

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

**ARTERIOPATIA NA ATRESIA BILIAR: PAPEL DOS FATORES INDUZIDOS POR
HIPÓXIA E SUA RELAÇÃO COM PROGNÓSTICO PÓS-PORTOENTEROSTOMIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LEILA XAVIER SINIGAGLIA FRATTA

PORTO ALEGRE

2015

Leila Xavier Sinigaglia Fratta

ARTERIOPATIA NA ATRESIA BILIAR: PAPEL DOS FATORES INDUZIDOS POR
HIPÓXIA E SUA RELAÇÃO COM PROGNÓSTICO PÓS-PORTOENTEROSTOMIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação:
Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz dos Santos

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Xavier Sinigaglia Fratta, Leila

ARTERIOPATIA NA ATRESIA BILIAR: PAPEL DOS FATORES
INDUZIDOS POR HIPÓXIA E SUA RELAÇÃO COM PROGNÓSTICO PÓS-
PORTOENTEROSTOMIA / Leila Xavier Sinigaglia Fratta. -
- 2015.
128 f.

Orientador: Jorge Luiz dos Santos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Atresia biliar. 2. Colestase intra-hepática.
3. Hipóxia. 4. Artéria hepática. I. Luiz dos Santos,
Jorge , orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que, de alguma forma, colaboraram para a conclusão desta dissertação e, em especial:

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Jorge Luiz dos Santos pelo incansável apoio e confiança depositada em todas as fases deste trabalho. Profissional admirável, sempre em busca de conhecimento e um exemplo a ser seguido. Além disso, agradeço pelo incentivo na busca do conhecimento e crescimento pessoal.

À Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira pelo apoio e aprendizado durante a realização deste trabalho. Uma pesquisadora admirável e exemplo para todos nós.

À Profa. Dra. Norma Anair Possa Marroni pela compreensão e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Vinícius Duval da Silva pelo auxílio na realização e compreensão nas análises morfométricas e imunoistoquímicas.

À minha família e amigos, em especial aos meus pais Moacir Fratta e Rosane Berny Xavier Fratta pelo apoio e compreensão em toda esta caminhada.

Às colegas Giovana Regina Weber e Larisse Longo pelo apoio em todas as etapas deste trabalho, ajudando, colaborando e incentivando. Além disso, agradeço de coração pela amizade que construímos e pela cumplicidade que compartilhamos ao longo desta jornada.

Às minhas colegas e amigas (Ana Cláudia Schneider, Carolina Uribe, Jacqueline Weis Bonfanti, Jéssica Ferrari, Juliana Abdalla, Laisa Beduschi, Laura Alencastro de Azevedo, Maria Inês Wilasco, Thais Ortiz Hammes, Thayssa Escobar, Renata Leke, Andrea Cristiane Janz Moreira, Silvia Bona e Graziella Rodrigues) do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio durante a realização do trabalho, tanto nas técnicas quanto na parte da construção científica, e pela amizade construída diariamente.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela estrutura fornecida no Centro de Pesquisa Experimental, bem como a todos os seus funcionários pela competência e auxílio quando necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo constante aprendizado e auxílio dispensados nesta caminhada.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo aporte financeiro para que esse estudo fosse concluído.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Colestase Neonatal	11
2.2 Atresia biliar	15
2.2.1 Diagnóstico de Atresia biliar	16
2.2.2 Tratamento cirúrgico da Atresia biliar.....	19
2.3 Etiopatogenia na Atresia biliar	20
2.3.1 Heterogeneidade da AB sugere diferentes fenótipos.....	22
2.3.1.1 Variantes anatômicas da AB	22
2.3.1.2 Variantes clínicas de AB	23
2.3.1.3 Forma cística	29
2.3.1.4 Variantes inflamatória versus fibrosante de AB.....	30
2.4 Alterações vasculares na atresia biliar	30
2.4.1 Plexo vascular peribiliar	30
2.4.2 Arteriopatia na Atresia biliar	32
2.5 Fibrogênese e reação ductular na AB como marcadores da gravidade da doença	33
2.6 Angiogênese.....	35
2.7 Hipóxia.....	38
2.7.1 Fator Induzido por Hipóxia	38
2.7.2 Papel de HIF-1 α e HIF-2 α	42
2.7.3 Hipóxia e Doenças Hepáticas	43
3. JUSTIFICATIVA	45
4. QUESTÃO DE PESQUISA	46

5. HIPÓTESE	47
6. OBJETIVOS	48
6.1 Objetivo Geral	48
6.2 Objetivos Específicos	48
7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	49
8. CONCLUSÕES	78
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	79
10. REFERÊNCIAS	80

ANEXOS

Anexo I - Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas	102
Anexo II - Alerta Amarelo	103

APÊNDICES

Apêndice I - Material Suplementar	104
Apêndice II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	120

RESUMO

Introdução: A atresia biliar (AB) inclui obstrução completas das vias biliares extra-hepáticas e uma colangiopatia intra-hepática progressiva, cirrogênica. A natureza da colangiopatia destes processos permanece obscura. Uma arteriopatia levando a colangiopatia isquêmica explicaria a natureza progressiva da lesão biliar. A imunolocalização do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) em ramos arteriais e ductos biliares intra-hepáticos e do *porta hepatis* dos pacientes com AB sugere isquemia nestas estruturas. A ocorrência de hipóxia hepatobiliar na AB necessita ser esclarecida. **Objetivo:** Determinar a presença de hipóxia nos fígados de pacientes com AB, analisando a expressão gênica dos fatores induzidos por hipóxia (HIF) -1α e -2α . **Métodos:** Estudo de amostras de biópsias em cunha coletadas na laparotomia exploradora de pacientes com AB isolada sem IgM+ para citomegalovírus (n= 32) comparando com lactentes com colestase intra-hepática (CIH, n= 09), pareados por idade. Uma amostra foi ultracongelada (análise molecular) e outra, parafinizada (análises histológica e imunoistoquímica). Por PCRq, usando sondas TaqMan®, avaliaram-se as expressões gênicas de: HIF1- α , HIF2- α , proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1) (marcador de fibrose biliar), citoqueratina 19 (CK19) (marcador de colangiócitos). O gene normalizador foi 18S ribossômico. Por morfometria, foram quantificadas as extensões de fibrose e reação ductular. Dados clínico-laboratoriais foram prospectivamente coletados. **Resultados:** O grupo AB, comparado à CIH, apresentou maior expressão de HIF1- α e HIF2- α . No grupo AB, a expressão do HIF1- α correlacionou-se positivamente com a bilirrubina total (BT) sérica. Dois subgrupos de AB foram detectados quanto à expressão dos HIFs: alta (hiHIF, expressão 3x maior que a mediana da CIH) e baixa (loHIF). Pacientes hiHIF-1 α eram mais velhos e com maiores níveis de BT e bilirrubina direta (BD) que loHIF-1 α . O subgrupo

hiHIF-2 α apresentou expressão de CK19 inferior a do loHIF-2 α . As demais variáveis foram semelhantes nos subgrupos HIFs. **Conclusão:** Na AB ocorre hipóxia tecidual hepática. Os dados sugerem a existência de hipóxia tecidual progressiva nos fígados afetados pela AB, associada ao desaparecimento de ductos biliares e à piora do quadro obstrutivo biliar.

Palavras-chave: Atresia biliar; colestase intra-hepática; hipóxia; artéria hepática.

ABSTRACT

Background: Biliary atresia (BA) includes a complete obstruction of the extrahepatic biliary tract and progressive intrahepatic cholangiopathy, and the nature of these processes remains unclear. An arteriopathy, leading to an ischemic cholangiopathy, can be involved. The immunolocalization of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in arterial branches and bile ducts both within the liver and at *porta hepatis* from patients with BA suggests ischemia in these structures. The occurrence of hypoxia in the hepatobiliary system in BA needs to be elucidated. **Aim:** To determinate the presence of hypoxia in the livers from patients with BA, by analyzing the gene expression of hypoxia-inducible factor (HIF) -1 α and -2 α . **Methods:** Liver biopsy specimens collected at exploratory laparotomy of age-matched patients with isolated, cytomegalovirus IgM-negative BA (n=32) and intrahepatic cholestasis (IHC, n=9) were evaluated. A sample was ultrafrozen (molecular analysis) and the other was paraffin-embedded (for histological and morphometric analyzes). Gene expression of: HIF-1 α , HIF-2 α , monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) (biliary fibrosis marker) and cytokeratin 19 (CK19) (cholangiocyte marker) were evaluated by PCRq using TaqMan® probes. The normalizing gene was 18S ribosomal. The extents of fibrosis and ductular reaction were assessed by morphometry. Clinical and laboratory data were prospectively collected. **Results:** There was higher HIF-1 α and HIF-2 α expression in BA in comparison with IHC. In BA, the HIF-1 α expression was positively correlated with total serum bilirubin (TB). Two groups were observable in BA regarding HIFs: higher (hiHIF, considering as cutoff point a value higher than 3x the median of expression in IHC) and lower (loHIF). Patients with hiHIF-1 α were older and presented increased levels of TB and direct-reacting serum bilirubin (DB) than loHIF-1 α . Patients with hiHIF-2 α presented CK19 expression

lower than in loHIF-2 α . The other variables were similar in subgroups HIFs. **Conclusion:** In BA there is hypoxia in the liver tissue, which seems to be progressive and associated with the disappearance of bile ducts and worsening biliary obstruction.

Keywords: Biliary atresia; intrahepatic cholestasis; hypoxia; hepatic artery.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB: atresia biliar

ARNT: *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*

BASM: *biliary atresia splenic malformation*

BD: bilirrubina de reação direta

BT: bilirrubina total

CC: cisto do colédoco

CIH: colestase intra-hepática

CK: citoqueratina

CMV: citomegalovírus

cDNA: *complementary DNA*

DNA: *deoxyribonucleic acid*

GGT: gama glutamil transferase

hiHIF: alta expressão de HIF

HIF: *hypoxia-inducible factor*

HRE: *hypoxia-response element*

ICAM: *intercellular adhesion molecule*

IgM: imunoglobulina M

I/R: isquemia e reperfusão

LDB: ligadura de ducto biliar

loHIF: baixa expressão de HIF

MCP1: *monocyte chemoattractant protein 1*

NK: *natural killer*

PCK7: positividade de citoqueratina 7

PCR: *polymerase chain reaction*

PVP: plexo vascular peribiliar

REDL: razão espessura de túnica média e diâmetro luminal

RNA: *ribonucleic acid*

Th: *T helper*

TxH: transplante hepático

VEGFA: *vascular endothelial growth factor A*

VEGFR: *vascular endothelial growth factor receptor*

VHL: von Hippel-Lindau

XPNPEP: *X-prolyl aminopeptidase*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das alterações histopatológicas indicativas de obstrução mecânica extra-hepática.	17
Figura 2 - Anatomia do plexo vascular peribiliar intra e extra-hepático.....	31
Figura 3 - Passo a passo do processo de angiogênese.	37
Figura 4 - Representação do comportamento do HIF- α em situações de normóxia e hipóxia.	40
Figura 5 - Medidas de espessura da túnica média arterial e diâmetro luminal.....	108
Figura 6 - Medida da área positividade para citoqueratina 7	108
Figura 7 - Área de positividade para fibrose..... 7a, 7b.....	109
Figura 8 - Sobrevida com o fígado nativo em 2 anos.....	114
Figura 9 - Sobrevida com o fígado nativo em 2 anos conforme expressão gênica de HIF-2 α	115
Figura 10 - Sobrevida com o fígado nativo em 2 anos conforme expressão gênica de HIF-1 α	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diagnóstico diferencial da colestase neonatal.....	12
Tabela 2 - Agentes envolvidos na etiologia da AB	21
Tabela 3 - Comparação entre atresia biliar e colestase intra-hepática em relação às variáveis em estudo.....	111
Tabela 4 - Correlação entre as variáveis em estudo considerando pacientes com atresia biliar	112
Tabela 5 - Comparação entre os subgrupos de atresia biliar	113

1. INTRODUÇÃO

A atresia biliar (AB) é uma doença que inicia exclusivamente na infância e consiste na obliteração completa de parte ou da totalidade das vias biliares extra-hepáticas, englobando a maioria dos casos de colestase neonatal (1, 2). Independente da realização de uma portoenterostomia para desobstrução do fluxo biliar, em condições ideais, mantém-se no fígado uma colangiopatia progressiva, que geralmente leva à cirrose e à necessidade de transplante hepático (TxH) (3), único tratamento definitivo da doença (4). A AB é a causa mais frequente de TxH pediátrico, e cerca de 50% destes procedimentos devem-se a ela (5).

A etiopatogenia da AB é desconhecida, porém, diferentes estudos têm associado a doença a fatores genético-cromossômicos, ambientais, anormalidades imunológicas e imunogenéticas, além de doenças maternas como diabetes gestacional (1, 2). Diversos estudos, incluindo um modelo murino de AB, têm indicado a presença de um processo imune com um padrão de resposta à infecção viral afetando as estruturas biliares (6).

A hipotética associação entre a AB e anomalias dos ramos da artéria hepática tem sido estudada (7). Uma arteriopatia desencadeando colangiopatia isquêmica explicaria a natureza progressiva da lesão biliar, pois os ductos são nutridos exclusivamente por ramos arteriais do plexo vascular peribiliar (PVP) (8).

Estudos em pacientes com AB demonstraram que há dilatação luminal da artéria hepática no *porta hepatis*, e espessamento de parede vascular dos ramos intrahepáticos sugerindo uma arteriopatia característica (9). Além disto, estudos arteriográficos demonstraram em pacientes com AB, a presença de ramos arteriais periféricos disformes, apresentando irregularidades no contorno, com sinais de oclusão e formação de “tufos” vasculares (10). Nos fígados de pacientes com AB, segundo avaliação morfométrica dos

ramos da artéria hepática, observou-se espessamento de túnica média aparentemente relacionado ao desaparecimento de ductos biliares (7). O fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA, do inglês *vascular endothelial growth factor A*), fator angiogênico secretado em situações de hipóxia mostrou, especificamente na AB por ocasião da portoenterostomia, positividade em estruturas portais, incluindo ramos da artéria hepática e ductos biliares, bem como em artérias e remanescentes biliares no *porta hepatis* (11). O sistema de fatores angiogênicos das angiopoietinas 1 e 2, relacionado ao recrutamento de perícitos e, portanto, ao espessamento de paredes arteriais, apresentou expressão gênica aumentada no fígado de pacientes com AB, observando-se uma correlação positiva entre a expressão destas angiopoietinas com o espessamento da túnica média arterial (12). Estes estudos tornam relevante analisar o comportamento de moléculas envolvidas na hipóxia, como o fator induzido por hipóxia (HIF, do inglês *hypoxia-inducible factor*) -1 α e -2 α , no fígado de pacientes com AB, comparando com os de lactentes afetados por colestase intra-hepática (CIH) e buscando compreender a sua relação com marcadores de gravidade da AB, tanto clínicos quanto laboratoriais, bem como com a evolução clínica dos pacientes após a portoenterostomia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Colestase Neonatal

Colestase é o termo utilizado para descrever os estados patológicos que cursam com a redução do fluxo biliar em qualquer uma das etapas do processo de síntese e secreção da bile, por alterações anatômicas ou funcionais. Os pacientes colestáticos apresentam concentrações séricas elevadas de substâncias que habitualmente são excretadas na bile, como a bilirrubina direta (BD), os sais biliares e o colesterol (13).

A icterícia é um problema comum nos recém-nascidos, ocorrendo em cerca de dois terços dos bebês na primeira semana de vida (14). Uma icterícia prolongada além de 14 dias de vida, porém, merece ser sempre investigada, pois pode ser a expressão de uma doença colestática neonatal (15).

O diagnóstico precoce de uma colestase neonatal é de extrema importância no manejo destes pacientes, visando possibilitar a diferenciação das causas intra- e extra-hepáticas, de modo que os tratamentos clínico e cirúrgico sejam instituídos a tempo e, portanto, sejam idealmente eficazes. A discriminação de doenças específicas potencialmente tratáveis, incluídas na Tabela 1, antes que sequelas hepáticas e sistêmicas tornem-se inevitáveis é questão fundamental da terapêutica.

Tabela 1 - Diagnóstico diferencial da colestase neonatal

Causas intra-hepáticas

- A. Hepatite neonatal idiopática – mecanismo desconhecido
- B. Desordens da embriogênese
 - 1. Síndrome de Alagille (defeito do Jagged 1, rarefação biliar sindrômica)
 - 2. Malformação de placa ductal (ARPKD/FHC, doença de Caroli, ADPKD,)
- C. Desordens da biossíntese e conjugação de sais biliares
 - 1. Deficiência de 3-oxo-4-esteroide 5-beta-redutase
 - 2. Deficiência de 3-beta-hidroxi-5-C27-esteroide desidrogenase
 - 3. Deficiência de oxisterol 7-alfa-hidroxilase
 - 4. Deficiência de BACAT (hipercolenemia familiar)
 - 5. Outras
- D. Desordens do transporte e secreção por membrana
 - 1. Desordens de secreção canalicular
 - a. Transporte de sais biliares – deficiência de BSEP
 - i. Persistente progressiva (PFIC tipo 2)
 - ii. Recorrente benigna (BRIC tipo 2)
 - b. Transporte de fosfolipídios – deficiência de MDR3 (PFIC tipo 3)
 - c. Defeito na oclusão canalicular - deficiência de ocludinas (PFIC tipo 4)
 - d. Transporte iônico – fibrose cística (CFTR)
 - 2. Desordens complexas ou multiorgânicas
 - a. Deficiência de FIC (distúrbio na translocação de fosfatidilserina)
 - i. Persistente, progressiva (PFIC tipo 1, doença de Byler)
 - ii. Recorrente benigna (BRIC tipo 1)
 - b. Colangite esclerosante neonatal (defeito nas junções oclusivas)
 - c. Disfunção artrogripose-renal-colestase
- E. Doenças hepáticas metabólicas
 - 1. Desordens glandulares: hipotireoidismo, hipopituitarismo
 - 2. Com envolvimento do trato biliar: doença de depósito intrahepático de alfa-1-antitripsina, fibrose cística (CFTR)
 - 3. Sem envolvimento do trato biliar

continua

Tabela 1 - Diagnóstico diferencial da colestase neonatal

conclusão

a. Desordem do metabolismo dos carboidratos: galactosemia, intolerância hereditária à frutose, glicogenose IV, síndrome da glicoproteína deficiente de carboidrato
b. Desordem do metabolismo dos aminoácidos: tirosinemia
c. Desordem do metabolismo dos lipídios: doenças de Wolman, Niemann-Pick, Gaucher
d. Desordem do metabolismo dos sais biliares secundária: síndrome de Zellweger (distúrbio nos peroxissomos)
e. Defeito no trânsito molecular mitocôndria-citoplasma: deficiência de citrina (NICCD)
f. Outras: hepatopatias mitocondriais, hemocromatose neonatal
F. Infecções congênicas
1. Parasítica: toxoplasmose
2. Viral: rubéola, citomegalovírus, herpes simples, vírus hepatotrópicos (A, B e C), HIV, parvovírus 19, varicela, paramixovírus, sepse entérica viral (echo-, coxsackie- e adenovírus)
3. Bacteriana: sífilis, sepse bacteriana, infecção do trato urinário, listeriose, tuberculose
G. Desordem imune
Lúpus eritematoso neonatal, hepatite neonatal com anemia hemolítica autoimune
H. Associada à nutrição parenteral total
I. Miscelânea
Histiocitose X; choque e hipoperfusão; asfixia neonatal; associada com obstrução intestinal; hepatite fibrosante com leucemia transitória (trissomia do 21)

Causas extra-hepáticas

Atresia biliar

Cisto de colédoco

Perfuração espontânea do ducto biliar comum

Barro biliar e colelitíase

Fonte: Modificado de Santos *et al.*, 2012.

Abreviaturas: ARPKD/FHC: doença renal policística recessiva autossômica/fibrose hepática congênita; ADPKD: doença renal policística dominante autossômica; BRIC: colestase intra-hepática benigna recorrente; BSEP: bomba de transporte dos sais biliares; CFTR: regulador transmembrana da fibrose cística; MDR3: proteína de resistência multidrogas 3; PFIC: colestase intra-hepática familiar progressiva.

O diagnóstico de colestase neonatal inclui investigações clínica, laboratorial e histopatológica.

Icterícia, hipocolia ou acolia, colúria e, mais tardiamente, prurido e xantomas são achados clínicos na colestase neonatal. A avaliação da coloração fecal e urinária de um paciente icterico, é dado clínico fundamental no diagnóstico de uma colestase neonatal (17, 18). Do ponto de vista laboratorial, colestase é conceituada como a presença de valores de BD maiores que 20% dos valores da bilirrubina total (BT) ou, sendo a BT menor ou igual a 5 mg/dL, valores de BD maiores ou iguais a 1mg/dL (14, 19). No estudo histológico, a colestase é caracterizada pelo acúmulo de pigmento bilirrubínico nos hepatócitos e canalículos biliares, além de outros achados relacionados à etiologia do caso (20).

Um dado a ser considerado é que algumas doenças colestáticas neonatais causadas por alterações canaliculares, tais como colestase intra-hepática familiar progressiva (PFIC, do inglês *progressive familial intrahepatic cholestasis*) 1 e 2, e por desordens da biossíntese dos sais biliares primários, apresentam valores normais ou baixos de gama glutamil transferase (GGT) no soro, cujos níveis elevados são comumente marcadores de colestase. A presença de

colestase evidente sem elevação da GGT serve como critério laboratorial de suspeita destas enfermidades (16).

2.2 Atresia biliar

A AB é uma doença que se inicia exclusivamente na infância, constituindo a causa mais frequente de colestase neonatal (21) e de doença hepática crônica em crianças. Consiste na obstrução completa de parte ou da totalidade das vias biliares extra-hepáticas, associada a uma destruição progressiva da árvore biliar intra-hepática, com rápida progressão da fibrose (1, 22). Com o passar do tempo, a colangiopatia da AB leva a um padrão de rarefação de ductos interlobulares (23).

Os primeiros relatos de AB foram publicados por Thompson em 1891 (24). Em 1916, Holmes introduziu os conceitos de AB “corrigível“, quando alguma área do canal biliar extra-hepático é patente, permitindo anastomose primária do ducto pérvio com o intestino, e “não corrigível“, quando inexistente um canal viável para esta anastomose (25). Ladd, em 1928, realizou a primeira cirurgia de um caso “corrigível“ (26), mas foi apenas em 1959 que Kasai descreveu a portoenterostomia, procedimento cirúrgico paliativo para os casos ditos “não corrigíveis” de AB (27).

Independente da realização adequada da portoenterostomia, em termos de precocidade do procedimento, experiência do cirurgião e capacitação do centro de referência no tratamento de AB, mantém-se no fígado uma colangiopatia progressiva, que, na maioria dos casos, leva à insuficiência hepática crônica e necessidade de TxH (3). A AB é a causa mais frequente de TxH pediátrico, o qual em 50% dos casos deve-se a ela, constituindo seu tratamento definitivo (28, 29).

A AB tem uma distribuição universal, com incidência variável nas diferentes regiões do mundo, estimando-se que afeta 1:5.000 a 1:18.000 nascidos vivos (22). É mais comum na Ásia e na região do Pacífico do que no resto do mundo. A incidência da AB na Polinésia Francesa de 1:3000 nascidos vivos (30), afetando em Taiwan 1,51 crianças a cada 10.000 nascidos vivos (31), enquanto incide em 1:14.000 nascidos vivos nos Estados Unidos (32) e 1:15.000 no Reino Unido (33).

2.2.1 Diagnóstico de Atresia biliar

A investigação diagnóstica de uma AB não deve ser baseada em qualquer exame isolado, sendo a presença da enfermidade sugerida por manifestações clínicas e laboratoriais, e confirmada por exames complementares, especialmente a avaliação histopatológica.

Do ponto de vista clínico, caracteriza-se por um quadro de icterícia secundária à hiperbilirrubinemia de reação direta (conjugada) que se inicia ao nascimento ou nas primeiras semanas de vida, colúria, acolia além de hepatoesplenomegalia variável. A permanência destes achados sugere fortemente uma AB e a investigação deve ser ágil. Geralmente, um paciente com AB tem aparência hígida, é eutrófico e sua icterícia é leve, tendo nascido com peso adequado para a idade gestacional, enquanto pacientes afetados por doenças intra-hepáticas, com frequência apresentam sinais que evidenciam doença sistêmica e, eventualmente, sugerem doenças específicas (34).

Do ponto de vista laboratorial, os níveis de BT e BD, apesar de estarem elevados, não são muito altos. Quanto às enzimas hepáticas, em geral as canaliculares GGT e fosfatase alcalina (FA) encontram-se mais elevadas que as tissulares, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (29).

Exames complementares, incluindo ultrassonografia, tubagem duodenal para detecção de sais biliares na luz duodenal, cintilografia biliar sequencial de 24 horas com tecnécio-99m auxiliam na investigação e são escolhidos de acordo com a preferência da equipe médica e também da sua disponibilidade nos serviços (35). O estudo diagnóstico complementar de maior importância no diagnóstico de AB é a análise histopatológica de uma amostra de tecido hepático coletado por biópsia percutânea. O estudo histopatológico visa primeiramente a identificação das variáveis que se associam especificamente a um quadro obstrutivo das vias biliares, incluindo: 1) reação ductular; 2) expansão portal por infiltrado inflamatório, edema e fibrose; 3) colestase em ductos neoformados, sob a forma de tampões biliares, e 4) presença de pontes fibrosas. (Figura 1)

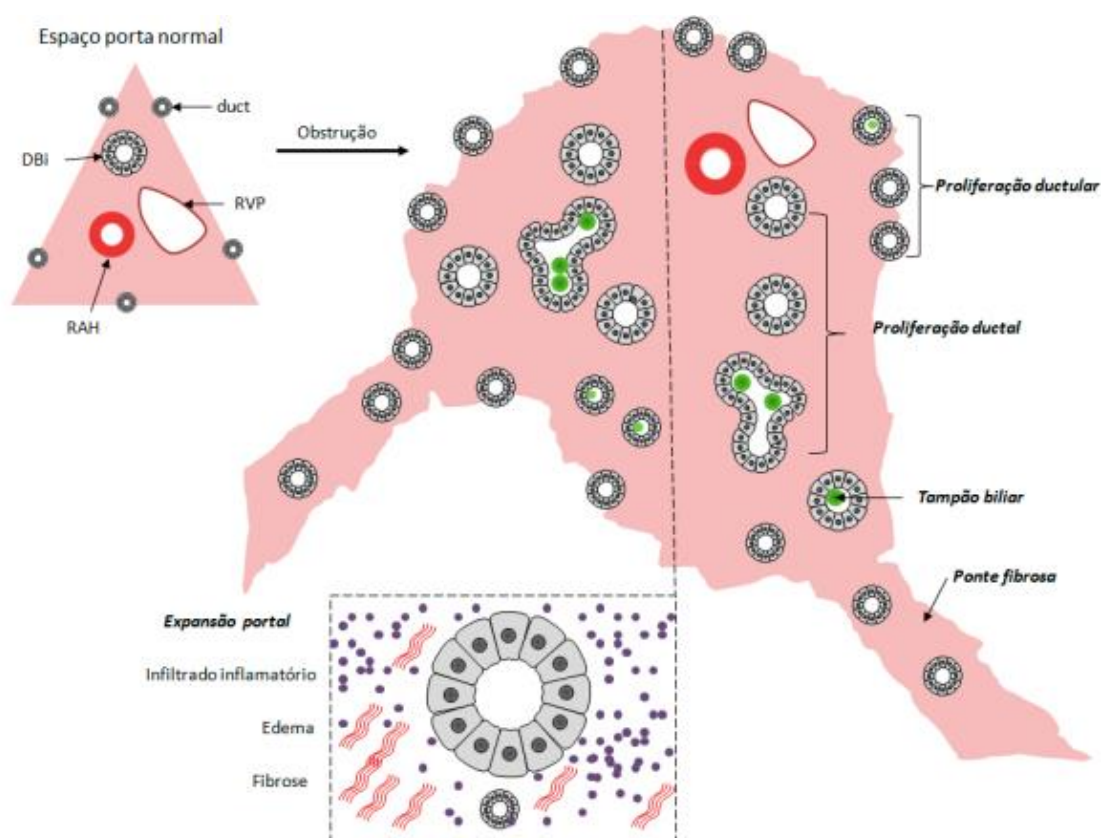


Figura 1 - Representação esquemática das alterações histopatológicas indicativas de obstrução mecânica extra-hepática.

No espaço porta normal pode ser observada a tríade porta, composta por ducto biliar interlobular, ramo da veia porta e ramo da artéria hepática. Na periferia do espaço porta, normalmente, localizam-se ductos biliares, os quais, em situações lesivas e não somente obstrutivas, sofrem proliferação. Na vigência de obstrução mecânica, ocorre expansão portal devido à proliferação de ductos, fibrose, edema portal e infiltrado inflamatório. Nos ductos interlobulares e ductos proliferados, acumulam-se tampões biliares. A fibrose ultrapassa os limites do espaço porta, formando-se pontes de fibrose e estruturas biliares proliferadas, que ligam espaços porta entre si e espaços porta a veias centrolobulares.

Abreviaturas: DBi: ducto biliar interlobular; duct: ductos biliares; RAH: ramo da artéria hepática; RVP: ramo da veia porta. Fonte: Santos *et al.*, 2012.

Com a utilização destes parâmetros, a acurácia, a sensibilidade e a especificidade do método atingem 90,5%, 100%, e 75,9%, respectivamente (36). Porém, alguns dados podem confundir o diagnóstico histopatológico da AB com o de doenças intra-hepáticas:

- 1) as características obstrutivas, especialmente a presença de tampões biliares em ductos neoformados, são achados tempo-dependentes e podem estar ausentes caso a biópsia percutânea tenha sido realizada precocemente;
- 2) pacientes com AB frequentemente apresentam alterações lobulares inespecíficas, decorrentes da colestase *per se* e que não devem ser consideradas como indicadoras de uma colestase de causa intra-hepática;

3) doenças colestáticas de causa intra-hepática, incluindo as hepatopatias causadas por citomegalovírus (CMV), deficiência de alfa-1-antitripsina e síndrome de Alagille, podem apresentar um padrão obstrutivo indistinguível da AB (34).

O diagnóstico final pode ser confirmado apenas no momento de uma laparotomia exploradora, através da inspeção das vias biliares extra-hepáticas e, quando a vesícula e o ducto cístico são permeáveis à passagem de contraste, por uma colangiografia trans-operatória demonstrando obstrução completa dos ductos biliares extra-hepáticos (29).

2.2.2 Tratamento cirúrgico da Atresia biliar

A portoenterostomia, ou cirurgia de Kasai (37), consiste na criação de um segmento intestinal anastomosado ao hilo hepático, de forma similar a um *bypass* em Y-de-Roux, assim desobstruindo as vias biliares extra-hepáticas e restabelecendo o fluxo biliar, de forma a aumentar as chances de sobrevivência com o fígado nativo (27). O restabelecimento de fluxo biliar no pós-operatório depende da idade por ocasião da portoenterostomia, a qual não deveria ultrapassar 60 dias de vida (38). Cerca de 70% a 80% dos pacientes que se submetem à cirurgia antes de 60 dias de vida conseguem restabelecer o fluxo biliar, enquanto 25% dos operados com mais de 90 dias atingem este desfecho (39). Para Serinet *et al.* (2009), porém, os melhores resultados ocorrem nas crianças operadas antes de 45 dias de vida e a realização de portoenterostomias dentro deste período evitaria a necessidade de 5,7% dos TxH até a adolescência. Por outro lado, em um estudo a realização da portoenterostomia antes dos 30 dias de vida levou a piores resultados, sugerindo os autores que, neste caso, uma manifestação tão precoce da AB poderia relacionar-se a uma patogenia diferente associada com pior prognóstico (40).

Outras variáveis, além da idade, podem influir nos resultados pós-operatórios dos pacientes com AB, incluindo aquelas modificáveis com medidas que aprimorem o sistema de saúde em relação à doença, incluindo: 1) experiência do cirurgião; 2) capacitação técnica do centro de referência. Outras variáveis que não podem ser modificadas são também importantes, tais como: 1) presença malformações extra-hepáticas; 2) presença de cistos na via biliar extra-hepática e 3) variante de AB associada à infecção por CMV, entre outras (41).

2.3 Etiopatogenia na Atresia biliar

A etiopatogenia da AB ainda não está totalmente elucidada, e desvendá-la pode levar ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas adicionais à cirúrgica. Múltiplos fatores podem contribuir para a patogênese da AB (42) e, talvez, a AB represente um fenótipo decorrente de diferentes desordens (43). Em um grande grupo de pacientes, a AB parece resultar de uma agressão imune às estruturas hepatobiliares desencadeada por uma infecção viral prévia, mas doenças maternas, fatores imunogenéticos, genético-cromossômicos, ambientais e epigenéticos podem ser gatilhos adicionais (1, 2, 29).

O nosso grupo avalia o papel das anormalidades dos ramos da artéria hepática no desenvolvimento da AB (7, 12).

A tabela 2 lista alguns dos agentes que têm sido propostos como envolvidos na etiologia da AB.

Tabela 2 – Agentes envolvidos na etiologia da AB

Fatores genético-cromossômicos
<ul style="list-style-type: none">• Fatores genéticos<ul style="list-style-type: none">○ Mutação CFC1○ Mutação NFkappaB/c○ Expressão ICAM e HLA-DR○ GPC1 (deleções at 2q37.3)○ Polimorfismos: VEGFA (+936 C/T); X proilil aminopeptidase (1rs 17095355); adiponectina – ADD3 (+276 G/T); MMIF (-173 G/C)• Anormalidades cromossômicas numéricas<ul style="list-style-type: none">○ Trissomias: 10q, 17, 18 e 21
Fatores ambientais
<ul style="list-style-type: none">• Infecções materna/neonatal<ul style="list-style-type: none">○ Citomegalovírus○ Reovírus tipo 3○ Papilomavírus○ Rotavírus• Fitotoxinas, micotoxinas
Outras
<ul style="list-style-type: none">• Anomalias estruturais<ul style="list-style-type: none">○ BASM○ Malformação da placa ductal○ Anomalias da artéria hepática• Anormalidades imunológicas<ul style="list-style-type: none">○ Diminuição linfócitos T reguladores○ Alterações linfócitos Th17○ Envolvimento da imunidade adquirida (vias Th1 e Th2)○ Envolvimento da imunidade inata• Doença materna<ul style="list-style-type: none">○ Diabetes gestacional
Fonte: Modificado de Santos <i>et al.</i> , 2010.

Abreviaturas: CFC: gene que codifica a proteína críptico; NF Kappa β : Fator Nuclear Kappa Beta; ICAM: Molécula de adesão intercelular; HLA-DR: Antígenos Leucocitários Humanos; GPC: glicoproteína; VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular; ADD: aducina; MMIF: Fator Inibitório da Migração de Macrófagos; BASM: Malformação Esplênica associada Atresia Biliar; Th: T helper.

2.3.1 Heterogeneidade da AB sugere diferentes fenótipos

A hipótese de que a AB representa um fenótipo resultante de distintas desordens (3) ainda não foi completamente demonstrada. Classificações da AB em relação à anatomia, clínica, histopatologia e perfil molecular têm sido descritas, e esta diversidade de variantes tem sido considerada como um dado corroborante à hipótese de uma heterogeneidade etiológica da doença. A natureza progressiva da AB, no entanto, torna difícil estabelecer se essas características distinguem subgrupos etiológicos, ou são manifestações tempo-dependentes de uma única doença.

2.3.1.1 Variantes anatômicas da AB

A identificação dos diferentes tipos de AB de acordo com o local da obstrução do ducto biliar comum foi descrita pela primeira vez por Holmes, em 1916 (25), e serviu para distinguir as formas cirurgicamente corrigíveis e não corrigíveis. A classificação mais amplamente utilizada das variantes anatômicas foi proposta pela Associação Japonesa de Cirurgiões Pediátricos (44, 45) constando de 3 tipos: **tipo 1**, presente em 5% dos casos, constitui a variante corrigível de AB por envolver obstrução do ducto biliar comum com manutenção de estruturas biliares proximais pérvias; **tipo 2**, compreende 2% dos pacientes e consiste de atresia do ducto hepático, algumas vezes associada a cistos no *porta hepatis*, e **tipo 3**, que ocorre em 90% dos pacientes com AB e apresenta o *porta hepatis* sólido

constituído por um cordão fibroso. No tipo 3, um cisto pode ser encontrado distalmente à obstrução ductal. Esta classificação foi útil para definir a viabilidade de uma correção cirúrgica para AB até que Dr. Morio Kasai, através da criação de uma portoenterostomia, tornou “corrigível a forma incorrigível (46). Esta classificação ainda hoje ajuda a prever o prognóstico pós-portoenterostomia, uma vez que o tipo 1, a variante corrigível, está associada a uma maior sobrevida do fígado nativo (47).

2.3.1.2 Variantes clínicas de AB

A existência de variantes clínicas da AB sugere que esta doença pode ser adquirida durante a vida intra-uterina precoce (forma embrionária), envolvendo cerca de 10% dos casos, ou durante o período perinatal (forma adquirida), que abrange os 90% restantes (48). Curiosamente, pacientes com a forma adquirida apresentam níveis séricos aumentados de bilirrubina conjugada e/ou BD logo nos dois primeiros dias de vida (49), sugerindo que, mesmo neste subgrupo, a AB é congênita e que o insulto causal ocorre na fase pré-natal, diferentemente do modelo murino de AB em que a infecção viral deve ocorrer após o parto para produzir a doença (50).

Forma embrionária

A hipótese de que a AB resulta de um insulto embrionário, e talvez associe-se a uma alteração genética, é reforçada pela ocorrência de um subgrupo de pacientes também afetados por anomalias congênitas extra-hepáticas. Estas anomalias, no entanto, não têm um padrão homogêneo, podendo ser classificadas em:

1) **Anomalia de lateralidade associada à AB:** ocorre em cerca de 10% dos pacientes com AB de acordo com um estudo multicêntrico americano (51), mas a sua frequência pode variar

entre 3% e 20% dos casos (52). Os defeitos de lateralidade são caracterizados pela malformação esplênica associada à AB (BASM, do inglês *biliary atresia splenic malformation*), anteriormente chamada de “síndrome de polisplenia“. Polisplenia é definida como a presença de cinco ou mais nódulos de baço, ou por um baço multilobulado, mas BASM pode incluir também asplenia (48). O transtorno de lateralidade associado com AB, independentemente da polisplenia, asplenia, ou mesmo de um baço normal, inclui uma combinação variável de *situs inversus* ou *situs ambiguus*, veia porta pré-duodenal, ausência de veia cava inferior, má-rotação intestinal, malformações cardíacas e/ou dextrocardia, malformações pancreáticas e pulmonares (53). Pacientes com BASM são expostos a uma alta incidência de eventos mórbidos durante a embriogênese, como o diabetes gestacional, sugerindo que agentes teratogênicos possam agir como gatilhos (48, 54). De acordo com Chandra (1974), a associação entre AB e defeitos de lateralidade não é casual, porque estas condições frequentemente se sobrepõem, e a organogênese tanto do primórdio esplênico e das vias biliares extra-hepáticas é coincidente no período embrionário com a septação do coração e do tronco arterial, e com o desenvolvimento da árvore broncopulmonar e dos coxins endocárdicos. O defeito de lateralidade poderia, neste caso, resultar da ação de teratógenos antes da quinta semana gestacional.

A etiopatogenia exata do defeito de lateralidade na AB, no entanto, permanece obscura, uma vez que as mutações associadas com o complexo de anomalias extra-hepáticas, incluindo as mutações em genes da Inversina, Polaris, Brachyury, fator nuclear de hepatócitos -3β (HNF, do inglês *hepatocyte nuclear factor*), *Sonic Hedgehog* (Shh), Smad-5, Lefty 1 e 2, e EGF-CFC1 não apresentam aumento de frequência na população afetada pela AB (48, 53).

Silveira *et al.* (1992) sugeriram a ocorrência de um ambiente intrauterino alterado associado com BASM. É concebível que tais alterações intra-uterinas possam atuar por via epigenética, induzindo a ocorrência de BASM. Alterações epigenéticas na metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) podem ser transmitidas por herança não mendeliana. Gatilhos ambientais, incluindo drogas, toxinas, ou vírus podem induzir distúrbios de metilação do DNA, atuando como teratógenos (56) e em um modelo de zebrafish de inibição da metilação do DNA, um desenvolvimento deficiente das vias biliares extra-hepáticas foi observado (57). A presença de BASM parece afetar negativamente o prognóstico pós-portoenterostomia (54).

2) **Anomalias extra-hepáticas não-sindrômicas associadas a AB:** compreende 6% dos pacientes com AB (51) e em torno de 58,5% dos pacientes com AB com anomalias extra-hepáticas importantes (58). Essas anomalias ocorrem principalmente no coração, nos tratos gastrointestinal e urinário, sem características de um defeito de lateralidade (51).

3) **Má-rotação intestinal isolada:** um subgrupo de pacientes com AB apresenta má-rotação intestinal como única anomalia congênita, com ou sem veia porta pré-duodenal (58).

A importância de um fator genético na etiologia da AB é sugerida, além da associação com anomalias congênitas extra-hepáticas, pelo aumento da frequência de polimorfismos genéticos em diferentes amostras de pacientes com a desordem. Estes polimorfismos indicam a necessidade de investigar mutações específicas na AB, mas alternativamente podem representar fatores predisponentes para a ocorrência da doença, na presença de determinados agentes ambientais. Polimorfismos foram observados em genes como os que codificam a proteína críptico 1 (CFC1, do inglês *encoding the Cryptic protein*) variante c.433G> A (59); a molécula de adesão intercelular -1 (ICAM-1, do inglês *intercellular adhesion molecule-1*):

variante G241R (60); a região entre os genes X-prolil-aminopeptidase (XPNPEP1, do inglês *X-prolyl aminopeptidase 1*) e aducina 3 (ADD3, do inglês *adducin 3*): variante rs17095355 (61). Entre os genes localizados nesta região, o da aducina, um gene envolvido na reatividade da parede arterial (62), e, portanto, com um fenótipo de aumento do tônus miogênico, parece ser um polimorfismo fundamental na AB (61, 63, 64). Outro polimorfismo encontrado em pacientes com AB e associado com alterações vasculares, além de inflamatórias, é a variante +936C/T do gene VEGFA (65). Polimorfismos adicionais associados com a AB ocorrem nos genes fator inibitório da migração de macrófagos (MMIF, do inglês *macrophage migration inhibitory factor*) (66), XPNPEP1 (67), adiponectina (68) e glicano 1 (GPC1, do inglês *glypican 1*) (69, 70).

Além dos fatores genéticos e epigenéticos, o aumento da frequência de casos de AB em pacientes com desordens cromossômicas, como as trissomia dos cromossomos 17, 18, 21 (71-74) e a Síndrome de Turner (75), bem como com anormalidades cromossômicas estruturais, incluindo monossomia, duplicação e trissomia proximal parcial do cromossomo 10 (76-79) indicam que nestes pacientes a etiologia da AB é parte de uma síndrome de múltiplos órgãos desencadeada por uma alteração cromossômica (80).

Forma adquirida ou isolada

A maioria dos casos de AB não têm anomalias extra-hepáticas associadas, e parece decorrer de uma lesão biliar adquirida durante o período perinatal. Esta hipótese é reforçada pela raridade da ocorrência de AB em bebês prematuros, fetos mortos e abortamentos (81).

A variação sazonal na ocorrência de AB sugere a ação de um agente ambiental (81), mas esse assunto é controverso. Caton *et al.* (2004) observaram variações nos padrões

sazonais na frequência de AB em recém-nascidos em Nova Iorque, com maior incidência durante a primavera, enquanto os resultados de The *et al.* (2007) indicaram que os bebês concebidos durante a primavera foram mais propensos a ter AB do que aqueles concebidos no inverno. Por outro lado, vários grupos (84-87) não encontraram variação sazonal na ocorrência da doença.

Em relação às discrepâncias geográficas na incidência da AB, a doença é mais frequente no leste da Ásia e na Polinésia Francesa do que na Europa e América do Norte, e, além disso, a incidência também é variável em diferentes regiões de um mesmo país (88). Esta variação geográfica pode indicar a importância não só de causas ambientais, mas também de peculiaridades genéticas destas populações.

Os fatores ambientais capazes de desencadear a AB não estão claramente definidos. Micotoxinas e fitotoxinas foram atribuídos como agentes responsáveis pelos surtos de AB observados em ovelhas na Austrália durante a estiagem (89). No entanto, os vírus são considerados os gatilhos exógenos mais importantes na AB para a maioria dos investigadores. Em crianças com AB há um aumento da expressão de genes associados à inflamação e à imunidade, especialmente a osteopontina, molécula reguladora da resposta imune T *helper* (Th) 1 e o interferon gama (90). No fígado de crianças afetadas, há infiltração de células associadas com a imunidade inata, tais como macrófagos (91), as *natural killer* (NK) (92), e as dendríticas (93), bem como ocorre uma expansão oligoclonal de células envolvidas na imunidade adquirida (94), incluindo linfócitos T CD8+ (95) e T CD4+ (92, 96). No soro dos pacientes com AB há um aumento dos níveis de ICAM e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM1, do inglês *vascular cell adhesion molecule*) (92, 97, 98).

Vários vírus têm sido associados com a etiologia da AB, tal como:

- Vírus da hepatite B (99-101).
- Vírus sincicial respiratório (102).
- Herpesvírus (103).
- Papilomavírus humano (103, 104).
- Reovírus (105-110).
 - Rotavírus (111).
- CMV (6, 112-117).

Entre os reovírus, o CMV destaca-se como um provável agente causador da AB. Os pacientes com CIH causada por CMV frequentemente apresentam um padrão histopatológico indistinguível da AB, e muitos pacientes com AB apresentam imunoglobulina M (IgM) positiva para CMV no soro. Adicionalmente, 55% dos pacientes com AB evidenciam uma resposta imune montada especificamente contra CMV (6). Os pacientes com anticorpos IgM+ para CMV representam uma variante clínica distinta da AB, além da BASM e do tipo isolado (118). Shen *et al.* (2008) observaram uma frequência de 48% de positividade de IgM para CMV e um efeito prejudicial da infecção na resposta à portoenterostomia. Os pacientes com AB associada ao CMV apresentam uma diminuição dos níveis de células T reguladoras (Tregs) no sangue periférico, sugerindo a ocorrência de uma resposta inflamatória exacerbada, assim agravando o dano hepático (6).

Porém, não há qualquer evidência direta de um vírus, incluindo seu DNA ou ácido ribonucléico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*), nas estruturas hepatobiliares de pacientes com AB, apesar de um perfil de proteínas indicativo de infecção viral crônica (120). O mecanismo de um processo contínuo prejudicial na ausência de um vírus poderia ser um distúrbio imune desencadeado pela exposição, durante a lesão de colangiócitos, de epítomos

crípticos, incluindo α -enolase (121), uma molécula induzida na adaptação à hipóxia tecidual (122). A exposição destes epítomos desencadearia a liberação de auto-antígenos alterados, conduzindo à ativação de linfócitos T auto-reativos com especificidade para colangiócitos, desencadeando uma colangiopatia esclerosante crônica (123).

2.3.1.3 Forma cística

A ocorrência de cistos nos ductos biliares extra-hepáticos de pacientes com AB é reconhecido desde as primeiras descrições anatômicas por Holmes em 1916 (25). A presença de cistos é atualmente considerada como um critério para a especificação da “variante cística” de AB. A presença de cistos constitui um dado significativo pois: 1) quando detectado por ultrassom pré-natal, sugere uma obstrução mecânica extra-hepática, incluindo AB ou um cisto de colédoco (CC) e, assim, ajuda a antecipar a investigação diagnóstica; 2) parece indicar um prognóstico diferenciado, e 3) representa um desafio para o diagnóstico diferencial entre a AB e CC tipo 1 com obstrução completa do ducto biliar comum (124). A distinção entre esses dois distúrbios é importante, pois, quando a cirrose ainda não está presente no CC, os resultados cirúrgicos após a correção de um CC são melhores do que os observados na AB. As diferenças entre AB e CC, detectadas por ultrassom ou colangiografia, reforçam que a AB inclui uma colangiopatia intra-hepática. No CC, os ductos biliares apresentam características saudáveis e dilatadas, associadas a uma vesícula biliar distendida, enquanto na AB as estruturas biliares intra-hepáticas são irregulares e hipoplásicas (125). A forma cística inclui 10% dos pacientes com AB (126) e não está associada a qualquer peculiaridade étnica, genética ou epidemiológica. Esses pacientes, no entanto, apresentam um melhor prognóstico pós-portoenterostomia (127). Curiosamente, do ponto de vista etiológico, no modelo murino de AB que apresenta um padrão de resposta Th2, há aumento da frequência de cistos biliares

extra-hepáticas, sugerindo o possibilidade de uma fisiopatologia imune peculiar para esta variante de AB em seres humanos (128).

2.3.1.4 Variantes inflamatória versus fibrosante de AB

Moyer *et al.* (2010), avaliaram os perfis moleculares e histopatológicos no fígado de pacientes com AB, e observaram que a apresentação da doença poderia ser dividida em três formas: 1) forma inflamatória, mostrando aumento do número de linfócitos T e células NK, bem como uma superexpressão de genes relacionados com o sistema imune e à inflamação; 2) forma fibrótica, com características de fibrose extensa e perfil de expressão gênica relacionados à fibrose; e 3) forma mista, sem desequilíbrio entre a inflamação e fibrose. No entanto, houve diferença de idade entre os grupos, e os pacientes da variante inflamatória eram mais jovens que os do tipo fibrótico, sugerindo que essas características definidoras representam etapas distintas de um mesmo processo progressivo.

2.4 Alterações vasculares na atresia biliar

Nosso grupo estuda a contribuição de uma anomalia nos ramos da artéria hepática, ou seja uma arteriopatia, no desencadeamento e manutenção da doença (7, 11, 12).

2.4.1 Plexo vascular peribiliar

O epitélio biliar é nutrido exclusivamente por uma rede de capilares localizados em estreita proximidade com as vias biliares, o PVP (7). O PVP está incluído nas subunidades microvasculares hepáticas (130), e deriva-se dos ramos arteriais portais, formando um plexo composto de: 1) arteríolas acompanhantes, que cursam paralelamente aos ductos, e 2)

arteríolas comunicantes, as quais se ramificam das primeiras e se comunicam com o epitélio biliar (130, 131).

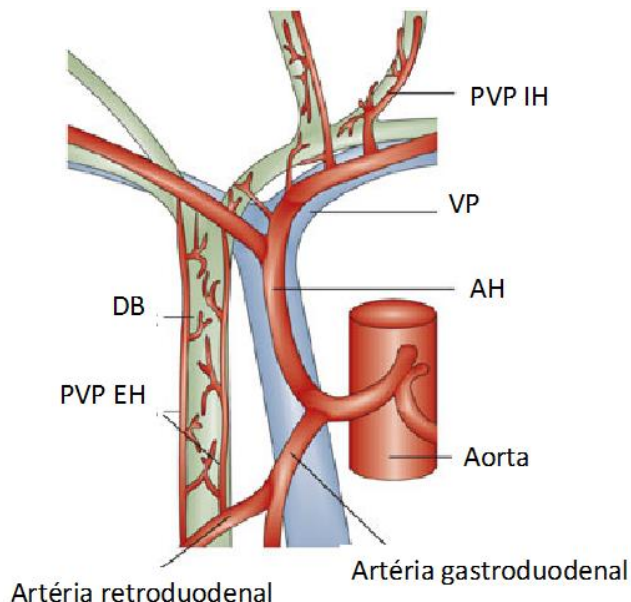


Figura 2 - Anatomia do plexo vascular peribiliar intra e extra-hepático.

O ducto biliar (DB) comum é vascularizado pelas artérias do PVP extra-hepático, que correm ao longo de sua extensão, irrigando-o. A maior parte do sangue do PVP extra-hepático é fornecido através da artéria retroduodenal inferior. Uma parte menor do PVP extra-hepático é suprida pela artéria hepática direita. Em contrapartida, os ductos biliares intra-hepáticos são irrigados pelo PVP intra-hepático, derivado das artérias hepáticas direita e esquerda.

Abreviaturas: DB: ducto biliar; PVP: plexo vascular peribiliar; AH: artéria hepática; VP: veia porta; IH: intra-hepática; EH: extra-hepática. Fonte: Ruemmele *et al.*, 2009.

O fato de os colangiócitos serem exclusivamente nutridos por sangue arterial, explica o envolvimento das estruturas biliares em caso de lesão isquêmica em quadros de

comprometimentos dos ramos da artéria hepática, caracterizando uma colangiopatia isquêmica (8).

2.4.2 Arteriopatia na Atresia biliar

Devido ao padrão de vascularização arterial da árvore biliar, uma arteriopatia afetaria todo este sistema, constituindo um fator crucial e ainda não investigado na patogênese da colangiopatia da AB (11). Uma relação da AB com processo isquêmico por distúrbio arterial foi observada em modelos animais (133-137).

Em pacientes afetados por AB, os primeiros relatos foram descritos em 1959 por Stowens descrevendo um espessamento de túnica média (138), e confirmado por Brough & Bernstein (1969). Após, em 1993, Ho *et al.* observaram a ocorrência de dilatação luminal e espessamento de parede vascular (9). Anormalidades anatômicas dos ramos arteriais hepáticos, por angiografia, foram descritas em 2004 por Uflacker & Pariente em todos os pacientes de uma amostra de AB por eles estudada (10).

Em 2005, Santos *et al.* confirmaram por morfometria em material hepático obtido por ocasião da portoenterostomia e marcado por imunoistoquímica, um espessamento da túnica média dos ramos arteriais hepáticos relacionado ao desaparecimento dos ductos biliares (7). Em estudos utilizando ultrassonografia e tomografia computadorizada, foram observados dilatação do lúmen arterial hepático no hilo hepático e aumento da vascularização na região subcapsular (140-142).

Edom *et al.* (2011) estudaram a imunolocalização do VEGFA e seus receptores para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR, do inglês *vascular endothelial growth factor receptor*) 1 e 2 em pacientes com AB, comparando com pacientes afetados por CIH, e

observaram um padrão de imunolocalização do VEGFA específico da AB por ocasião da portoenterostomia, sugestiva de hipóxia nos ductos biliares e ramos arteriais, tanto intra-hepáticos quanto no *porta hepatis*.

Em 2014, Souza *et al.* observaram uma expressão gênica aumentada das moléculas angiogênicas angiopoietinas 1 e 2 nos pacientes com AB em comparação com os pacientes com CIH, detectando uma correlação desta expressão com o espessamento da túnica média arterial e sugerindo o envolvimento do sistema de angiopoietinas neste processo (12).

Um dado interessante é que a análise de microRNAs no modelo murino de AB demonstrou, além de alterações de micro ácido ribonucléico (miRNA, do inglês *micro-ribonucleic acid*) que regulam genes com funções relacionadas à sobrevivência dos colangiócitos e à modulação da inflamação, uma diminuição dos níveis de miR-126, um miRNA endotelial (143).

2.5 Fibrogênese e reação ductular na AB como marcadores da gravidade da doença

Os pacientes com AB, na sua grande maioria evoluem, mesmo após a portoenterostomia, para uma disfunção hepática crônica associada ao desenvolvimento de cirrose (4). Variáveis histológicas observadas e/ou mensuradas em biópsias coletadas por ocasião da portoenterostomia têm sido consideradas como dados úteis na predição do prognóstico pós-cirúrgico do procedimento.

A extensão da fibrose hepática tem sido usada com esse propósito, podendo ser avaliada por escore específico (144) ou por método morfométrico (145). Na análise do prognóstico, a diferença tem sido encontrada entre grupos de pacientes com graus leves de

fibrose, apenas com expansão portal, e outros já com cirrose desenvolvida (146). Porém, em amostras nas quais a idade na portoenterostomia é muito elevada essa comparação torna-se difícil devido à raridade dos casos que apresentam extensão leve de fibrose. A extensão da fibrose pode não ser um marcador adequado para o prognóstico dos pacientes, uma vez que existem dificuldades inerentes à avaliação histopatológica, incluindo erros amostral e de métodos de coloração (147, 148).

Santos *et al.* (2009) descreveram que a extensão da reação ductular, avaliada por método morfométrico através da positividade de citoqueratina 7 (PCK7), mostrou-se variável relacionada, de forma independente de idade e grau de fibrose, com a sobrevida do fígado nativo em 1 ano.

A gravidade da fibrose e da reação ductular são mensuráveis, além da histopatologia e morfometria, também por método molecular. Entre os marcadores utilizados incluem-se a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1, do inglês *monocyte chemoattractant protein 1*), que possibilita inferir o grau de fibrogênese biliar (149) e a citoqueratina (CK) 19, que quantifica no tecido hepatobiliar o fenótipo celular dos colangiócitos (150).

A MCP1 é um membro da família de quimiocinas, responsável pela migração e infiltração de monócitos/macrófagos em resposta à inflamação (151). Evidências têm sugerido que a MCP1 pode ser um regulador importante da fibrose hepática e na AB já foi descrito seu aumento tanto em soro quanto em tecido hepático (149). Por outro lado, a CK19 é o menor membro da família de citoqueratinas, um grupo heterogêneo de proteínas de filamentos intermediários. É, normalmente, expressa na mucosa do trato gastroenteropancreático e hepatobiliar, conformando-se como um marcador de epitélio biliar no fígado (152, 153). Além disso, o aumento da CK19 pode ser útil na avaliação da gravidade de hepatopatias (153).

2.6 Angiogênese

A angiogênese pode ser encarada como um processo dinâmico estimulado pela hipóxia levando à formação de novos vasos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes (154). Este processo é fundamental tanto em condições fisiológicas, tais como a reparação de tecidos e o crescimento, como em condições patológicas, incluindo hepatopatias crônicas (155). No adulto, e em circunstâncias normais, a formação de novos vasos sanguíneos ocorre durante a cicatrização de feridas, regeneração de órgãos, e no sistema reprodutor feminino durante a ovulação, menstruação, e a formação da placenta (156).

O processo de angiogênese envolve a divisão das células endoteliais, degradação seletiva da membrana basal e da matriz extracelular, a migração de células endoteliais, e a formação de uma estrutura tubular (156). Cada etapa desse processo incorpora complexas cascatas moleculares, estimuladoras ou inibidoras, envolvidas na construção e maturação dos vasos, bem como da formação de redes vasculares visando nutrir os tecidos e assim resolver a hipóxia local (157).

Walti *et al.* (2013) detalharam o processo de angiogênese. (figura 3) O passo inicial ocorre através da ativação das células endoteliais por moléculas pró-angiogênicas, especialmente o VEGF. Junções intercelulares e membrana basal são remodeladas em conjunto com descolamento de perícitos, permitindo que células ponta migrem em resposta aos sinais de orientação através da estimulação de VEGFR2 ativado pelo VEGF. O broto cresce em direção ao gradiente de VEGF que é liberado na membrana extracelular. Em seguida, este broto se alonga através da proliferação de células pedunculares que formam um lúmen e recrutam perícitos para a estabilização. Este sistema permite a migração vascular, com direcionalidade, por meio da célula ponta, e o alongamento do eixo, através da

proliferação de células pedunculares. Quando ocorre o encontro entre estas duas células, elas anastomosam, num mecanismo assistido por macrófagos que se acumulam e estimulam o brotamento através da produção de fatores angiogênicos ou proteolíticos libertando-os da matriz extracelular. Uma vez que ocorre a fusão celular, um lúmen é formado para permitir o fluxo de sangue, o qual perfunde o tecido hipóxico, diminuindo os níveis de sinais angiogênicos, inativando os sensores de oxigênio das células endoteliais, e aumentando as moléculas pró-quiescentes que levam à quiescência do endotélio. As células endoteliais se tornam células falange quiescentes, que conduzem o fluxo sanguíneo e regulam a perfusão tecidual. Além disso, ocorre o depósito de membrana basal entre os perícitos e as células endoteliais, e o estabelecimento de uma barreira coberta por perícitos maduros. Esta barreira entre o sangue e tecido circundante controla a troca de fluidos e solutos.

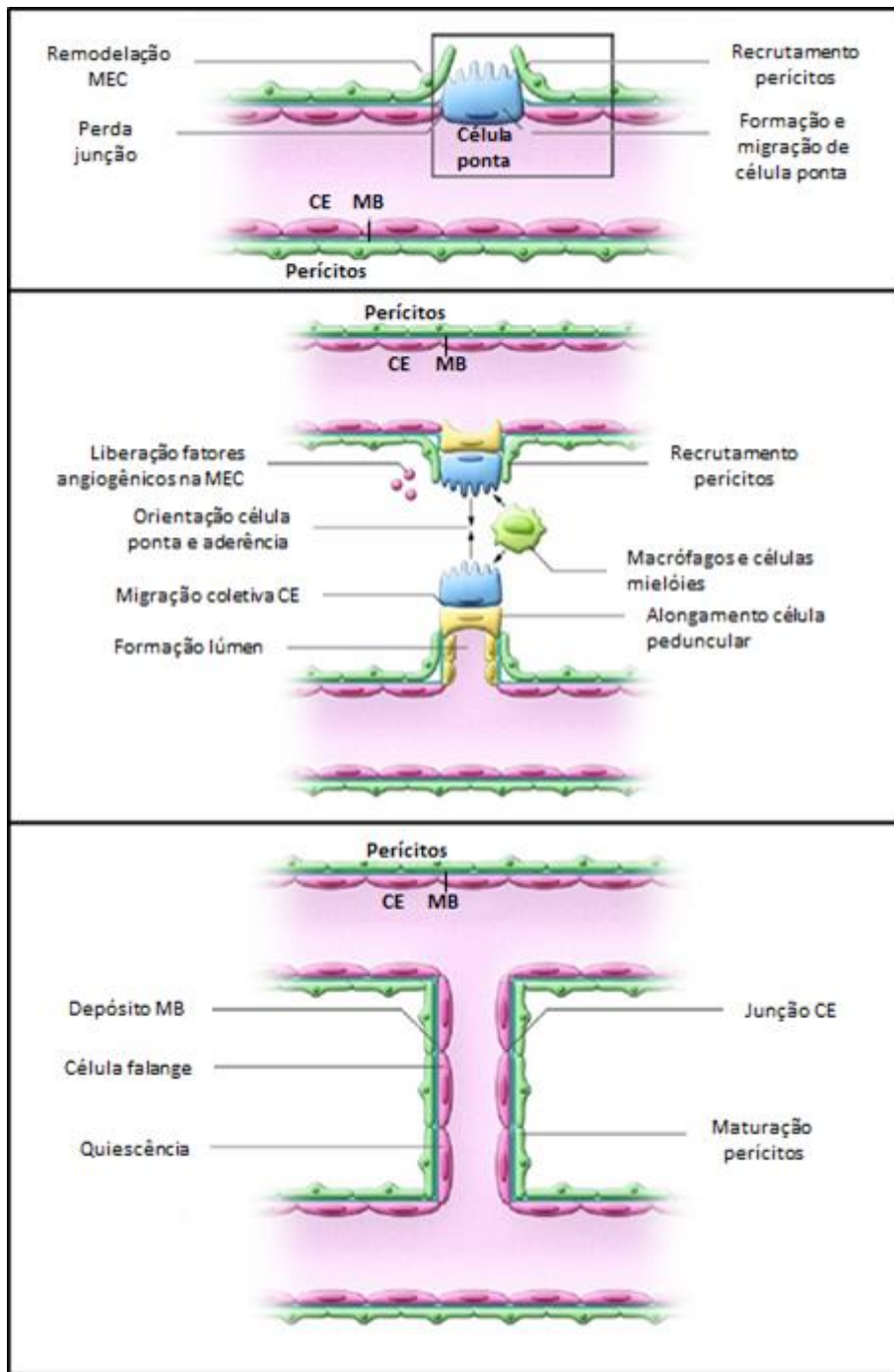


Figura 3 - Passo a passo do processo de angiogênese.

Abreviaturas: MEC: membrana extracelular; CE: célula endotelial; MB: membrana basal.

Fonte: Modificado de Welte *et al.* 2013.

2.7 Hipóxia

A capacidade de manter os níveis de oxigênio é essencial para a sobrevivência de um organismo (159). Em situações de hipóxia, ou seja, de baixa concentração de oxigênio num tecido, alterações sistêmicas e em nível intracelular são ativadas com o objetivo de restabelecer a oxigenação adequada e minimizar lesões (160). A hipóxia celular ocorre quando a demanda por oxigênio molecular necessária para gerar níveis de adenosina trifosfato (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*) suficientes para o funcionamento celular e tecidual excede o suprimento vascular. A hipóxia tecidual pode ocorrer durante uma variedade de estados de doença, como por exemplo, em doença vascular, inflamação crônica e tumor (161).

A resposta aguda do fígado à situação de hipóxia inclui mudanças no número dos fatores de transcrição fundamentais para a regulação do desenvolvimento celular, apoptose, inflamação, proliferação e diferenciação celular. O fígado tem papel regulador no equilíbrio energético, metabolismo de substratos, desintoxicação, e um pequeno papel na eritropoiese, e a ocorrência de hipóxia tecidual compromete todas estas funções (162).

A hipóxia pode ser sistêmica ou local. A principal causa de hipóxia local é a isquemia, processo no qual há um bloqueio no fornecimento de sangue ao tecido, causando falta do oxigênio necessário para o metabolismo celular (163).

2.7.1 Fator Induzido por Hipóxia

O processo de resposta à hipóxia é regulado, principalmente, pelo HIF (164), o qual funciona como o principal mediador da homeostase do oxigênio em praticamente todas as

células, desempenhando funções críticas no desenvolvimento embrionário e na fisiologia pós-natal (165). Este fator é composto por duas subunidades, α e β . A subunidade α é dependente de oxigênio e a subunidade β , também conhecida translocador nuclear de hidrocarbonetos aril (ARNT, do inglês *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), é independente, sendo ubiquamente expressa em todas as células eucariotas. Na presença de oxigênio, o HIF- α sofre ubiquitinação e degradação proteossomal rápida. Este processo é mediado pela proteína supressora de tumor de von Hippel-Lindau (VHL), a qual, para se ligar à subunidade α , requer uma prolil hidroxilação dependente do oxigênio. Quando ocorre esta ligação, o processo de degradação de HIF- α ocorre, no compartimento citoplasmático. Em situações de hipóxia, o HIF- α acumula-se no citoplasma e, a seguir, é translocado para o núcleo, formando o heterodímero com ARNT, que se liga ao elemento responsivo à hipóxia (HRE, do inglês *hypoxia-response element*) dos genes alvo (166). O complexo HIF/ARNT adicionalmente recruta coativadores transcricionais e ativa a transcrição de genes alvo, desempenhando um papel essencial nos processos de adaptação à hipóxia (167).

A expressão de VEGFA, principal fator angiogênico, é induzido por hipóxia (168), atuando diretamente nas células endoteliais ao se ligar e ativar seus receptores específicos, VEGFR1 e VEGFR2 (169).

O VEGFR2 parece ser o principal mediador dos efeitos mitogênico, angiogênico, e da permeabilidade induzida por VEGFA (170), embora tenha menor afinidade com o VEGFA que o VEGFR1 (171). Gaudio *et al.* (2006) demonstraram que a expressão do VEGFR2 no epitélio biliar associa-se à proliferação das células endoteliais, e que o bloqueio de sua expressão leva à apoptose de colangiócitos.

O VEGFR1 possui uma atividade de quinase muito mais fraca em relação ao VEGFA, sendo incapaz de gerar resposta mitogênica nas células endoteliais quando estimulado por VEGFA (171). O VEGFR1 modula a divisão das células endoteliais nas primeiras fases do desenvolvimento vascular, pouco antes da formação dos primeiros vasos sanguíneos primitivos, além de ser importante na migração das células (173, 174). Porém, sua atuação mais destacada ocorre nos processos inflamatórios, estimulando a ação dos macrófagos. Por outro lado, em situações de doenças, incluindo as hepáticas, ele também possui alguma atividade angiogênica, embora menos importante que o VEGFR2 (175).

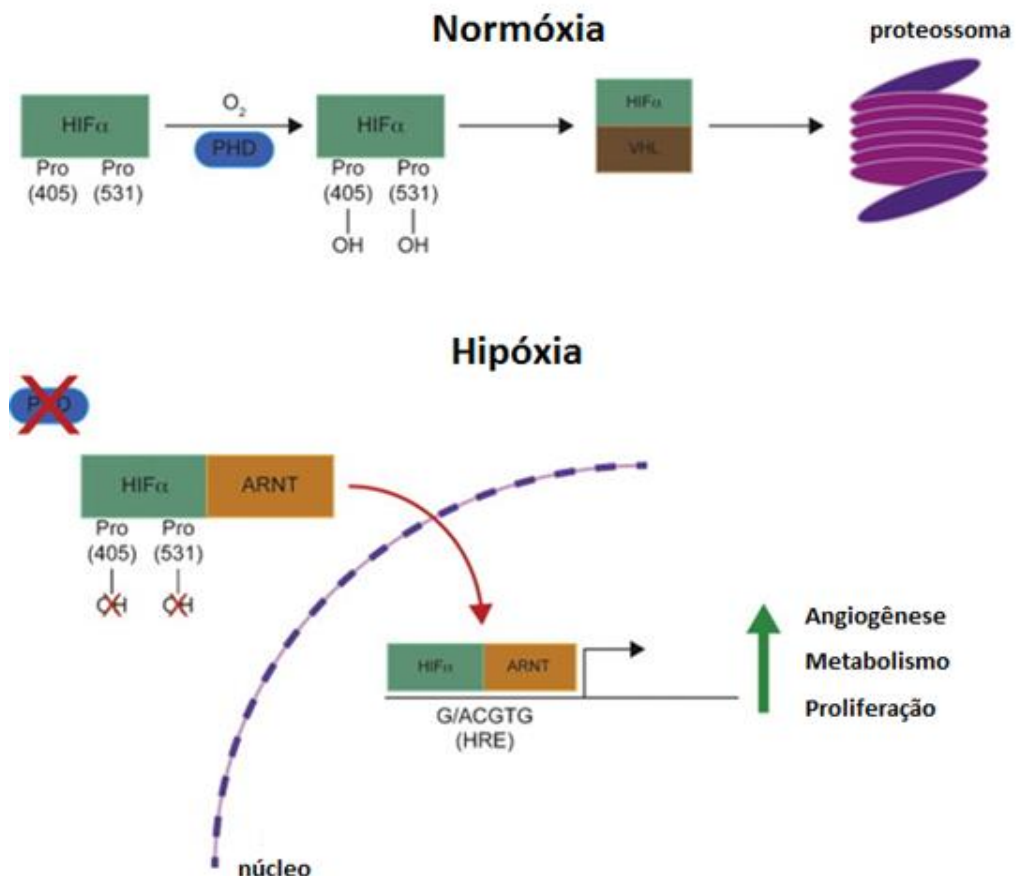


Figura 4 - Representação do comportamento do HIF- α em situações de normóxia e hipóxia.

Regulação de HIF. Em condições de normóxia, a hidroxilação dos resíduos de prolina ocorrem pela degradação dependente de oxigênio mediada pela proteína com domínio de prolil hidroxilase. HIF- α se liga à proteína supressora de tumor acarretando na sua degradação proteossomal. Em condições de hipóxia, HIF- α se dimeriza com a porção ARNT/HIF- β , transloca-se para o núcleo, e induz a transcrição de genes através de ligação e reconhecimento de sequências do elemento responsivo de hipóxia dentro das regiões promotoras dos genes alvo.

Abreviaturas: HIF: fator induzido por hipóxia; ARNT: translocador nuclear de hidrocarbonetos aril; HRE: elemento responsivo à hipoxia; PRO: prolina; VHL: von Hippel-Lindau; PHD: proteína com domínio de prolil hidroxilase. Fonte: Modificado de Shay *et al.*, 2012.

Existem três isoformas da subunidade HIF- α : HIF-1 α , HIF-2 α , e HIF-3 α (176). O HIF-1 α foi descoberto a partir da identificação de um HRE na região 5'-RCGTG-3' no gene da eritropoetina (177, 178) e é a molécula mais ubiquamente expressa e melhor caracterizada da família, sendo reconhecido como o principal regulador da sinalização hipoxêmica (179).

O HIF-2 α tem 48% de identidade sequencial com o HIF-1 α (180) e atua na regulação da hipóxia de forma semelhante ao HIF-1 α , mas sua expressão é restrita a determinados tipos celulares (161). Segundo Tian *et al.* (1997), a expressão de HIF-2 α ocorre, preferencialmente, em células endoteliais e, nestas células, o HIF-2 α representa um importante regulador da vascularização, enquanto que o HIF-1 α é expressado ubiquamente nos tecidos. Já a atuação do HIF-3 α foi caracterizada menos extensamente, mas sabe-se que pode atuar como um repressor interno do sistema HIF (181).

2.7.2 Papel de HIF-1 α e HIF-2 α

O HIF-1 α ativa a expressão de mais de 70 genes, e a variedade de genes regulados é diferente em cada tipo celular, sendo que para alguns genes a expressão pode ser induzida ou reprimida pelo HIF-1 α (179). Entre os processos fisiológicos críticos regulados por genes-alvo do HIF-1 α incluem-se a eritropoiese, a angiogênese, a glicólise, bem como a vasodilatação como, por exemplo, a produção da óxido nítrico sintase (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase*) (161). Além disso, em condições de hipóxia grave ou prolongada, o HIF-1 α pode também ativar a transcrição de genes de morte celular (182). Em modelo animal de fibrose hepática por ligadura de ducto biliar (LDB), há ativação do HIF-1 α após 3 dias do procedimento, período que antecede o desenvolvimento de fibrose significativa. Esta ativação de HIF-1 α ocorre, neste modelo, principalmente em hepatócitos e macrófagos (183). Os macrófagos acumulam-se em regiões hipóxicas do fígado durante a lesão crônica induzida por colestase, onde a hipóxia estimula a ativação de HIF-1 α . Além disso, a ativação de HIF-1 α em células estreladas pode ser importante para o desenvolvimento da fibrose. Considerando esses estudos, a modulação terapêutica do HIF-1 α pode ser eficaz na prevenção da progressão da fibrose nas hepatopatias colestáticas (184).

Em relação ao HIF-2 α , quando ativado ele se expressa no núcleo de células não-parenquimatosas, tais como as células endoteliais glomerulares, peritubulares e fibroblastos do rim, células endoteliais e da glia cerebral, além de expressar-se no parênquima de outros órgãos como fígado e intestino, ou ainda, de modo homogêneo, no músculo cardíaco (185).

No desenvolvimento vascular, os papéis de HIF-1 α e HIF-2 α são distintos, pois o HIF-1 α é responsável pela proliferação de células endoteliais, migração e surgimento de novos vasos, enquanto o HIF-2 α desempenha um papel mais destacado no controle da

morfogênese vascular e integridade na formação da árvore vascular (157).

Nas células tubulares renais, Rosenberger *et al.* (2002) descreveram que apenas HIF-1 α foi encontrado, ao passo que o HIF-2 α foi expresso em células endoteliais e fibroblastos. Em neuroblastoma, HIF-2 α , mas não HIF-1 α , é fortemente expressado em áreas tumorais bem vascularizadas e sua atividade induz crescimento tumoral e está associada com uma doença mais agressiva (187).

2.7.3 Hipóxia e Doenças Hepáticas

A hipóxia tem um papel importante na patogênese de diferentes doenças do fígado (166), incluindo a lesão tecidual provocada durante o processo de isquemia e reperfusão (I/R), na qual as alterações iniciam no período isquêmico, mas agravam-se no estágio de reoxigenação tecidual (188, 189). A indução de HIF-1 α constitui evento precoce, que precede a apoptose de células do fígado na lesão por I/R (190). Porém, há estudos que sugerem que a ativação do HIF-1 α talvez tenha efeito protetor sobre a lesão por I/R (191) e o bloqueio da ligação entre VEGF e HIF-1 α através de um antagonista de VEGF reduziria a lesão por I/R ao reprimir a migração de leucócitos e produção de citocinas no tecido (192).

No modelo animal de LDB, o HIF-1 α é ativado em hepatócitos e macrófagos na periferia de infartos biliares e dentro das regiões de proliferação dos ductos biliares, levando à fibrose hepática. O bloqueio da expressão de HIF-1 α inibe a fibrogênese neste modelo (183). Hepatócitos sob hipóxia, além de expressar HIF-1 α , também ativam HIF-2 α em menor proporção (193).

Mediadores pró-fibróticos são secretados em cultura de hepatócitos de rato num ambiente pobre em oxigênio (194). Na fibrogênese associada à lesão hepática colestática, o

HIF-1 α tem efeito marcante. O HIF-2 α também tem importante papel na regulação da fibrogênese hepática durante o estabelecimento da esteato-hepatite. Em modelo animal de sobre-expressão de HIF através da inativação de VHL observou-se rápida ativação de HIF-2 α , a qual levou ao aumento da inflamação e fibrose hepáticas, demonstrando que estes processos são respostas do fígado desencadeadas em situações de hipóxia (195).

Em doenças do fígado, tais como cirrose biliar primária e colangite esclerosante primária, macrófagos, fibroblastos e hepatócitos são os grupos celulares envolvidos na fibrogênese induzida por hipóxia (184).

A inibição de HIFs pode ter um papel na terapia do câncer. No hepatocarcinoma, HIFs desempenham um papel importante na patogênese, apresentando-se sobre-expressados (166). Bangoura *et al.* (2004) observaram uma expressão de HIF-2 α em 52% dos casos de hepatocarcinoma com infiltração capsular e invasão da veia porta, sugerindo uma associação com o desenvolvimento de metástases. A positividade de HIF-2 α foi de 69,5% nos casos de hepatocarcinoma, 55% em tecido não canceroso adjacente, e nenhuma em tecido hepático normal, além de uma correlação com a expressão do VEGF e com a diminuição da sobrevivência dos pacientes. Os autores sugeriram que o HIF-2 α possa ser uma ferramenta no prognóstico e, possivelmente, um alvo terapêutico no tratamento do hepatocarcinoma (197).

3. JUSTIFICATIVA

A etiologia da AB ainda não está totalmente esclarecida. Entre as hipóteses etiológicas, nosso grupo estuda o envolvimento de uma arteriopatía no surgimento e progressão da doença. Uma arteriopatía afetaria todo o sistema biliar, pois os ductos são nutridos exclusivamente por um PVP, podendo constituir elemento-chave na patogênese da AB, a qual então incluiria uma colangiopatía isquêmica. A determinação da existência desta colangiopatía isquêmica na AB, e sua associação com o prognóstico pós-portoenterostomia, pode possibilitar o desenvolvimento de novas terapêuticas por meio da modulação da atividade de moléculas angiogênicas, reduzindo ou retardando a necessidade de TxH.

A presença de hipóxia em tecidos hepatobiliares, ajudaria a confirmar a existência de colangiopatía isquêmica na AB. Portanto, este estudo visa detectar e quantificar a presença de hipóxia em tecidos hepatobiliares de pacientes com AB, visando incrementar a compreensão teórica da patogenia desta doença.

4. QUESTÃO DE PESQUISA

Há evidências de isquemia em tecido hepatobiliar na AB, passíveis de detecção por meio da análise da expressão gênica dos fatores induzidos por hipóxia HIF-1 α e HIF-2 α ?

5. HIPÓTESE

Na AB, por ocasião da portoenterostomia, há evidências de isquemia em tecido hepatobiliar, detectável através da avaliação dos fatores induzidos por hipóxia HIF-1 α e HIF-2 α .

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Estudar a presença de isquemia em tecidos hepatobiliares nos pacientes com AB através avaliação dos marcadores específicos de hipóxia HIF-1 α e HIF-2 α , buscando compreender a sua relação com marcadores de gravidade da doença, tanto clínicos quanto laboratoriais, bem como com a evolução clínica dos pacientes após a portoenterostomia.

6.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a expressão gênica de HIF-1 α e HIF-2 α .
- Estudar a associação entre a expressão gênica de HIF-1 α com variáveis associadas à gravidade da AB, que afetam o prognóstico pós-portoenterostomia, incluindo idade por ocasião da portoenterostomia, extensão da reação ductular e a extensão da fibrose.
- Relacionar a expressão gênica de HIF-1 α com a razão entre a espessura de túnica média arterial e o diâmetro luminal (REDL).
- Estudar a associação entre a expressão gênica de HIF-2 α associadas à gravidade da AB que afetam o prognóstico pós-portoenterostomia.
- Relacionar a expressão gênica de HIF-2 α com a REDL.
- Verificar a associação entre a expressão gênica de HIF-1 α e HIF-2 α com outros dados clínico-laboratoriais.
- Verificar a associação entre a expressão gênica de HIF-1 α e HIF-2 α com a sobrevida do fígado nativo em 2 anos do pós-operatório da portoenterostomia.

7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

The American Journal of Gastroenterology

Status: Submetido

Hypoxic-Ischemic Gene Expression Profile in the Isolated Variant of Biliary Atresia

Authors

Leila Xavier Sinigaglia Fratta*^{1,2}, lfratta@gmail.com

Giovana Regina Weber*^{1,2}, giovana.weber@gmail.com

Larisse Longo^{1,2}, larisselongo@hotmail.com

Carolina Uribe Cruz^{1,2}, carolinaurib10@yahoo.com.ar

Themis Reverbel da Silveira^{1,2}, Themis.silveira@gmail.com

Sandra Maria Gonçalves Vieira^{2,3}, svieira.gastroped@gmail.com

Carlos Oscar Kieling^{2,3}, ckieling@hcpa.ufrgs.br

Jorge Luiz dos Santos^{1,2,3}, kapars@terra.com.br

Affiliation

1- Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

2- Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

3- Pediatric Hepatology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

**These authors contributed equally to this work.*

Hypoxia and the associated angiogenic response is involved in liver diseases.

This study shows that in the livers from patients with isolated biliary atresia there is a unique pattern of angiogenic molecule expression, associating increased hypoxia with decreased expression of VEGFA and its receptor VEGFR2.

Keywords: biliary atresia, cholestasis; pathophysiology; fibrosis; hepatic artery; bile ducts.

Contact Information: Jorge Luiz dos Santos. Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Rua Ramiro Barcelos, 2350/ sala 12214. CEP 90035-003. Bairro Rio Branco. Porto Alegre, Brazil. Phone: 55-51-3359.8847; Fax number- 55-51-3359.8760; E-mail – kapars@terra.com.br

List of Abbreviations: BA, biliary atresia; IHC, intrahepatic cholestasis; VEGFA, vascular endothelial growth factor A; VEGFR, VEGF receptor; HIF, hypoxia inducible factor; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase; TB, total bilirubin; TD, direct-reacting bilirubin; MCP1, monocyte chemoattractant protein-1; CK19, cytokeratin 19; hi, higher; lo, lower; MT, medial thickening; PVP, peribiliary vascular plexus; PAH, pulmonary arterial hypertension.

Financial Support: We acknowledge the financial support of Fundação de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rio Grande do Sul, Brazil and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *American Journal of Gastroenterology*.

Manuscript ID: AJG-15-0293
Title: Hypoxic-Ischemic Gene Expression Profile in the Isolated Variant of Biliary Atresia
Authors: Fratta, Leila Weber, Giovana Longo, Larisse Cruz, Carolina da Silveira, Themis Vieira, Sandra Kielling, Carlos dos Santos, Jorge
Date Submitted: 06-Feb-2015
Print Return to Dashboard

ABSTRACT

Biliary atresia (BA) includes a sclerosing cholangiopathy whose nature is not fully deciphered. Aiming to evaluate the role of an arteriopathy as etiologic factor in BA, we investigated hypoxia and the correlated angiogenic response in livers from affected patients by assessing, through qPCR, gene expression of the molecular axis hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α and vascular endothelial growth factor A (VEGFA)/VEGF receptors (VEGFRs) VEGFR1 and VEGFR2. Liver biopsy specimens collected at exploratory laparotomy of age-matched patients with isolated, cytomegalovirus IgM-negative BA (n=32) and intrahepatic cholestasis (IHC, n=9) were evaluated. We observed higher HIF-1 α and HIF-2 α expression in BA than in IHC. Paradoxically, VEGFR2, the main target of VEGFA-induced angiogenesis, was underexpressed in BA, and VEGFA expression was decreased in most BA patients. Patients with the highest expression of HIFs and the lowest VEGFA and VEGFR2 expression were essentially the same, indicating hypoxia without the necessary angiogenesis. This finding suggests hypoxia/ischemia in the liver of these patients with BA, reminiscent of an arteriopathy molecular profile. They included most BA patients and, except for HIF-2 α , were older and presented increased bilirubin serum levels. In the highest HIF-2 α /lowest VEGFR2 subsets, gene expression of the cytokeratin 19, marker of cholangiocyte phenotype, was decreased. Monocyte-chemoattractant protein 1, marker of fibrosis, was not associated with hypoxia/ischemia. **Conclusion:** This study suggests that hypoxia-ischemia is present in the livers of patients with BA, progresses over time, leads to a decreased cholangiocyte mass, and seems to be independent of fibrosis.

Biliary atresia (BA) is a pediatric hepatobiliary disorder characterized by bile duct obstruction and progressive sclerosing cholangiopathy. The primary treatment for BA is portoenterostomy, which should be performed as soon as possible, since postoperative results are affected by age⁽¹⁾. Additionally, the extents of fibrosis and ductular reaction have been used to infer disease severity, and help predict postoperative outcomes⁽²⁾. Regardless of a timely portoenterostomy, BA induces cirrhosis by ongoing cholangiopathy, constituting the leading cause of pediatric liver transplantation⁽³⁾. An immune disorder induced by virus appears to be implicated in BA etiology⁽⁴⁾, but pathophysiological details are not fully elucidated. Distinct clinical variants, such as BA-associated splenic malformation (BASM), isolated BA, cystic BA, and cytomegalovirus IgM-positive BA, suggest distinct patterns of disease acquisition⁽⁵⁾. Our group is interested in the putative role of an arteriopathy in BA etiology. Histology^(6, 7), morphometry⁽⁸⁾, arteriography⁽⁹⁾, ultrasound⁽¹⁰⁾, and immunohistochemical studies⁽¹¹⁾ reinforce such a hypothesis. Evaluating hypoxia and the correlated angiogenic response in livers of patients with BA is thus of major interest. This study aimed to assess gene expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α , vascular endothelial growth factor A (VEGFA), and its receptors (VEGFRs), VEGFR1 and VEGFR2, in livers from infants with the isolated variant of BA, comparing findings to those observed in infants with intrahepatic cholestasis (IHC), and correlating with variables associated with disease severity.

METHODS

The study sample comprised infants with BA (n=32) and IHC (n=9) who underwent exploratory laparotomy between 2006 and 2014. In BA group, exploratory laparotomy preceded portoenterostomy; in IHC, it was performed to rule out this diagnosis. The causes of

IHC encompassed idiopathic neonatal hepatitis (n=7) and alpha-1 antitrypsin deficiency (n=2). Infants with BA had no associated extrahepatic anomalies and were IgM-negative for cytomegalovirus. During surgery, a tissue sample was collected from hepatic segment IV, immediately placed in a tube containing 1 mL of RNAholder (BioAgency, Brazil), and stored at -80°C.

In the BA group, we evaluated the association between the expression of the genes of interest and: 1) age at portoenterostomy, aiming to infer disease severity; 2) laboratory parameters indicative of bile flow impairment, including total and direct-reacting bilirubin (TB and DB, respectively) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT); and 3) gene expression in the liver of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1), a marker of biliary fibrosis⁽¹²⁾, and cytokeratin 19 (CK19), a marker of cholangiocyte phenotype. Blood samples were also prospectively collected at portoenterostomy.

Quantitative PCR (qPCR) procedures

RNA extraction and cDNA generation

RNA was extracted from 20 mg of tissue using a Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Carlsbad, CA). Briefly, samples were macerated and the RNA extracted in accordance with manufacturer instructions. The cDNA was generated from 2 µg of RNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), following the manufacturer's instructions.

qPCR

The qPCR was performed using TaqMan® probes (shown in **TABLE 1** with their respective amplicon sizes). Annealing temperature was 60°C for every molecule. The PCR reaction was performed using TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), in a StepOne system (Life Technologies, Carlsbad, CA). Ribosomal 18S was chosen as normalizing gene because it is not affected by hypoxia⁽¹³⁾. Relative quantification was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Statistical analysis

Quantitative variables were expressed as median (interquartile range) and categorical data were described as absolute and relative frequencies. The Mann-Whitney *U* and chi-square tests were used for between-group comparisons. Interdependence among variables was evaluated by Spearman correlations. P-values <0.05 were considered significant. Data processing and analysis were performed in Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corp., Redmond, WA), PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL), and GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

Ethical considerations

This study was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Ethics Committee.

RESULTS

Patient profile

Patients with BA had a median age of 65 (52–86.8) days at surgery, with no significant difference compared to IHC. The only laboratory result that was significantly different between groups was GGT, serum levels of which were higher in BA ($P=0.003$) (**TABLE 2**). At portoenterostomy, 14 (43.8%) BA patients were younger than 60 days; 12 (37.5%) were aged 61–90 days; and only 6 (18.7%) were older than 90 days. Regarding markers associated with liver disease severity, MCP1 gene expression was higher in BA than in IHC ($P=0.014$). CK19 expression was similar in both groups (**TABLE 2**).

Intensity of liver hypoxia in patients with biliary atresia

Gene expression of both HIF-1 α and HIF-2 α was higher in BA than in IHC patients ($P=0.001$ and $P<0.001$, respectively), and the lowest percentile values of both molecules in BA group were higher than the medians of IHC (**TABLE 2**). HIF-1 α and HIF-2 α expressions were strongly and positively correlated ($r_s=0.62$; $P<0.001$), and HIF-1 α expression correlated with TB ($r_s=0.44$; $P=0.021$) (**TABLE 3**). Figures 1a and 1b demonstrate the presence of two distinct subsets of BA in terms of HIF- α expression, which we named the higher HIF (hiHIF) and lower HIF (loHIF) subsets. Patients in the hiHIF subset exhibited HIF gene expression values threefold higher than the median observed in IHC. The hiHIF-1 α subset ($n=20$, 63% of BA) exhibited significantly higher gene expression than loHIF-1 α ($P<0.001$), and gene expression in hiHIF-2 α subset ($n=19$, 59% of BA) was higher than in loHIF-2 α ($P<0.001$) (**TABLE 4a, 4b**). Patients in the hiHIF-1 α subset had a median age of 66 (58.5–86.7) days at portoenterostomy, whereas those in the loHIF-1 α were aged 51 (36.3–83.3) days ($P=0.045$). Levels of both TB and DB were significantly higher in hiHIF-1 α than in loHIF-1 α ($P=0.005$ and $P=0.037$, respectively) (**TABLE 4a**). There were no differences in age or bilirubin levels at portoenterostomy between the hiHIF-2 α and loHIF-2 α subsets (**TABLE 4b**). CK19 gene

expression was lower in hiHIF-2 α than in loHIF-2 α patients (P=0.040). MCP1 was not associated with intensity of liver hypoxia in the HIF subsets (**TABLES 4a, 4b**).

Angiogenic response to hypoxia

VEGFA gene expression

VEGFA gene expression seemed to be lower in BA than in IHC, but there was not significant difference between the groups (**FIGURE 1c**). Analysis of VEGFA behavior in BA revealed (**FIGURE 1d**) two distinct subsets, with lower (loVEGFA) and higher (hiVEGFA) expression in comparison with IHC. VEGFA expression in the loVEGFA subset (n=21, 66% of BA) was threefold lower than the median of IHC patients, with a significant difference in relation to IHC (P<0.001). The median age at portoenterostomy was 66 (59–88) days in loVEGFA patients, versus 48 (34–69) days in hiVEGFA (P=0.016) (**TABLE 4c**). Only 28.6% of the loVEGFA patients were less than 60 days old at portoenterostomy, versus 72.7% of the hiVEGFA infants (P=0.027). Both TB and DB were significantly increased in the loVEGFA subset as compared with hiVEGFA (P=0.001 and P=0.012, respectively) (**TABLE 4c**). Regarding molecular markers of disease severity, CK19 expression was positively correlated with VEGFA ($r_s=0.48$, P=0.006) (**TABLE 3**), but there were no differences in CK19 or MCP1 expression between loVEGFA and hiVEGFA (**TABLE 4c**).

Association between VEGFA and HIF expression

Strikingly, the hiHIF-1 α and loVEGFA subsets included essentially the same patients: only one infant in the loVEGFA subset was not included in hiHIF-1 α (**FIGURE 2**). VEGFA expression correlated negatively with HIF-1 α ($r_s=-0.62$; P<0.001) and HIF-2 α ($r_s=-0.40$;

P=0.022) (**TABLE 3**). In the loVEGFA subset, HIF-1 α and HIF-2 α gene expression was significantly higher than in hiVEGFA (P<0.001 and P=0.004, respectively) (**TABLE 4c**).

Gene expression of VEGFA receptors

VEGFR1 expression was not significantly different between the BA and IHC groups (**FIGURE 1e**). VEGFR1 expression exhibited strong positive correlations with expression of VEGFA ($r_s=0.81$, P<0.001) and VEGFR2 ($r_s=0.71$, P<0.001) (**TABLE 3**). In the loVEGFA subset, VEGFR1 expression was lower than in hiVEGFA (P<0.001) (**TABLE 4c**). Regarding variables associated with disease severity at portoenterostomy, VEGFR1 expression correlated negatively with TB ($r_s=-0.53$, P=0.005) and DB ($r_s=-0.5$, P=0.008), and positively with MCP1 expression ($r_s=0.53$; P=0.002) (**TABLE 3**). VEGFR2 expression was significantly lower in BA than in IHC (P<0.001) (**FIGURE 1f**). VEGFR2 expression presented a strong positive correlation with VEGFA expression ($r_s=0.62$, P<0.001) and a negative correlation with HIF-1 α expression ($r_s=-0.47$, P=0.007) (**TABLE 3**). Figure 1f demonstrates the existence of two distinct subsets of BA patients in terms of VEGFR2 expression: one featuring higher expression (hiVEGFR2) and one with lower expression (loVEGFR2). The loVEGFR2 subset (n=23, 72% of BA) presented VEGFR2 gene expression levels threefold lower than the median levels of IHC patients. Two patients (8.7%) of the loVEGFR2 subset did not belong to loVEGFA, and three patients (13%) did not belong to hiHIF-1 α (**FIGURE 2**). VEGFR2 expression correlated negatively with age ($r_s=-0.52$, P=0.002), TB ($r_s=-0.54$; P=0.004), and DB ($r_s=-0.58$, P=0.001) (**TABLE 3**). Patients in the loVEGFR2 subset had a median age of 66 (56–88) days at portoenterostomy, versus 45 (33–80.5) days in hiVEGFR2 (P=0.040). Furthermore, patients in the loVEGFR2 subset exhibited increased TB and DB levels compared to hiVEGFR2 (P=0.014 and P=0.043, respectively) (**TABLE 4d**). Regarding molecular markers of disease severity, CK19 expression was lower

in the loVEGFR2 subset than in the hiVEGFR2 (P=0.020). MCP1 gene expression did not differ between VEGFR2 subsets (**TABLE 4d**).

DISCUSSION

Inadequate cellular access to oxygen is a crucial component of many diseases. Local hypoxia can result from ischemia secondary to a blockade of tissue blood supply, causing a shortage of oxygen required for cell metabolism⁽¹⁴⁾. HIFs are heterodimeric transcription factors critical to oxygen homeostasis. Levels of HIF-1 α and HIF-2 α are downregulated in normoxic cells, but increase during hypoxia⁽¹⁵⁾, when they translocate to the nucleus and induce transcription of hypoxia-inducible genes⁽¹⁶⁾. They play a central role in diseases characterized by hypoxia-ischemia⁽¹⁷⁾. Their overexpression generally results in increased transcription of VEGFA⁽¹⁸⁾, whose signaling represents the rate-limiting step to angiogenesis⁽¹⁹⁾.

This study evaluated gene expression of HIF-1 α , HIF-2 α , VEGFA, VEGFR1, and VEGFR2 in liver tissue from infants with BA and from age-matched IHC patients. We selected a homogeneous sample of BA patients in terms of clinical variants and cytomegalovirus serology. BA and IHC patients exhibited a similar cholangiocyte mass, as assessed by CK19 expression, but BA patients had a greater intensity of fibrosis as evaluated by MCP1⁽²⁰⁾.

Hepatic artery medial thickening (MT) has been reported in livers from BA patients⁽⁶⁾, and Ho *et al.*⁽⁷⁾ proposed that it is indicative of an arteriopathy. Our group confirmed by morphometry that progressive MT occurs in BA⁽⁸⁾. Hepatic arteriopathy could lead to derangement of the whole biliary tree, as the bile ducts are nourished exclusively by hepatic artery branches

through the peribiliary vascular plexus (PVP), and inadequate arterial blood flow leads to ischemic cholangiopathy⁽²¹⁾.

Hypoxia induces liver fibrosis. The markedly increased HIF expression we observed in BA may be attributable to the degree of disease severity, since MCP1 expression was higher in BA (**TABLE 2**). In the bile duct ligation (BDL) model, HIF-1 α is activated early in liver cells, inducing fibrosis⁽²²⁾.

In the hypoxic liver, HIF-2 α is expressed to a lesser extent than HIF-1 α .⁽²³⁾ In this study, HIF-1 α and HIF-2 α expressions were strongly correlated (**TABLE 3**), and, when categorizing BA patients in relation to HIF expression subsets, we observed that the hiHIF-1 α and hiHIF-2 α subsets comprised virtually the same patients (**FIGURE 2**).

VEGFA participates in the response to hypoxia whenever induced by HIFs⁽²⁴⁾. Cirrhosis features increased expression of VEGFA, which induces angiogenesis, and VEGFA receptor blockade suppresses angiogenesis and associated fibrogenesis⁽²⁵⁾.

In this study, at first glance, BA and IHC did not present difference regarding VEGFA gene expression (**FIGURE 1c**). However, analysis of data distribution in the BA group evinced two distinct patient subsets, loVEGFA and hiVEGFA (**FIGURE 1d**). Additionally, the loVEGFA subset included virtually the same patients as the hiHIF-1 α and hiHIF-2 α , with the most intense liver hypoxia (**FIGURE 2**). VEGFA was found to be negatively correlated with both HIF-1 α and HIF-2 α gene expression (**TABLE 3**). VEGFR2 expression behaved similarly to VEGFA: loVEGFR2 corresponded to the loVEGFA, hiHIF-1 α , and hiHIF-2 α subsets (**FIGURE 1f, FIGURE 2**). Increased hypoxia in the presence of VEGFA and VEGFR2 blockade suggests hepatobiliary ischemia, as the required angiogenic response to oxygen deprivation cannot be mounted. The hiHIF-1 α /hiHIF-2 α /loVEGFA/loVEGFR2

subsets (**FIGURE 2**), therefore, may represent a hypoxic/ischemic form of BA (HIBA). HIBA features a molecular pattern of arteriopathy observed in other systems, such as pulmonary arterial hypertension (PAH) and peripheral artery disease, both of which present with decreased VEGFA tissue levels⁽²⁶⁾. One feature of PAH is an arteriole MT similar to that observed in BA⁽²⁷⁾. Blood flow abnormalities associated with secondary triggers, including inflammation, genetic predisposition, drugs and toxins are crucial for PAH development^(27, 28), and one animal model of PAH consists of blocking VEGFA expression through treatment with the VEGF-R antagonist/tyrosine kinase inhibitor semaxanib in the presence of hypoxia⁽²⁹⁾.

We focused on arterial vessels because, in a previous study of VEGFA immunolocalization in livers from patients with BA at portoenterostomy and transplantation⁽¹¹⁾, we observed in explants a lobular pattern of VEGFA positivity characteristic of cirrhosis⁽³⁰⁾, while at portoenterostomy, we detected VEGFA in portal structures, such as arterial walls and bile ducts, suggesting a reduction in blood supply by the PVP similar to that seen in the animal model of complete arterial blood deprivation to bile ducts⁽³¹⁾. At the *porta hepatis*, VEGFA positivity was detected in artery branches and biliary remnants. Interestingly, by immunohistochemistry VEGFR2 was virtually absent in livers with BA⁽¹¹⁾, agreeing with the depressed VEGFR2 gene expression of BA patients observed in the present study. In turn, VEGFR1 positivity rates were similar to those observed in IHC⁽¹¹⁾. In the present study, VEGFR1 expression correlated positively with VEGFA and VEGFR2 (**TABLE 3**), but did not differ in the BA and IHC groups (**FIGURE 1e**). While VEGFR2 is induced in long-lasting hypoxic situations, such as ischemia⁽³²⁾, VEGFR1 is not primarily a pro-angiogenic effector, but rather acts as a positive regulator of inflammation and carcinogenesis by

influencing macrophage activity⁽³³⁾. The similar VEGFR1 expression in BA and IHC may reflect the inflammatory process common to both diseases.

Besides its role in angiogenesis, VEGFA regulates cholangiocyte proliferation.

Cholangiocytes express VEGFA and VEGFR2 but not VEGFR1 mRNA, and secrete VEGFA protein⁽³⁴⁾. In the BDL model, there is increased VEGFA secretion, which autocrinally

induces cholangiocyte proliferation, followed by PVP proliferation to irrigate neoductules⁽³⁵⁾.

In turn, in the animal model of BDL plus hepatic artery ligation (BDL+HAL), the observed features are: effacement of PVP, increased apoptosis and decreased proliferation of

cholangiocytes, decreased secretin-induced bile flow, and reduced secretion of VEGFA by cholangiocytes. Administration of recombinant VEGFA to animals subjected to BDL+HAL

prevents development of HAL-related biliary disorder by maintaining PVP integrity and

enabling cholangiocyte proliferation⁽³⁶⁾. The decreased VEGFA gene expression observed in

BA patients in the present study appears similar to the features induced by BDL+HAL,

perhaps representing the effect of PVP disruption associated with bile duct obstruction. Most

of the BA patients in our study shared the HIBA molecular profile (hiHIF-1 α /hiHIF-

2 α /loVEGFA/loVEGFR2) (**FIGURE 2**), with minimal variation in which patients belonged

to each of these subsets. The frequency of HIBA ranged from 59% of the BA group for

hiHIF-2 α to 72% for loVEGFR2, and the loVEGFR2 subset included all patients that

composed the other HIBA subsets. The HIBA subsets apparently represented the same

hypoxic/ischemic process, exhibiting similar features. Every one of these subsets, except

hiHIF-2 α , included older infants presenting with the most elevated TB and DB levels at

portoenterostomy, suggesting that this hypoxic/ischemic process affects all or nearly all BA

patients over time, at least in the isolated variant of BA, and contributes to bile flow

impairment. Uflacker & Pariente⁽⁹⁾ conducted an arteriographic evaluation of the livers of 46

children with BA and observed, in every patient, enlarged hepatic arteries with encasement, strictures, dilatation, and angulation, as well as imaging findings suggestive of peripheral occlusion. Vascular “tuft-like” blush surrounding occluded peripheral arteries was observed in 82% of patients, apparently representing arterial-portal connections within portal tracts. Interestingly, VEGFR2 blockade causes sprouting defects during vessel formation⁽¹⁹⁾. All of these findings suggest that a chronic, progressive ischemic process, with associated vascular disruption, is implicated in BA.

Unlike the other HIBA subsets, hiHIF-2 α showed no associations with age, TB, or DB at portoenterostomy (**TABLE 4b**). HIF-1 α and HIF-2 α show some overlap between their target genes⁽³⁷⁾, and during embryogenesis, they offset one another in response to hypoxia. In adult angiogenesis, they display different roles: HIF-2 α is triggered in chronic adaptation to hypoxia, while HIF-1 α activity is amplified in the presence of acute hypoxia^(38, 39). In this study, the behavior of the hiHIF-2 α subset, unrelated to age and bile flow impairment, may represent a nonspecific hypoxic response to chronic liver disease, while hiHIF-1 α behavior may arise from an additional hypoxic aggression developing over time and impairing bile flow, such as a superimposed vascular disruption.

We assessed gene expression of CK19 and MCP1 in an attempt to analyze the effect of hypoxia/ischemia on liver disease severity. CK19 is used to assess severity of liver disease and fibrosis deposition in some hepatic disorders^(40, 41). In the present study, CK19 gene expression was lower in the hiHIF-2 α and loVEGFR2 subsets. It was positively correlated with VEGFA expression, but no difference in CK19 was observed between the hiVEGFA and loVEGFA subsets.

Cholangiocytes and the PVP share interrelated behaviors. In the BDL model, they proliferate together⁽³⁵⁾, while in BDL+HAL, PVP effacement induces hypoxic/ischemic injury of the biliary tree, resulting in decreased proliferation and increased apoptosis of cholangiocytes⁽³⁶⁾. The lower CK19 expression observed in HIBA subsets probably represents a decrease in cholangiocyte mass, prompted by increased apoptosis and decreased proliferation of these cells. In the long run, BA represents a vanishing biliary disorder⁽⁴²⁾, and the reduced CK19 expression and hypoxia/ischemia we observed in patients with this condition suggests that bile duct disappearance in BA is the result of an ischemic cholangiopathy.

MCP1 is associated with biliary fibrosis⁽¹²⁾. Thus, it was surprising that, in patients with BA, MCP1 was not associated with expression of any of the studied molecules, except for a positive correlation with VEGFR1 (**TABLE 3**), which acts more on induction inflammation and fibrosis than on angiogenesis⁽³³⁾. The absence of a correlation between MCP1 and the other studied molecules suggests that the bulk of hypoxia/ischemia in BA is not dependent merely on fibrosis.

Finally, we considered whether decreased VEGFA-VEGFR2 expression in BA could have a protective role, since modulation of these molecules is a proposed treatment for liver diseases⁽⁴³⁾. Recent studies have shown that blocking VEGFA expression in fact aggravates liver fibrosis^(44, 45). In an animal model of BDL followed by bile flow surgical decompression⁽⁴⁶⁾, VEGFA neutralization impaired resolution of fibrosis by decreasing sinusoidal permeability and precluding recruitment and infiltration of monocytes to fibrous tissues, which is a crucial mechanism for fibrosis reabsorption. The decreased VEGFA and VEGFR-2 gene expression observed in BA patients in the present study does not imply a protective role against liver impairment; conversely, it seems to be associated with worsening disease⁽⁴⁷⁾.

This is a single center study evaluating a limited amount of patients, and the molecular analysis is restricted to the determination of steady-state mRNA levels of seven selected genes. Additional steps of investigation were not feasible due to technical limitations, including the amount of liver tissue for protein expression and immunohistochemistry studies. It is eventually necessary to elucidate in larger samples: the protein expression of molecules involved with hypoxia; the involvement of inflammatory cells, including macrophages, of angiogenic pathways alternative to VEGFA and VEGFR2, such as those involving other tyrosine kinase receptors⁽⁴⁸⁾, and the participation of the signaling by other molecules such as Notch and Hedgehog⁽⁴⁹⁾.

In conclusion, this study suggests a role for hypoxia-ischemia in the development of the isolated BA variant, describing a gene expression profile reminiscent of an arteriopathy in the affected patients, similar to the animal model of bile duct plus hepatic artery ligation. Hypoxia-ischemia in BA seems to evolve over time, lead to a decreasing cholangiocyte mass and to be independent of fibrosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Jorge Abdon Bezerra, from the Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, for his support in the inaugural steps of this study by screening candidate angiogenic molecules through a transcriptome analysis in patients with neonatal cholestasis.

REFERENCES

1. Mieli-Vergani G, Howard ER, Portman B *et al.* Late referral for biliary atresia--missed opportunities for effective surgery. *Lancet* 1989;1:421-423.
2. Santos JL, Kieling CO, Meurer L *et al.* The extent of biliary proliferation in liver biopsies from patients with biliary atresia at portoenterostomy is associated with the postoperative prognosis. *J Pediatr Surg* 2009;44:695-701.
3. Carvalho E, Santos JL, Silveira TR *et al.* Biliary atresia: the Brazilian experience. *J Pediatr (Rio J)* 2010;86:473-479.
4. Bessho K, Mourya R, Shivakumar P *et al.* Gene expression signature for biliary atresia and a role for interleukin-8 in pathogenesis of experimental disease. *Hepatology* 2014;60:211-223.
5. Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia. *Lancet* 2009;374:1704-1713.
6. Brough AJ, Bernstein J. Liver biopsy in the diagnosis of infantile obstructive jaundice. *Pediatrics* 1969;43:519-526.
7. Ho CW, Shioda K, Shirasaki K *et al.* The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the hepatobiliary system and the hepatic artery. *JPGN* 1993;16:53-60.
8. dos Santos JL, da Silveira TR, da Silva VD *et al.* Medial thickening of hepatic artery branches in biliary atresia. A morphometric study. *J Pediatr Surg* 2005;40:637-642.
9. Uflacker R, Pariente DM. Angiographic findings in biliary atresia. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2004;27:486-490.
10. Kim WS, Cheon JE, Youn BJ *et al.* Hepatic arterial diameter measured with US: adjunct for US diagnosis of biliary atresia. *Radiology* 2007;245:549-555.

11. Edom PT, Meurer L, da Silveira TR *et al.* Immunolocalization of VEGF A and its receptors, VEGFR1 and VEGFR2, in the liver from patients with biliary atresia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011;19:360-368.
12. Ramm GA, Shepherd RW, Hoskins AC *et al.* Fibrogenesis in pediatric cholestatic liver disease: role of taurocholate and hepatocyte-derived monocyte chemotaxis protein-1 in hepatic stellate cell recruitment. *Hepatology* 2009;49:533-544.
13. Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:523-526.
14. Shay JE, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: crosstalk between inflammation and metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23:389-394.
15. Talks KL, Turley H, Gatter KC *et al.* The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000;157:411-421.
16. Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 2000;203:1253-1263.
17. Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev* 2000;14:1983-1991.
18. Tudor RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 1995;95:1798-1807.
19. Welti J, Loges S, Dimmeler S *et al.* Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest* 2013;123:3190-3200.

20. Kobayashi H, Tamatani T, Tamura T *et al.* The role of monocyte chemoattractant protein-1 in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2006;41:1967-1972.
21. Deltenre P, Valla DC. Ischemic cholangiopathy. *J Hepatol* 2006;44:806-817.
22. Moon JO, Welch TP, Gonzalez FJ *et al.* Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G582-G592.
23. Copple BL, Bustamante JJ, Welch TP *et al.* Hypoxia-inducible factor-dependent production of profibrotic mediators by hypoxic hepatocytes. *Liver Int* 2009;29:1010-1021.
24. Nath B, Szabo G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver diseases. *Hepatology* 2012;55:622-633.
25. Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C *et al.* Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* 2009;49:1245-1256.
26. Gardner AW, Parker DE, Montgomery PS *et al.* Greater endothelial apoptosis and oxidative stress in patients with peripheral artery disease. *Int J Vasc Med* 2014;2014:160534.
27. Dickinson MG, Bartelds B, Borgdorff MA *et al.* The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013;305:L1-L14.
28. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2012;122:4306-4313.
29. Nicolls MR, Mizuno S, Taraseviciene-Stewart L *et al.* New models of pulmonary hypertension based on VEGF receptor blockade-induced endothelial cell apoptosis. *Pulm Circ* 2012;2:434-442.
30. Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis* 2010;30:258-270.

31. Beaussier M, Wendum D, Fouassier L *et al.* Adaptive bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia. *J Hepatol* 2005;42:257-265.
32. Li J, Brown LF, Hibberd MG *et al.* VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* 1996;270:H1803-H1811.
33. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:469-478.
34. Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology* 2006;130:1270-1282.
35. Gaudio E, Onori P, Pannarale L *et al.* Hepatic microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: a morphological study. *Gastroenterology* 1996;111:1118-1124.
36. Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D *et al.* Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G307-G317.
37. Kim WY, Safran M, Buckley MR *et al.* Failure to prolyl hydroxylate hypoxia-inducible factor alpha phenocopies VHL inactivation in vivo. *EMBO J* 2006;25:4650-4662.
38. Skuli N, Liu L, Runge A *et al.* Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood* 2009;114:469-477.
39. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T *et al.* Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 2006;10:413-423.

40. Meriden Z, Forde KA, Pasha TL *et al.* Histologic predictors of fibrosis progression in liver allografts in patients with hepatitis C virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:289-296.
41. Guimei M, Baddour N, Elkaffash D *et al.* Gremlin in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma complicating chronic hepatitis C: an immunohistochemical and PCR study of human liver biopsies. *BMC Res Notes* 2012;5:390-400.
42. Nietgen GW, Vacanti JP, Perez-Atayde AR. Intrahepatic bile duct loss in biliary atresia despite portoenterostomy: a consequence of ongoing obstruction? *Gastroenterology* 1992;102:2126-2133.
43. Shah VH, Bruix J. Antiangiogenic therapy: not just for cancer anymore? *Hepatology* 2009;49:1066-1068.
44. Patsenker E, Popov Y, Stickel F *et al.* Pharmacological inhibition of integrin alphavbeta3 aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis. *Hepatology* 2009;50:1501-1511.
45. Kaur S, Anita K. Angiogenesis in liver regeneration and fibrosis: “a double-edged sword”. *Hepatology International* 2013;7:10.
46. Yang L, Kwon J, Popov Y *et al.* Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology* 2014;146:1339-1350.
47. Iwakiri Y, Shah V, Rockey DC. Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis - Current status and future directions. *J Hepatol* 2014;61:912-924.
48. de Souza AF, Meurer L, da Silveira TR *et al.* Angiopoietin 1 and angiopoietin 2 are associated with medial thickening of hepatic arterial branches in biliary atresia. *Pediatr Res* 2014;75:22-28.

49. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis.
Cell 2011;146:873-887.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Gene expression of the studied molecules in patients with biliary atresia (BA) and in patients with intrahepatic cholestasis (IHC). Between-group differences in gene expression were as follows: a) HIF-1 α : P=0.001; b) HIF-2 α : P<0.001; c) VEGFA: P=0.060; d) specifically, loVEGFA vs. IHC: P<0.001; e) VEGFR1: P= 0.086; and f) VEGFR2: P<0.001. Data expressed as median (interquartile range), Mann–Whitney *U* test. Abbreviations: HIF, hypoxia inducible factor; VEGFA, vascular endothelial growth factor A; VEGFR, VEGF receptor; loVEGF, subset of BA patients with lower VEGFA expression.

Fig. 2. Venn diagram showing the interrelation between hypoxic/ischemic biliary atresia (HIBA) subsets. All patients from the HIBA subsets were included in the lower VEGFR2 (loVEGFR2) subset (n=23, 72% of BA). Seventeen patients (53% of BA) were included in all HIBA subsets. Abbreviations: lo, subset of BA patients with lower gene expression; hi, subset of BA patients with higher gene expression; HIF, hypoxia-inducible factor; VEGFA, vascular endothelial growth factor A; VEGFR, vascular endothelial receptor.

FIGURE 1

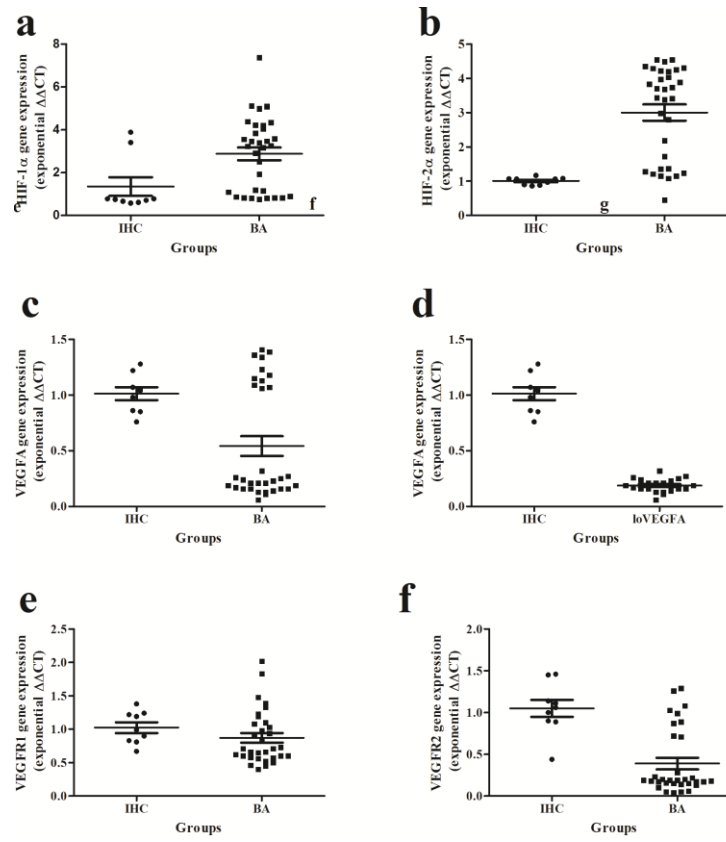


FIGURE 2

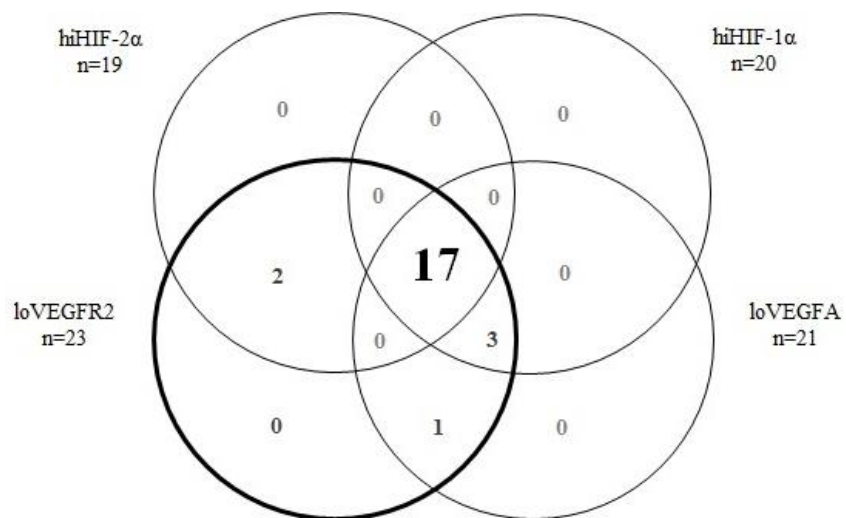


TABLE 1- Probes used in this study

Molecules	Probes	Size (pb)
HIF1 α	Hs00153153_m1	76
HIF2 α	Hs01026149_m1	70
VEGFA	Hs00900055_m1	59
VEGFR1	Hs01052961_m1	72
VEGFR2	Hs00911700_m1	83
CK19	Hs00761767_s1	116
MCP1	Hs00234140_m1	101
18S	Hs01026310_m1	71

Abbreviations: HIF- hypoxia inducible factor; VEGFA- vascular endothelial growth factor A; VEGFR- vascular endothelial growth factor receptor; CK19- cytokeratin 19; MCP1- monocyte chemoattractant protein 1; 18S- ribosomal RNA.

TABLE 2- Comparison of biliary atresia and intrahepatic cholestasis regarding variables under study

VARIABLES	BA (n=32) Median (P25- P75)	IHC (n=9) Median (P25- P75)	P
HIF-1α	3.2 (0.9 – 4.2)	0.8 (0.6 – 2.1)	0.001
HIF-2α	3.6 (1.4 – 4.2)	1.1 (0.9 – 1.1)	<0.001
VEGFA	0.2 (0.2 – 1.1)	1.0 (0.9-1.1)	0.060
VEGFR1	0.7 (0.6-1.1)	0.9 (0.8-1.2)	0.086
VEGFR2	0.2 (0.2-0.7)	1.1 (0.9-1.3)	<0.001
MCP1	1.7 (1.2-2.5)	0.9 (0.9-1.5)	0.014
CK19	1.7 (0.6-4.2)	1 (0.6-1.8)	0.327
AGEP (days of life)	65 (52-86.8)	67(52.5- 89)	0.571
TB (mg/dL)	9.5 (7-11.6)	9.2 (3.9-15.7)	0.835
DB (mg/dL)	6.6 (5.2-8.6)	6.4 (2.9-11.9)	0.959
GGT (U/L)	853 (622-1280)	368 (145-703)	0.003

Statistics- Mann-Whitney test. Abbreviations: BA- biliary atresia; IHC- Intrahepatic Cholestasis; HIF- hypoxia inducible factor; VEGF- vascular endothelial growth factor; VEGFR- vascular endothelial growth factor receptor; MCP-monocyte chemotactic protein; CK- cytokeratin; AGEP- age at procedure; TB- total bilirubin; DB- direct-reacting bilirubin; GGT- gamma-glutamyl transpeptidase.

TABLE 3 - Correlation among variables under study considering biliary atresia patients

	HIF-1α	HIF-2α	VEGFA	VEGFR1	VEGFR2	MCP1	CK19	TB	DB
HIF-2α	0.62 (<0.001)	-							
VEGFA	-0.62 (<0.001)	-0.40 (0.022)	-						
VEGFR1	-0.39 (0.029)	-0.18 (0.330)	0.81 (<0.001)	-					
VEGFR2	-0.47 (0.007)	-.320 (0.074)	0.62 (<0.001)	0.71 (<0.001)	-				
MCP1	0.29 (0.098)	0.25 (0.177)	0.26 (0.146)	0.53 (0.002)	0.39 (0.024)	-			
CK19	-0.15 (0.414)	-0.36 (0.046)	0.48 (0.006)	0.35 (0.048)	-0.01 (0.975)	0.09 (0.644)	-		
TB	0.44 (0.021)	0.18 (0.384)	-0.51 (0.007)	-0.53 (0.005)	-0.54 (0.004)	-0.18 (0.358)	0.21 (0.286)	-	
DB	0.26 (0.179)	0.01 (0.983)	-0.42 (0.031)	-0.50 (0.008)	-0.58 (0.001)	-0.20 (0.315)	0.28 (0.164)	0.91 (<0.001)	-
AGEP	0.33 (0.070)	0.04 (0.850)	-0.22 (0.232)	-0.29 (0.102)	-0.52 (0.002)	-0.09 (0.621)	0.19 (0.285)	0.49 (0.009)	0.47 (0.013)

Statistics based on Spearman correlation. Data are presented as the Spearman correlation coefficient and its statistical significance (within parentheses). Empty cells represent correlations displayed at the complementary sites of the table. (-) means correlation of one parameter with itself. Abbreviations: HIF- hypoxia inducible factor; VEGF- vascular endothelial growth factor; VEGFR- vascular endothelial growth factor receptor; MCP-monocyte chemotactic protein; CK- cytokeratin; TB- total bilirubin; DB- direct-reacting bilirubin; AGEP- age at portoenterostomy.

TABLE 4- Comparison of biliary atresia subsets

VARIABLES	4a- HIF-1 α		P
	hi HIF-1 α (n=20) <i>Median (P25- P75)</i>	lo HIF-1 α (n=12) <i>Median (P25- P75)</i>	
HIF-1 α	3.7 (3.3-4.4)	0.8 (0.8-1.1)	<0.001
HIF-2 α	3.9 (3.4-4.3)	1.3 (1.2-2.1)	0.003
VEGFA	0.2 (0.2-0.3)	1.2 (1.1-1.4)	<0.001
VEGF R1	0.6 (0.6 – 0.7)	1.2 (1-1.5)	<0.001
VEGF R2	0.2 (0.1-0.2)	0.9 (0.3-1.1)	<0.001
MCP 1	1.6 (1.2 – 2.3)	2.2 (1 – 3.8)	0.669
CK 19	1 (0.5 – 3.6)	3.8 (1.3 – 9.7)	0.056
AGEP (days of life)	66 (58.5 – 86.7)	51 (36.3 – 83.3)	0.045
TB (mg/dL)	10 (8.3 – 12.7)	6.9 (5.4 – 9.2)	0.005
DB (mg/dL)	6.8 (5.8 – 9.3)	5.4 (4.3 – 7)	0.037
GGT (U/L)	731 (590.5 – 1246)	840 (576.5 – 1399)	1.000
	4b- HIF-2 α		
	hi HIF-2 α (n=19) <i>Median (P25- P75)</i>	lo HIF-2 α (n=13) <i>Median (P25- P75)</i>	
HIF-1 α	3.8 (3.4-4.4)	1.1 (0.8-2.2)	<0.001
HIF-2 α	4.0 (3.7-4.3)	1.3 (1.2-1.9)	<0.001
VEGFA	0.2 (0.1-0.3)	1.2 (0.2 -1.4)	0.001
VEGFR1	0.7 (0.6 – 0.8)	1.1 (0.6-1.4)	0.074
VEGFR2	0.2 (0.1-0.2)	0.9 (0.1-1.1)	0.020
MCP1	1.7 (1.4 – 2.4)	1.6 (0.7 – 3.4)	0.347
CK19	0.9 (0.5 – 2.3)	3.8 (1.3 – 7.9)	0.040
AGEP (days of life)	65 (56 – 75)	69 (38.5 – 92.5)	0.744
TB (mg/dL)	9.8 (7.4 – 12.7)	8 (5.4 – 10.2)	0.071
DB (mg/dL)	6.6 (5.4 – 9.3)	6.1 (4.3 – 7.7)	0.237
GGT (U/L)	714 (584.5 – 1182)	1030.5 (576.5 – 1399)	0.366
	4c- VEGFA		
	lo VEGFA (n=21) <i>Median (P25- P75)</i>	hi VEGFA (n=11) <i>Median (P25- P75)</i>	
HIF-1 α	3.6 (3.2-4.4)	0.8 (0.8-1.1)	<0.001
HIF-2 α	3.8(3.4-4.3)	1.3 (1.2– 1.7)	0.004
VEGFA	0.2 (0.2-0.2)	1.2 (1.1-1.4)	<0.001
VEGFR1	0.6 (0.5 – 0.7)	1.2 (1.1-1.5)	<0.001
VEGFR2	0.2 (0.1-0.2)	0.9 (0.7-1.1)	<0.001
MCP1	1.6 (1.1– 2.2)	2.2 (1.3 – 4.2)	0.307
CK19	1.2 (0.5 – 4.1)	3.8 (1.3 – 4.6)	0.168
AGEP (days of life)	66 (59-88)	48(34-69)	0.016
TB (mg/dL)	10.2 (8.6 – 12.6)	6.7 (5.2 – 8)	0.001
DB (mg/dL)	6.9 (5.9 – 9.1)	5.3 (4.2 – 6.1)	0.012
GGT (U/L)	726 (547 – 1229)	1001 (621 – 1459)	0.631
	4d- VEGFR2		
	lo VEGFR2 (n=23) <i>Median (P25- P75)</i>	hi VEGFR2 (n=9) <i>Median (P25- P75)</i>	
HIF-1 α	3.6 (3.2-4.3)	0.7 (0.8-1.1)	<0.001
HIF-2 α	3.9 (3.4-4.3)	1.2 (1.2-1.4)	<0.001
VEGFA	0.2 (0.2-0.3)	1.2 (1.1-1.4)	<0.001
VEGFR1	0.6 (0.6 – 0.7)	1.3 (1-1.7)	<0.001
VEGFR2	0.2 (0.1-0.2)	0.9 (0.8-1.2)	<0.001
MCP1	1.6 (1.2 – 2.3)	2.2 (1.3 – 4.4)	0.249
CK19	0.9 (0.5 – 3.9)	3.8 (2.1 – 7.9)	0.020
AGEP (days of life)	66 (56 – 88)	45 (33 – 80.5)	0.040
TB (mg/dL)	9.9 (7.6 – 12.3)	6.7 (4.7 – 8.6)	0.014
DB (mg/dL)	6.8 (5.5 – 8.9)	4.4 (4 – 6.6)	0.043
GGT (U/L)	717.5 (565.7 – 1197)	1060 (620 – 1579)	0.268

Statistics- Mann-Whitney test. Abbreviations: lo- lower; hi- higher; HIF- hypoxia inducible factor; VEGF- vascular endothelial growth factor; VEGFR- vascular endothelial growth factor receptor; MCP-monocyte chemotactic protein; CK- cytokeratin; AGEP- age at portoenterostomy ; TB- total bilirubin; DB- direct-reacting bilirubin; GGT- gamma-glutamyl transpeptidase.

8. CONCLUSÕES

- A expressão gênica de HIF-1 α e HIF-2 α foi maior nos pacientes com AB em relação aos lactentes com CIH.
- A expressão gênica de HIF-1 α não se correlacionou com nenhuma das variáveis associadas à gravidade da doença, que afetam o prognóstico pós-portoenterostomia, incluindo idade por ocasião da portoenterostomia, extensão da reação ductular e a extensão da fibrose.
- Não foi observada uma relação entre a expressão gênica de HIF-1 α com a REDL.
- A expressão gênica de HIF-2 α correlacionou-se negativamente com a expressão de CK19.
- A expressão gênica de HIF-2 α não se correlacionou com a REDL.
- Apenas a expressão gênica de HIF-1 α correlacionou-se positivamente com os níveis de BT.
- Não foi observado uma associação entre a expressão gênica de HIF-1 α e HIF-2 α com a sobrevida do fígado nativo em 2 anos do pós-operatório da portoenterostomia.
- Pacientes com hiHIF-1 α eram mais velhos por ocasião da portoenterostomia e apresentaram níveis mais altos de BT e BD.
- Pacientes com loHIF-2 α apresentaram níveis de expressão mais elevados de CK19.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Devido à etiologia da AB ainda não estar totalmente elucidada e o fato de termos observado, a nível molecular, hipóxia no tecido hepático destes pacientes, se faz necessário outras técnicas com o objetivo de confirmar estes achados. Além disso, são necessárias mais pesquisas para elucidar o envolvimento de células inflamatórias, incluindo os macrófagos, bem como de outras vias angiogênicas alternativas. O estudo de outras vias alternativas que confirmem este processo hipóxico/isquêmico pode ajudar a incrementar a compreensão teórica da patogenia desta doença.

10. REFERÊNCIAS

1. Santos JL, Carvalho E, Bezerra JA. Advances in biliary atresia: from patient care to research. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43 (6): 522-7.
2. Santos JL, Choquette M, Bezerra JA. Cholestatic liver disease in children. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010; 12 (1): 30-9.
3. Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia. *Lancet.* 2009; 374 (9702): 1704-13.
4. Sun LY, Yang YS, Zhu ZJ, Gao W, Wei L, Sun XY, et al. Outcomes in children with biliary atresia following liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2013; 12 (2): 143-8.
5. Suchy FJ. Biliary atresia in sea lampreys. What can it tell us about the disorder in human infants? *Hepatology.* 2013; 57 (6): 2114-6.
6. Brindley SM, Lanham AM, Karrer FM, Tucker RM, Fontenot AP, Mack CL. Cytomegalovirus-specific T-cell reactivity in biliary atresia at the time of diagnosis is associated with deficits in regulatory T cells. *Hepatology.* 2012; 55 (4): 1130-8.
7. dos Santos JL, da Silveira TR, da Silva VD, Cerski CT, Wagner MB. Medial thickening of hepatic artery branches in biliary atresia. A morphometric study. *J Pediatr Surg.* 2005; 40 (4): 637-42.
8. Deltenre P, Valla DC. Ischemic cholangiopathy. *J Hepatol.* 2006; 44 (4): 806-17.
9. Ho CW, Shioda K, Shirasaki K, Takahashi S, Tokimatsu S, Maeda K. The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the hepatobiliary system and the hepatic artery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1993; 16 (1): 53-60.
10. Uflacker R, Pariente DM. Angiographic findings in biliary atresia. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2004; 27 (5): 486-90.

11. Edom PT, Meurer L, da Silveira TR, Matte U, dos Santos JL. Immunolocalization of VEGF A and its receptors, VEGFR1 and VEGFR2, in the liver from patients with biliary atresia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011; 19 (4): 360-8.
12. de Souza AF, Meurer L, da Silveira TR, Gregorio C, Reus N, Uribe C, et al. Angiopoietin 1 and angiopoietin 2 are associated with medial thickening of hepatic arterial branches in biliary atresia. *Pediatr Res*. 2014; 75 (1-1): 22-8.
13. Suchy FJ. Neonatal cholestasis. *Pediatr Rev*. 2004; 25 (11): 388-96.
14. Porta G, Hirschfeld A. *Icterícia*. Coleção Pediatria ICr – HC-FMUSP. Gastroenterologia e hepatologia Barueri: Manole; 2011. p. 80-7.
15. Moyer V, Freese DK, Whittington PF, Olson AD, Brewer F, Colletti RB, et al. Guideline for the evaluation of cholestatic jaundice in infants: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004; 39 (2): 115-28.
16. Santos J, Carvalho E, Seixas R. *Colestase Neonatal*. Barueri: Manole; 2012. p. 219-26.
17. Jacquemin E. Screening for biliary atresia and stool color: method of colorimetric scale. *Presse Med*. 2007; 36 (6 Pt 2): 945-8.
18. Hsiao CH, Chang MH, Chen HL, Lee HC, Wu TC, Lin CC, et al. Universal screening for biliary atresia using an infant stool color card in Taiwan. *Hepatology*. 2008; 47 (4): 1233-40.
19. Suchy F. *Approach to infant with cholestasis*. Cambridge: Cambridge Medicine; 2007. p. 179-89.
20. Li MK, Crawford JM. The pathology of cholestasis. *Semin Liver Dis*. 2004; 24 (1): 21-42.

21. dos Santos JL, Cerski CT, da Silva VD, de Mello ES, Wagner MB, da Silveira TR. Factors related to the post-portoenterostomy prognosis of biliary atresia. *J Pediatr (Rio J)*. 2002; 78 (4): 341-6.
22. Sokol RJ, Shepherd RW, Superina R, Bezerra JA, Robuck P, Hoofnagle JH. Screening and outcomes in biliary atresia: summary of a National Institutes of Health workshop. *Hepatology*. 2007; 46 (2): 566-81.
23. Hussein A, Wyatt J, Guthrie A, Stringer MD. Kasai portoenterostomy--new insights from hepatic morphology. *J Pediatr Surg*. 2005; 40 (2): 322-6.
24. Thompson J. On congenital obliteration of the bile ducts. *Edinb Med J*. 1891; 37:523-31.
25. Holmes J. Congenital obliteration of the bile ducts- Diagnosis and suggestions for treatment. *Am J Dis of Child*. 1916; 11: 405-31.
26. Ladd W. Congenital atresia and stenosis of the bile ducts. *JAMA*. 1928; 91: 1082-5.
27. Kasai M, Suzuki S. A new operation for "non-correctable" biliary atresia: Hepatic portoenterostomy. *Shujutsu*. 1959; 13: 733-9.
28. Balistreri WF, Grand R, Hoofnagle JH, Suchy FJ, Ryckman FC, Perlmutter DH, et al. Biliary atresia: current concepts and research directions. Summary of a symposium. *Hepatology*. 1996; 23 (6): 1682-92.
29. de Carvalho E, Ivantes CA, Bezerra JA. Extrahepatic biliary atresia: current concepts and future directions. *J Pediatr (Rio J)*. 2007; 83 (2): 105-20.
30. Vic P, Gestas P, Mallet EC, Arnaud JP. Biliary atresia in French Polynesia. Retrospective study of 10 years. *Arch Pediatr*. 1994; 1 (7): 646-51.
31. Lin YC, Chang MH, Liao SF, Wu JF, Ni YH, Tiao MM, et al. Decreasing rate of biliary atresia in Taiwan: a survey, 2004-2009. *Pediatrics*. 2011; 128 (3): 530-6.

32. Yoon PW, Bresee JS, Olney RS, James LM, Khoury MJ. Epidemiology of biliary atresia: a population-based study. *Pediatrics*. 1997; 99 (3): 376-82.
33. McKiernan PJ, Baker AJ, Kelly DA. The frequency and outcome of biliary atresia in the UK and Ireland. *Lancet*. 2000; 355 (9197): 25-9.
34. Santos J, Silveira T. *Atresia biliar*. Barueri: Manole; 2012. p. 263-95.
35. Cauduro SM. Extrahepatic biliary atresia: diagnostic methods. *J Pediatr (Rio J)*. 2003; 79 (2): 107-14.
36. Zerbini MC, Gallucci SD, Maezono R, Ueno CM, Porta G, Maksoud JG, et al. Liver biopsy in neonatal cholestasis: a review on statistical grounds. *Mod Pathol*. 1997; 10 (8): 793-9.
37. Ohi R. A history of the Kasai operation: hepatic portoenterostomy for biliary atresia. *World J Surg*. 1988; 12 (6): 871-4.
38. Mieli-Vergani G, Howard ER, Portman B, Mowat AP. Late referral for biliary atresia-missed opportunities for effective surgery. *Lancet*. 1989; 1 (8635): 421-3.
39. Serinet MO, Wildhaber BE, Broué P, Lachaux A, Sarles J, Jacquemin E, et al. Impact of age at Kasai operation on its results in late childhood and adolescence: a rational basis for biliary atresia screening. *Pediatrics*. 2009; 123 (5): 1280-6.
40. Volpert D, White F, Finegold MJ, Molleston J, Debaun M, Perlmutter DH. Outcome of early hepatic portoenterostomy for biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001; 32 (3): 265-9.
41. Davenport M, Caponcelli E, Livesey E, Hadzic N, Howard E. Surgical outcome in biliary atresia: etiology affects the influence of age at surgery. *Ann Surg*. 2008; 247 (4): 694-8.

42. Bezerra JA. The next challenge in pediatric cholestasis: deciphering the pathogenesis of biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006; 43 (1): 23-9.
43. Lefkowitz JH. Biliary atresia. *Mayo Clin Proc.* 1998; 73 (1): 90-5.
44. Saito T, Horie H, Yoshida H, Matsunaga T, Kouchi K, Kuroda H, et al. The perinatal transition of the hepatobiliary cyst size provides information about the condition of bile flow in biliary cystic malformation cases. *J Pediatr Surg.* 2006; 41 (8): 1397-402.
45. Biliary atresia--lessons from Japanese experience. *Lancet.* 1980; 2 (8207): 1283-4.
46. Reuben A. The sensei of Sendai: correcting the uncorrectable. *Hepatology.* 2003; 37 (4): 952-5.
47. Superina R, Magee JC, Brandt ML, Healey PJ, Tiao G, Ryckman F, et al. The anatomic pattern of biliary atresia identified at time of Kasai hepatoportoenterostomy and early postoperative clearance of jaundice are significant predictors of transplant-free survival. *Ann Surg.* 2011; 254 (4): 577-85.
48. Davenport M, Tizzard SA, Underhill J, Mieli-Vergani G, Portmann B, Hadzić N. The biliary atresia splenic malformation syndrome: a 28-year single-center retrospective study. *J Pediatr.* 2006; 149 (3): 393-400.
49. Harpavat S, Finegold MJ, Karpen SJ. Patients with biliary atresia have elevated direct/conjugated bilirubin levels shortly after birth. *Pediatrics.* 2011; 128 (6): 1428-33.
50. Czech-Schmidt G, Verhagen W, Szavay P, Leonhardt J, Petersen C. Immunological gap in the infectious animal model for biliary atresia. *J Surg Res.* 2001; 101 (1): 62-7.
51. Schwarz KB, Haber BH, Rosenthal P, Mack CL, Moore J, Bove K, et al. Extrahepatic anomalies in infants with biliary atresia: results of a large prospective North American multicenter study. *Hepatology.* 2013; 58 (5): 1724-31.

52. Guttman OR, Roberts EA, Schreiber RA, Barker CC, Ng VL, Group CPHR. Biliary atresia with associated structural malformations in Canadian infants. *Liver Int.* 2011; 31 (10): 1485-93.
53. Chandra RS. Biliary atresia and other structural anomalies in the congenital polysplenia syndrome. *J Pediatr.* 1974; 85 (5): 649-55.
54. Davenport M, Savage M, Mowat AP, Howard ER. Biliary atresia splenic malformation syndrome: an etiologic and prognostic subgroup. *Surgery.* 1993; 113 (6): 662-8.
55. Silveira TR, Salzano FM, Howard ER, Mowat AP. The relative importance of familial, reproductive and environmental factors in biliary atresia: etiological implications and effect on patient survival. *Braz J Med Biol Res.* 1992; 25 (7): 673-81.
56. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res.* 2008; 647 (1-2): 30-8.
57. Matthews RP, Eauc Claire SF, Mugnier M, Lorent K, Cui S, Ross MM, et al. DNA hypomethylation causes bile duct defects in zebrafish and is a distinguishing feature of infantile biliary atresia. *Hepatology.* 2011; 53 (3): 905-14.
58. Carmi R, Magee CA, Neill CA, Karrer FM. Extrahepatic biliary atresia and associated anomalies: etiologic heterogeneity suggested by distinctive patterns of associations. *Am J Med Genet.* 1993; 45 (6) :683-93.
59. Davit-Spraul A, Baussan C, Hermeziu B, Bernard O, Jacquemin E. CFC1 gene involvement in biliary atresia with polysplenia syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008; 46 (1): 111-2.
60. Arikan C, Berdeli A, Kilic M, Tumgor G, Yagci RV, Aydogdu S. Polymorphisms of the ICAM-1 gene are associated with biliary atresia. *Dig Dis Sci.* 2008; 53 (7): 2000-4.

61. Tsai EA, Grochowski CM, Loomes KM, Bessho K, Hakonarson H, Bezerra JA, et al. Replication of a GWAS signal in a Caucasian population implicates ADD3 in susceptibility to biliary atresia. *Hum Genet.* 2014; 133 (2): 235-43.
62. Linde CI, Karashima E, Raina H, Zulian A, Wier WG, Hamlyn JM, et al. Increased arterial smooth muscle Ca²⁺ signaling, vasoconstriction, and myogenic reactivity in Milan hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012; 302 (3): 611-20.
63. Cheng G, Tang CS, Wong EH, Cheng WW, So MT, Miao X, et al. Common genetic variants regulating ADD3 gene expression alter biliary atresia risk. *J Hepatol.* 2013; 59 (6): 1285-91.
64. Zeng S, Sun P, Chen Z, Mao J, Wang J, Wang B, et al. Association between single nucleotide polymorphisms in the ADD3 gene and susceptibility to biliary atresia. *PLoS One.* 2014; 9 (10): 107977.
65. Lee HC, Chang TY, Yeung CY, Chan WT, Jiang CB, Chen WF, et al. Genetic variation in the vascular endothelial growth factor gene is associated with biliary atresia. *J Clin Gastroenterol.* 2010; 44 (2): 135-9.
66. Arikan C, Berdeli A, Ozgenc F, Tumgor G, Yagci RV, Aydogdu S. Positive association of macrophage migration inhibitory factor gene-173G/C polymorphism with biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006; 42 (1): 77-82.
67. Kaewkiattiyot S, Honsawek S, Vejchapipat P, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. Association of X-prolyl aminopeptidase 1 rs17095355 polymorphism with biliary atresia in Thai children. *Hepatol Res.* 2011; 41 (12): 1249-52.
68. Udomsinprasert W, Tencomnao T, Honsawek S, Anomasiri W, Vejchapipat P, Chongsrisawat V, et al. +276 G/T single nucleotide polymorphism of the adiponectin gene is associated with the susceptibility to biliary atresia. *World J Pediatr.* 2012; 8 (4): 328-34.

69. Cui S, Leyva-Vega M, Tsai EA, EauClaire SF, Glessner JT, Hakonarson H, et al. Evidence from human and zebrafish that GPC1 is a biliary atresia susceptibility gene. *Gastroenterology*. 2013; 144 (5): 1107-15.
70. Leyva-Vega M, Gerfen J, Thiel BD, Jurkiewicz D, Rand EB, Pawlowska J, et al. Genomic alterations in biliary atresia suggest region of potential disease susceptibility in 2q37.3. *Am J Med Genet A*. 2010; 152 (4): 886-95.
71. Alpert LI, Strauss L, Hirschhorn K. Neonatal hepatitis and biliary atresia associated with trisomy 17-18 syndrome. *N Engl J Med*. 1969; 280 (1): 16-20.
72. Buffa V, Tancredi F, Pierro M, Guanti G. Case of trisomy of chromosome 18 associated with hypermethioninemia and biliary atresia. *Pediatria (Napoli)*. 1972; 80 (2): 159-69.
73. Ikeda S, Sera Y, Yoshida M, Ohshiro H, Ueno M, Izaki T, et al. Extrahepatic biliary atresia associated with trisomy 18. *Pediatr Surg Int*. 1999; 15 (2): 137-8.
74. Pameijer CR, Hubbard AM, Coleman B, Flake AW. Combined pure esophageal atresia, duodenal atresia, biliary atresia, and pancreatic ductal atresia: prenatal diagnostic features and review of the literature. *J Pediatr Surg*. 2000; 35 (5): 745-7.
75. Molland EA, Purcell M. Biliary atresia and the Dandy-Walker anomaly in a neonate with 45,X Turner's syndrome. *J Pathol*. 1975; 115 (4): 227-30.
76. Lam FW, Chan WK, Lam ST, Chu WP, Kwong NS. Proximal 10q trisomy: a new case with anal atresia. *J Med Genet*. 2000; 37 (9): 24.
77. Lysy PA, Sibille C, Gillerot Y, Smets F, Sokal EM. Partial proximal 10q trisomy: a new case associated with biliary atresia. *Hereditas*. 2007; 144 (5): 191-4.

78. Tsukuda T, Nagata I, Sawada H, Murakami J, Hanaki K, Urashima H, et al. Partial monosomy 10q and partial trisomy 9q with anal atresia due to maternal translocation: t(9;10)(q32;q26). *Clin Genet.* 1996; 50 (4): 220-2.
79. Maruyama K, Koizumi T, Ikeda H. Partial monosomy 10q with partial trisomy 11q due to paternal balanced translocation. *J Pediatr Child Health.* 2001; 37 (2): 198-200.
80. Silveira TR, Salzano FM, Howard ER, Mowat AP. Congenital structural abnormalities in biliary atresia: evidence for etiopathogenic heterogeneity and therapeutic implications. *Acta Paediatr Scand.* 1991; 80 (12): 1192-9.
81. Danks DM, Campbell PE, Jack I, Rogers J, Smith AL. Studies of the aetiology of neonatal hepatitis and biliary atresia. *Arch Dis Child.* 1977; 52 (5): 360-7.
82. Caton AR, Druschel CM, McNutt LA. The epidemiology of extrahepatic biliary atresia in New York State, 1983-98. *Pediatr Perinat Epidemiol.* 2004; 18 (2): 97-105.
83. The NS, Honein MA, Caton AR, Moore CA, Siega-Riz AM, Druschel CM, et al. Risk factors for isolated biliary atresia, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2002. *Am J Med Genet A.* 2007; 143 (19): 2274-84.
84. Ayas MF, Hillemeier AC, Olson AD. Lack of evidence for seasonal variation in extrahepatic biliary atresia during infancy. *J Clin Gastroenterol.* 1996; 22 (4): 292-4.
85. Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, Le Pommelet C, Golmard JL, Auvert B. Epidemiology of biliary atresia in France: a national study 1986-96. *J Hepatol.* 1999; 31 (6): 1006-13.
86. Wada H, Muraji T, Yokoi A, Okamoto T, Sato S, Takamizawa S, et al. Insignificant seasonal and geographical variation in incidence of biliary atresia in Japan: a regional survey of over 20 years. *J Pediatr Surg.* 2007; 42 (12): 2090-2.

87. Wildhaber BE, Majno P, Mayr J, Zachariou Z, Hohlfeld J, Schwoebel M, et al. Biliary atresia: Swiss national study, 1994-2004. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008; 46 (3): 299-307.
88. Jimenez-Rivera C, Jolin-Dahel KS, Fortinsky KJ, Gozdyra P, Benchimol EI. International incidence and outcomes of biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013; 56 (4): 344-54.
89. Harper P, Plant JW, Unger DB. Congenital biliary atresia and jaundice in lambs and calves. *Aust Vet J.* 1990; 67 (1): 18-22.
90. Bezerra JA, Tiao G, Ryckman FC, Alonso M, Sabla GE, Shneider B, et al. Genetic induction of proinflammatory immunity in children with biliary atresia. *Lancet.* 2002; 360 (9346): 1653-9.
91. Urushihara N, Iwagaki H, Yagi T, Kohka H, Kobashi K, Morimoto Y, et al. Elevation of serum interleukin-18 levels and activation of Kupffer cells in biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 2000; 35 (3): 446-9.
92. Davenport M, Gonde C, Redkar R, Koukoulis G, Tredger M, Mieli-Vergani G, et al. Immunohistochemistry of the liver and biliary tree in extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 2001; 36 (7): 1017-25.
93. Saxena V, Shivakumar P, Sabla G, Mourya R, Chougnet C, Bezerra JA. Dendritic cells regulate natural killer cell activation and epithelial injury in experimental biliary atresia. *Sci Transl Med.* 2011; 3 (102): 102ra94.
94. Mack CL, Falta MT, Sullivan AK, Karrer F, Sokol RJ, Freed BM, et al. Oligoclonal expansions of CD4+ and CD8+ T-cells in the target organ of patients with biliary atresia. *Gastroenterology.* 2007; 133 (1): 278-87.

95. Shinkai M, Shinkai T, Puri P, Stringer MD. Elevated expression of IL2 is associated with increased infiltration of CD8+ T cells in biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 2006; 41 (2): 300-5.
96. Broomé U, Nemeth A, Hulcrantz R, Scheynius A. Different expression of HLA-DR and ICAM-1 in livers from patients with biliary atresia and Byler's disease. *J Hepatol.* 1997; 26 (4): 857-62.
97. Dillon P, Belchis D, Tracy T, Cilley R, Hafer L, Krummel T. Increased expression of intercellular adhesion molecules in biliary atresia. *Am J Pathol.* 1994; 145 (2): 263-7.
98. Dillon PW, Belchis D, Minnick K, Tracy T. Differential expression of the major histocompatibility antigens and ICAM-1 on bile duct epithelial cells in biliary atresia. *Tohoku J Exp Med.* 1997; 181 (1): 33-40.
99. Landing BH. Considerations of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst--the concept of infantile obstructive cholangiopathy. *Prog Pediatr Surg.* 1974; 6: 113-39.
100. Balistreri WF, Tabor E, Gerety RJ. Negative serology for hepatitis A and B viruses in 18 cases of neonatal cholestasis. *Pediatrics.* 1980; 66 (2): 269-71.
101. Tanaka M, Ishikawa T, Sakaguchi M. The pathogenesis of biliary atresia in Japan: immunohistochemical study of HBV-associated antigen. *Acta Pathol Jpn.* 1993; 43 (7-8): 360-6.
102. Nadal D, Wunderli W, Meurmann O, Briner J, Hirsig J. Isolation of respiratory syncytial virus from liver tissue and extrahepatic biliary atresia material. *Scand J Infect Dis.* 1990; 22 (1): 91-3.
103. Domiati-Saad R, Dawson DB, Margraf LR, Finegold MJ, Weinberg AG, Rogers BB. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in

- neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia. *Pediatr Dev Pathol*. 2000; 3 (4): 367-73.
104. Drut R, Drut RM, Gómez MA, Cueto Rúa E, Lojo MM. Presence of human papillomavirus in extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1998; 27 (5): 530-5.
105. Bangaru B, Morecki R, Glaser JH, Gartner LM, Horwitz MS. Comparative studies of biliary atresia in the human newborn and reovirus-induced cholangitis in weanling mice. *t*. 1980; 43 (5): 456-62.
106. Morecki R, Glaser JH, Cho S, Balistreri WF, Horwitz MS. Biliary atresia and reovirus type 3 infection. *N Engl J Med*. 1982; 307 (8): 481-4.
107. Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus SM, Le M, Karrer FM, Narkewicz MR, et al. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology*. 1998; 27 (6): 1475-82.
108. Dussaix E, Hadchouel M, Tardieu M, Alagille D. Biliary atresia and reovirus type 3 infection. *N Engl J Med*. 1984; 310 (10): 658.
109. Glaser JH, Balistreri WF, Morecki R. Role of reovirus type 3 in persistent infantile cholestasis. *J Pediatr*. 1984; 105 (6): 912-5.
110. Steele TA, Cox DC. Reovirus type 3 chemoimmunotherapy of murine lymphoma is abrogated by cyclosporine. *Cancer Biother*. 1995; 10 (4): 307-15.
111. Riepenhoff-Talty M, Gouvea V, Evans MJ, Svensson L, Hoffenberg E, Sokol RJ, et al. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *J Infect Dis*. 1996; 174 (1): 8-15.
112. Tarr PI, Haas JE, Christie DL. Biliary atresia, cytomegalovirus, and age at referral. *Pediatrics*. 1996; 97 (6 Pt 1): 828-31.

113. Fischler B, Ehrnst A, Forsgren M, Orvell C, Nemeth A. The viral association of neonatal cholestasis in Sweden: a possible link between cytomegalovirus infection and extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998; 27 (1): 57-64.
114. Fischler B, Woxenius S, Nemeth A, Papadogiannakis N. Immunoglobulin deposits in liver tissue from infants with biliary atresia and the correlation to cytomegalovirus infection. *J Pediatr Surg.* 2005; 40 (3): 541-6.
115. Jevon GP, Dimmick JE. Biliary atresia and cytomegalovirus infection: a DNA study. *Pediatr Dev Pathol.* 1999; 2 (1): 11-4.
116. De Tommaso AM, Andrade PD, Costa SC, Escanhoela CA, Hessel G. High frequency of human cytomegalovirus DNA in the liver of infants with extrahepatic neonatal cholestasis. *BMC Infect Dis.* 2005; 5: 108.
117. Soomro GB, Abbas Z, Hassan M, Luck N, Memon Y, Khan AW. Is there any association of extra hepatic biliary atresia with cytomegalovirus or other infections? *J Pak Med Assoc.* 2011; 61 (3): 281-3.
118. Davenport M. Biliary atresia: clinical aspects. *Semin Pediatr Surg.* 2012; 21 (3): 175-84.
119. Shen C, Zheng S, Wang W, Xiao XM. Relationship between prognosis of biliary atresia and infection of cytomegalovirus. *World J Pediatr.* 2008; 4 (2): 123-6.
120. Rauschenfels S, Krassmann M, Al-Masri AN, Verhagen W, Leonhardt J, Kuebler JF, et al. Incidence of hepatotropic viruses in biliary atresia. *Eur J Pediatr.* 2009; 168 (4): 469-76.
121. Lu BR, Brindley SM, Tucker RM, Lambert CL, Mack CL. α -enolase autoantibodies cross-reactive to viral proteins in a mouse model of biliary atresia. *Gastroenterology.* 2010; 139 (5): 1753-61.

122. Sedoris KC, Thomas SD, Miller DM. Hypoxia induces differential translation of enolase/MBP-1. *BMC Cancer*. 2010; 10: 157.
123. Mack CL, Tucker RM, Lu BR, Sokol RJ, Fontenot AP, Ueno Y, et al. Cellular and humoral autoimmunity directed at bile duct epithelia in murine biliary atresia. *Hepatology*. 2006; 44 (5): 1231-9.
124. Casaccia G, Bilancioni E, Nahom A, Trucchi A, Aite L, Marcellini M, et al. Cystic anomalies of biliary tree in the fetus: is it possible to make a more specific prenatal diagnosis? *J Pediatr Surg*. 2002; 37 (8): 1191-4.
125. Vijayaraghavan P, Lal R, Sikora SS, Poddar U, Yachha SK. Experience with choledochal cysts in infants. *Pediatr Surg Int*. 2006; 22 (10): 803-7.
126. Caponcelli E, Knisely AS, Davenport M. Cystic biliary atresia: an etiologic and prognostic subgroup. *J Pediatr Surg*. 2008; 43 (9): 1619-24.
127. Hinds R, Davenport M, Mieli-Vergani G, Hadzić N. Antenatal presentation of biliary atresia. *J Pediatr*. 2004; 144 (1): 43-6.
128. Li J, Bessho K, Shivakumar P, Mourya R, Mohanty SK, Dos Santos JL, et al. Th2 signals induce epithelial injury in mice and are compatible with the biliary atresia phenotype. *J Clin Invest*. 2011; 121 (11): 4244-56.
129. Moyer K, Kaimal V, Pacheco C, Mourya R, Xu H, Shivakumar P, et al. Staging of biliary atresia at diagnosis by molecular profiling of the liver. *Genome Med*. 2010; 2 (5): 33.
130. Takemura M, Oguma S, Mori S, Ishii M, Starzl TE, Demetris AJ, et al. Peribiliary vascular diseases in rejected livers; computer-aided three-dimensional reconstruction and morphometry. *Transplant Proc*. 1991; 23 (1 Pt 2): 1409-12.

131. Yamamoto K, Sherman I, Phillips MJ, Fisher MM. Three-dimensional observations of the hepatic arterial terminations in rat, hamster and human liver by scanning electron microscopy of microvascular casts. *Hepatology*. 1985; 5 (3): 452-6.
132. Ruemmele P, Hofstaedter F, Gelbmann CM. Secondary sclerosing cholangitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009; 6 (5): 287-95.
133. Cameron GR, Hou CT. An experimental study of stricture of the common bile-duct in the guinea-pig. *J Pathol Bacteriol*. 1962; 83: 265-74.
134. Morgan WW, Rosenkrantz JC, Hill RB. Hepatic arterial interruption in the fetus--an attempt to simulate biliary atresia. *J Pediatr Surg*. 1966; 1 (4): 342-6.
135. Pickett LK, Briggs HC. Biliary obstruction secondary to hepatic vascular ligation in fetal sheep. *J Pediatr Surg*. 1969; 4 (1): 95-101.
136. Okamoto E, Okasara T, Toyosaka A. *An experimental study of the etiology of congenital biliary atresia*. Tokio: University of Tokyo Press; 1980. p. 217-34.
137. Hashimoto T, Yura J, Mahour G, et al. *Recent topics of experimental production of biliary atresia and an experimental model using devascularization of the extra-hepatic bile duct in fetal sheep*. Sendai, Japan. Amsterdam: Excerpta Medica; 1983. p. 38-45.
138. Stowens D. Congenital biliary atresia. *Am J Gastroenterol* 1959; 32: 577-90
139. Brough AJ, Bernstein J. Liver biopsy in the diagnosis of infantile obstructive jaundice. *Pediatrics*. 1969; 43 (4): 519-26.
140. Humphrey TM, Stringer MD. Biliary atresia: US diagnosis. *Radiology*. 2007; 244 (3): 845-51.
141. Kim WS, Cheon JE, Youn BJ, Yoo SY, Kim WY, Kim IO, et al. Hepatic arterial diameter measured with US: adjunct for US diagnosis of biliary atresia. *Radiology*. 2007; 245 (2): 549-55.

142. Lee MS, Kim MJ, Lee MJ, Yoon CS, Han SJ, Oh JT, et al. Biliary atresia: color doppler US findings in neonates and infants. *Radiology*. 2009; 252 (1): 282-9.
143. Hand NJ, Horner AM, Master ZR, Boateng LA, LeGuen C, Uvaydova M, et al. MicroRNA profiling identifies miR-29 as a regulator of disease-associated pathways in experimental biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012; 54 (2): 186-92.
144. Weerasooriya VS, White FV, Shepherd RW. Hepatic fibrosis and survival in biliary atresia. *J Pediatr*. 2004; 144 (1): 123-5.
145. Pape L, Olsson K, Petersen C, von Wasilewski R, Melter M. Prognostic value of computerized quantification of liver fibrosis in children with biliary atresia. *Liver Transpl*. 2009; 15 (8): 876-82.
146. Wildhaber BE, Coran AG, Drongowski RA, Hirschl RB, Geiger JD, Lelli JL, et al. The Kasai portoenterostomy for biliary atresia: A review of a 27-year experience with 81 patients. *J Pediatr Surg*. 2003; 38 (10): 1480-5.
147. Santos JL, Kieling CO, Meurer L, Vieira S, Ferreira CT, Lorentz A, et al. The extent of biliary proliferation in liver biopsies from patients with biliary atresia at portoenterostomy is associated with the postoperative prognosis. *J Pediatr Surg*. 2009; 44 (4): 695-701.
148. Davenport M, Puricelli V, Farrant P, Hadzic N, Mieli-Vergani G, Portmann B, et al. The outcome of the older (> or =100 days) infant with biliary atresia. *J Pediatr Surg*. 2004; 39 (4): 575-81.
149. Ramm GA, Shepherd RW, Hoskins AC, Greco SA, Ney AD, Pereira TN, et al. Fibrogenesis in pediatric cholestatic liver disease: role of taurocholate and hepatocyte-derived monocyte chemotaxis protein-1 in hepatic stellate cell recruitment. *Hepatology*. 2009; 49 (2): 533-44.

150. Desmet VJ. Ductal plates in hepatic ductular reactions. Hypothesis and implications. I. Types of ductular reaction reconsidered. *Virchows Arch.* 2011; 458 (3): 251-9.
151. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009; 29 (6): 313-26.
152. Isic Dencic T, Cvejic D, Paunovic I, Tatic S, Havelka M, Savin S. Cytokeratin19 expression discriminates papillary thyroid carcinoma from other thyroid lesions and predicts its aggressive behavior. *Med Oncol.* 2013; 30 (1): 362.
153. Jain R, Fischer S, Serra S, Chetty R. The use of Cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010; 18 (1): 9-15.
154. Logsdon EA, Finley SD, Popel AS, Mac Gabhann F. A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *J Cell Mol Med.* 2014; 18 (8): 1491-508.
155. Paternostro C, David E, Novo E, Parola M. Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2010; 16 (3): 281-8.
156. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004; 56 (4): 549-80.
157. Fraisl P, Mazzone M, Schmidt T, Carmeliet P. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell.* 2009; 16 (2): 167-79.
158. Welte J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest.* 2013; 123 (8): 3190-200.
159. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol (1985).* 2000; 88 (4): 1474-80.

160. Smith TG, Robbins PA, Ratcliffe PJ. The human side of hypoxia-inducible factor. *Br J Hematol.* 2008; 141 (3): 325-34.
161. Cummins EP, Taylor CT. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch.* 2005; 450 (6): 363-71.
162. Baze MM, Schlauch K, Hayes JP. Gene expression of the liver in response to chronic hypoxia. *Physiol Genomics.* 2010; 41 (3): 275-88.
163. Shay JE, Celeste Simon M. Hypoxia-inducible factors: crosstalk between inflammation and metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 2012; 23 (4): 389-94.
164. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92 (12): 5510-4.
165. Adams JM, Difazio LT, Rolandelli RH, Luján JJ, Haskó G, Csóka B, et al. HIF-1: a key mediator in hypoxia. *Acta Physiol Hung.* 2009; 96 (1): 19-28.
166. Nath B, Szabo G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver diseases. *Hepatology.* 2012; 55 (2): 622-33.
167. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev.* 1998; 8 (5): 588-94.
168. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9 (6): 669-76.
169. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudła B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology. *Endokrynol Pol.* 2011; 62 (5): 444-55.
170. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004; 25 (4): 581-611.

171. Terman B, Khandke L, Dougher-Vermazan M, Maglione D, Lassam NJ, Gospodarowicz D, et al. VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor. *Growth Factors*. 1994; 11 (3): 187-95.
172. Gaudio E, Franchitto A, Pannarale L, Carpino G, Alpini G, Francis H, et al. Cholangiocytes and blood supply. *World J Gastroenterol*. 2006; 12 (22): 3546-52.
173. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*. 1992; 3 (2): 211-20.
174. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996; 87 (8): 3336-43.
175. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*. 2006; 39 (5): 469-78.
176. Kietzmann T, Cornesse Y, Brechtel K, Modaressi S, Jungermann K. Perivenous expression of the mRNA of the three hypoxia-inducible factor alpha-subunits, HIF1alpha, HIF2alpha and HIF3alpha, in rat liver. *Biochem J*. 2001; 354 (3): 531-7.
177. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*. 1988; 242 (4884): 1412-5.
178. Semenza GL, Neufelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88 (13): 5680-4.
179. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)*. 2004; 19: 176-82.

180. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997; 11 (1): 72-82.
181. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr.* 1998; 7 (3): 205-13.
182. Sparkenbaugh EM, Ganey PE, Roth RA. Hypoxia sensitization of hepatocytes to neutrophil elastase-mediated cell death depends on MAPKs and HIF-1 α . *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012; 302 (7): 748-57.
183. Moon JO, Welch TP, Gonzalez FJ, Copple BL. Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 296 (3): 582-92.
184. Copple BL, Kaska S, Wentling C. Hypoxia-inducible factor activation in myeloid cells contributes to the development of liver fibrosis in cholestatic mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 341 (2): 307-16.
185. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* 2003; 17 (2): 271-3.
186. Rosenberger C, Mandriota S, Jürgensen JS, Wiesener MS, Hörstrup JH, Frei U, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13 (7): 1721-32.
187. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, et al. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell.* 2006; 10 (5): 413-23.

188. Knudsen AR, Kannerup AS, Grønbæk H, Dutoit SH, Nyengaard JR, Funch-Jensen P, et al. Quantitative histological assessment of hepatic ischemia-reperfusion injuries following ischemic pre- and post-conditioning in the rat liver. *J Surg Res.* 2013; 180 (1): 11-20.
189. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models. *World J Gastroenterol.* 2013; 19 (11): 1683-98.
190. Cursio R, Miele C, Filippa N, Van Obberghen E, Gugenheim J. Liver HIF-1 alpha induction precedes apoptosis following normothermic ischemia-reperfusion in rats. *Transplant Proc.* 2008; 40 (6): 2042-5.
191. Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, et al. Adenosine-dependent activation of hypoxia-inducible factor-1 induces late preconditioning in liver cells. *Hepatology.* 2008; 48 (1): 230-9.
192. Tsuchihashi S, Ke B, Kaldas F, Flynn E, Busuttill RW, Briscoe DM, et al. Vascular endothelial growth factor antagonist modulates leukocyte trafficking and protects mouse livers against ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2006; 168 (2): 695-705.
193. Copple BL, Bustamante JJ, Welch TP, Kim ND, Moon JO. Hypoxia-inducible factor-dependent production of profibrotic mediators by hypoxic hepatocytes. *Liver Int.* 2009; 29 (7): 1010-21.
194. Copple BL, Bai S, Moon JO. Hypoxia-inducible factor-dependent production of profibrotic mediators by hypoxic Kupffer cells. *Hepatol Res.* 2010; 40 (5): 530-9.
195. Qu A, Taylor M, Xue X, Matsubara T, Metzger D, Chambon P, et al. Hypoxia-inducible transcription factor 2 α promotes steatohepatitis through augmenting lipid accumulation, inflammation, and fibrosis. *Hepatology.* 2011; 54 (2): 472-83.

196. Bangoura G, Yang LY, Huang GW, Wang W. Expression of HIF-2alpha/EPAS1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004; 10 (4): 525-30.
197. Bangoura G, Liu ZS, Qian Q, Jiang CQ, Yang GF, Jing S. Prognostic significance of HIF-2alpha/EPAS1 expression in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2007; 13 (23): 3176-82.
198. Inoué S, Spring K. *Microscope Image Formation*. New York: Plenum Press; 1997. p. 13-117.
199. Wang B, Dolinski BM, Kikuchi N, Leone DR, Peters MG, Weinreb PH, et al. Role of alphavbeta6 integrin in acute biliary fibrosis. *Hepatology*. 2007; 46 (5): 1404-12.
200. Kumagi T, Drenth JP, Guttman O, Ng V, Lilly L, Therapondos G, et al. Biliary atresia and survival into adulthood without transplantation: a collaborative multicentre clinic review. *Liver Int*. 2012; 32 (3): 510-8.
201. Stowens D. Congenital Biliary Atresia. *Ann NY Acad Sci*. 1963; 111: 337-57.
202. Carvalho E, Santos JL, Silveira TR, Kieling CO, Silva LR, Porta G, et al. Biliary atresia: the Brazilian experience. *J Pediatr (Rio J)*. 2010; 86 (6): 473-9.
203. Kieling CO, Santos JL, Vieira SM, Ferreira CT, Linhares AR, Lorentz AL, et al. Biliary atresia: we still operate too late. *J Pediatr (Rio J)*. 2008; 84 (5): 436-41.

ANEXOS

Anexo I - Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas

--

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

Porto Alegre, ____ de _____ de 20__.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura

Anexo II - Alerta Amarelo



ALERTA AMARELO

O aumento da bilirrubina direta (colestase) representa a presença de doença hepatocelular ou biliar e necessita exploração clínica urgente. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado influem decisivamente na sobrevivência e na qualidade de vida de muitos pacientes, como nos portadores de atresia biliar e alguns erros inatos do metabolismo.

A atresia biliar é a principal causa de transplante hepático em crianças e, se não tratada, é fatal em 100% dos casos. A cirurgia de Kasai (portoenterostomia) é a única alternativa para evitar o transplante hepático, tendo melhores resultados se realizada precocemente. No Brasil, o encaminhamento tardio destes pacientes é um importante problema. Medidas simples, como as descritas a seguir, podem facilitar o diagnóstico precoce e melhorar o prognóstico destas crianças:

- O recém-nascido que persistir com icterícia com idade igual ou maior que 14 dias deve ser avaliado do ponto de vista clínico (global e coloração das fezes e urina) e laboratorial (bilirrubinas).
- Se as fezes foram "suspeitas" ou a criança apresentar aumento de bilirrubina direta, encaminhar o paciente para serviços especializados.

								
Fezes Normais					Fezes suspeitas			

A COLESTASE NEONATAL É UMA URGÊNCIA EM PEDIATRIA!

Departamento Científico de
Gastroenterologia Pediátrica
SBP



APÊNDICE

Apêndice I – Material Suplementar

Os dados apresentados a seguir não constam no artigo original.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do Estudo

O estudo proposto é uma coorte de série de casos controlado, avaliando material histológico coletado por ocasião da laparotomia exploratória, e guardado tanto sob ultracongelamento quanto parafinado de pacientes com AB e com CIH. Os responsáveis pelas crianças, cujo material biológico foi analisado neste estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) permitindo sua análise na pesquisa. (APÊNDICE II)

Critérios de Inclusão

- Colestase neonatal, por ocasião da laparotomia exploratória;
- Idade de no máximo 120 dias de vida;
- AB sem malformações extra-hepáticas associadas, e sem IgM positivo para CMV no soro;
- Presença de tecido ultracongelado no banco de tecidos do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG).

CrITÉRIOS de Exclusão

- Não consentimento dos pais ou responsáveis através do TCLE;
- Nutrição Parenteral Total;
- Infecção Aguda;
- Material insuficiente para as análises.

Variáveis em estudo

- Expressão gênica de HIF-1 α e HIF-2 α
- Variáveis associadas com a gravidade da AB:
 - Idade por ocasião da portoenterostomia.
 - Variáveis laboratoriais indicativas do grau de obstrução biliar por ocasião da portoenterostomia: BT, BD, GGT.
 - Variáveis avaliadas por método morfométrico:
 - Área de PCK7.
 - Extensão do depósito de colágeno.
 - Variáveis avaliadas por análise molecular (expressão gênica):
 - MCP1 (grau de fibrogênese biliar);
 - CK19 (quantificação de tecido com fenótipo biliar).
- Variável associada ao espessamento da túnica média arterial (por morfometria):
 - REDL.
- Prognóstico pós-portoenterostomia:
 - Sobrevida do fígado nativo em 2 anos.

Avaliações morfométricas das variáveis histológicas

Secções de 5 µm de espessura das amostras parafinizadas foram obtidas para a coloração com hematoxilina e eosina, e picrossírius e submetidas à imunistoquímica para marcar citoqueratina 7 (CK7; Dako, Glostrup, Dinamarca; diluição, 1:100).

Descrição do equipamento e calibração

As imagens foram capturadas em um microscópio de pesquisa Zeiss modelo Axioskop 40 (Oberkochen, Alemanha), equipado com módulo de polarização e óptica neofluar, acoplado a videocâmera Retiga 2000R (QImaging, British Columbia, Canada) e *software* de análise de imagem (Image Pro Plus 6.0, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) em microcomputador padrão IBM-PC. O sistema foi calibrado antes de cada sessão através do método de Koehler (198), calibração da intensidade de iluminação, abertura de diafragma do condensador do microscópio e ajuste manual de branco (*white balance*) da videocâmera.

Aquisição de imagens

Foram obtidas até dez imagens capturadas de forma aleatória e sequencial para evitar sobreposição de áreas. Todas as imagens foram capturadas em 200X e gravadas em formato TIFF sem compressão. As imagens da microscopia foram obtidas através da aquisição sequencial de imagens com ajustes de calibração fixos de tempos de aquisição da videocâmera determinados por controle por software.

Mensuração das imagens – Imunoistoquímica e Picrossírius

Cada lâmina teve a gama de tonalidades para diaminabenzidina previamente selecionada por dois observadores, gravada e aplicada a cada imagem subsequente. Os resultados foram exportados pra planilha em Excel (Microsoft, Redmond, EUA).

Cálculos morfométricos

REDL

Para cada vaso, a espessura da túnica média foi calculada como a média de 6 mensurações da parede vascular, em micrômetros, cada uma delas obtida por uma linha traçada na direção do centro do vaso e conectando um ponto localizado na interface média-adventícia e outro situado na interface média-íntima. O diâmetro luminal foi calculado como a média das medidas de comprimento de 2 linhas, cada qual traçada entre 2 pontos opostos localizados na interface média-íntima e medindo o maior e o menor diâmetros. O valor de REDL, consistindo na razão espessura da túnica média/diâmetro luminal, por paciente incluiu a média dos valores obtidos em todos os vasos analisados em 10 imagens, calculado através do programa Microsoft Excel 2010.

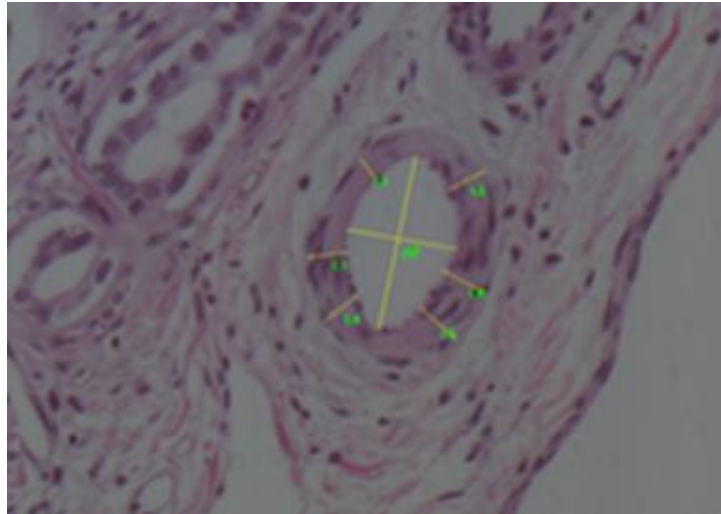


Figura 5 - Medidas de espessura da túnica média arterial e diâmetro luminal (200x).

Área de positividade do CK7

As áreas CK7 positivas foram marcadas e a cada lâmina foi feita a medida da área total em micrômetros. Posteriormente foi obtida a média das medidas das 10 imagens e os valores transformados de micrômetros para milímetros para melhor visualização dos resultados.

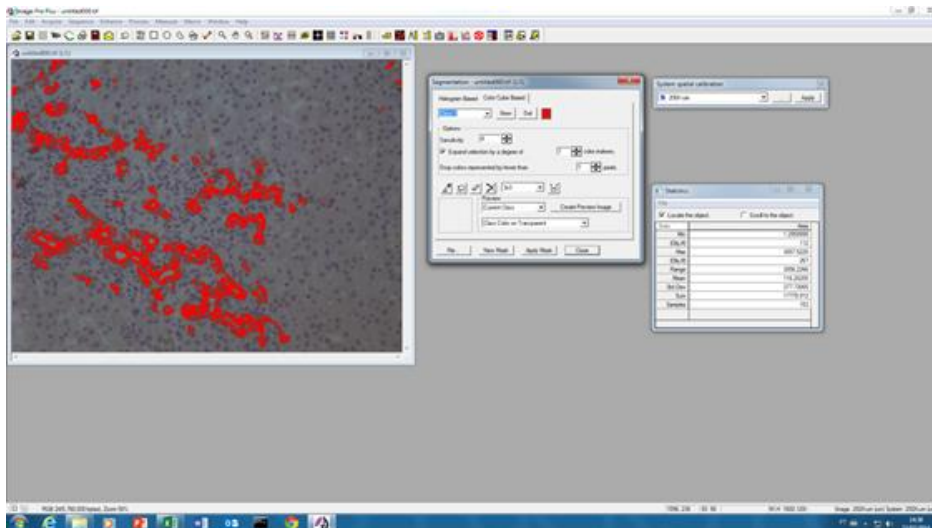


Figura 6 - Medida da área positividade para citoqueratina 7 (200x).

Extensão do depósito de colágeno (área de fibrose)

As regiões de positividade para picrossírius nos espaços porta e septos fibrosos foram selecionadas aleatoriamente, evitando a área subcapsular. Em cada lâmina foi feita a medida da área total em micrômetros e, posteriormente foi realizada a média das medidas das 10 imagens. Os valores obtidos foram transformados de micrômetros para milímetros para melhor visualização dos resultados.

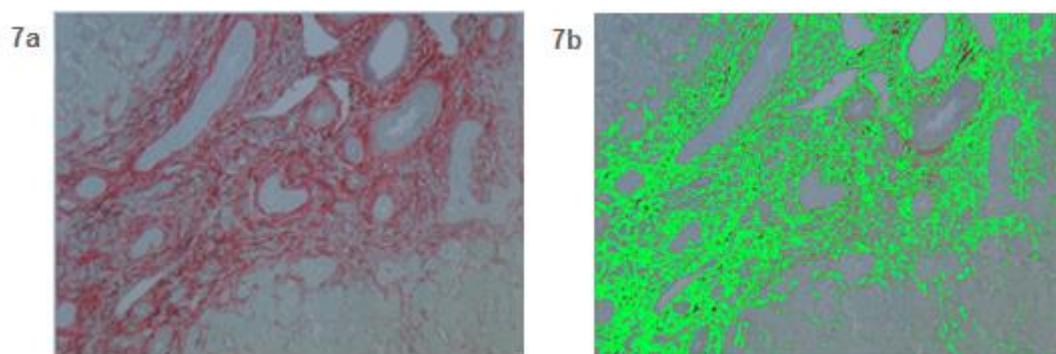


Figura 7 - Área de positividade para fibrose. 7a- imagem picrossírius 7b- imagem marcada (200x).

Análise do prognóstico pós-portoenterostomia

O prognóstico pós-portoenterostomia foi analisado segundo o desfecho sobrevida do fígado nativo em 2 anos, analisada segundo a ocorrência ou não de óbito e/ou TxH. Os dados clínicos foram coletados pelos autores do estudo através de revisão do Banco de Dados Clínicos do Setor de Hepatologia Pediátrica do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Locais

A análise do material hepático foi realizada, na sua maioria, no LEHG, e teve como locais de apoio a Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP), Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas Experimental do HCPA e o Centro de Terapia Gênica (CTG) do Centro de Pesquisa do HCPA. O Setor de Hepatologia Pediátrica do Serviço de Pediatria do HCPA disponibilizou o Banco de Dados dos pacientes em estudo. As análises morfométricas foram realizadas no Serviço de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da Pontífca Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Aspectos Éticos

O projeto Arteriopatia na Atresia Biliar, no qual se insere este estudo, já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do GPPG do HCPA (projeto 07-479). Devido à utilização dos prontuários dos pacientes, o Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas foi preenchido (ANEXO I). Em relação ao material armazenado no Banco de Tecidos foi preenchido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos responsáveis dos pacientes (APÊNDICE II). Este projeto está de acordo com a Resolução 466/2012 das Boas Práticas Clínicas do Conselho Nacional de Saúde envolvendo Seres Humanos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA sob o número 13-0030 e pela Plataforma Brasil.

RESULTADOS

Variáveis avaliadas por estudo morfológico

Quanto às mensurações morfológicas, a mediana da área de colágeno foi de 40 (20,5 - 58,9) nos pacientes com AB, maior do que no grupo com CIH 2,7 (2,6 - 11,6), com diferença significativa ($P < 0,001$). A área de PCK7 foi de 9,2 (4,6 - 17,8) nos pacientes com AB, maior que os valores observados nos pacientes com CIH de 2,5 (1,6 - 6,4) ($P = 0,006$). A REDL não apresentou diferença estatística entre os grupos. (Tabela 3)

Tabela 3 - Comparação entre atresia biliar e colestase intra-hepática em relação às variáveis em estudo

VARIÁVEIS	AB (n=32) <i>Mediana (P25- P75)</i>	CIH (n=9) <i>Mediana (P25- P75)</i>	P
Área de colágeno (mm)	40 (20,5 - 58,9)	2,7 (2,6 - 11,6)	<0,001
Área de PCK7 (mm)	9,2 (4,6 - 17,8)	2,5 (1,6 - 6,4)	0,006
REDL (μm)	0,6 (0,4 - 0,8)	0,6 (0,6 - 0,8)	0,402

Estatística- Teste de Mann-Whitney. Abreviaturas: AB: atresia biliar; CIH: colestase intra-hepática; PCK: positividade de citoqueratina; REDL: razão da espessura da túnica média arterial/diâmetro luminal.

Tabela 4 – Correlação entre as variáveis em estudo considerando pacientes com atresia biliar

Variáveis	HIF-		MCP1	CK19	Idade	BT	BD	GGT	Área de	Área de
	HIF-1 α	2 α							Colágeno	de PCK7
Área de Colágeno	-0,06 (0,774)	0,25 (0,273)	0,09 (0,669)	0,23 (0,294)	-0,14 (0,522)	-0,01 (0,964)	-0,14 (0,537)	-0,31 (0,164)	-	-
Área de PCK7	0,12 (0,597)	0,09 (0,687)	-0,31 (0,167)	0,45 (0,038)	0,39 (0,073)	0,15 (0,509)	0,17 (0,436)	0,16 (0,474)	0,28 (0,220)	-
REDL	-0,19 (0,351)	-0,19 (0,356)	0,17 (0,439)	-0,11 (0,595)	-0,35 (0,091)	-0,43 (0,036)	-0,52 (0,009)	0,34 (0,099)	0,27 (0,224)	-0,08 (0,726)

Estatística: Correlação de Spearman. Em cada célula, os dados são apresentados pela correlação de Spearman e sua significância estatística (parênteses). (-) correlação do parâmetro com ele mesmo. Abreviaturas: HIF: fator induzido por hipóxia; MCP: proteína quimiotática de monócitos; PCK: positividade de citoqueratina; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; GGT: gama glutamil transferase; REDL: razão da espessura da túnica média arterial/diâmetro luminal.

Nenhuma correlação adicional foi observada com o comportamento de variáveis associadas à gravidade da doença, incluindo as medidas morfométricas áreas de colágeno e área de PCK7. REDL também não apresentou relação com a expressão gênica de HIF-1 α ou HIF-2 α . (Tabela 4)

Marcadores de gravidade da doença

Os demais marcadores de gravidade da doença, avaliadas por análise morfológica (extensões da fibrose e da reação ductular, e REDL) não apresentaram diferenças nos subgrupos de HIFs. (Tabela 5a e 5b)

Tabela 5 - Comparação entre os subgrupos de atresia biliar

VARIÁVEIS	5a- HIF-1 α		P
	hi HIF-1 α (n=20)	lo HIF-1 α (n=12)	
	<i>Mediana (P25- P75)</i>	<i>Mediana (P25- P75)</i>	
HIF-1α	3,7 (3,3 - 4,4)	0,8 (0,8 - 1,1)	<0,001
HIF-2α	3,9 (3,4 - 4,3)	1,3 (1,2 - 2,1)	0,003
Área de colágeno (mm)	36,5 (1,6 - 12,7)	40,0 (28,1 - 58,9)	0,644
Área de PCK7 (mm)	9,9 (4,5 - 18,0)	8,5 (5,3 - 19,3)	0,664
REDL (μm)	0,50 (0,3 - 0,7)	0,5 (0,4 - 0,9)	0,253

VARIÁVEIS	5b- HIF-2 α		P
	hi HIF-2 α (n=19)	lo HIF-2 α (n=13)	
	<i>Mediana (P25- P75)</i>	<i>Mediana (P25- P75)</i>	
HIF-1α	3,8 (3,4 - 4,4)	1,1 (0,8 - 2,2)	<0,001
HIF-2α	4,0 (3,7 - 4,3)	1,3 (1,2 - 1,9)	<0,001
Área de colágeno (mm)	37,9 (19,1 - 149,1)	40,0 (20,5 - 49,7)	0,742
Área de PCK7 (mm)	9,6 (4,9 - 16,9)	8,8 (4,4 - 22,3)	0,843
REDL (μm)	0,4 (0,3 - 0,7)	0,5 (0,4 - 0,9)	0,107

Estatística- Teste de Mann-Whitney. Abreviaturas: AB: atresia biliar; HIF: fator induzido por hipóxia; PCK: positividade de citoqueratina; REDL: razão da espessura da túnica média arterial/diâmetro luminal.

Sobrevida do fígado nativo em 2 anos pós portoenterostomia

Dos trinta e dois pacientes com AB avaliados, quatorze (43,8%) pacientes realizaram a portoenterostomia antes dos 60 dias de vida, enquanto 12 (37,5%) tinham idade entre 61 - 90 dias e apenas 6 (18,8%) foram submetidos à cirurgia depois de 91 dias de vida. A sobrevida do fígado nativo, levando em consideração óbito e/ou TxH, destes pacientes foi em torno de 50% até o final do estudo. (Figura 8)

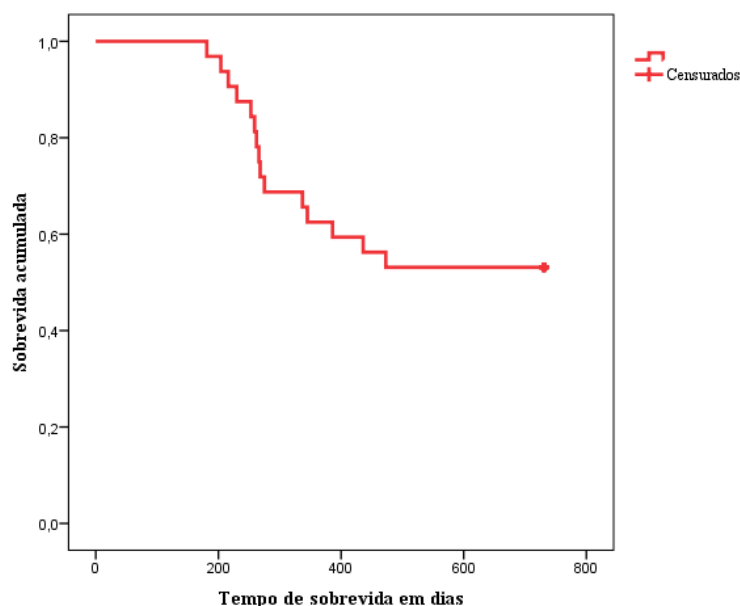


Figura 8 - Sobrevida com o fígado nativo em 2 anos. Estatística: Kaplan-Meier.

Quando avaliada a curva de sobrevida do fígado nativo em 2 anos em relação a expressão gênica dos subgrupos de HIF-1 α (Figura 9) e HIF-2 α (Figura 10), não foram observadas diferenças estatísticas.

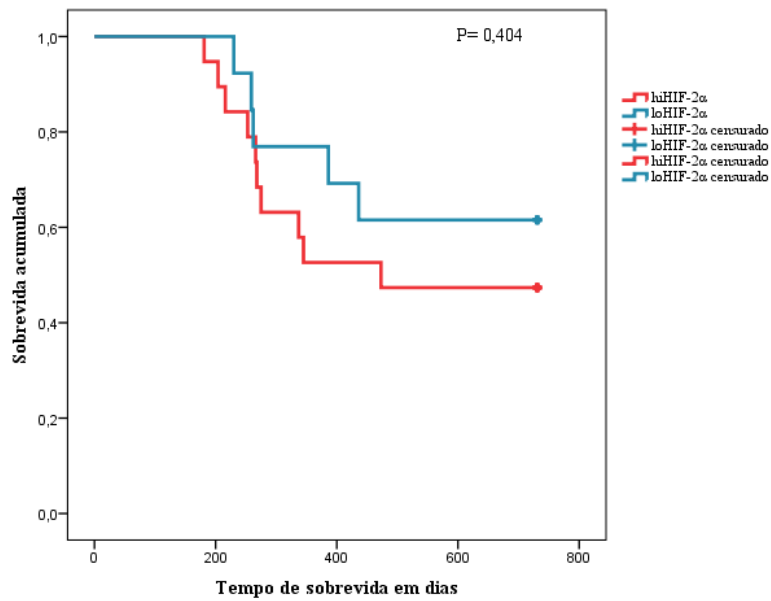


Figura 9 - Sobrevida com o fígado nativo em 2 anos conforme expressão gênica de HIF-2 α . Estatística: Kaplan-Meier.

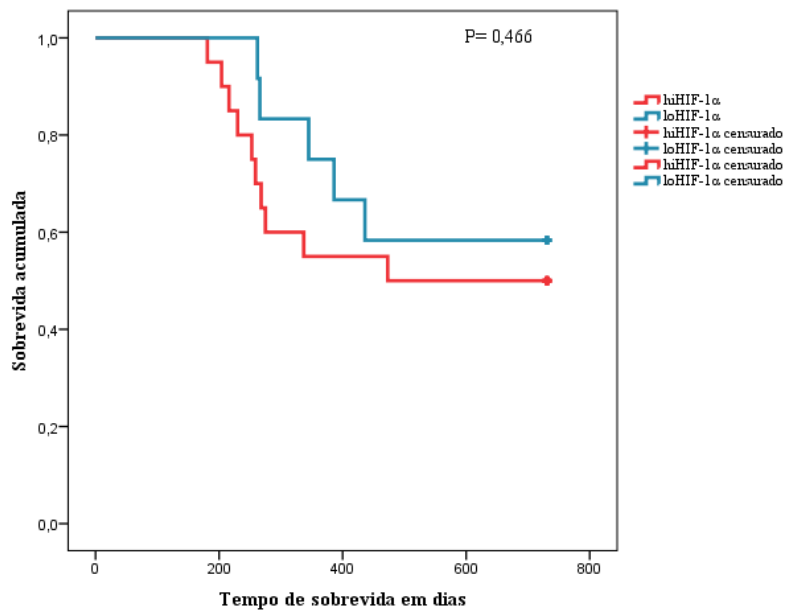


Figura 10 - Sobrevida com o fígado nativo em 2 anos conforme expressão gênica de HIF-1 α . Estatística: Kaplan-Meier.

DISCUSSÃO

O método de análise da extensão da deposição de colágeno marcado por picrossírius (21) e mensurado por morfometria, utilizado neste estudo, demonstrou que os pacientes com AB apresentavam maior intensidade de fibrose que os lactentes com CIH. A intensidade da fibrogênese associa-se à gravidade da doença hepática e estes dados eram esperados, pois a AB apresenta um comportamento especialmente agressivo em relação à fibrose (129). Porém, surpreendentemente a análise digital da extensão da fibrose não correlacionou-se com a expressão gênica dos HIFs neste estudo.

Moon *et al.* (2009) testaram a hipótese de que HIF-1 α é ativado no fígado durante lesão crônica e regula a expressão de proteínas pró-fibróticas. Para tal experimento, foi utilizado um modelo animal de LDB e verificado um acúmulo de HIF-1 α após 3 dias da LDB indicando hipóxia, antecedendo a instalação da fibrose. Os autores sugeriram que HIF-1 α regula a ação de uma série de mediadores pró-fibróticos e, portanto, serve como o elo crítico entre a lesão hepática crônica e o início da fibrose. É possível que, precocemente, no momento da portoenterostomia, a associação entre a expressão do HIF e a extensão de fibrose ainda não seja evidente, vindo a ocorrer a posteriori. Por outro lado, estes dados sugerem que a maior parte da hipóxia detectada nos pacientes com AB não é secundária à extensão da fibrose hepática.

Por outro lado, a área de PCK7, avaliada por morfometria, indicadora da extensão da reação ductular, foi maior nos pacientes com AB em comparação à CIH. Em estudo anterior do nosso grupo, a extensão morfométrica da reação ductular, e não a extensão da fibrose, serviu para indicar a sobrevida do fígado nativo em 1 ano (7). Esse dado pode ser explicado

pelo fato de que a reação ductular antecede e induz a fibrogênese hepática, sendo sua maior extensão identificável mais precocemente (199).

Nosso grupo está interessado no suposto papel de uma arteriopatia no desenvolvimento da AB, trabalhando com a hipótese de que uma colangiopatia isquêmica (8) que poderia participar da etiologia da AB. Neste cenário, AB compreenderia um colangite esclerosante secundária (200). O espessamento da túnica média da artéria hepática nos espaços porta de lactentes com AB foi descrito por Stowens (1963) e Brough & Bernstein (1969), enquanto Ho *et al.* (1993), propuseram um espessamento medial indicando uma arteriopatia característica da doença. Em 2005, o nosso grupo, utilizando a análise de imagem digital, confirmou a presença de um espessamento da túnica média da artéria hepática, progressiva por ocasião da portoenterostomia até o TxH, espalhando-se do *porta hepatis* para a periferia do órgão e, aparentemente, relacionada com o desaparecimento dos ductos biliares interlobulares (7). Uflacker & Pariente (2004) avaliando pela arteriografia o fígado de crianças com AB, detectaram artérias com irregularidades no contorno, incluindo o revestimento, estenoses, dilatação e angulação, e imagens sugestivas de obstrução periférica. Além disso, “tufos vasculares” foram observados nos espaços porta destes pacientes. Em modelo animal espontâneo de AB (89), observaram em cordeiros um espessamento medial dos ramos da artéria hepática na avaliação histológica hepática dos animais afetados.

A presença de uma arteriopatia pode perturbar todo o sistema hepatobiliar, já que os ductos biliares, paredes vasculares e nervos são alimentados por uma rede de ramos da artéria hepática chamado PVP, e do fluxo sanguíneo arterial inadequada levando a colangiopatia isquêmica (8). Nosso grupo em 2011 observou a imunolocalização do VEGFA e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 em pacientes com AB, comparando com pacientes com CIH.

A imunolocalização do VEGFA nos pacientes com AB foi portal característica, envolvendo artérias e ductos biliares, além de expressar-se na parede arterial e nos ductos biliares remanescentes no *porta hepatis* destes pacientes. Ainda, a imunolocalização do VEGFA em estruturas portais, correlacionou-se com o espessamento da túnica média arterial (11). Em 2014, nosso grupo observou uma expressão gênica aumentada das moléculas angiogênicas angiopoietinas 1 e 2 nos pacientes com AB, além de uma correlação desta expressão com a espessura da túnica média arterial (12). No presente estudo, não encontramos correlação entre características moleculares de hipóxia e espessamento da túnica média em pacientes com AB, sugerindo que os HIFs não afetam diretamente o espessamento da parede arterial na AB.

Na AB há uma degradação progressiva do fígado, sendo que a idade por ocasião da portoenterostomia afeta os resultados pós-operatórios (1, 22, 28). Uma idade superando 60 dias de vida, segundo a maioria dos autores, pode encurtar a sobrevida do fígado nativo (202, 203). Neste estudo, 14 (43,8%) pacientes com AB tinham idade inferior a 60 dias de vida, enquanto 12 (37,5%) pacientes com idade entre 61 e 90 dias, e apenas 6 (18,8%) pacientes tinham mais de 90 dias da vida. Estes dados representam uma melhoria em comparação com os dados anteriormente obtidos por nosso grupo em relação ao tempo de encaminhamento de pacientes com AB para o centro de referência (202, 203).

A expressão gênica dos HIFs por ocasião da portoenterostomia pareceu não se relacionar à sobrevida do fígado nativo e isto é surpreendente, considerando os efeitos deletérios da hipóxia crônica sobre os tecidos hepatobiliares. Isto, porém, pode se dever ao fato de que os subgrupos de expressão dos HIFs não representam variantes distintas, estanques, de AB, mas sim que a hipóxia ocorra em todos, ou quase todos, os pacientes com AB no decorrer do tempo, deteriorando de forma progressiva as estruturas biliares,

independente do momento da desobstrução ao fluxo biliar. Esta explicação é reforçada pela existência de uma relação entre a idade na portoenterostomia e maior ou menor expressão do HIF-1 α .

Uma das limitações do nosso estudo é o pequeno número de pacientes com AB, dada à raridade da doença e o fato deste trabalho ter sido realizado apenas por um centro de referência. Além disso, inicialmente tínhamos como objetivo avaliar em nível protéico (quantificação por *western blot* da fração nuclear dos HIFs) e por imunistoquímica (expressão nuclear das proteínas HIFs) o comportamento dos marcadores de hipóxia em estudo. Porém, a pouca quantidade de material ultracongelado (para as análises protéicas) e as dificuldades técnicas encontradas na imunistoquímica impossibilitaram a realização dessas etapas adicionais de investigação, assim restringindo conclusões mais definitivas.

Em conclusão, neste estudo observamos que na AB ocorre hipóxia tecidual hepática. A maior expressão gênica do HIF-1 α , marcador de hipóxia, ocorreu em pacientes mais velhos e com características laboratoriais de obstrução biliar mais intensa. Por outro lado, o aumento da expressão do HIF-2 α , e aparentemente do HIF-1 α , associaram-se à menor expressão de CK19, marcador de colangiócitos. Os dados sugerem a existência de hipóxia tecidual progressiva nos fígados afetados pela AB, associada ao desaparecimento de ductos biliares e à piora do quadro obstrutivo biliar.

Apêndice II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Seu filho está sendo convidado a participar de um estudo sobre ARTERIOPATIA NA ATRESIA BILIAR E SUA RELAÇÃO COM PROGNÓSTICO PÓS-PORTOENTEROSTOMIA a ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A participação de seu filho neste estudo implicará na coleta de materiais biológicos que serão posteriormente analisados em suas diversas características. Como já é do seu conhecimento, seu filho é portador do diagnóstico colestase neonatal, necessitando um procedimento cirúrgico para diagnosticar Atresia Biliar.

Se você aceitar que seu filho participe do estudo, será realizada uma coleta de material durante este procedimento cirúrgico indicado para seu filho. A coleta será realizada da seguinte forma: durante o procedimento cirúrgico a que seu filho será submetido, sob anestesia geral, uma pequena parte do material normalmente coletado, uma amostra de fígado, será utilizado para esta pesquisa. Este procedimento envolve alguns riscos e desconfortos, tais como um risco potencial de sangramento no fígado, embora a coleta seja realizada independentemente desta pesquisa. Esta pequena quantidade de material coletado para a pesquisa não afetará a saúde do seu filho. Este estudo poderá trazer algum benefício para o seu filho, pois estuda os processos causadores da doença, podendo ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos, além de auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos da Atresia Biliar.

A participação de seu filho é voluntária e você poderá aceitar ou não este convite, sem qualquer repercussão no atendimento assistencial que ele possa estar recebendo no HCPA. Se você autorizar, o material biológico coletado será armazenado por um período de 10 anos. Após este prazo, caso ainda exista interesse em manter este material armazenado, você será novamente contatado para solicitar uma nova autorização. Durante este período em que o material estiver armazenado, caso exista oportunidade de que os pesquisadores utilizem esta amostra em nova pesquisa, você será contatado para ser informado sobre esta nova utilização do material e consentir novamente com o uso deste material.

Da mesma maneira como nesta pesquisa, se você não autorizar o uso do material para novas pesquisas, não haverá prejuízo no atendimento assistencial de seu filho no HCPA.

Mesmo se você autorizar poderá retirar esta sua autorização, sem necessidade de justificar sua decisão ou repercussão no tratamento de seu filho. Isto significa que todos os dados gerados a partir deste momento não mais poderão ser utilizados pelos pesquisadores e que os materiais biológicos ainda armazenados serão descartados.

Todos os dados de identificação pessoal de você e de seu filho não serão divulgados,

Rubrica responsável: _____

Rubrica pesquisador: _____

permanecendo confidenciais. Os demais dados serão utilizados para fins científicos.

O pesquisador responsável pela condução deste projeto é o Prof. Jorge Luiz dos Santos, que pode ser contactado pelo telefone 51-33598847. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que também pode ser acessado (51-33598304) no caso de necessitar algum esclarecimento. A seguir são feitas algumas perguntas no sentido de verificar o que você está autorizando:

1) Você autoriza a coleta de quais materiais biológicos?

Material Biológico a ser coletado	sim	não
Tecido do fígado		
Tecido de vias biliares		

2) Você deseja saber os resultados dos exames realizados com os materiais biológicos coletados de seu filho? ()Sim ()Não

3) Você autoriza o contato da equipe de pesquisa para solicitar o uso futuro do material biológico e das informações associadas para outros estudos a serem realizados? ()Sim ()Não

Eu _____, responsável legal pelo paciente _____, declaro que li e compreendi as informações que me foram fornecidas, que as minhas dúvidas foram esclarecidas e que uma cópia deste TCLE me foi entregue.

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Pesquisador que obteve o TCLE

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____