questiona a importância da amônia na etiologia desta afecção. Outra evidência contra o papel central da amônia na EPS é que a hemodiálise não traz melhora dos sintomas de EPS. Pacientes que foram à diálise mostraram melhora em menos de 50% dos casos e alguns tiveram piora dos sintomas neurológicos (Goldstein et al, 1984). Outro argumento contra a hipótese da amônia é que a intoxicação

por amônia não produz as mudanças na personalidade ou as alterações no padrão de sono tão comumente observados nos estágios iniciais da EPS (Jalan et al, 2003).

2.2.7. Alterações no metabolismo dos aminoácidos

Tem sido proposto que alterações no metabolismo de aminoácidos também possam contribuir para a síndrome de EPS. Existem evidências que na EPS os níveis de aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano) estejam aumentados. Alguns aminoácidos aromáticos, particularmente o triptofano, podem ser diretamente neurotóxicos. A neurotoxicidade aparece pela habilidade dos aminoácidos de prejudicar a síntese de catecolaminas, e de servirem com precursores de falsos neurotransmissores como a octopamina e a feniletanolamina. Estes falsos neurotransmissores deslocam a dopamina e a noradrenalina das vesículas sinápticas, aumentando a sua degradação. Além de depletar as reservas de monoaminas, os falsos neurotransmissores podem suprimir a sua síntese. Assim, anormalidades no metabolismo dos aminoácidos podem ocorrer na PSE, mas seu papel na gênese da síndrome ainda não está bem esclarecido (Cascino et al, 1982).

2.2.8. Outras neurotoxinas

Substâncias como os mercaptanos, ácidos graxos e fenóis têm sido implicados na EPS. Eles podem ser neurotóxicos em certos níveis e são potencialmente acumulados na EPS. Não existem evidências consistentes de que estas substâncias possam produzir sozinhas a EPS. Entretanto, existem evidências

de que a ação destas substâncias possa ser potencializada pela co-existência de mais de uma toxina ao mesmo tempo (Albrecht et al, 1999).

2.2.9. Proteína S100B e encefalopatia porto-sistêmica

A proteína S100B é considerada um marcador sensível de dano cerebral, seus níveis estão aumentados no líquido e/ou no sangue de pacientes com danos agudos e crônicos do sistema nervoso central, como HTLV-I, esquizofrenia e acidente vascular cerebral (Herrmann et al, 2000; Lara et al, 2001; Walz et al, 2000). A S100B é uma proteína ligante de cálcio produzida fisiologicamente e liberada pelos astrócitos. Assim a especificidade dessa proteína pode ser usada para entender o envolvimento de tipos diferentes de células nervosas em condições patológicas. Aumentos na S100B podem refletir tanto um dano glial ou a uma gama de reações astrocitárias ao dano neuronal (astroglíose reativa), que pode desempenhar um papel neuroprotetor (Donato et al, 1999).

Com relação a S100B e a doença hepática, um estudo de células gliais por imunorreatividade para S100B em cérebros de pessoas com encefalopatia não mostrou alterações significantes (Kimura et al, 1986). Ainda, o aumento dos níveis de S100B em porcos após uma insuficiência hepática aguda induzida cirurgicamente indica que a determinação dos níveis séricos dessa proteína possa trazer informações úteis quanto à presença e a extensão da pressão intracraniana; mas não com relação com os níveis de amônia (Ytrebo et al, 2000).

2.2.10. Alterações na neurotransmissão

Alterações em vários sistemas de neurotransmissão foram implicadas na EPS. Devido às mudanças no metabolismo dos aminoácidos induzidas pela insuficiência hepática, os sistemas de neurotransmissão mais investigados na EPS foram os de aminoácidos e das aminas biogênicas. Existem algumas evidências do envolvimento dos sistemas serotoninérgicos, catecolaminérgicos e aminoácido excitatórios. Elevações nos níveis de serotonina no cérebro parecem contribuir para as manifestações da EPS. Entretanto, o metabolismo de serotonina parece ser o mesmo em cirróticos com e sem EPS. Ainda, nenhuma correlação foi encontrada entre o metabolismo de serotonina e o status neurológico. Em modelos animais de EPS os níveis de noradrenalina estavam diminuídos em alguns relatos. Entretanto não se sabe se a depleção de noradrenalina no cérebro tem relação causal com os sintomas de EPS. A diminuição da atividade dos sistemas excitatórios do glutamato e aspartato foram também postuladas como um fator de contribuição para os sintomas da EPS. Mais recentemente, o sistema gabaérgico também foi implicado na gênese da EPS (Mullen et al, 1993; Basile et al, 1991).

2.2.11. Diagnóstico da encefalopatia porto-sistêmica

A encefalopatia porto-sistêmica latente pode acometer 60-85% dos cirróticos, com variações na literatura de 10 a 100% (Mullen,1993). Estas grandes variações na freqüência ocorrem, basicamente, pelas diferentes técnicas e valores empregados na sua detecção (Mehndiratta, 1990). Os pacientes parecem clinicamente bem (exame clínico normal), porém exibem sutil disfunção cerebral ao estudo neurofisiológico.

A identificação dos pacientes com encefalopatia porto-sistêmica latente ou subclínica, adquire grande importância, pois o diagnóstico precoce pode melhorar a conduta e , assim, a qualidade de vida do paciente (Arria et al, 1991).

Os métodos para a sua detecção são os testes psicométricos, o eletroencefalograma e os potenciais evocados. Os testes psicométricos são, atualmente, reconhecidos como o padrão ouro na detecção das formas iniciais de encefalopatia. O eletroencefalograma tem se mostrado pouco sensível na detecção das formas latentes da encefalopatia. Os potenciais evocados aparecem como um método promissor na detecção desta entidade. Alterações da latência da onda N1 foram descritas em potenciais evocados visuais, avaliados por estímulo flash, em pacientes cirróticos sem clínica de encefalopatia, tanto em adultos (Casellas et al, 1986), quanto em crianças e adolescentes (Nora et al., 2000).

A encefalopatia porto-sistêmica clinicamente manifesta apresenta características variáveis que dependem da extensão e rapidez do dano hepático, o grau de shunts porto-sistêmicos e a contribuição de fatores desencadeantes. Uma escala clínica de graduação da EPS, baseada no estado de consciência, tem sido proposta, tal como estágio 0 compreende ausência de alterações de consciência, função intelectual, personalidade ou comportamento; estágio I, hipersônia, insônia, euforia ou ansiedade, perda da atenção, irritabilidade; estágio II, letargia, desorientação, alteração na cognição, fala arrastada, comportamento inadequado; estágio III, sonolência, confusão

acentuada, manutenção da resposta a estímulos nocivos; estágio IV, coma, perda das respostas aos estímulos nocivos (Mullen et al., 1999).

2.2.11.1 Potenciais Evocados

Os potenciais evocados são sinais elétricos volume conduzidos e registrados por eletrodos extracelulares. Correspondem as respostas de grupos neuronais a estímulos externos. São representados por ondas, também chamados de potenciais, que representam o processamento e a condução de informações sensitivas em vias específicas dentro do sistema nervoso. Estas ondas são estudadas através das amplitudes e latências de seus componentes. Os estímulos podem ser auditivos, visuais ou somatosensitivos. O papel exato dos potenciais evocados na detecção da encefalopatia porto-sistêmica não está totalmente elucidado, existindo tendências que mostram que são métodos promissores e úteis na detecção desta patologia. As técnicas de registro dos potenciais evocados não são invasivas e apresentam uma boa resolução temporal, permitindo o estudo de alterações dinâmicas no sistema nervoso (Hoyt et al, 1982).

Potencial Evocado Auditivo de Tronco Cerebral (PEATC)

Os PEATCs são eliciados por estímulos sonoros através de cliques de curta duração, sendo o registro dos potenciais feitos no escalpo. A estimulação acústica do oitavo nervo craniano é seguida pela estimulação de outras partes da via auditiva no tronco cerebral. Destes estímulos são geradas sete ondas (I a VII), sendo que as que apresentam maior relevância clínica são as ondas I, III e V, por serem mais constantes e geradas em estruturas mais importantes. A

onda I é formada, provavelmente, no nervo auditivo, a onda III no bulbo e a onda V nos colículos inferiores do mesencéfalo. Ellingson et al (1995), estudando pacientes candidatos a transplante hepático, sugere que o PEATC é um método sensível mas não específico na detecção da encefalopatia porto-sistêmica, inclusive em formas incipientes. Os resultados em crianças abaixo de 3 anos não estão claramente padronizados.

Potencial Evocado Visual (PEV)

Os PEVs são exames onde a via visual é estimulada através de estímulos luminosos, levando a formação de ondas. Estes estímulos podem ser por flash ou por padrão reverso, sendo os potenciais captados no escalpo, nas regiões occipitais próximas ao córtex visual primário. O estímulo por padrão reverso é um exame mais fidedigno na detecção de alterações na via visual, mas requer a colaboração do paciente que necessita fixar o olhar em uma tela. Esta forma de estímulo é de difícil obtenção na população pediátrica, mas, atualmente, cada vez mais utilizado, pois permite a obtenção de resultados mais reproduzíveis e confiáveis. Zeneroli et al (1984) concluíram que o PEV é um método adequado na detecção dos diferentes graus de encefalopatia em pacientes com cirrose hepática. Estudos posteriores não confirmaram estes achados (Johanson, 1989; Weissenborn, 1990), sendo que o valor dos PEVs no diagnóstico da encefalopatia porto-sistêmica continua controverso. Nora e colaboradores (2000), encontraram prolongamento da latência, de forma significativa, do componente N1, em estudo onde foram analisados apenas crianças e adolescentes sendo utilizado o estímulo de flash. Não existem estudos na literatura que utilizem o potencial evocado por padrão reverso em

crianças e adolescentes com cirrose, candidatos a transplante hepático, na busca de alterações que sugiram a presença de encefalopatia porto-sistêmica.

2.2.11.2 Eletroencefalograma (EEG)

O EEG mostra-se um método útil no diagnóstico da encefalopatia porto-sistêmica, principalmente nos graus mais severos, onde as alterações são mais evidentes. Há uma gradual lentificação nos ritmos alfa sendo que são gradualmente substituídos por ritmos mais lentos: theta e delta. Com a evolução da doença há o aparecimento de ondas lentas trifásicas, geralmente simétricas e sincrônicas nos dois hemisférios de forma mais intensa nas regiões frontais. A amplitude dos potenciais diminui com a progressão do quadro, sendo que ocorre um abafamento importante da atividade cortical nos graus mais severos da doença. Estas alterações são comuns a todas as formas de encefalopatias metabólicas difusas, portanto, sendo pouco específicas na detecção da encefalopatia porto-sistêmica. Em 1957, Parson-Smith et al, recomendaram um sistema de graduação eletroencefalográfica para os diferentes graus de EPS, graduação esta que, com pequenas variações, é utilizada até hoje.

2.2.11.3 Testes Psicométricos

Atualmente uma bateria de testes psicométricos é recomendada para detectar a encefalopatia porto-sistêmica, principalmente na sua forma subclínica (Conn, 1994). Estes testes são influenciados por variáveis que incluem idade, grau de educação e status econômico (Mehndiratta, 1990). Os testes mais utilizados são os testes de conexão numérica, de orientação no tempo e no espaço,

cópia de estrelas de 5 pontas, memória episódica entre outros (Tarter et al, 1990; Conn, 1977). Estes testes são considerados o padrão-ouro na detecção da encefalopatia porto-sistêmica latente. Nas crianças, como são exames de difícil realização, têm sido pouco utilizados.

2.3. Estresse Oxidativo

Os radicais de oxigênio e seus derivados podem ser mortais as células. O radical hidroxila causa dano oxidativo a proteínas, DNA, membranas lipídicas contendo ligações poliinsaturadas, e outros componentes. Em alguns casos as espécies reativas de oxigênio de oxigênio são a causa direta da doença (ex: lesão de tecidos iniciada pela exposição à radiação ionizante). Em outros casos, como na artrite reumatóide, as espécies reativas de oxigênio (ROS) pode potencializar os danos celulares iniciados por outros processos. Células granulomatosas e neutrófilos usam as ROS para destruir organismos estranhos durante a fagocitose (Dröge, 2002).

As células têm um bom número de mecanismos para protegê-las das ROS que naturalmente e continuamente são formadas fisiologicamente. O estresse oxidativo ocorre quando a taxa de geração de ROS ultrapassa a capacidade de sua remoção pela célula .

O estresse oxidativo desempenha um importante papel em várias condições clínicas, como câncer, diabete, aterosclerose, lesões por isquemia e reperfusão, doença de Parkinson, de Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica.

Nos últimos anos têm surgido, também, evidências de correlação entre as ROS e alguns transtornos neuropsiquiátricos, como a esquizofrenia e a mania (Atluntas, 2000; Mahadik et al, 2001). Atualmente muitas pesquisas vêm sendo realizadas nesse campo, no entanto, a dificuldade de detecção de espécies ativas *in vivo* e em diferentes tecidos e patologias tem sido um fator limitante.

A presença das espécies reativas de oxigênio (ROS) em materiais biológicos foi descoberta a menos de 50 anos e logo associada à indução de danos celulares, mutagênese e carcinogênese. A ciência das espécies reativas de oxigênio entrou em uma segunda era quando McCord e Fridovich descobriram a enzima superóxido dismutase e mostraram a importância dos RL em mecanismos biológicos. Atualmente, os estudos nessa área entram na terceira era, com a descrição detalhada de uma série de efeitos benéficos gerados pelos RL, incluindo regularização do tônus vascular, controle da ventilação, relaxamento muscular, controle da produção de eritropoetina, controle de receptores de membrana, modulação das funções imunológicas e manutenção da homeostase redox celular (Halliwell & Gutteridge, 2000).

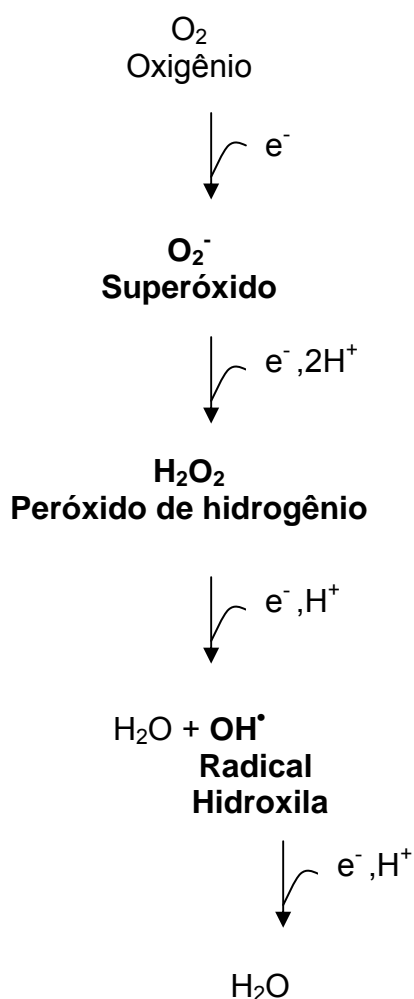
2.3.1. Propriedades do Oxigênio e a Restrição pelo spin

A característica do O_2 que é a responsável pelo desenvolvimento da vida em ambientes ricos em oxigênio é a presença de dois elétrons não-pareados com spins paralelos. Moléculas orgânicas típicas que servem de substrato para a oxidação não contém elétrons não-pareados; sua camada externa está na forma estável de dois elétrons com spins antiparalelos. Para o O_2 aceitar um par de elétrons do substrato, um dos elétrons deve inverter seu spin. Existe

uma grande barreira termodinâmica para inversão de spin, e ela deve ocorrer através de vários passos com altas energias de ativação. A barreira cinética resultante desta restrição pelo spin lentifica o processo direto de oxidação das ligações C-H das moléculas orgânicas e detém a combustão espontânea dos combustíveis (Fridovich, 1998).

Reduções de um elétron no O_2 não estão sujeitas à barreira cinética imposta pela restrição de spin, e ocorrem na presença de doadores de um elétron. A redução do oxigênio por passos de um elétron gera superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (Fig 1).

Figura 1: Passos de um-elétron na redução do oxigênio



As enzimas que catalisam a redução do oxigênio, como a citocromo oxidase da cadeia de transporte de elétrons, devem ter mecanismos para suplantar a restrição de spin ou energia para a transferência do primeiro elétron. Ainda, devem ter sítios ativos para prevenir a interação de porções parcialmente reduzidas de oxigênio com outros componentes celulares (Dröge, 2002).

2.3.2. Espécies reativas de oxigênio (ROS)

Os RL são espécies altamente reativas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo. São exemplos de espécies reativas de oxigênio: o superóxido ($O_2^{\cdot-}$); a hidroxila (OH^{\cdot}); o peroxil (RO_2^{\cdot}), o alcoxil (RO^{\cdot}) e o óxido nítrico (NO^{\cdot}).

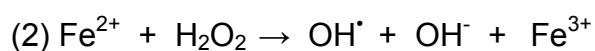
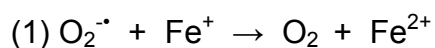
No organismo humano são produzidas espécies reativas de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio, mas os que ganham mais destaque, devido à reatividade e aos danos que podem causar, são as espécies derivadas do oxigênio. O termo espécies reativas de oxigênio (ROS) inclui não somente radicais livres, mas também espécies não radicais derivadas do oxigênio, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio, capaz de levar à formação do radical hidroxila quando em presença de metais.

As ROS podem ser produzidos por fontes exógenas ou endógenas. Dentre as fontes exógenas podem-se citar os xenobióticos, a exposição à radiação, o fumo, a poluição ambiental e a administração de alguns medicamentos, como por exemplo, doxorubicina e paracetamol.

Na célula, as ROS são produzidas como consequência do metabolismo celular normal. As principais fontes endógenas são a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, a degradação de ácidos graxos nos peroxissomos, os mecanismos de detoxificação mediados pelo complexo enzimático citocromo P450, o processo de fagocitose e a oxidação de pequenas moléculas como hidroquinonas, ferredoxinas reduzidas e catecolaminas, entre outras.

No transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória, as ROS podem ser geradas durante episódios de erros no processo de redução univalente do oxigênio. Cerca de 96% do oxigênio consumido pelas células é reduzido por quatro elétrons para formar água. No entanto, em torno de 4% das vezes o oxigênio pode receber apenas um, dois ou três elétrons, gerando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), respectivamente (Yu, 1994).

Nos organismos, o $O_2^{\cdot-}$ participa na reação de Haber-Weiss: (1) gerando oxigênio e ferro reduzido, o qual catalisa a reação de Fenton; (2) formando o radical hidroxila.



Acredita-se que a membrana mitocondrial, considerada a maior fonte de $O_2^{\cdot-}$, é impermeável a esse elemento. Porém o $O_2^{\cdot-}$ é dismutado para H_2O_2 , que atravessa membranas com facilidade. A reação do superóxido com peróxido de

hidrogênio sem catalisador metálico é muito lenta, mas pode ser acelerada *in vivo* na presença de metais de transição, particularmente de ferro, por meio da reação de Haber-Weiss/Fenton (Yu, 1994).

2.3.3. Peroxidação lipídica

Em condições normais, as ROS produzidas em uma célula reagem com as defesas enzimáticas e/ou não-enzimáticas. Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes do organismo, estabelece-se uma condição denominada estresse oxidativo, em que espécies reativas de oxigênio em excesso começam a produzir danos a lipídios, proteínas, DNA e/ou carboidratos. O dano causado pelas ROS aos lipídios é o mais estudado e é chamado de peroxidação lipídica. Na presença de ROS, os lipídios reagem com o oxigênio para produzir radicais alquila e peroxila, que se propagam por uma cadeia de espécies reativas e formam hidroperóxidos como produtos primários. A peroxidação lipídica resulta em uma mistura complexa de hidroperóxidos e produtos secundários de oxidação, incluindo peróxidos cíclicos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE). A mutagênese do MDA, uma marcadora de intensidade da peroxidação lipídica, foi comprovada em linhagens de *Salmonella thyphimurium* no teste *Salmonella*/microsoma. Os produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), que incluem o MDA, têm sido marcadores de estresse oxidativo amplamente utilizados (Wills, 1966).

Em sistemas biológicos, a peroxidação lipídica ocorre principalmente em membranas, onde o conteúdo de ácidos graxos insaturados é relativamente

alto. Um dos efeitos primários da peroxidação lipídica é a modificação da estrutura e a diminuição da fluidez da membrana celular, resultando na alteração de suas propriedades fisiológicas. A destruição da membrana celular causa a perda da função das organelas, podendo levar à morte celular.

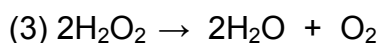
2.3.4. Defesas antioxidantes

As defesas celulares contra a toxicidade do oxigênio estão agrupadas em categorias: enzimas antioxidantes para a remoção de ROS; antioxidantes varredores de espécies reativas de oxigênio e vitaminas; compartimentalização celular e reparo.

São defesas antioxidantes primárias, incluem as enzimas superóxido dismutase (Sod), glutathione peroxidase (GPx), catalase (Cat), glutathione-S-transferase (GST) e outras que não participam diretamente do processo, mas fornecem suporte a GPx, como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a glutathione redutase (GR). Os antioxidantes não-enzimáticos, como a vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), flavonóides e outras moléculas, como β -caroteno, N-acetilcisteína e glutathione, agem principalmente bloqueando a cadeia de peroxidação lipídica, eliminando oxigênio ou quelando íons metálicos (Herber & Butterwoth, 1999).

A enzima catalase tem como função principal dismutar peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio molecular, conforme a reação (3) que segue:

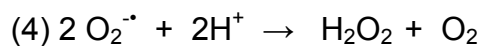
Cat



Em células eucarióticas existem catalases citosólicas e perioxossomais, estando principalmente nos peroxissomas. Por possuírem menos peroxissomas, alguns órgãos estão mais expostos aos danos provocados pela produção de espécies ativas de oxigênio, como o coração, os pulmões e o cérebro. Nesses órgãos, um mecanismo de defesa pode ser a difusão do peróxido de hidrogênio para o sangue, onde reage com a Cat eritrocitária (Chance & Machley, 1995).

As enzimas superóxido dismutase são metaloenzimas abundantes em células aeróbias e que agem sobre o radical $O_2^{\cdot-}$, dismutando-o a H_2O_2 conforme a reação (4) a seguir:

Sod



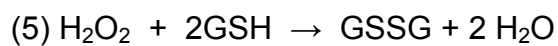
Em mamíferos, foram identificados três diferentes tipos de enzimas Sod: Sod1 ou SodCuZn, um homodímero de cobre e zinco encontrado no citoplasma; Sod2 ou SodMn, um tetrâmero contendo manganês em seu sítio ativo e encontrado exclusivamente na mitocôndria; e Sod3 ou SodEC, a mais recente Sod caracterizada, um tetrâmero de cobre e zinco que apresenta um peptídeo sinalizador que direciona exclusivamente para o espaço extracelular (Mirsa & Fridovich, 1972).

Esse grupo de enzimas produz peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como catalase ou glutathione

peroxidase. A velocidade da reação catalisada pela Sod é 10^4 vezes maior que a velocidade da dismutação espontânea do $O_2^{\cdot-}$ em pH fisiológico.

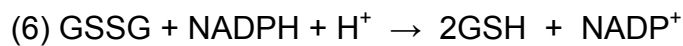
A glutathione peroxidase (GPx) é uma selenoenzima cuja ação se baseia na oxidação de glutathione (GSH) ao seu dissulfeto correspondente GSSG (5):

GPx



A razão entre GSH e GSSG em células normais é alta, pois existe um mecanismo de redução de GSSG que é catalisado pela enzima glutathione reductase (GR):

GR



A glutathione desempenha também um importante papel na detoxificação de xenobióticos e vários compostos endógenos, como prostaglandinas, leucotrienos e hidroperóxidos orgânicos, por meio de reações mediadas pela glutathione transferase (Chance & Machley, 1995).

2.4. Estresse oxidativo e cirrose

O cérebro consome grandes quantidades de oxigênio e é particularmente suscetível ao estresse oxidativo. O metabolismo de alguns dos principais

neurotransmissores, como a dopamina, gera ROS capazes de consumir as defesas antioxidantes, que são baixas em muitas regiões do cérebro. As membranas neuronais contêm níveis elevados de lipídeos poliinsaturados suscetíveis a peroxidação lipídica. A presença da barreira hematencefálica, com o intuito de manter a constância dos líquidos intersticiais, age seletivamente sobre muitos substratos, mas permite a passagem de ferro e cobre, que ficam livres para participar da reação de Haber-Weiss/Fenton. Além disso, os macrófagos do SNC são capazes de produzir superóxido, peróxido de hidrogênio e, provavelmente, NO^* (Aboutwerat et al, 2003).

Evidências do envolvimento do óxido nítrico (NO) na encefalopatia porto-sistêmica têm surgido recentemente. Foi demonstrado, em cérebros de ratos submetidos à anastomose porto-cava, que é um modelo animal de insuficiência hepática aguda, um aumento generalizado da atividade da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), enzima responsável pela produção de NO. O estresse oxidativo em pacientes com insuficiência hepática crônica pode ser causado pelo aumento da produção de óxido nítrico no cérebro. A hiperamoniemia presente nos pacientes com insuficiência hepática parece levar a um aumento da produção do radical livre superóxido e a uma diminuição das atividades de várias enzimas antioxidantes do cérebro. Estresse oxidativo, com aumento da produção de ROS, aparece no sangue de pacientes portadores de cirrose alcoólica descompensada (Szuster-Cisielska et al, 2002). Segundo Aboutwerat (2003) o estresse oxidativo seria um fator fundamental na cirrose biliar primária.

Finalmente, vários estudos mostram que a quantidade de ROS presente em um indivíduo com fígado saudável é significativamente mais baixa do que aquela encontrada em portadores de hepatites B e C, bem como de outras doenças não-virais, como hepatite auto-imune, cirrose biliar primária e colangite esclerosante (Aboutwerat, 2003).

Acreditamos que o estresse oxidativo possa ser um dos mecanismos importantes de lesão do sistema nervoso central em pacientes cirróticos. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a presença de estresse oxidativo, alterações gliais (conforme indicadas pelos níveis séricos de S100B) bem como as condições neurológicas das crianças com cirrose.

2.5. Bibliografia

1. Aboutwerat A, Pemberton PW, Smith A, Burrows PC, McMahon RF, Jain SK, Warnes TW. Oxidant stress is a significant feature of primary biliary cirrhosis. *Biochem Biophys Acta* 2003; 1637(2):142-150.
2. Albrecht J, Jones EA. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci* 1999; 170:138-146.
3. Altuntas I et al. Erythrocyte superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities, and malondialdehyde and reduced glutathione levels in schizophrenic patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2000; 38(12): 1277-81.
4. Amodio P, Quero JC, Del Piccolo F, Gatta A, Schalm SW. Diagnostic tools for the detection of subclinical hepatic encephalopathy: comparison of standard and computerized psychometric tests with spectral EEG. *Metab Brain Dis* 1996; 11: 315-327.
5. Arria Am, Tarter RE, Starzl TE, Van-Thiel DH. Improvement in cognitive functioning of alcoholics following orthotopic liver transplantation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 1991; 15: 956-962.
6. Basile AS, Jones EA, Skolnick P. The pathogenesis and treatment of hepatic encephalopathy: evidence for the involvement of benzodiazepine receptor ligands. *Pharmacological Reviews* 1991; 43: 27-71.
7. Bengtsson F, Gage FH, Jeppsson B, Nobin A, Rosengren E. Brain monoamine metabolism and behavior in portocaval shunted rats. *Experimental Neurology* 1985; 90: 21-35.

8. Cascino. Plasma and cerebrospinal fluid amino acid patterns in hepatic encephalopathy. *Digestive Disease Sciences* 1982; 27: 828-832.
9. Casellas F, Sagales T, de la Calzada MD, Accarino A, Guarner L, Vargas V. Visual evoked potentials in hepatic encephalopathy. *Med Clin (Barc)* 1985; 85(4):139-42.
10. Chance B, Machley AL. Assay of catalases and peroxidases. *Meth Enzymol* 1995; 2: 764-775.
11. Conn HO. Trail making and number-connection tests in the assessment of mental state in portal systemic encephalopathy. *Am J Dig Dis* 1977; 22(6):541-50.
12. Conn V, Taylor S, Miller R. Cognitive impairment and medication adherence. *J Gerontol Nurs* 1994; 20(7):41-7.
13. Donato R. Functional roles of S100B proteins, calcium-binding proteins of EF-hand type. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1450:191-231.
14. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiology Review* 2002; 82: 47-95.
15. Ellingson RJ, Wszolek ZK, Kendall JD, Donovan JP, Schafer DF. Brainstem auditory evoked potentials in liver transplant candidates. *Nebr Med J.* 1995; 80(7):167-70.
16. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of experimental Biology* 1998; 201:1203-9.
17. Goldstein GW. The role of brain capillaries in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Hepatology* 1984; 4: 565-567.
18. Groeneweg M, Quero JC, De Bruijn I. Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology* 1998; 28: 45-49.

19. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. Oxford: Clarendon, 2000.
20. Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocytes swelling and low-grade cerebral edema? J Hepatol 2000; 32:1035-1038.
21. Hazell AS, Butterworth RF. Hepatic encephalopathy: an update of pathophysiologic mechanisms. PSEBM 1999; 222:99-112.
22. Herber V. The antioxidants supplement myth. Am J Clin Nutr 1994; 60:157-158.
23. Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, de Bruijn CH, Lamers KJ. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. Stroke 2000; 31(11):2670-7.
24. Hoyt WF, Maitland CG, Aminoff MJ, Kennard C. Evoked potentials in the evaluation of visual field defects due to chiasmal or retrochiasmal lesions. Neurology 1982; 32(9):986-91.
25. Jalan R, Shawcross D, Davies N. The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy. IJBCB 2003; 35:1175-1181.
26. Johanson A, Hagberg B. Psychometric characteristics in patients with frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. Arch Gerontol Geriatr 1989; 8(2):129-37.
27. Kimura T, Budka H. Glial fibrillary acidic protein and S-100 protein in human hepatic encephalopathy: immunocytochemical demonstration of

- dissociation of two glia-associated proteins. *Acta Neuropathol* 1986; 70:17-21.
28. Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Gonçalves CA, Fonseca M, Hauck S, Souza DO. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res* 2001; 35(1):11-4.
29. Lebental E. Pediatric gastroenterology. *Pediatr Clin. North Am* 1996; 43:1-10.
30. Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001; 25(3): 463-493.
31. Mehndiratta MM, Sood GK, Sarin SK, Gupta M. Comparative evaluation of visual, somatosensory, and auditory evoked potentials in the detection of subclinical hepatic encephalopathy in patients with nonalcoholic cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1990; 85(7):799-803.
32. Mirsa HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 217(10): 3170-3175.
33. Mullen KD, Basile AS. Benzodiazepine-receptor antagonists and hepatic encephalopathy: where do we stand? *Gastroenterology* 1993; 105(3):937-40.
34. Nora DB, Amaral OB, Busnello JV, Quevedo J, Vieira S, da Silveira TR, Kapczinski F. Evoked potentials for the evaluation of latent hepatic encephalopathy in pediatric liver transplant candidates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31(4):371-376.

35. Parson-Smith G, Bates JA. Discussion of the changing values in electroencephalography. *Proc R Soc Med* 1957; 50(10):899-910.
36. Portela LV, Tort AB, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R, Rotta LN, Silva CT, Busnello JV, Kapczinski F, Gonçalves CA, Souza DO. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem* 2002; 48:950-952.
37. Rikkers L, Jenko P, Rudman D, Freides D. Subclinical hepatic encephalopathy: detection, prevalence and relationship to nitrogen metabolism. *Gastroenterology* 1978; 75: 462-469.
38. Sandford NL, Saul RE. Assessment of hepatic encephalopathy with visual evoked potentials compared with conventional methods. *Hepatology* 1988; 8: 1094-1098.
39. Saxena N, Bhatia M, Joshi YK, Garg PK, Dwivedi SN, Tandon RK. Electrophysiological and neuropsychological tests for the diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy and prediction of overt encephalopathy. *Liver* 2002; 22: 190-197.
40. Schmidt AP, Tort AB, Amaral OB, Schmidt AP, Walz R, Vettorazzi-Stuckzynski J, Martins-Costa SH, Ramos JG, Souza DO, Portela LV. Serum S100B in pregnancy-related hypertensive disorders: a case-control study. *Clin Chem* 2004; 50(2):435-8.
41. Sokol RJ, Narkewicz MR. Liver and pancreas. In: *Current: pediatric diagnosis and treatment*. Hay WW, Hayward AR, Levin MJ, Sondheimer JM (Eds). 14ed. 2003.

42. Szuster-Ciesielska A, Daniluk J, Kandefer-Szerszen M. Oxidative stress in the blood of patients with alcohol-related liver cirrhosis. *Med Sci Monit* 2002; 8(6):419-424.
43. Tarter RE, Moss H, Arria A, Van Thiel D. Hepatic, nutritional, and genetic influences on cognitive process in alcoholics. *NIDA Res Monogr* 1990; 101:124-35.
44. Walz R, Portela LV, Tort AB, Neto EC, Fernandes LN, Gonçalves CA, Souza DO. Serum S100B levels in patients with HTLV-I-associated myelopathy /tropical spastic paraparesis. *Neurology* 2000; 54(10):2021-2022.
45. Weissenborn K, Ruckert N, Hecker H, Manns MP. The number connection tests A and B. Interindividual variability and use for the assessment of early hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 1998; 28: 646-653.
46. Weissenborn K, Scholz M, Hinrichs H, Wiltfang J, Schmidt FW, Kunkel H. Neurophysiological assessment of early hepatic encephalopathy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1990; 75(4):289-95.
47. Wiesner RH, McDiarmid SV, Kamath PS et al. MELD and PELD: application of survival models of liver allocation. *Liver Transplant* 2001; 7:567-580.
48. Wills ED. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* 1966; 99(5): 667-676.
49. Ytrebo LM, Ingebrigsten T, Nedredal GI, Elvenes OP, Korvald C, Rommer B, Revhaug A. Protein S100B: A biochemical marker for

- increased intracranial pressure in pigs with acute hepatic failure. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:546-551.
50. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74:139-162.
51. Zaki AEO, Ede RJ, Davis M, Williams R. Experimental studies of blood brain barrier permeability in acute hepatic failure. *Hepatology* 1983; 4: 359-363.
52. Zeneroli ML, Pinelli G, Gollini G, Penne A, Messori E, Zani G, Ventura E. Visual evoked potential: a diagnostic tool for the assessment of hepatic encephalopathy. *Gut* 1984; 25(3):291-9.

3. Objetivos

Geral:

O objetivo deste estudo é avaliar a presença de estresse oxidativo, as alterações gliais (conforme indicadas pelos níveis séricos de S100B), e as condições neuropsicológicas de crianças com cirrose.

Específicos:

Avaliar a presença de correlação entre os indicadores de estresse oxidativo e de alterações de função glial.

Avaliar a existência de correlação entre o desempenho neuropsicológico e os níveis séricos da proteína S100B e os parâmetros de estresse oxidativo.

4. Fontes de financiamento

FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos; Hospital de Clínicas de Porto Alegre

CAPES – Financiamento recebido por um ano, sob a forma de Bolsa de Fomento a Pesquisa.

5. Artigo em Inglês

Oxidative Stress and Glial Dysfunction in Cirrhotic Children.

Luciana Ribeiro, Ph.D. ¹, Ana Cristina Andrezza ², Miriam Salvador, Ph.D. ², Themis Reverbel da Silveira Ph.D. ³, Sandra Vieira Ph.D. ³, Daniel Bocchese Nora Ph.D. ⁴, Cleonice Bosa Ph.D. ⁵, Francesca Di Napoli ⁵, Luis Valmor Cruz Portela Ph.D. ⁶, Diogo Onofre Souza Ph.D. ⁶, Flávio Pereira Kapczinski Ph.D. ¹.

¹ Experimental Psychiatry Laboratory, Research Center, Clínicas Hospital of Porto Alegre and Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. ² Biotechnology Institute of Caxias do Sul University, Brazil. ³ Pediatric Gastroenterology Unit, Clínicas Hospital of Porto Alegre, Brazil. ⁴ Neurology Unit, Clínicas Hospital of Porto Alegre, Brazil. ⁵ Psychology Institute, Department of Development Psychology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. ⁶ Biochemistry Department, Basic Health Sciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding Author: Luciana Ribeiro
Praça Dom Feliciano, 126 / 81 Bairro Centro
CEP 90020-160 Porto Alegre – RS – Brasil
Telephone number: (051) 3227.0361 / 9679.3891
E-mail: ribeiro.lu@terra.com.br

Acknowledgments: The authors thank CAPES and FIPE for financial support.

Abstract

Objective: The aim of the present study was to evaluate the presence of oxidative stress (as evidenced by serum levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and plasma levels of MDA (malondialdehyde) measured by the thiobarbituric acid method (TBARS) and glial alterations (as evidenced by serum levels of S100B protein), as well as the neurological conditions of pediatric cirrhotic patients and to compare these results with those measured in a group of children and adolescents without liver and neurological diseases.

Methods: We conducted a case-control study to assess the serum levels of S100B protein, SOD, CAT, and TBARS; the auditory evoked potentials (BAEPs); the pattern reversal visual evoked potentials (VEPs), and the cognitive status in a group of 14 pediatric patients with cirrhosis (5-14 years; 7 male), waiting for liver transplantation without clinical evidence of hepatic encephalopathy and in a control group of 26 healthy children. Biliary atresia was the most prevalent diagnosis and the median of PELD score was 6. **Results:** No differences were found between groups in BAEPs, VEPs and S100B levels. SOD activity and TBARS levels are higher; and CAT activity is lower in the cirrhotic group. A correlation between S100B and TBARS in the case group was found ($r = -0.815$, $p=0.001$). **Conclusion:** This study suggests that oxidative stress may be an important factor in the glial dysfunction found in portal-systemic encephalopathy.

Key words: Cirrhosis, latent portal-systemic encephalopathy, oxidative stress, S100B protein

Introduction

Portal-systemic encephalopathy (PSE) is a frequent complication of cirrhosis. Its pathogenesis is not fully understood, although there is agreement on the important role of neurotoxins, especially ammonia (1). In the brain of cirrhotic patients, neurons appear to be morphologically normal, but astrocytes exhibit signs of Alzheimer type II degeneration with nuclear enlargement, peripheral margination of chromatin and prominent nucleoli.

Functional alterations in portal-systemic encephalopathy (PSE) include selective alterations of blood-brain barrier permeability, changes in cerebral energy metabolism, an increased GABA-ergic tone and changes in several other neurotransmitter systems and their receptors (2,3). The finding that Alzheimer type II changes can be induced experimentally in cultured astrocytes upon exposure to ammonia prompted the idea that portal-systemic encephalopathy is a disorder of glial cells, with neuronal dysfunction being the consequence (4).

Latent portal-systemic encephalopathy (LPSE) is a disorder in which patients with chronic liver disease exhibit neuropsychological or electroencephalographic abnormalities in the absence of clinically obvious mental or neurologic defects. The diagnosis of LPSE has been an area of

intense investigation during the last two decades (5). Diagnostic tests employed for detection of LPSE include neuropsychological and electrophysiological measurements. The earliest defects in the mental status are picked up by neuropsychological testing. However, these tests are known to be influenced by age, education, socio-cultural background, and repetitive testing (6). Electrophysiological tests, electroencephalogram (EEG) and evoked potentials have been used to identify cases of LPSE (7). However, there is no firm data available on the relative sensitivity of the electrophysiological methods in comparison to psychological assessment in detection of LPSE (8,9). In addition, these diagnostic models have not been adapted to children (10). There is evidence that LPSE affects the quality of life of patients (11). The detection of LPSE is important in order to prevent the deterioration to frank encephalopathy (12).

Oxidative stress is defined as a state of higher cellular levels of reactive oxygen species (ROS, e.g., O_2^- , OH^\bullet , $ONOO^-$) than the cellular antioxidant defenses. Generation of ROS is ubiquitous since ROS are generated during aerobic metabolism. Under normal circumstances, ROS are eliminated by cellular enzymatic (e.g., superoxide dismutase and catalase) and non-enzymatic (GSH and uric acid) antioxidants defenses, and by dietary antioxidants, such as vitamins A, E and C. If not effectively removed, ROS can cause oxidative cell injury, i.e., peroxidation of membrane lipids, as well as damage on proteins and DNA (13,14).

Increasing in oxidative stress has been associated with liver disease (15). Accordingly, hyperammonemia, a common biochemical alteration induced by chronic liver failure, increases the production of superoxide free radical and decrease the activities of several antioxidant enzymes in the brain (1). Moreover, patients with decompensated alcoholic cirrhosis have an increase production of ROS by neutrophils not accompanied by any increase in serum glutathione peroxidase and catalase activities (16). The brain tissue appears to be more sensitive to the oxidative stress, which results in neurological injury caused by liver disease (14).

S100B is considered sensitive marker of brain damage since its levels are increased in the cerebrospinal fluid (CSF) and/or blood in acute and chronic central nervous system (CNS) injuries (17,18,19,20). S100B is a calcium binding protein physiologically produced and released by astrocytes. Thus, the cellular specificity of this protein can be used for understanding the involvement of different neural cell types in pathological conditions. Increase in S100B may reflect either glial damage or it may belong to a body of astrocytic reactions to neural injury (astrogliosis reactive), which may have neuroprotective roles (21).

The aim of the present study was to evaluate the presence of oxidative stress (as evidenced by serum levels of SOD, CAT and TBARS) and glial alterations (as evidenced by serum levels of S100B), as well as the neurological conditions of pediatric cirrhotic patients and to compare these results with those measured in a group of children and adolescents without liver and neurological diseases.

Methods

We conducted a case-control study in children with liver cirrhosis to assess the following biochemical parameters: i) serum levels of S100B protein; ii) superoxide dismutase activity (SOD), catalase activity (CAT); iii) plasma levels of MDA measured by the thiobarbituric acid method (TBARS). Electrophysiological evaluation by the auditory evoked potentials (BAEPs) and pattern reversal visual evoked potentials (VEPs), and assessments of cognitive status were also performed. Fourteen subjects with diagnosis of liver cirrhosis waiting for liver transplantation (range 5-18 years; mean 12.5 years) were recruited from the pediatric gastroenterology unit of our institution (from January/2001 to April/2002). The diagnosis of cirrhosis was based on clinical, biochemical, ultrasonographic and histological criteria. Cryptogenic cirrhosis was diagnosed when the following causes were ruled out: alpha-1 antitrypsin deficiency, inborn errors of metabolism, sclerosing cholangitis, viral hepatitis B and C, congenital infective disease, use of hepatotoxic drugs, presence of autoantibodies to autoimmune hepatitis types 1 and 2, and Wilson Disease. All patients were alert, oriented and without a history of sleep rhythm reversal. The severity of the underlying liver disease was assessed using the Pediatric End-Stage Liver Disease (PELD) scores and Pugh-Child's grading of the severity of liver disease (22).

Patients and controls who met any of the following criteria were excluded: alcoholic cirrhosis, history of neurological disease unrelated to liver impairment,

clinical signs of portal-systemic encephalopathy on physical examination, or non compliance with the consent form. The protocol was approved by the local Ethics Committee and informed consent was obtained from parents after the description of the study. Twenty six controls were recruited. They were healthy children of hospital employees, and underwent clinical, laboratorial and psychological examinations. Patients who presented a history of neurological illness, recent head trauma or clinical diseases were excluded. The laboratorial workup for cases and controls included: aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyl transferase, total and direct bilirubin, albumin, erythrocyte sedimentation rate (ESR) and prothrombin time.

S100B protein

As previously described by Portela et al (23), S100B measurement was performed in a Lumat LB9507 luminometer (EG&G Berthold) using an immunoluminescent assay kit, which use an antibody labeled with isoluminol. The S100B standard curve was linear up to 20 ng/ml and the coefficient of variation of the duplicates in all range levels of standards and samples were within 5%. S100B levels are expressed as ng/ml (mean \pm S.D.).

Superoxide dismutase activity (SOD)

Superoxide dismutase activity was determined spectrophotometrically in plasma samples by measuring the inhibition of the rate of autocatalytic adrenochrome formation at 480nm in a reaction medium containing 1mmol/l adrenaline (pH 2) and 50 mmol/l glycine (pH 10.2). This reaction was conducted at 30°C for 3 minutes. The enzyme activity is expressed as superoxide dismutase units per g

of protein. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50% (24).

Catalase activity (CAT)

The assay was performed according to described by Chance (25). The principle of assay is based on the determination of the rate of hydrogen peroxide decomposition, measured at 240 nm. This reaction was conducted at 30°C for 1 minute. The enzyme activity is expressed as catalase units per mg of protein. One unit of catalase decomposed 1 μ mole of H₂O₂ per min at pH 7.4 and 30°C.

Determination of plasma MDA levels (TBARS)

Levels of plasma MDA were measured by the thiobarbituric acid (TBA) method, described by Wills (26). Peroxidation was measured as the production of MDA which in combination with TBA forms a pink chromogen (measured at 530 nm). MDA results were expressed as nmol/ml.

Evoked Potentials

Before the evoked potentials studies, patients were submitted to examination by a neurologist to look for signs of PSE. They also underwent an electroretinogram and an audiometric study to assure that visual or hearing deficits would not interfere with the study. The evoked potential tests performed were brainstem auditory evoked potentials (BAEPs) and pattern reversal visual evoked potentials (VEPs). BAEPs were registered in resting or sleeping patients, through surface electrodes on the scalp, with the positive electrode on Cz (International 10-20 System), the negative electrode on the mastoid

ipsilateral to the stimulus, and the ground electrode on the contralateral mastoid. Two series of 2000 stimuli per click, rarified pattern, at 86 dB, with contralateral 40 dB masking were used to evoke brainstem responses. The stimulus frequency was 10 Hz, the analysis time was 10 ms and filtering was set to block stimuli above 3 KHz and below 50 Hz. Whenever necessary, the patient was sedated using 20% chloral hydrate at a dose of 50 mg/kg. VEPs were elicited through pattern reversal stimuli with registering of the potentials on the scalp through surface electrodes. The positive electrode was placed on Cz, the negative electrode in Oz (International 10-20 System) and the ground electrode on the forehead. Patients were examined in a half-light room, with the pattern reversal stimuli at a distance of 01m from the eyes. Each eye was examined separately (with the other one covered) using 2 series of 200 stimuli, with a 2Hz frequency, a 200ms analysis time, a 20 μ V sensibility and a filter blocking stimuli above 100Hz and below 1Hz frequency. Whenever necessary, patients were sedated in the same way as in BAEPs. Studies on controls were performed in the same way as on patients in both methods.

Psychological assessment

Psychological assessment of the cognitive functioning was carried out using Raven Colored Progressive Matrices and Rey's Complex Figures. Both of which have already been adapted to Brazilian Portuguese versions (27). Raven Colored Progressive Matrices (CPM) - a non-verbal test which evaluates perceptive skills and inductive thinking, requiring the individual to infer about existing relations between abstract items. The Special Scale is for children from 5 to 11 years and to individuals with suspected intellectual deficit. The test

consists of a notebook which contains matrices or figures printed in the upper part of each page. In between figures there is a blank space which must be completed according the logic of the set. In the inferior part there are six or eight answer options which can be chosen by the individual. The series are organized according to progressive levels of difficulty. Rey's Complex Figures (CF) – this is a test of neuropsychological evaluation of memory and perception functions. Its basic premise is that the graphic visual memory can be accurately measured if there is, concurrently to this process, the examination of organizational and analytical perceptive activities. It consists of copying and reproducing from memory a geometrical tracing whose structure is complex and forms a figure with no evident significance. The reproductions are analyzed according to their components and are scored in units based upon a Brazilian normatization.

Statistical Analysis

The data is expressed as mean \pm SD. One-way analysis of variance (ANOVA) and Student Test- t was applied to compare differences between control and cases groups. For correlation evaluations, the Pearson correlation (two-tailed) was used. The statistical significance was accepted as $p < 0.05$. All statistical tests were performed with the statistical program SPSS 11.0 for Windows.

Results

Clinical and laboratory data on the 14 cirrhotic patients are shown in Table 1. All patients, as well as controls, had normal electroretinogram and audiometric

results. The patient group was older than control group (patients 12.2 ± 3.6 years; and controls 8.7 ± 3.4 years). The cognitive profile evaluated by CPM testing showed a difference between groups, having the cirrhotic group scores lower than the control group, $9,84 \pm 2,47$ e $22,78 \pm 7,36$ respectively; $p < 0,001$, suggesting difficulties in intellectual functioning. Evaluations performed by CF testing did not show differences among groups. No statistical differences were found between patients and controls in both BAEPs and VEPs. There was no statistical difference in serum S100B levels (ng/ml) between cirrhotic and control groups (0.47 ± 0.36 and 0.44 ± 0.19 , $p = 0.731$). Parameters of oxidative stress (measured in blood) are summarized in Table 2. The SOD activity and TBARS levels were higher in cirrhotic group. The activity of CAT is lower in this group.

A strong significant correlation between TBARS and serum S100B protein on case group is shown in Figure 1 ($r = -0.815$, $p = 0.001$). No correlations were found between SOD and CAT and serum S100B protein.

Discussion

In pediatric cirrhotic patients such as in adults a wide spectrum of symptoms are summarized under the term PSE. These neuropsychiatric abnormalities range from minor sleep disturbances, through discernable changes in brain function to overt psychiatric/neurological symptoms and deep coma. In cirrhosis as well as in acute liver failure, the neurons and the blood-brain barrier are anatomically

normal. PSE in cirrhosis is characterized neuropathologically by Alzheimer type II astrocytosis (2).

The high levels of ammonia appear to be crucial for induce these neuropsychiatric and neuropathological alterations. In the brain, astrocytes are the main site for ammonia detoxification, converting glutamate to glutamine. An increased ammonia level raises the amount of glutamine within astrocytes, causing an osmotic imbalance resulting in cell swelling and ultimately brain edema. However, considering the closely metabolic and structural relationship between astrocytes and neurons is plausible to believe that both cells can be affected in minor or major extension. In spite of the advances, the early diagnostic of LPSE, a silent condition of hepatic disease, is still a challenge in medical practice. In this study we used a combination of electrophysiological, neuropsychiatric and biochemical parameters in order to evaluate the brain function in cirrhotic children.

In our study there was a significant difference between groups in the CPM test (psychological assessment), that is a measure of non-verbal intelligence, suggesting the presence of LPSE.

In the present study we did not find alterations in the electrophysiological parameters. According to studies with electrophysiological tests, electroencephalogram and evoked potentials are not sensitive enough to detect brain alterations in LPSE, which is confirmed by our study (7,8,9).

Concerning the brain alterations in cirrhosis, an increasing amount of evidence suggests that oxidative stress is important in either the primary or secondary pathophysiological mechanisms underlying acute and chronic brain injuries. Additionally, reduction in the endogenous antioxidant defense system due to environmental and genetic factors may contribute to oxidative stress. Therefore, the discovery and development of potent antioxidant agents has been one of the most interesting and promising approaches in the search for treatment of CNS injury. In LPSE the identification of oxidative stress and early treatment with antioxidants could be an interesting means to prevent the full development of PSE or retard the process allowing these children to wait for the hepatic transplant.

The medical literature has described SOD as the most important enzyme involved in the removal of superoxide anions. According to Szuster-Ciesielska and colleagues (16), cirrhotic patients present with an increased neutrophil production of superoxide, which induces the SOD biosynthesis. Elevations in SOD serum levels have been found in patients with alcoholic cirrhosis (28). This study shows a significant increase in SOD levels of cirrhotic children, a finding consonant with the current literature.

Superoxide presence may also explain the high levels of TBARS found in this paper. The ROS lipid damage in an oxidative stress situation is called lipid peroxidation. Lipid peroxidation results in a complex mixture of hydroperoxides and secondary oxidation products, such as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxy-2-transnonenal (HNE), which, in turn, can be used as markers of lipid

peroxidation intensity. The thiobarbituric acid reaction products (TBARS), which include MDA, have been a thoroughly utilized marker of oxidative stress (13). In our study there was a significant increase of TBARS levels in the cirrhotic group, indicating the presence of oxidative damage in this disease.

Although the presence of hydrogen peroxide in cirrhotic patients has been reported, this work did not find a significant increase of the catalase enzyme. Studies performed on the *Saccharomyces cerevisiae* yeast have shown that despite the importance of CAT for detoxification of hydrogen peroxide, this enzyme is only moderately induced by this aggressor agent. Other factors such as the concentration of oxygen and ATP seem to play an important role in CAT regulation (29). It must be reminded that all cellular defense systems, enzymatic or not, operate in an integrated manner aiming to generate an efficient protection against oxidative stress.

Concerning to S100B and hepatic disease, a study of glial cells immunoreactivity for S100 protein in human encephalopathy did not present a significant change (30). Moreover, an increase in S100B levels after a surgically induced acute hepatic failure in pigs indicates that serum determination of this protein may provide useful information on the presence and extent of intracranial hypertension and is not related to ammonia levels (31). In our study, no difference in S100B levels was observed between patients and controls. This could be due to self-adjust processes involving glial cells during the course of disease; to the insensitivity of S100B protein in detecting alterations other than intracranial pressure secondary to PSE, to the or to the

incapacity of the damaged glia to adequately respond by producing and releasing S100B protein.

The present study showed a strong correlation between serum S100B levels and oxidative stress evaluated by TBARS in plasma of children and adolescents with cirrhosis. A possible correlation between oxidative stress and S100B was already demonstrated by its S100B protein copper-binding property, and its ability of suppression of copper-induced cell damage (32). Approximately 70-95% of S100B is within the brain, and it is possible that S100B copper-binding properties play a role in copper homeostasis as well as in preventing the copper induced oxidative damage in the brain. The transition metal copper is essential to a variety of cell functions; however, excess intake is toxic to living organisms. The toxicity is thought to result, at least in part, from the Fenton or Haber-Weiss reaction, in which copper ions would catalyze the formation of OH⁻ radical from H₂O₂. The OH⁻ radical is a powerful oxidant that can damage various cellular components, such as lipid, nucleic acid and protein. Therefore, copper ion in vivo must be sequestered such that their redox cycling could be hampered, thereby copper ions being unable to participate in the production of OH⁻. Considering the occurrence of 0.1-10mg of copper/100g of wet tissue or body fluid in human body, the copper sequestration should be recognized as an important mechanism for prevention of oxidative damage (32,33). As far as we are aware, this is the first study showing a strong correlation between oxidative stress and changes in glial function in cirrhotic children.

One of the main findings in PSE patients is damage in glial cells. Our study suggests that oxidative stress may be one of the factors involved in the glial damage related to cirrhosis in children. Furthermore, this damaged glia may not fully exert its S100B defense capacities against ROS, leaving the cell without one more oxidative stress protective mechanism, resulting in more oxidative stress damage.

Acknowledgments

The authors thank CAPES and FIPE for financial support.

References

1. Hazell AS, Butterwoth RF. Hepatic encephalopathy: an update of pathophysiologic mechanisms. *PSEBM* 1999; 222:99-112.
2. Jalan R, Shawcross D, Davies N. The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy. *IJBCB* 2003; 35:1175-1181.
3. Albrecht J, Jones EA. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci* 1999; 170:138-146.
4. Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocytes swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* 2000; 32:1035-1038.
5. Saxena N, Bhatia M, Joshi YK, et al. Electrophysiological and neuropsychological tests for the diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy and prediction of overt encephalopathy. *Liver* 2002; 22: 190-197.
6. Weissenborn K, Ruckert N, Hecker H, et al. The number connection tests A and B. Interindividual variability and use for the assessment of early hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 1998; 28: 646-653.
7. Nora DB, Amaral OB, Busnello JV, et al. Evoked potentials for the evaluation of latent hepatic encephalopathy in pediatric liver transplant candidates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31(4):371-376.
8. Sandford NL, Saul RE. Assessment of hepatic encephalopathy with visual evoked potentials compared with conventional methods. *Hepatology* 1988; 8: 1094-1098.

9. Amodio P, Quero JC, Del Piccolo F, et al. Diagnostic tools for the detection of subclinical hepatic encephalopathy: comparison of standard and computerized psychometric tests with spectral EEG. *Metab Brain Dis* 1996; 11:315-327.
10. Genovese E, Maghnie M, Magiore G et al. MR imaging of CNS involvement in children affected by chronic liver disease. *Am J Neuroradiol* 2000; 21:845-51.
11. Groeneweg M, Quero JC, De Bruijn I. Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology* 1998; 28:45-49.
12. Tandon BN. Hepatic encephalopathy syndromes. *Indian J Gastroenterol* 2003; 22 Suppl 2:S4-S6.
13. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899:136-47.
14. Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol & Biol Psych* 2001; 25(3): 463-493.
15. Aboutwerat A, Pemberton PW, Smith A, et al. Oxidant stress is a significant feature of primary biliary cirrhosis. *Biochem Biophys Acta* 2003; 1637(2):142-150.
16. Szuster-Ciesielska A, Daniluk J, Kandefer-Szerszen M. Oxidative stress in the blood of patients with alcohol-related liver cirrhosis. *Med Sci Monit* 2002; 8(6):419-424.
17. Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, de Bruijn CH, et al. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of

- serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 2000; 31(11):2670-7.
18. Schmidt AP, Tort AB, Amaral OB, et al. Serum S100B in pregnancy-related hypertensive disorders: a case-control study. *Clin Chem* 2004; 50(2):435-8.
 19. Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, et al. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res* 2001; 35(1):11-14.
 20. Walz R, Portela LV, Tort AB, et al. Serum S100B levels in patients with HTLV-I-associated myelopathy /tropical spastic paraparesis. *Neurology* 2000; 54(10):2021-2022.
 21. Donato R. Funcional roles of S100B proteins, calcium-binding proteins of EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1999;1450:191-231.
 22. Wiesner RH, McDiarmid SV, Kamath PS. MELD and PELD: application of survival models of liver allocation. *Liver Transplant* 2001; 7:567-580.
 23. Portela LV, Tort AB, Schaf DV, et al. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem* 2002; 48:950-952.
 24. Mirsa HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 217(10): 3170-3175.
 25. Chance B, Machley AL. Assay of catalases and peroxidases. *Meth. Enzymol* 1995; 2:764-775.
 26. Wills ED. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* 1966; 99(5): 667-676.

27. Angelini AL, Alves ICB, Custodio EM, et al. The São Paulo Norms for J. Raven's Colored Progressive Matrices. *Psychological Test Bull* 1989; 2(2):46-49.
28. Kubota S, Sato N, Matsumura T, et al. Chemiluminescence and superoxide dismutase in the plasma in patients with alcoholic and non-alcoholic liver injuries. *Alcohol* 1985; 2(3):469-72.
29. Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998; 14(16):1511-27.
30. Kimura T, Budka H. Glial fibrillary acidic protein and S-100 protein in human hepatic encephalopathy: immunocytochemical demonstration of dissociation of two glia-associated proteins. *Acta Neuropathol* 1986; 70:17-21.
31. Ytrebo LM, Ingebrigsten T, Nedredal GI, et al. Protein S100B: A biochemical marker for increased intracranial pressure in pigs with acute hepatic failure. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:546-551.
32. Nishikawa T, Lee ISM, Shiraishi N, et al. Identification of S100B protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *J Biol Chem* 1997; 272(37): 23037-23041.
33. Ha BJ, Lee JY. The effect of chondroitin sulfate against CCl₄-induced hepatotoxicity. *Biol Pharm Bull* 2003; 26(5):622-626.

Table 1: Clinical and laboratory patient-by-patient data.

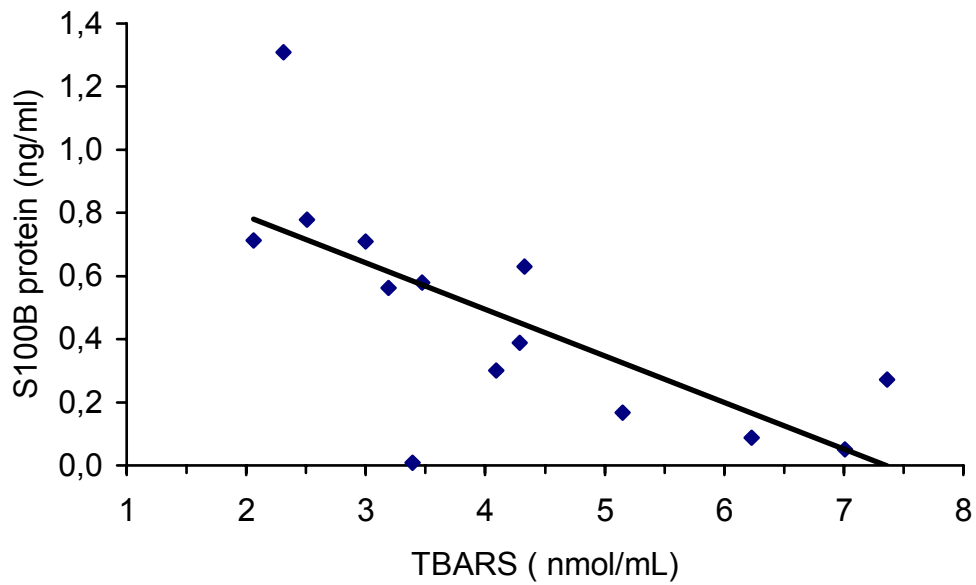
Patient	Gender ^a	Age ^b	BT ^c	ALB ^d	TP ^e	PELD ^f	Pugh-Child ^g	Etiology ^h
1	F	16,4	1,5	3,3	14,1	3,0	6 - A	SC
2	M	7,9	1,8	4,0	11,8	0,0	5 - A	Alagille S
3	M	16,0	2,3	3,2	16,8	4,0	8 - B	BA
4	F	12,5	16	3,5	19,0	17,0	12 - C	AIH
5	M	18,4	5,8	1,4	19,0	17,0	11 - C	BA
6	F	9,6	2,3	4,1	14,0	2,0	6 - A	CRYPT
7	F	9,8	0,7	3,6	16,1	4,0	6 - A	HCV
8	F	15,4	3,6	3,6	21,3	11,0	9 - B	AIH
9	M	5,1	0,3	4,1	13,1	7,0	5 - A	BA
10	M	14,2	1,1	3,8	12,6	1,0	5 - A	BA
11	M	16,0	2,1	3,1	20,7	8,0	10 - C	AIH
12	F	9,3	1	4,3	15,3	5,0	5 - A	CRYPT
13	F	13,3	2,9	3,0	22,0	11,0	9 - B	AIH
14	M	11,3	5	2,5	20,8	19,0	13 - C	BA

^aF, female; M, male. ^bAge (years). ^cBT, total bilirubin (mg/dl). ^dALB, albumin (g/dl). ^eTP, prothrombin time (seg). ^fPELD Pediatric End-Stage Liver Disease. ^gPugh-Child's grading of the severity of liver disease; ^hCRYPT, cryptogenic cirrhosis; AIH, autoimmune hepatitis; BA, biliary atresia; HCV, hepatitis C virus infection; SC, sclerosing cholangitis.

Table 2: Variables with statistically significant differences among groups using t test. Superoxide dismutase activity (SOD), catalase activity (CAT), levels of plasma MDA measured by the thiobarbituric acid (TBARS). Expressed by Mean \pm Std. Deviation

	Controls	Cirrhotics	p (t test)
SOD /g protein	1.22 \pm 0.74	4.52 \pm 2.32	0.001
CAT / mg protein	2.95 \pm 2.61	1.07 \pm 1.04	0.019
TBARS (nmol/mL)	2.91 \pm 0.49	4.17 \pm 1,70	0.002

Figure 1: Correlation between serum S100B protein and levels of plasma MDA (malondialdehyde) measured by the thiobarbituric acid (TBARS). Pearson's correlation coefficient $r = -0.815$, $p=0.001$.



6. Artigo em Português

Estresse Oxidativo e Disfunção Glial em Crianças com Cirrose.

Luciana Ribeiro ¹, Ana Cristina Andrezza ², Miriam Salvador ², Themis R. da Silveira ³, Sandra Vieira ³, Daniel Bocchese Nora ⁴, Cleonice Bosa ⁵, Francesca Di Napoli ⁵, Luis Valmor Cruz Portela ⁶, Diogo O. Souza ⁶, Flávio Kapczinski ¹.

¹ Laboratório de Psiquiatria Experimental, Centro de Pesquisa, Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

² Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, Brasil.

³ Unidade de Gastroenterologia Pediátrica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

⁴ Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

⁵ Instituto de Psicologia, Departamento de Psicologia do Desenvolvimento, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

⁶ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Título abreviado: Estresse oxidativo e proteína S100B na cirrose.

Autor correspondente:

Luciana Ribeiro

Praça Dom Feliciano, 126 / 81 Bairro Centro

CEP 90020-160 Porto Alegre – RS – Brasil

Telefone: (051) 3227.0361 / 9679.3891

E-mail: ribeiro.lu@terra.com.br

Resumo

Este estudo tem como objetivo avaliar o estresse oxidativo, as alterações gliais, e a performance neuropsicológica de crianças com cirrose. Conduzimos um estudo caso-controle para medir os níveis séricos da proteína S100B; a atividade da superóxido dismutase (SOD), a atividade da catalase (CAT); os níveis plasmáticos de MDA medidos pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBARS); os potenciais evocados auditivos (PEA); os potenciais evocados visuais de padrão reverso (PEVR); e medidas de status cognitivo. Resultados: Não foram encontradas diferenças nos PEA, PEVR e S100B entre os grupos. A atividade da SOD e os níveis de TBARS foram maiores no grupo de casos, e a atividade da CAT foi menor. Foi encontrada uma correlação entre S100B e TBARS no grupo de casos ($r = -0,815$; $p = 0,001$). Este estudo sugere que o estresse oxidativo possa ser um fator importante na disfunção glial da encefalopatia porto-sistêmica.

Palavras-chave: Cirrose, Encefalopatia porto-sistêmica latente, estresse oxidativo, proteína S100B, TBARS.

Introdução

A cirrose é uma lesão do fígado definida histologicamente, caracterizada por um dano difuso e regeneração dos hepatócitos, um aumento do tecido conjuntivo (fibrose), e desorganização da arquitetura lobular e vascular. A encefalopatia porto-sistêmica é uma complicação freqüente da cirrose. Sua patogênese não está plenamente elucidada, embora exista consenso sobre a importância das neurotoxinas, em especial da amônia (Hazell & Butterworth, 1999). Em cérebros de pacientes cirróticos os neurônios encontram-se morfológicamente normais, mas os astrócitos mostram sinais da degeneração Alzheimer tipo II, com aumento do núcleo, marginação periférica da cromatina e nucléolo proeminente.

As alterações funcionais da encefalopatia porto-sistêmica (EPS) incluem modificações na permeabilidade da barreira hematencefálica, mudanças no metabolismo energético cerebral, um aumento do tono gabaérgico e alterações em vários sistemas neurotransmissores e seus receptores (Jalan et al, 2003; Albrecht & Jones, 1999). O fato de que alterações Alzheimer tipo II podem ser induzidas experimentalmente, em culturas de astrócitos, pela exposição à amônia, trouxe a idéia de que a EPS seria uma desordem de células gliais, sendo a alteração neuronal uma consequência (Häussinger et al, 2000).

A encefalopatia porto-sistêmica latente (EPSL) é uma síndrome na qual pacientes com doença hepática crônica apresentam anormalidades neuropsicológicas ou eletroencefalográficas na ausência de alterações clínicas

óbvias, mentais ou neurológicas. Nas duas últimas décadas a área de diagnóstico da EPSL tem sido intensamente pesquisada (Saxena et al, 2002). Os testes diagnósticos empregados para a detecção da EPSL são as medidas neuropsicológicas e eletrofisiológicas. Os defeitos mais precoces no estado mental são detectados por testagens neuropsicológicas. Todavia, esses testes são sabidamente influenciados pela idade, educação, nível sociocultural e pela repetição das testagens (Weissenborn et al, 1998). Testes eletrofisiológicos, eletroencefalogramas e potenciais evocados têm sido usados para identificar casos de encefalopatia porto-sistêmica latente (Nora et al, 2000). Dados comparando a relativa sensibilidade dos métodos eletrofisiológicos com as avaliações psicológicas para detecção de encefalopatia porto-sistêmica latente são inconclusivos (Sandford et al, 1988; Amodio et al, 1996). Existe evidência de que a EPSL afeta a qualidade de vida dos pacientes (Groeneweg et al, 1998), e, desse modo, necessita ser detectada e tratada.

O estresse oxidativo é definido como um estado de níveis mais altos de espécies reativas de oxigênio (ROS, e.g., O_2^- , OH^\bullet , $ONOO^-$) do que das defesas celulares antioxidantes. A geração de ROS é proeminente pois a essas são geradas durante o metabolismo aeróbico. Em condições normais as ROS são eliminadas por defesas celulares antioxidantes enzimáticas (e.g., superóxido dismutase e catalase) e não enzimáticas (GSH e ácido úrico) e por antioxidantes encontrados na dieta tais como as vitaminas A, E e C. Se não removidas de maneira efetiva as ROS podem causar dano celular oxidativo como, por exemplo, peroxidação das membranas lipídicas bem como dano as proteínas e DNA (Halliwell & Gutteridge, 2000; Mahadik et al., 2001).

Aumento do estresse oxidativo tem sido associado com doença hepática (Aboutwerat et al, 2003). Em consonância a hiperamonemia, uma alteração bioquímica comum induzida pela insuficiência hepática crônica, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio superóxido e diminui a atividade de diversas enzimas antioxidantes no cérebro (Hazell, 1999). Além disso, pacientes com cirrose alcoólica descompensada têm um aumento na produção de ROS pelos neutrófilos não acompanhada por qualquer elevação nas atividades da glutathione peroxidase e da catalase. O tecido cerebral parece mais sensível ao estresse oxidativo, o qual resulta em dano neurológico causado pela doença hepática (Mahadik et al., 2001).

A proteína S100B é considerada um marcador sensível de dano cerebral pois seus níveis estão aumentados no líquido e/ou no sangue em danos agudos e crônicos do sistema nervoso central (SNC) (Portela et al, 2002; Schmidt et al., 2004; Donato, 2001). A S100B é uma proteína ligante de cálcio produzida fisiologicamente e liberada pelos astrócitos. Assim a especificidade dessa proteína pode ser usada para entender o envolvimento de tipos diferentes de células nervosas em condições patológicas. Aumentos na S100B podem refletir tanto um dano glial ou a uma gama de reações astrocitárias ao dano neuronal (astrogliose reativa), que pode desempenhar um papel neuroprotetor (Donato, 2001).

O objetivo deste estudo é avaliar a presença de estresse oxidativo, alterações gliais (conforme indicadas pelos níveis séricos de S100B) bem como as condições neurológicas das crianças com cirrose.

Procedimento Experimental

Nós conduzimos um estudo caso-controle com crianças portadoras de cirrose para avaliar os seguintes parâmetros: i) níveis séricos da proteína S100B; ii) atividades da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT); iii) níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA) medidos pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Avaliação eletrofisiológica pelos potenciais evocados auditivos (PEA) e potenciais evocados visuais por padrão reverso (PEVR), e a avaliação do status cognitivo. Quatorze sujeitos com diagnóstico de cirrose (de 5-18 anos; média 12,5 anos) foram recrutados na Unidade de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (de janeiro de 2001 a abril de 2002). O diagnóstico de cirrose foi baseado em critérios clínicos, bioquímicos, ultrassonográficos e histológicos. Cirrose criptogênica foi diagnosticada quando foram excluídas as seguintes causas: deficiência de alfa-1 antitripsina, erros inatos do metabolismo, colangite esclerosante, hepatites virais B e C, doença infecciosa congênita, uso de drogas hepatotóxicas, presença de anticorpos para hepatite auto-imune tipos 1 e 2, e doença de Wilson. A gravidade da doença foi medida usando o escore pediátrico de doença hepática - Pediatric End-Stage Liver Disease (PELD) (Wiesner et al, 2001).

Foram excluídos pacientes que entraram em algum destes critérios: cirrose alcoólica, história de doença neurológica não relacionada com a insuficiência hepática, sinais clínicos ou ao exame físico de EPS, ou não aceitação do termo de consentimento. O protocolo do estudo foi aprovado pelo comitê de ética local e após a descrição completa do estudo aos pais um termo de consentimento era obtido. Foram recrutados vinte e seis controles. Eram crianças saudáveis, filhos de funcionários do hospital, que passaram por exames clínicos, laboratoriais e psicológicos. Foram excluídos aqueles que apresentassem história de doença neurológica, trauma cranioencefálico recente ou doenças físicas. Os exames laboratoriais para casos e controles foram: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamil transferase, bilirrubinas total e direta, albumina, taxa de sedimentação eritrocitária, tempo de protrombina, e fator V.

Proteína S100B

Como já descrito por Portela et al. (2002), as medidas de S100B foram realizadas em um luminômetro Lumat LB9507 (EG&G Berthold) usando um kit de ensaio de imunoluminescência, que usa os anticorpos marcados com isoluminol. A curva padrão da S100B foi linear até 20ng/ml e o coeficiente de variação nas duplicatas dos padrões e das amostras foi de até 5% em todos níveis. Os níveis de S100B estão expressos em ng/ml (média \pm desvio padrão).

Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD foi determinada por espectrofotômetro nas amostras de plasma pela medida da inibição da taxa de formação de adrenocromo em 480nm num meio

de reação contendo 1mmol/l de adrenalina (pH 2) e 50 mmol/l de glicina (pH 10,2). Esta reação foi realizada a 30°C por 3 minutos. A atividade da enzima está expressa em unidades de superóxido dismutase por g de proteína. Uma unidade é definida como a quantidade de enzima que inibe a taxa de formação de adrenocromo em 50% (Mirsa HP, Fridovich I, 1972).

Atividade da Catalase (CAT)

O ensaio foi realizado conforme descrito por Chance (Chance B, Machley AL, 1995). O ensaio é baseado na determinação da taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, medido a 240nm. A reação foi realizada a 30°C por 1 minuto. A atividade da enzima está expressa em unidades de catalase por mg de proteína. Uma unidade de catalase decompõe 1 μ mol de H₂O₂ por minuto num pH de 7.4 e 30°C.

Determinação dos níveis séricos de MDA (TBARS)

Os níveis de MDA foram medidos pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA), descrito por Wills (Wills ED, 1966). A peroxidação foi medida quando da produção de MDA que em combinação com TBA forma um cromógeno rosa (medido a 530nm). Os resultados de MDA estão expressos em nmol/ml.

Potenciais Evocados

Antes dos estudos de potenciais evocados, os pacientes fizeram testes audiométricos e eletrorretinograma para excluir défices auditivos ou visuais que prejudicariam o estudo. Os testes de potenciais evocados realizados foram os potenciais evocados auditivos de tronco cerebral (PEA) e potenciais evocados

visuais por padrão reverso (PEV). Os PEA foram registrados no paciente em repouso ou sonolência, através de eletrodos de superfície localizados no escalpo sendo o eletrodo positivo colocado em Cz (sistema internacional 10-20), o negativo na mastóide ipsilateral ao estímulo, e o terra na mastóide contralateral. Foram usadas duas séries de 2000 estímulos clique, padrão rarefeito, a 60dB acima do limiar auditivo, com emascaramento contralateral de 40dB. A frequência do estímulo foi de 10Hz, tempo de análise 10ms, e filtragem para bloquear estímulos acima de 3KHz e abaixo de 50Hz. Sempre que necessário o paciente foi sedado com hidrato de cloral a 20% na dose de 50mg/Kg/dose. PEV foi realizado por estímulo de padrão reverso com o registro dos potenciais no escalpo através de eletrodos de superfície. O eletrodo positivo colocado em Cz, o negativo em Oz e o terra em Fpz (sistema internacional 10-20). O paciente foi examinado em uma sala em penumbra, com a tela de padrão reverso a uma distância de 1m dos olhos. Cada olho foi examinado separadamente (o outro coberto) com duas séries de 200 estímulos, com frequência de 2Hz, tempo de análise de 200ms, sensibilidade de 20 μ V e filtragem bloqueando estímulos acima de 100Hz e abaixo de 1Hz. Sempre que necessário o paciente foi sedado do mesmo modo descrito para PEA. Nos casos e controles os métodos foram os mesmos.

Avaliação do funcionamento cognitivo

A avaliação psicológica da função cognitiva foi feita usando as Matrizes Progressivas Coloridas de Raven (Raven et al, 1988) e as Figuras Complexas de Rey (Rey, 1998, 1999). Ambas já adaptadas para versões em português brasileiro (Angelini et al, 1989).

Matrizes Progressivas Coloridas (MPC) - É um teste não-verbal que avalia habilidades perceptivas e raciocínio indutivo, exigindo inferências sobre as relações existentes entre itens abstratos. A Escala Especial, destina-se a crianças de 5 a 11 anos e a indivíduos com suspeita de comprometimento intelectual. As séries que compõem o teste são apresentadas na forma de caderno, contendo matrizes ou desenhos impressos na parte superior de cada página. Entre os desenhos, há um espaço em branco que deve ser completado de acordo com a lógica do conjunto. Na parte inferior, constam seis ou oito alternativas de respostas a qual deve ser selecionada pelo sujeito. As séries são ordenadas por dificuldade crescente.

Figuras Complexas (FC) - Trata-se de um teste de avaliação neuropsicológica de funções de percepção e memória. Sua principal premissa é de que a memória visográfica pode ser avaliada de forma acurada se houver, concomitante a esse processo, o exame da atividade perceptiva analítica e organizadora. Consta de cópia e reprodução de memória de um traçado geométrico, cuja estrutura é complexa e forma uma figura sem significado evidente. As reproduções são analisadas de acordo com os seus componentes, sendo pontuadas unidades de escore com base em normas brasileiras.

Análise Estatística

Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Para avaliar diferenças entre os grupos, casos e controles, foi utilizada análise de variância

(ANOVA – one-way) e teste t de Student. Para avaliações de correlações foi utilizada correlação de Pearson (two-tailed). Significância estatística foi determinada com $p < 0.05$. Todos os testes estatísticos foram feitos através do programa SPSS 11.0 para Windows.

Resultados

Os dados clínicos e laboratoriais dos 14 pacientes cirróticos estão dispostos na Tabela 1. Todos os casos e controles tiveram audiometria e eletrorretinograma normais. O grupo de casos mostrou-se mais velho que o grupo controle (pacientes 12.2 ± 3.6 anos; e controles 8.7 ± 3.4 anos). O perfil cognitivo avaliado pelo teste MPC mostrou diferença entre os grupos, sendo que o grupo com cirrose apresentou escores mais baixos que o grupo controle, $9,84 \pm 2,47$ e $22,78 \pm 7,36$ respectivamente; $p < 0,001$, sugerindo dificuldades no funcionamento intelectual. A avaliação pelo teste FC não mostrou diferença entre os grupos. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes e controles em ambos, PEV e PEA. Não houve diferença estatística dos níveis de S100B entre os grupos ($0,47 \pm 0,36$ e $0,44 \pm 0,19$; $p = 0,731$). Os resultados dos parâmetros de estresse oxidativo estão sumarizados na Tabela 2. A atividade da SOD e os níveis de TBARS estão aumentados no grupo cirrótico, sendo que a atividade da CAT está diminuída.

Foi evidenciada uma forte correlação entre TBARS e S100B no grupo de casos, Figura 1 ($r = -0,815$, $p = 0,001$).

Tabela 1: Dados clínicos e laboratoriais dos casos.

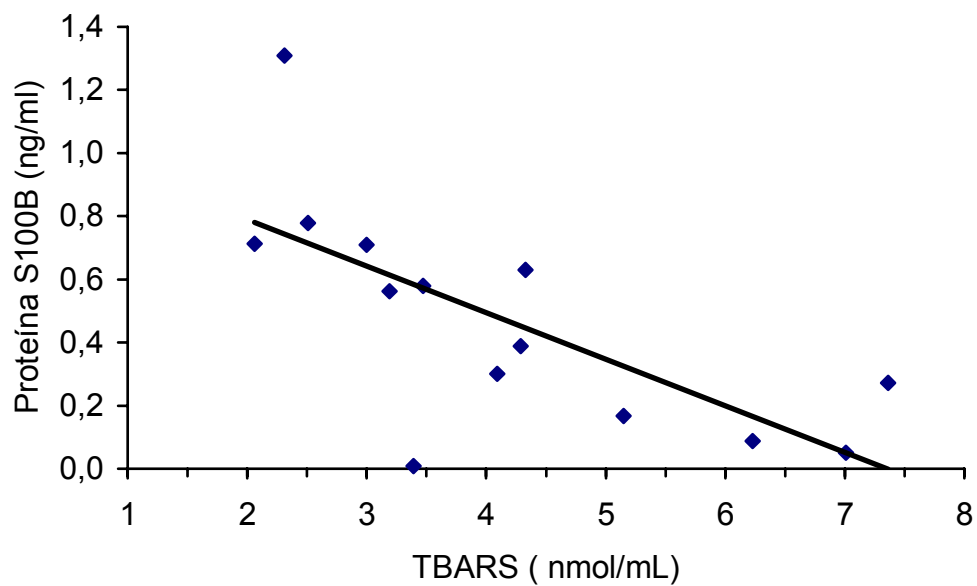
Paciente	Sexo ^a	Idade ^b	BT ^c	ALB _d	TP ^e	PELD ^f	Etiologia ^g
1	F	16,4	1,5	3,3	14,1	-2,90	CS
2	M	7,9	1,8	4,0	11,8	0,00	Alagille S
3	M	16,0	2,3	3,2	16,8	3,50	AHB
4	F	12,5	16	3,5	19,0	16,80	HAI
5	M	18,4	5,8	1,4	19,0	17,00	AHB
6	F	9,6	2,3	4,1	14,0	-2,30	CR IPT
7	F	9,8	0,7	3,6	16,1	-4,30	HCV
8	F	15,4	3,6	3,6	21,3	10,50	HAI
9	M	5,1	0,3	4,1	13,1	-7,00	AHB
10	M	14,2	1,1	3,8	12,6	-0,30	AHB
11	M	16,0	2,1	3,1	20,7	7,70	HAI
12	F	9,3	1	4,3	15,3	-5,10	CR IPT
13	F	13,3	2,9	3,0	22,0	11,30	HAI
14	M	11,3	5	2,5	20,8	18,50	AHB

^aF, feminino; M, masculino. ^bIdade (anos). ^cBT, bilirrubina total (mg/dl). ^dALB, albumina (g/dl). ^eTP, tempo de protrombina (seg). ^fPELD Pediatric End-Stage Liver Disease. ^gCR IPT, cirrose criptogênica; HAI, hepatite autoimune; AHB, atresia hepática biliar; HCV, hepatite vírus C; CS, colangite esclerosante.

Tabela 2: Variáveis com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos pelo teste t. Atividade da superóxido dismutase (SOD), atividade da catalase (CAT), níveis plasmáticos de MDA medidos pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Expressos em média \pm desvio padrão.

	Controles	Cirróticos	p (teste t)
U SOD /g de proteína	1.22 \pm 0.74	4.52 \pm 2.32	0,001
U CAT / mg de proteína	2.95 \pm 2.61	1.07 \pm 1.04	0,019
TBARS (nmol/mL)	2.91 \pm 0.49	4.17 \pm 1,70	0,002

Figura 1: Correlação entre níveis séricos da proteína S100B e TBARS. Coeficiente de correlação de Pearson $r = -0,815$, $p=0,001$.



Discussão

Em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que evidencia uma forte correlação entre estresse oxidativo e alteração de função glial em crianças com cirrose.

Nos pacientes cirróticos, uma grande gama de sintomas está dentro do termo EPS. Estas anormalidades neuropsiquiátricas vão de distúrbios leves do sono, passam por alterações nítidas da função cerebral, até graves sintomas neuropsiquiátricos e coma. Na cirrose, bem como na insuficiência hepática aguda, os neurônios e a barreira hematencefálica parecem anatomicamente normais. A EPS na cirrose se caracteriza neuropatologicamente por astrocitose Alzheimer tipo II (Jalan et al, 2003).

Os altos níveis de amônia parecem ser cruciais na indução dessas alterações neuropsiquiátricas e neuropatológicas. No cérebro, os astrócitos são os principais responsáveis pela detoxificação da amônia, convertendo glutamato em glutamina. Um aumento dos níveis de amônia eleva a quantidade de glutamina nos astrócitos, levando a um desequilíbrio osmótico, que resulta no inchaço celular e finalmente edema cerebral. Entretanto, considerando a relação íntima estrutural e metabólica entre os astrócitos e os neurônios é plausível acreditar que ambas as células possam ser afetadas em maior ou menor grau.

Apesar dos avanços, o diagnóstico precoce da EPSL, uma condição silenciosa da doença hepática, permanece um desafio a prática médica. Neste estudo nós

utilizamos uma combinação de parâmetros eletrofisiológicos, neuropsiquiátricos e bioquímicos para avaliar a função cerebral das crianças com cirrose.

Em nosso estudo houve diferença significativa entre os grupos no teste MPC (avaliação psicológica), que é uma medida de inteligência não-verbal, sugerindo a presença de EPSL.

Não foram encontradas alterações nos parâmetros eletrofisiológicos. De acordo com estudos com testes eletrofisiológicos, o eletroencefalograma e os potenciais evocados não são suficientemente sensíveis para detectar as alterações cerebrais na EPSL, o que se confirmou em nosso estudo (Sandford et al, 1988; Amodio et al, 1996; Nora et al, 2000).

No que tange as alterações cerebrais na EPSL, cada vez mais evidências sugerem que o estresse oxidativo é importante de forma primária ou secundária nos mecanismos patofisiológicos agudos ou crônicos de lesão cerebral. Ainda, a redução dos sistemas de defesas antioxidantes endógenas devido a fatores ambientais ou genéticos pode contribuir ainda mais para o estresse oxidativo. Portanto, a descoberta e o desenvolvimento de agentes antioxidantes potentes tem sido uma das áreas mais promissoras e interessantes no sentido de buscar tratamentos para lesões do SNC. Na EPSL a identificação de estresse oxidativo e tratamento precoce com antioxidantes poderiam ser formas interessantes de prevenir o desenvolvimento completo da EPS, ou retardar o processo, permitindo a essas crianças esperarem pelo transplante hepático.

A literatura descreve a SOD com a mais importante enzima envolvida na remoção de ânions de superóxido. Segundo Szuster-Ciesielska et al.(2002), pacientes com cirrose apresentam um aumento na produção de superóxido pelos neutrófilos, o qual induz a biossíntese de SOD. Aumento dos níveis séricos de SOD foram encontrados em pacientes portadores de cirrose alcoólica (Kubota et al.1985). Em nosso trabalho os níveis da SOD estavam significativamente aumentados nas crianças cirróticas, o que está em concordância com a literatura.

A presença de superóxido pode explicar, também, os níveis aumentados de TBARS encontrados neste trabalho. Na presença de estresse oxidativo o dano causado pelas ROS aos lipídios é chamada peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica resulta em uma mistura complexa de hidroperóxidos e produtos secundários de oxidação, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-transnonenal (HNE), estes, então, podem ser usados como marcadores da intensidade de peroxidação lipídica. Os produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS), que incluem o MDA, tem sido um marcador de estresse oxidativo amplamente utilizado (Halliwell & Gutteridge, 2000). Em nosso trabalho houve um aumento significativo dos níveis de TBARS nos pacientes cirróticos, indicando a presença de dano oxidativo nessa doença.

Embora tenha sido detectada a presença de peróxido de hidrogênio em portadores de cirrose, em nosso trabalho não foi identificado um aumento significativo da enzima catalase. Estudos realizados em leveduras

Saccharomyces cerevisiae mostraram que apesar da CAT ser importante para a detoxificação do peróxido de hidrogênio, esta enzima é apenas, moderadamente, induzida por este agente agressor. Outros fatores como a concentração de oxigênio e ATP parece desempenhar um papel importante na regulação da CAT (Jamieson, 1998). Deve se lembrar, no entanto, que todos os sistemas de defesa celular, enzimáticos e não-enzimáticos, operam de forma conjunta a fim de gerar uma eficiente proteção contra o estresse oxidativo.

Com relação a S100B e a doença hepática, um estudo de células gliais por imunorreatividade para S100B em cérebros de pessoas com encefalopatia não mostrou alterações significantes (Kimura & Budka, 1986). Ainda, o aumento dos níveis de S100B em porcos após uma insuficiência hepática aguda induzida cirurgicamente indica que a determinação dos níveis séricos dessa proteína possa trazer informações úteis quanto à presença e a extensão da pressão intracraniana; mas não com relação com os níveis de amônia (Ytrebo et al, 2000). Em nosso estudo, não encontramos diferenças entre os níveis de S100B dos casos e controles. Isto pode ser devido a processos de auto-regulação envolvendo células gliais durante o curso da doença, ou a falta de sensibilidade da proteína S100B em detectar outras alterações que não o aumento da pressão intracraniana secundária a PSE.

Nosso estudo mostrou uma forte correlação entre níveis séricos de S100B e estresse oxidativo, medido pela TBARS no plasma das crianças com cirrose. Uma possível correlação entre estresse oxidativo e S100B já foi demonstrada

pela propriedade ligante de cobre da proteína S100B, e sua habilidade de suprimir danos celulares causados pelo cobre (Nishikawa et al, 1997). Aproximadamente 95% da proteína S100B está no cérebro, e é possível que sua propriedade ligante de cobre tenha um papel importante na homeostase do cobre, bem como na prevenção de danos cerebrais oxidativos causados pelo cobre. O metal de transição cobre é essencial para uma variedade de funções celulares, entretanto, o seu excesso é tóxico para os organismos vivos. A toxicidade resulta, pelo menos em parte, através da reação de Fenton ou Haber-Weiss, nas quais os íons de cobre catalisam a formação de radical OH^\bullet a partir de H_2O_2 . O radical OH^\bullet é um oxidante potente que pode trazer danos a vários componentes celulares, como lipídios, ácidos nucleicos e proteínas. Por isso o íon cobre *in vivo* deve ser contido, para que seu ciclo de redução possa ser obstruído e assim impedir os íons cobre de participar da produção de OH^\bullet . Considerando a ocorrência de 0,1-10mg de cobre/100g de tecidos moles ou líquidos corporais no corpo humano, a contensão do cobre deve ser vista como um mecanismo importante de prevenção do dano oxidativo (Nishikawa et al, 1997; Ha & Lee, 2003).

Um dos principais achados em pacientes com EPS é o dano em células gliais. Nosso estudo sugere que o estresse oxidativo possa ser um dos fatores envolvidos na lesão glial relacionada à cirrose em crianças. Mais ainda, que esta glia lesada possa não exercer plenamente suas capacidades de defesa contra as ROS (via S100B), deixando a célula sem mais este mecanismo protetor contra o estresse oxidativo, resultando em dano oxidativo ainda maior.

Bibliografia

1. Aboutwerat A, Pemberton PW, Smith A, Burrows PC, McMahon RF, Jain SK, Warnes TW. Oxidant stress is a significant feature of primary biliary cirrhosis. *Biochem Biophys Acta* 2003; 1637(2):142-150.
2. Albrecht J, Jones EA. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci* 1999; 170:138-146.
3. Amodio P, Quero JC, Del Piccolo F, Gatta A, Schalm SW. Diagnostic tools for the detection of subclinical hepatic encephalopathy: comparison of standard and computerized psychometric tests with spectral EEG. *Metab Brain Dis.* 1996; 11:315-327.
4. Angelini AL, Alves ICB, Custodio EM, Duarte WF. The São Paulo Norms for J. Raven's Colored Progressive Matrices. *Psychological Test Bull* 1989; 2(2):46-49.
5. Chance B, Machley AL. Assay of catalases and peroxidases. *Meth. Enzymol* 1995; 2:764-775.
6. Donato R. Funcional roles of S100B proteins, calcium-binding proteins of EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1999;1450:191-231.
7. Gazzolo D, Michetti F, Bruschetti M, Marchese N, Lituania M, Mangraviti S, Pedrazzi E, Bruschetti P. Pediatric Concentration of S100B Protein in Blood: Age- and Sex-related Changes. *Clin Chem* 2003; 49(6):967-969.
8. Groeneweg M, Quero JC, De Bruijn I. Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology* 1998; 28:45-49.

9. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899:136-47.
10. Ha BJ, Lee JY. 2003. The effect of chondroitin sulfate against CCl₄-induced hepatotoxicity. *Biol Pharm Bull* 2000; 26(5):622-626.
11. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine 3ed* Oxford: Clarendon; 2000.
12. Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocytes swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* 2000; 32:1035-1038.
13. Hazell AS, Butterwoth RF. Hepatic encephalopathy: an update of pathophysiologic mechanisms. *PSEBM* 1999; 222:99-112.
14. Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, de Bruijn CH, Lamers KJ. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 2000; 31(11):2670-7.
15. Jalan R, Shawcross D, Davies N. The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy. *IJBCB* 2003; 35:1175-1181.
16. Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998; 14(16):1511-27.
17. Kimura T, Budka H. Glial fibrillary acidic protein and S-100 protein in human hepatic encephalopathy: immunocytochemical demonstration of dissociation of two glia-associated proteins. *Acta Neuropathol* 1986; 70:17-21.

18. Kubota S, Sato N, Matsumura T, Kamada T. Chemiluminescence and superoxide dismutase in the plasma in patients with alcoholic and non-alcoholic liver injuries. *Alcohol* 1985; 2(3):469-72.
19. Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Goncalves CA, Fonseca M, Hauck S, Souza DO. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res* 2001; 35(1):11-4.
20. Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Neuro-psychopharmacol & Biol Psych* 2001; 25(3): 463-493.
21. Mirsa HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 217(10): 3170-3175.
22. Nishikawa T, Lee ISM, Shiraishi N, Ishikawa T, Ohta Y, Nishikimi M. Identification of S100B protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *J Biol Chem* 1997; 272(37): 23037-23041.
23. Nora DB, Amaral OB, Busnello JV, Quevedo J, Vieira S, da Silveira TR, Kapczinski F. Evoked potentials for the evaluation of latent hepatic encephalopathy in pediatric liver transplant candidates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31(4):371-376.
24. Portela LV, Tort AB, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R, Rotta LN, Silva CT, Busnello JV, Kapczinski F, Goncalves CA, Souza DO. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem* 2002; 48:950-952.

25. Sandford NL, Saul RE. Assessment of hepatic encephalopathy with visual evoked potentials compared with conventional methods. *Hepatology* 1988; 8: 1094-1098.
26. Saxena N, Bhatia M, Joshi YK, Garg PK, Dwivedi SN, Tandon RK. Electrophysiological and neuropsychological tests for the diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy and prediction of overt encephalopathy. *Liver* 2002; 22: 190-197.
27. Schmidt AP, Tort AB, Amaral OB, Schmidt AP, Walz R, Vettorazzi-Stuckzynski J, Martins-Costa SH, Ramos JG, Souza DO, Portela LV. Serum S100B in pregnancy-related hypertensive disorders: a case-control study. *Clin Chem* 2004; 50(2):435-8.
28. Szuster-Ciesielska A, Daniluk J, Kandefer-Szerszen M. Oxidative stress in the blood of patients with alcohol-related liver cirrhosis. *Med Sci Monit* 2002; 8(6):419-424.
29. Walz R, Portela LV, Tort AB, Neto EC, Fernandes LN, Goncalves CA, Souza DO. Serum S100B levels in patients with HTLV-I-associated myelopathy /tropical spastic paraparesis. *Neurology* 2000; 54(10):2021-2022.
30. Weissenborn K, Ruckert N, Hecker H, Manns MP. The number connection tests A and B. Interindividual variability and use for the assessment of early hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 1998; 28: 646-653.
31. Wiesner RH, McDiarmid SV, Kamath PS. MELD and PELD: application of survival models of liver allocation. *Liver Transplant* 2001; 7:567-580.

32. Wills ED. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* 1966; 99(5): 667-676.
33. Ytrebo LM, Ingebrigsten T, Nedredal GI, Elvenes OP, Korvald C, Rommer B, Revhaug A. Protein S100B: A biochemical marker for increased intracranial pressure in pigs with acute hepatic failure. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:546-551.

7. ANEXOS

- I. Planilhas com os resultados dos potenciais evocados em casos e controles.
- II. Diferenças entre os grupos nos potenciais evocados visuais por padrão reverso (PEV).
- III. Diferenças entre os grupos nos potenciais evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC).
- IV. Planilhas com os resultados das dosagens da SOD, CAT e TBARS em casos e controles.
- V. Gráficos com os resultados da SOD, CAT e TBARS em casos e controles.
- VI. Gráfico dos resultados da avaliação cognitiva com as Matrizes Progressivas de Raven

ANEXO I

Planilhas com os resultados dos potenciais evocados em casos e controles.

PEV. OLHO ESQUERDO - CONTROLES

Nº	OE.E.75	OE.E.100	OE.E.145	OE.D.75	OE.D.100	OE.D.145	OE.C.75	OE.C.100	OE.C.145
1	77,1	125,0	163,0	81,3	130,0	163,0	78,9	122,0	161,0
2	65,7	96,9	127,5	76,5	99,0	146,7	78,9	102,3	132,9
3	65,7	111,6	155,4	72,6	128,4	185,1	76,8	117,0	191,7
4	73,8	102,3	140,4	72,6	107,4	139,8	72,9	107,4	138,9
5	67,5	99,6	134,4	66,0	100,8	151,8	69,0	100,8	152,1
6	92,1	132,9	196,5	100,5	124,2	163,8	92,1	141,3	199,5
7	72,6	106,8	147,0	67,5	108,3	140,1	72,9	105,9	138,0
8	72,9	122,4	175,2	69,9	103,5	165,0	72,6	107,7	159,9
9	80,7	129,9	175,2	83,1	132,6	181,5	80,7	132,0	165,6
10	69,0	110,1	156,9	70,2	105,6	140,4	75,6	109,5	145,5
11	72,0	113,7	166,5	72,6	110,7	159,9	79,5	121,5	184,8
12	76,5	106,5	135,3	71,4	107,1	149,1	66,6	107,4	151,2
13	69,9	109,2	150,9	65,7	111,3	153,0	68,1	110,1	161,7
14	73,8	120,3	177,9	54,3	110,1	195,3	69,9	105,9	181,5
15	79,5	109,2	149,1	66,9	113,7	157,2	72,0	110,7	145,8
16									
17									
18	85,8	117,3	179,7	64,8	109,2	156,9	79,8	115,5	160,5
19	80,7	113,4	164,7	71,7	106,8	160,5	73,8	105,0	149,1
20	72,0	99,3	146,4	73,5	106,8	153,0	81,6	109,5	156,6
21	66,6	110,4	150,3	76,8	110,4	146,7	72,6	107,7	136,8
22	79,5	111,3	140,4	90,3	120,0	168,3	74,4	111,9	145,8
23	79,5	105,0	145,8	68,1	109,5	150,9	76,8	109,5	149,1
24	75,6	106,5	144,0	75,3	112,8	173,7	74,4	108,0	147,9
25	69,0	113,4	161,4	66,9	106,2	148,5	71,4	109,5	155,1
26	78,0	112,8	164,1	76,2	111,9	166,2	69,3	105,3	154,8

PEV. OLHO ESQUERDO - CASOS

Nº	OE.E.75	OE.E.100	OE.E.145	OE.D.75	OE.D.100	OE.D.145	OE.C.75	OE.C.100	OE.C.145
1	89,1	132,3	162,3	102,3	144,9	195,6	94,5	132,6	170,4
2	70,2	109,5	156,3	73,2	107,4	137,4	70,2	107,1	142,5
3	75,3	115,2	170,4	81,3	111,6	188,1	81,3	113,4	180,3
4	78,9	104,4	144,6	71,7	107,1	145,2	75,3	107,1	151,8
5	75,3	122,1	184,2	71,1	109,5	160,8	76,2	111,6	163,5
6	64,2	96,3	116,1	72,9	107,4	164,7	68,4	107,4	179,7
7	62,1	105,6	141,3	68,7	108,3	136,8	73,2	106,5	143,1
8	76,8	110,1	140,1	74,7	116,1	135,9	76,8	111,6	140,7
9	69,9	103,2	166,2	73,2	110,4	148,5	69,6	104,4	173,4
10	68,1	105,9	157,2	65,1	105,6	183,0	62,7	105,9	149,1
11									
12	77,8	117,0	186,6	65,2	107,2	176,0	78,4	116,0	179,4
13	77,0	125,6	166,2	74,8	113,8	180,2	76,0	108,0	122,8
14	81,0	123,8	172,2	77,2	113,6	149,8	77,8	113,8	158,4

PEV. OLHO DIREITO - CONTROLES

Nº	OD.E.75	OD.E.100	OD.E.145	OD.D.75	OD.D.100	OD.D.145	OD.C.75	OD.C.100	OD.C.145
1	76,8	118,0	179,0	78,6	119,0	183,0	78,0	116,0	177,0
2	64,2	104,1	142,2	58,2	98,7	138,6			
3	69,3	109,5	155,4	87,3	132,6	176,4	80,7	120,6	178,2
4	81,3	111,6	145,8	74,4	105,6	133,8	72,9	107,4	136,8
5	65,7	101,1	136,8	66,9	101,4	134,7	66,9	101,7	155,7
6	94,5	138,9	171,9	77,7	119,1	162,6	101,4	136,8	184,8
7	74,7	107,4	171,3	71,7	110,4	144,0	76,2	108,3	169,5
8	62,4	111,3	163,2	69,3	98,4	153,0	75,3	105,0	162,3
9	76,8	126,9	171,6	64,8	105,0	148,2	84,0	125,1	164,7
10	81,6	115,5	145,5	75,3	111,9	156,0	82,5	112,8	141,6
11	79,8	136,8	180,6	76,5	121,2	178,2	84,0	116,4	173,4
12	77,1	110,1	145,8	66,6	108,3	153,6	70,8	111,0	140,7
13	73,8	117,0	162,3	67,5	111,9	153,0	76,2	107,4	148,5
14	76,2	120,0	179,4	77,4	111,6	154,8	73,2	108,6	156,3
15	69,9	114,0	151,5	73,8	114,9	173,7	72,6	111,0	173,4
16									
17									
18	68,4	114,3	161,7	70,5	119,1	165,6	76,8	111,9	157,8
19	78,9	108,6	140,4	73,5	114,6	168,6	74,4	105,9	152,1
20	68,1	108,3	146,7	77,4	108,9	154,2	80,1	115,2	155,4
21	75,3	115,5	159,9	83,4	114,9	154,8	81,6	111,0	156,9
22	68,1	117,0	171,9	86,4	145,2	186,0	77,7	126,0	183,9
23	71,1	111,3	151,2	77,7	111,0	151,2	66,3	106,8	145,2
24	75,6	108,3	136,2	75,3	111,3	160,5	71,4	111,0	159,9
25	70,8	103,8	162,6	63,9	111,3	162,6	72,6	112,2	167,1
26	71,7	107,4	155,1	66,0	101,4	159,0	72,0	102,6	145,8

PEV. OLHO DIREITO - CASOS

Nº	OD.E.75	OD.E.100	OD.E.145	OD.D.75	OD.D.100	OD.D.145	OD.C.75	OD.C.100	OD.C.145
1	94,5	129,9	174,3	93,0	130,2	165,0	92,7	129,6	164,1
2	72,3	108,9	135,3	71,1	111,0	171,3	66,9	97,2	131,7
3	88,5	118,8	157,2	78,9	107,7	163,8	81,3	114,6	151,2
4	75,6	111,9	148,5	68,1	103,8	170,1	72,6	106,5	149,4
5	75,3	108,3	165,6	88,5	112,8	164,1	76,8	112,8	159,3
6	70,2	100,2	117,0	67,8	109,8	162,3	67,8	107,7	150,0
7	61,5	108,3	141,6	70,2	120,0	176,1	63,3	102,9	144,3
8	83,7	107,4	137,4	77,1	111,9	136,5	76,8	111,6	134,7
9	69,9	106,8	154,8	69,3	105,0	140,4	74,1	106,2	147,6
10	65,1	103,5	161,4	63,3	106,5	183,3	72,0	105,9	187,5
11									
12	79,0	114,6	170,4	76,6	117,4	161,0	71,2	110,0	177,0
13	73,2	113,0	159,8	66,6	109,2	159,8	70,0	139,8	182,6
14	78,6	107,8	156,0	80,4	109,4	161,6	76,6	106,8	165,8

PEATC. OUVIDO ESQUERDO - CONTROLES

Nº	OuE.I	OuE.III	OuE.V	OuE.I-V	OuE.I-III	OuE.III-V
1	1,52	3,90	5,72	4,20	2,38	1,82
2	1,56	3,92	5,68	4,12	2,36	1,76
3	1,40	3,58	5,18	3,78	2,18	1,60
4	1,52	3,58	5,56	4,04	2,06	1,98
5	1,62	3,74	5,60	3,98	2,12	1,86
6	1,82	4,22	6,16	4,34	2,40	1,94
7	1,66	3,96	5,78	4,12	2,30	1,82
8	1,78	4,06	5,96	4,18	2,28	1,90
9	1,64	4,00	6,06	4,42	2,36	2,06
10	1,56	4,00	5,84	4,28	2,44	1,84
11	1,76	3,94	5,84	4,08	2,18	1,90
12	1,54	3,72	5,64	4,10	2,18	1,92
13	1,48	3,90	5,56	4,08	2,42	1,66
14	1,78	4,34	6,10	4,32	2,56	1,76
15	1,48	3,86	5,82	4,34	2,38	1,96
16						
17						
18	1,52	3,96	6,08	4,56	2,44	2,12
19	1,62	3,84	5,68	4,06	2,22	1,84
20	1,48	3,66	5,66	4,18	2,18	2,00
21	1,52	3,90	6,12	4,60	2,38	2,22
22	1,50	3,96	6,06	4,56	2,46	2,10
23	1,46	3,60	5,34	3,88	2,14	1,74
24	1,38	3,94	5,66	4,28	2,56	1,72
25	1,68	3,60	5,62	3,94	1,92	2,02
26	1,54	3,72	5,72	4,18	2,18	2,00

PEATC. OUVIDO ESQUERDO - CASOS

Nº	OuE.I	OuE.III	OuE.V	OuE.I-V	OuE.I-III	OuE.III-V
1	1,50	3,58	5,50	4,00	2,08	1,92
2	1,86	3,74	5,78	3,92	1,88	2,04
3	1,48	3,80	5,88	4,40	2,32	2,08
4	1,46	3,90	5,90	4,44	2,44	2,00
5	1,52	3,86	6,18	4,66	2,34	2,32
6	1,46	3,58	5,66	4,20	2,12	2,08
7	1,60	3,76	5,60	4,00	2,16	1,84
8	1,60	3,76	5,66	4,06	2,16	1,90
9	1,44	3,42	5,32	3,88	1,98	1,90
10	1,44	3,94	5,98	4,54	2,50	2,04
11						
12	1,48	4,20	5,40	3,92	2,72	1,20
13	1,48	3,78	5,68	4,20	2,30	1,90
14	1,64	4,04	6,04	4,40	2,40	2,00

PEATC. OUVIDO DIREITO - CONTROLES

Nº	OuD.I	OuD.III	OuD.V	OuD.I-V	OuD.I-III	OuD.III-V
1	1,46	3,82	5,58	4,12	2,36	1,76
2	1,56	3,94	5,68	4,12	2,38	1,74
3	1,56	3,60	5,36	3,80	2,04	1,76
4	1,68	3,60	5,48	3,80	1,92	1,88
5	1,62	3,76	5,56	3,84	2,14	1,70
6	1,82	4,02	6,10	4,28	2,20	2,08
7	1,76	3,96	6,02	4,26	2,20	2,06
8	1,72	4,06	5,92	4,20	2,34	1,86
9	1,70	4,06	6,02	4,32	2,36	1,96
10	1,56	4,06	5,76	4,20	2,50	1,70
11	1,68	3,96	5,92	4,24	2,28	1,96
12	1,42	3,76	5,62	4,20	2,34	1,86
13	1,46	3,80	5,50	4,04	2,34	1,70
14	1,72	4,34	6,26	4,54	2,62	1,92
15	1,82	3,88	5,86	4,04	2,06	1,98
16						
17						
18	1,54	3,98	6,08	4,54	2,44	2,10
19	1,56	3,86	5,42	3,86	2,30	1,56
20	1,50	3,78	5,74	4,24	2,28	1,96
21	1,76	4,10	6,10	4,34	2,34	2,00
22	1,72	3,88	5,92	4,20	2,16	2,04
23	1,56	3,70	5,62	4,06	2,14	1,92
24	1,54	3,80	5,46	3,92	2,26	1,66
25	1,62	3,52	5,46	3,84	1,90	2,60
26	1,46	3,80	5,84	4,38	2,34	2,04

PEATC. OUVIDO DIREITO - CASOS

Nº	OuD.I	OuD.III	OuD.V	OuD.I-V	OuD.I-III	OuD.III-V
1	1,58	3,56	5,58	4,00	1,98	2,02
2	1,82	3,60	5,66	3,84	1,78	2,06
3	1,52	3,82	5,92	4,40	2,30	2,10
4	1,46	3,96	5,96	4,50	2,50	2,00
5	1,50	3,84	6,24	4,74	2,34	2,40
6	1,42	3,66	5,66	4,14	2,24	1,90
7	1,64	3,82	5,66	4,02	2,18	1,84
8	1,48	3,72	5,70	4,22	2,24	1,98
9	1,30	3,44	5,18	3,88	2,14	1,74
10	1,58	3,86	5,90	4,32	2,28	2,04
11						
12	1,50	4,10	5,38	3,88	2,60	1,28
13	1,50	3,76	5,56	4,06	2,26	1,80
14	1,74	4,04	6,18	4,44	2,30	2,14

ANEXO II

Diferenças entre os grupos nos potenciais evocados visuais por padrão reverso (PEV). Teste t de Student.

Group
Statistics

	Group	Mean	Std. Deviation	p
OE.E.75	Controls	74,9	6,834	0,805
	Cirrhotic	74,285	7,293	
OE.E.100	Controls	112,052	9,752	0,758
	Cirrhotic	113,154	10,512	
OE.E.145	Controls	156,119	17,652	0,688
	Cirrhotic	158,746	19,458	
OE.D.75	Controls	73,157	9,71	0,647
	Cirrhotic	74,723	9,397	
OE.D.100	Controls	112,162	9,422	0,915
	Cirrhotic	112,531	10,224	
OE.D.145	Controls	158,476	14,72	0,603
	Cirrhotic	161,692	21,057	
OE.C.75	Controls	75,5	5,723	0,971
	Cirrhotic	75,415	7,6	
OE.C.100	Controls	112,41	9,82	0,701
	Cirrhotic	111,185	7,346	
OE.C.145	Controls	157,524	18,376	0,931
	Cirrhotic	158,085	18,179	
OD.E.75	Controls	74	7,311	0,496
	Cirrhotic	75,954	9,109	
OD.E.100	Controls	115,105	9,436	0,165
	Cirrhotic	110,723	7,458	
OD.E.145	Controls	158,767	13,954	0,22
	Cirrhotic	152,254	15,962	
OD.D.75	Controls	74,043	7,143	0,817
	Cirrhotic	74,685	8,822	
OD.D.100	Controls	113,51	10,789	0,637
	Cirrhotic	111,9	7,132	
OD.D.145	Controls	158,286	15,072	0,384
	Cirrhotic	162,715	12,707	
OD.C.75	Controls	77,58	7,537	0,19
	Cirrhotic	74,008	7,408	
OD.C.100	Controls	113,245	8,466	0,649
	Cirrhotic	111,662	11,333	
OD.C.145	Controls	160,71	14,517	0,549
	Cirrhotic	157,323	17,428	

ANEXO III

Diferenças entre os grupos nos potenciais evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC). Teste t de Student.

Group
Statistics

	Group	Mean	Std. Deviation	p
OUE.I	Controls	1,5819	0,119	0,274
	Cirrhotic	1,5354	0,1172	
OUE.III	Controls	3,888	0,196	0,206
	Cirrhotic	3,797	0,204	
OUE.V	Controls	5,7829	0,2637	0,62
	Cirrhotic	5,7369	0,2539	
Oue.I-V	Controls	4,201	0,218	0,994
	Cirrhotic	4,202	0,262	
Oue.I-III	Controls	2,3057	0,1346	0,482
	Cirrhotic	2,2615	0,2287	
Oue.III-V	Controls	1,8952	0,1536	0,525
	Cirrhotic	1,94	0,2539	
OUD.I	Controls	1,6276	0,1207	0,062
	Cirrhotic	1,5415	0,135	
OUD.III	Controls	3,901	0,1778	0,076
	Cirrhotic	3,7831	0,1894	
OUD.V	Controls	5,7867	0,2579	0,61
	Cirrhotic	5,7369	0,2989	
OuD.I-V	Controls	4,1543	0,2102	0,693
	Cirrhotic	4,1877	0,2772	
OuD.I-III	Controls	2,2733	0,1625	0,62
	Cirrhotic	2,2415	0,206	
OuD.III-V	Controls	1,881	0,1487	0,359
	Cirrhotic	1,9462	0,2613	

ANEXO IV

Planilhas com os resultados das dosagens da SOD, CAT e TBARS em casos e controles.

Amostra	CONTROLES			OBS
	Usod/g de proteína	Ucat/mg de proteína	TBARS (nmol/mL)	
CO1	0,99 ± 0,14	3,73 ± 0,52	2,62 ± 0,06	
CO2	0,42 ± 0,04	1,06 ± 0,35	2,64 ± 0,03	
CO3	0,31 ± 0,06	1,72 ± 0,81	2,64 ± 0,14	
CO4	1,21 ± 0,42	8,26 ± 2,25	3,47 ± 0,12	
CO5	3,21 ± 0,56	1,08 ± 0,16	3,54 ± 0,14	Hemolisada
CO6	0,67 ± 0,01	7,35 ± 0,95	3,49 ± 0,09	
CO7	2,15 ± 0,25	5,47 ± 0,92	2,57 ± 0,00	
CO8	0,35 ± 0,06	1,10 ± 0,00	2,06 ± 0,03	
CO9	0,57 ± 0,08	3,39 ± 0,41	2,86 ± 0,00	
CO10	0,91 ± 0,11	1,04 ± 0,24	3,23 ± 0,06	
CO11	0,71 ± 0,11	0,92 ± 0,36	3,02 ± 0,06	
CO12	0,66 ± 0,11	9,68 ± 3,07	2,53 ± 0,06	
CO13	1,23 ± 0,04	1,41 ± 0,30	2,45 ± 0,06	
CO14	1,12 ± 0,04	0,79 ± 0,12	1,94 ± 0,09	
CO15	0,42 ± 0,07	5,75 ± 0,51	2,98 ± 0,06	
CO16	1,04 ± 0,19	0,52 ± 0,02	4,15 ± 0,09	
CO17	1,38 ± 0,52	0,77 ± 0,27	2,94 ± 0,06	
CO18	0,89 ± 0,84	2,66 ± 0,81	3,33 ± 0,09	
CO19	-	-	-	Amostra Insuficiente
CO20	1,74 ± 0,00	6,03 ± 1,14	2,47 ± 0,14	
CO21	1,06 ± 0,31	1,36 ± 0,18	2,92 ± 0,09	
CO22	1,23 ± 0,47	2,29 ± 0,15	2,66 ± 0,06	
CO23	2,67 ± 1,05	1,44 ± 0,19	3,11 ± 0,12	
CO24	2,09 ± 1,11	2,39 ± 0,83	2,92 ± 0,14	
CO25	1,60 ± 0,74	1,65 ± 0,63	2,74 ± 0,06	
CO26	1,86 ± 0,39	1,80 ± 0,71	3,39 ± 0,06	
Média	1,22 ± 0,74	2,95 ± 2,61	2,91 ± 0,49	

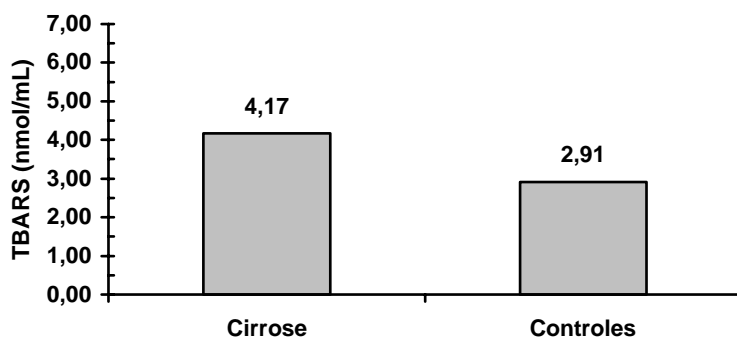
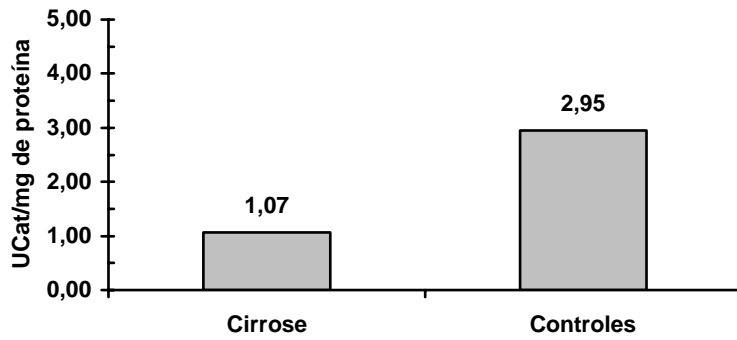
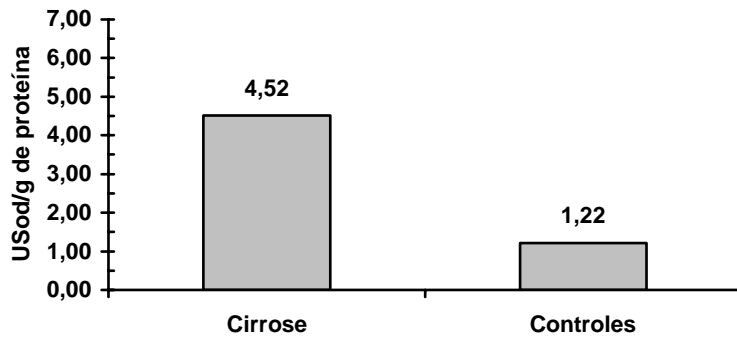
CIRROSE				
Amostra	Usod/g de proteína	Ucat/mg de proteína	TBARS (nmol/mL)	OBS
C1	2,46 ± 0,15	0,93 ± 0,10	3,39 ± 0,06	
C2	5,90 ± 0,03	1,27 ± 0,43	6,23 ± 0,03	
C3	3,52 ± 0,62	2,39 ± 0,94	7,01 ± 0,09	
C4	3,90 ± 0,46	0,34 ± 0,04	7,36 ± 0,12	
C5	4,65 ± 0,75	3,93 ± 0,12	3,19 ± 0,06	
C6	5,01 ± 0,76	1,86 ± 0,07	4,33 ± 0,06	
C7	7,04 ± 0,04	1,03 ± 0,11	3,00 ± 0,03	
C8	9,11 ± 2,21	0,63 ± 0,11	4,29 ± 0,23	
C9	6,08 ± 1,58	0,79 ± 0,18	5,15 ± 0,75	
C10	7,29 ± 0,96	0,35 ± 0,04	3,47 ± 0,06	
C11	1,31 ± 0,56	0,35 ± 0,04	2,31 ± 0,09	
C12	2,27 ± 0,78	0,26 ± 0,07	2,51 ± 0,03	
C13	3,47 ± 0,04	0,61 ± 0,07	2,06 ± 0,09	
C14	1,64 ± 0,14	0,28 ± 0,13	4,09 ± 0,12	
Média	4,52 ± 2,32	1,07 ± 1,04	4,17 ± 1,70	

	Grupos	
	Controle	Cirróticos
USOD/g proteína	1,22 ± 0,74	4,52 ± 2,32 *
U Cat/mg de proteína	2,95 ± 2,61	1,07 ± 1,04 *
TBARS (nmol/mL)	2,91 ± 0,49	4,17 ± 1,70 *

*valores significativamente diferentes entre os grupos pelo teste t com $p \leq 0,05$

ANEXO V

Gráficos com os resultados da SOD, CAT e TBARS.



ANEXO VI

Gráfico dos resultados da avaliação cognitiva com as Matrizes Progressivas Coloridas de Raven; Grupo dos cirróticos $9,84 \pm 2,47$ e dos controles $22,78 \pm 7,36$; $p < 0,001$.

