

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

**EXPRESSÃO DAS ANGIOPOIETINAS 1 E 2 E DO  
RECEPTOR TIE2 EM FÍGADOS DE PACIENTES  
COM ATRESIA BILIAR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ALINE FRIEDRICHS DE SOUZA

Porto Alegre, Brasil, 2013

### CIP - Catalogação na Publicação

Friedrichs de Souza, Aline  
Expressão das Angiopoietinas 1 e 2 e do Receptor  
Tie2 em Fígados de Pacientes com Atresia Biliar /  
Aline Friedrichs de Souza. -- 2013.  
110 f.

Orientadora: Themis Reverbel da Silveira.

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

1. Atresia Biliar. 2. Angiopoietinas 1 e 2. 3.  
Receptor Tie 2. I. Reverbel da Silveira, Themis,  
orient. II. Título.

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

**EXPRESSÃO DAS ANGIOPOIETINAS 1 E 2 E DO  
RECEPTOR TIE2 EM FÍGADOS DE PACIENTES  
COM ATRESIA BILIAR**

ALINE FRIEDRICHS DE SOUZA

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Themis Reverbel da Silveira**

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

**Porto Alegre, Brasil, 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**

**SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 13 DE

NOVEMBRO DE 2013

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Paulo Roberto Antonacci Carvalho

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª Dra. Elisa Carvalho

Hospital da Criança de Brasília (HCB) / Hospital de Base do DF (HBDF) –  
Secretaria de Estado de Saúde (SES-DF) / Centro Universitário de Brasília  
(CEUB)

Prof. Dr. Matias Epifânio

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta Dissertação ao estimado professor, doutor Jorge Luiz dos Santos, incansável e extremamente competente no incentivo para que esta e inúmeras outras pesquisas se tornem realidade. Dedico também às crianças com doença hepática crônica, motivo de nosso trabalho e amor na busca de novas modalidades diagnósticas e terapêuticas na Hepatologia Pediátrica.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a nossa mestra inspiradora, professora Themis Reverbel da Silveira, pioneira e esteio da Hepatologia Pediátrica. Agradeço a Sandra Maria Vieira pelo incentivo a ingressar na Pós Graduação e juntamente com Carlos Oscar Kieling e Cristina Targa Ferreira, por terem me ensinado Hepatologia Pediátrica tão brilhantemente. Agradeço a toda equipe dos laboratórios de Hepatologia e Gastroenterologia, da Unidade de Análise Molecular e de Patologia Experimentas do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente a Cleandra Gregório, Najara Maurício Reus e Carolina Uribe pela dedicação e amizade na elaboração técnica desta pesquisa. Agradeço também o apoio de minha família, principalmente a meu esposo Gustavo Simon de Souza, e aos meus colegas de trabalho que me substituíram na assistência toda vez que precisei me dedicar à pesquisa e à pós-graduação.

Finalmente, agradeço à vida a oportunidade, nem sempre fácil, mas sempre memorável de poder estudar e buscar a excelência como profissional e ser humano, rodeada de seres humanos tão especiais, um privilégio.

## RESUMO

A atresia biliar (AB) é uma doença da infância caracterizada por uma colangiopatia esclerosante progressiva que leva à obstrução biliar. O tratamento de escolha é a portoenterostomia, cujo prognóstico é relacionado à idade do paciente na época da cirurgia e a variáveis histológicas como a extensão da fibrose e da reação ductular. O espessamento da túnica média (TM) sugere uma arteriopatia na patogenia da AB. Nós avaliamos a expressão do sistema angiopoietinas (ANGPT)/receptor tirosinaquinase com domínios imunoglobulina e EGF(*endotelial growth fator*) like (Tie2) no fígado de pacientes com AB e com colestase intra-hepática (CIH), correlacionando com espessamento da TM, com variáveis associadas a gravidade da doença e com o prognóstico pós operatório. **Métodos** - A expressão da ANGPT1, ANGPT2 e Tie2 foi feita com o método de PCR quantitativo em amostras de fígado obtidas de pacientes com AB (n23) na ocasião da portoenterostomia e de crianças de idade semelhante com CIH (n7). As variáveis histológicas foram analisadas por método morfométrico. **Resultados** - A ANGPT1 e a ANGPT2 apresentaram expressão aumentada no grupo com AB em comparação com o grupo com CIH (P=0,024 e P=0,029, respectivamente). No grupo com AB, a expressão das ANPTs correlacionou-se positivamente com a espessura da TM (ANGPT1:  $r_s=0,59$ , P=0,013; ANGPT2:  $r_s=0,52$ , P=0,032) e não teve correlação com variáveis associadas a gravidade da doença. O Tie2 e as ANGPTs correlacionaram-se negativamente (ANGPT1:  $r_s=-0,73$ , P<0,001; ANGPT2:  $r_s=-0,54$ , P=0,007). **Conclusão** - Na AB há uma expressão aumentada da ANGPT1 e da ANGPT2 e uma correlação positiva desta expressão com a espessura da TM, mas, não com a idade na ocasião da portoenterostomia ou com variáveis histológicas associadas com a gravidade da doença na época do procedimento.

## ABSTRACT

**Background-** Biliary atresia (BA) is an infantile disorder characterized by progressive sclerosing cholangiopathy leading to biliary obstruction. First line treatment of BA is hepatoporto-enterostomy, whose prognosis is related to age at surgery and to histologic variables such as extent of fibrosis and ductular reaction. Hepatic arterial medial thickening (MT) suggests an arteriopathy in BA pathogenesis. We evaluated the expression of angiopoietin (ANGPT)/tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2 (Tie2) system in livers from patients with BA, correlating with MT, variables associated with disease severity and postoperative prognosis. **Methods-** ANGPT1, ANGPT2 and Tie2 expressions were assessed by qPCR in liver samples obtained from BA patients (n=23) at portoenterostomy and age-matched infants with intrahepatic cholestasis (IHC, n=7). Histologic variables were morphometrically assessed. **Results-** ANGPT1 and ANGPT2 were overexpressed in BA in comparison with IHC (respectively, P=0.024 and P=0.029). In BA, ANGPTs' expression was positively correlated with MT (ANGPT1:rs=0.59, P=0.013; ANGPT2:rs=0.52, P=0.032), not with variables associated with disease severity. Tie2 and ANGPTs' expressions were negatively correlated (ANGPT1: rs=-0.73, P<0.001; ANGPT2: rs=-0.54, P=0.007). **Conclusion-** In BA there is overexpression of both ANGPT1 and ANGPT2 correlated with MT but not with age at portoenterostomy or with the histological variables associated with disease severity at the procedure.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Exames laboratoriais na atresia biliar .....	21
Figura 1 – Anatomia do abdome superior .....	23
Figura 2 – Representação esquemática dos locais de lesão da via biliar e da portoenterostomia na atresia biliar .....	23
Quadro 2 – Fatores propostos na etiopatogenia da atresia biliar .....	26
Figura 3 – Representação esquemática de um lóbulo hepático .....	32
Figura 4 – Reação ductular tipo 2B .....	33
Figura 5 – Representação esquemática da microvasculatura hepática .....	38
Figura 6 – Fluxograma de coleta de amostras histológicas e moleculares .....	49
Figura 7 – Imagem das medidas utilizadas no cálculo da razão espessura da túnica média arterial/ diâmetro luminal (RMED) .....	56
Figura 8 – Imagem da interface de computador utilizada na morfometria da reação ductular (PCK7) .....	58
Figura 9 - Imagem da interface de computador utilizada na morfometria da área de deposição de colágeno (ACol) .....	59
Figura 10 – Imunolocalização da angiopoietina 1 na atresia biliar .....	60

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1 – Expressão gênica da angiopoietina 1: comparação entre os grupos com colestase intra-hepática e atresia biliar .....	100
Figura 2 - Expressão gênica da angiopoietina 2: comparação entre os grupos com colestase intra-hepática e atresia biliar .....	101
Figura 3 – Comparação da razão espessura da parede vascular/diâmetro luminal (RMED) entre dois subgrupos com atresia biliar conforme a expressão gênica de angiopoietina 1 .....	102
Figura 4 – Imunolocalização da angiopoietina 1 na atresia biliar e na colestase intra-hepática .....	103

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados no PCR quantitativo .....	95
Tabela 2 – Comparação entre os grupos com atresia biliar e colestase intra-hepática conforme a área de deposição de colágeno e a reação ductular (percentagem de positividade de citoqueratina 7 – PCK7) .....	95
Tabela 3 – Correlação da expressão gênica do sistema angiopietinas/Tie2 com razão espessura da parede vascular/diâmetro luminal (RMED) e com idade na portoenterostomia, área de deposição de colágeno e reação ductular (percentagem de positividade de citoqueratina 7 – PCK7) .....	97
Tabela 4 – Associação das variáveis em estudo com a perda de fígado nativo em 2 anos após a portoenterostomia .....	98
Tabela 5 – Associação das variáveis em estudo com a resolução da icterícia em 6 meses depois da portoenterostomia .....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – atresia biliar

ACol – área de colágeno

ANGPT – angiopoietina

CIH – colestase intra-hepática

CMLV – célula muscular lisa vascular

DB – ducto biliar

DLA – diâmetro luminal arterial

EGF – *epidermal growth factor*

ESP – espessura da parede arterial

FGF – *fibroblast growth factor*

GPPG - Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HIF – *hypoxia-inducible factor*

IHC- imunohistoquímica

IFN – interferon

LEHG – Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia

PCK7 – percentual de citoqueratina 7

PDGF – *platelet-derived growth factor*

POE – portoenterostomia

RMED – razão da espessura da túnica média arterial / diâmetro luminal

PCRq – reação da cadeia da polimerase quantitativa

sICAM - *soluble intercelular adhesión molecule*

sVCAM - *soluble vascular adhesionmolecule*

Tie 2 – receptor tirosinaquinase com dominios imunoglobulina *like* e EGF-*like* 2

TNF – *tumor necrosis factor*

VCL – veia centrolobular

VEGF – *vascular endotelial growthfactor*

VP – veia porta

## **PALAVRAS CHAVE**

Atresia Biliar

Colestase Neonatal

Arteriopatia

Angiopietinas

Receptor Tie 2

Espessura da túnica média arterial

Reação ductular

Fibrose hepática

Transplante hepático infantil

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Colestase Neonatal .....	16
2.2 Atresia Biliar.....	18
2.3 Etiopatogenia da atresia biliar.....	25
2.4 Angiogênese e Doenças Hepatobiliares.....	28
2.4.1 O papel da hipóxia nas doenças hepatobiliares .....	29
2.4.2 Angiogênese e desenvolvimento de fibrose nas doenças hepatobiliares .....	35
2.5 Arteriopatia na atresia biliar .....	37
2.6 Angiogênese e o sistema angiopoietinas e receptor tirosinaquinase com domínios imunoglobulina <i>like</i> and EGF- <i>like</i> 2 (Tie2) .....	41
3. JUSTIFICATIVA .....	45
4. OBJETIVOS .....	46
4.1 Objetivo geral .....	46
4.2 Objetivos Específicos .....	46
5. HIPÓTESE .....	47
6. METODOLOGIA .....	48
6.1 Delineamento .....	48
6.2 Amostra .....	48
6.2.1 Critérios de inclusão .....	48
6.2.2 Critérios de exclusão .....	48
6.3 Definição de variáveis .....	50
6.4 Coleta de material .....	50

6.5 Extração de RNA .....	51
6.6 Quantificação do RNA .....	51
6.7 DNA complementar .....	51
6.8 Reação em cadeia da polimerase quantitativa .....	52
6.9 Preparações histológicas e imunohistoquímicas .....	53
6.10 Captura de imagens .....	55
6.11 Avaliação morfométrica das estruturas vasculares arteriais para medida de espessamento arterial .....	55
6.12 Análise da extensão da reação ductular por método morfométrico - quantificação da percentagem de estruturas CK7-positivas (PCK7) .....	57
6.13 Escore histológico de fibrose – área de colágeno .....	58
6.14 Imunolocalização da angiopoietina 1 .....	60
6.15 Análise estatística .....	61
6.16 Considerações éticas .....	61
6.17 Apoio Financeiro .....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
8. ARTIGO CIENTÍFICO .....	73
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	104
10. ANEXOS	
Anexo 1 – Alerta Amarelo .....	1
Anexo 2 – Protocolo de Coleta de Dados .....	106



Anexo 3 – Dados Brutos ..... 107

Anexo 4 – Carta de aceite do artigo científico para publicação na revista

*Pediatric Research* ..... 108

## 1. INTRODUÇÃO

A atresia biliar (AB) é uma doença exclusiva da infância, caracterizada pela obstrução dos ductos biliares extra-hepáticos e por uma colangiopatia intra-hepática que progride independente da realização do tratamento cirúrgico (portoenterostomia) em até 8 semanas de vida, período associado a melhor prognóstico pós operatório (BALISTRERI *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2010).

Os achados histopatológicos observados na biópsia hepática por ocasião da portoenterostomia, tais como a extensão da fibrose, auxiliam na predição do prognóstico (WEERASOORYA *et al.*, 2004; PAPE *et al.*, 2009). A quantificação da reação ductular, parece ser útil na determinação da sobrevida do fígado nativo (sobrevida sem transplante hepático) em um ano (SANTOS *et al.*, 2009).

Invariavelmente, os pacientes com AB evoluem com fibrose hepática e, na maioria dos casos, com cirrose, sendo esta doença a principal causa de transplante hepático na infância. (SANTOS *et al.*, 2010; SOKOL, MACK, 2001)

A etiologia da obstrução extra-hepática e da colangiopatia progressiva que leva à cirrose ainda precisa ser esclarecida. Acredita-se que exista mais de um fator envolvido na gênese e na persistência da colangiopatia (SANTOS *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010; TUCKER *et al.*, 2007).

Estudos em AB demonstraram a presença de ramos arteriais periféricos dismórficos, com irregularidade de contornos e sinais de oclusão ao estudo arteriográfico (UFLACKER, PARIENTE, 2004). Estudos ultrassonográficos e de tomografia computadorizada demonstram dilatação do lúmen arterial no *porta hepatis*, principalmente nos estágios iniciais da doença sugerindo um bloqueio do fluxo sanguíneo localizado nos vasos intra-hepáticos (HUMPHREY *et al.*, 2007; KIM *et al.*,

2007; LEE, *et al.*, 2009; CARUSO *et al.*, 2010). As arteríolas apresentam espessamento da túnica média desde a portoenterostomia até o transplante hepático. As artérias do *porta hepatis* encontram-se tortuosas e com paredes espessadas. Existe, portanto, um remodelamento vascular como consequência de eventos hipóxico/isquêmicos que acontecem no espaço porta e no *porta hepatis* (SANTOS *et al.*, 2005; EDOM *et al.*, 2011). Tais estudos, tornam relevante estudar o comportamento de um sistema de fatores angiogênicos, as angiopoietinas 1 e 2 e seu receptor tirosinaquinase com domínios imunoglobulina e EGF *like*, Tie2, no fígado de pacientes com AB e com outras causas de colestase neonatal, buscando compreender seu papel em relação ao espessamento da túnica média arterial (possível marcador de uma arteriopatia), na reação ductular e na extensão da fibrose (marcadores histológicos de gravidade na AB) e no prognóstico pós operatório (morte ou transplante hepático e resolução da icterícia em 6 meses após a portoenterostomia).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Colestase Neonatal

A introdução a seguir foi, em suas linhas gerais baseado no texto de SANTOS *et al.*, 2012.

A icterícia, cor amarelada da pele, escleróticas e mucosas é decorrente da deposição de bilirrubina (principal elemento do metabolismo da heme da hemoglobina) nestes tecidos quando esta se encontra em níveis elevados no plasma. A icterícia por predomínio de bilirrubina indireta (não conjugada) em recém-nascidos é comum e, na maioria das vezes fisiológica. Entretanto, o aumento da bilirrubina direta (colestase) traduz a presença de doença hepatocelular ou biliar e necessita de exploração clínica urgente. Considera-se neonatal a colestase que se desenvolve até os três meses de vida. A colestase desenvolve-se quando há uma diminuição do fluxo de bile nos ductos biliares intra ou extra-hepáticos. Além da icterícia com aumento da bilirrubina direta (conjugada) a colestase caracteriza-se, clinicamente, por hipocolia até acolia (coloração clara nas fezes, vide anexo 1 – alerta amarelo), colúria (coloração escura da urina que pode manchar as fraldas), prurido e xantomias.

O diagnóstico laboratorial da colestase é definido por bilirrubina direta maior de 1mg/dl se o nível de bilirrubina total for menor de 5mg/dl ou bilirrubina direta maior de 2mg/dl ou mais de 20% do quando a bilirrubina total for maior de 5mg/dl. Também se encontram aumentadas enzimas canaliculares como a gamaglutamiltransferase (GGT) e a fosfatase alcalina (FA) e as concentrações séricas de ácidos biliares e de colesterol. Em doenças como as colestases familiares intra-hepáticas progressivas (*progressive familial intrahepatic cholestasis – PFICs*), nas colestases recorrentes benignas (*benign recurrent intrahepatic cholestasis – BRICs*), na hipercolanemia familiar, na artrogripose

e nos erros da síntese de sais biliares a GGT pode estar normal ou até diminuída.

As principais causas de colestase neonatal são AB e hepatite neonatal idiopática (MOYER *et al.*, 2004). Diversas outras doenças levam à colestase neonatal, entre as quais se destacam as infecções congênitas, erros inatos do metabolismo, sepse, nutrição parenteral total (NPT) e deficiência de alfa-1 antitripsina (BALISTRERI *et al.*, 2005).

A abordagem inicial do paciente com colestase neonatal é clínica, constando de história e exame físico completo e detalhado. Nesta avaliação, é importante detalhar a história familiar, idade gestacional (os prematuros possuem imaturidade hepática o que predispõe o desenvolvimento da colestase), data do início da colestase e cor das fezes e urina (SANTOS *et al.*, 2012).

Nos lactentes, a investigação da AB é prioridade porque a correção cirúrgica precoce aumenta as chances de drenagem biliar bem sucedida (KASAI *et al.*, 1978. SCHNEIDER *et al.*, 2006. MIELI-VERGANI *et al.*, 1989; ALTMAN *et al.*, 1997).

## 2.2 Atresia Biliar

Do ponto de vista histórico, as primeiras referências sobre a AB foram publicadas no século XIX, tendo sido relatada a natureza incurável e fatal nos primeiros anos de vida na doença quando sem tratamento (SANTOS, SILVEIRA, 2012).

Sua incidência é rara e varia conforme a região geográfica, desde 1:5000 em Taiwan até 1:20000 nascidos vivos no Norte da Europa (DAVENPORT, 2012). Nos Estados Unidos, um terço dos casos de colestase neonatal deve-se à AB. Existe uma discreta predominância no sexo feminino (1,2/1) (CARVALHO *et al.*, 2007).

Do ponto de vista histopatológico, caracteriza-se por expansão portal devido à presença de edema, infiltrado inflamatório, proliferação biliar, com a presença de tampões biliares em ductos neoformados. A fibrose contribui para a expansão portal e, ao ultrapassar a placa limitante, leva à formação de pontes entre espaços-porta, e entre estes e as veias centrolobulares. Diferentes graus de fibrose podem relacionar-se tanto ao estágio da doença quanto a um padrão fenotípico característico (MOYER *et al.*, 2010). Nos ductos biliares extra-hepáticos ocorre fibrose concêntrica e desaparecimento progressivo do epitélio (SANTOS; SILVEIRA, 2012).

Ainda são poucos os fatores histopatológicos conhecidos como preditores de prognóstico na AB. A quantificação das extensões da fibrose e da reação ductular por ocasião da portoenterostomia, calculadas por morfometria, parecem apresentar elevada sensibilidade na determinação da sobrevida do fígado nativo (PAPE, *et al.*, 2009. SANTOS *et al.*, 2009).

Várias classificações têm sido propostas para os pacientes com AB, tomando como referência padrões clínicos, histológicos e moleculares. Do ponto de vista clínico, parece haver 4 formas de AB:

1) forma associada a MEH, com subgrupos anomalia de lateralidade, sem padrão sindrômico e má-rotação intestinal isolada.

2) forma cística

3) forma isolada, englobando a maioria dos casos

4) forma associada a IgM anti-CMV sérico positivo

O fato de haver uma forma isolada e outra associada a anomalias extra-hepáticas sugere que a AB represente um fenótipo decorrente de diferentes doenças e não uma doença isolada. Outras características, específicas de determinados grupos de paciente com AB, tais como a presença de cistos extra-hepáticos ou padrões de fibrose e inflamação, parecem corroborar esta ideia. Modelos animais de AB com bloqueio da via do interferon gama, induzindo um padrão de inflamação do tipo linfócito T *helper 2* e não T *helper 1*, apresentaram uma frequência aumentada de cistos extra-hepáticos, sugerindo que a presença de lesão cística decorra de uma característica etiológica específica (SANTOS, SILVEIRA TR, 2012. WEERASOORIYA *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2011).

Relativo à classificação histopatológica e molecular, Moyer *et al* classificaram as seguintes formas de AB:

Forma inflamatória – caracteriza-se por aumento da população de linfócitos T e células *natural killer* nos espaços porta e por aumento da expressão dos genes relacionados ao sistema imune e à inflamação.

Forma fibrogênica – caracteriza-se pelo aumento da expressão dos genes relacionados à fibrose.

Forma mista – sem diferença quanto a essas características. Esta classificação parece estar associada à idade do paciente na biópsia, sendo que os mais jovens apresentam a forma inflamatória e os mais velhos a forma fibrogênica. Esta associação parece ser dependente da evolução natural da doença, sendo de pior prognóstico aqueles que já apresentam grau maior de fibrose, evento associado à idade mais avançada naqueles com maior grau de fibrose (MOYER *et al.*, 2010).

Os sinais clínicos da AB são icterícia, acolia, colúria e hepatomegalia. Na forma associada a malformações extra-hepáticas, estes sinais estão presentes desde os primeiros dias de vida e, geralmente, há associação com baixo peso ao nascer. Já na forma perinatal, o bebê nasce com peso adequado e aspecto saudável, sem outras malformações associadas. É importante ressaltar que a icterícia pode ser leve, independente do grau de obstrução das vias biliares, principalmente em pacientes de pele escura (CARVALHO *et al.*, 2007). Por outro lado, Harpavat *et al* (HARPAVAT *et al.*, 2011) demonstraram que os recém nascidos com AB já apresentam níveis elevados de bilirrubina conjugada logo após o nascimento, mesmo sem apresentar icterícia, identificando que o processo patogênico já estava presente e atuante ao nascimento. Estes autores sugerem que: 1. seja feito um triagem em todo recém-nascido para dosagem de bilirrubina direta; 2. que sejam seguidos aqueles bebês com bilirrubina direta aumentada, independente dos níveis de bilirrubina total. Estas duas medidas (consideradas sensíveis, mas não específicas para o diagnóstico de AB) poderiam tornar o diagnóstico mais rápido e a correção cirúrgica mais precoce, melhorando o prognóstico da doença.

Em fases mais avançadas, evidencia-se esteatorrea por má absorção de gorduras, sangramentos por má absorção de vitamina K (consequências da colestase e da não



absorção de ácidos biliares), esplenomegalia, circulação colateral, hipertensão portal e encefalopatia hepática (consequências da cirrose) (CARVALHO *et al.*, 2007).

Nenhum exame laboratorial, isoladamente, é definitivo no diagnóstico de AB. Evidenciam-se alterações compatíveis com colestase inespecífica.

Quadro1 – Exames laboratoriais na AB

<b>Relativos à colestase e a dano hepatocitário</b>	<b>Relativos à má absorção e à síntese hepática anormal</b>
↑ <b>Bilirrubina total</b>	↑ Tempo de protrombina ( <i>INR</i> )
↑ <b>Bilirrubina direta</b>	↓ Fator V
↑ <b>Gama glutamiltransferase</b>	↓ Colesterol
↑ <b>Fosfatase alcalina</b>	↓ Albumina
↑ <b>Alanina aminotransferase</b>	
↑ <b>Aspartato aminotransferase</b>	
↑ <b>Ácidos Biliares</b>	
↑ <b>Colesterol</b>	

Observação: *INR* – *international normalized ratio* – pode estar aumentado, somente pela má absorção de vitamina K presente nas situações de colestase (CARVALHO *et al.*, 2007).

Os exames de imagem como a ultrassonografia abdominal total, a cintilografia hepatobiliar com tecnécio e a colangiopancreatografia endoscópica retrógrada, em conjunto com os exames laboratoriais, podem auxiliar no diagnóstico de AB, mas, não são exames definitivos de forma isolada. A biópsia hepática é o exame com maior

sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da doença na maioria dos centros especializados em hepatologia pediátrica. (SANTOS, SILVEIRA, 2012)

O tratamento inicial da AB é cirúrgico através de um procedimento denominado portoenterostomia. Em 1957, Morio Kasai descreveu a técnica da portoenterostomia destinada a proporcionar drenagem biliar nos casos de AB denominados previamente de “não-corrigeíveis”. Obteve-se sucesso, desde então, com esta técnica, observando-se que os melhores resultados são obtidos quando a cirurgia é realizada antes das primeiras oito semanas de vida (KASAI *et al.*, 1978). Quando há sucesso na desobstrução do fluxo biliar (desaparecimento da icterícia e da acolia e níveis de bilirrubina sérica menores de 2mg/dl em 3 meses após a cirurgia) a necessidade de transplante hepático pode ser reduzida a 6% se a cirurgia for realizada até 45 dias de vida (SERINET *et al.*, 2009). Contudo, alguns estudos têm demonstrado que, pacientes operados mais tardiamente, mesmo após o terceiro mês de vida, têm alguma vantagem, reduzindo a taxas razoáveis a necessidade de transplante de fígado (25% a 45% de sobrevida sem transplante de fígado em 5 anos e até 40% em 10 anos segundo alguns autores). (WONG *et al.*, 2010; MIELI-VERGANI *et al.*, 1989; CHARDOT *et al.*, 2001; DAVENPORT *et al.*, 2004).

A cirurgia consiste em uma dissecação, desde a veia porta até o hilo hepático, dos ductos atrésicos (com fibrose) até identificar-se fluxo biliar, então, procede-se a uma hepaticojejunoestomia em Y de Roux junto à cápsula hepática peri-hilar (DE LORIMIER A *et al.*, 1994). Porém, independentemente do estabelecimento de do fluxo biliar adequado, a maioria das crianças com AB apresenta doença hepática progressiva (LILLY, ALTMAN. 1975; SHINKAI *et al.*, 2009; LYKAVIERIS *et al.*, 2005).

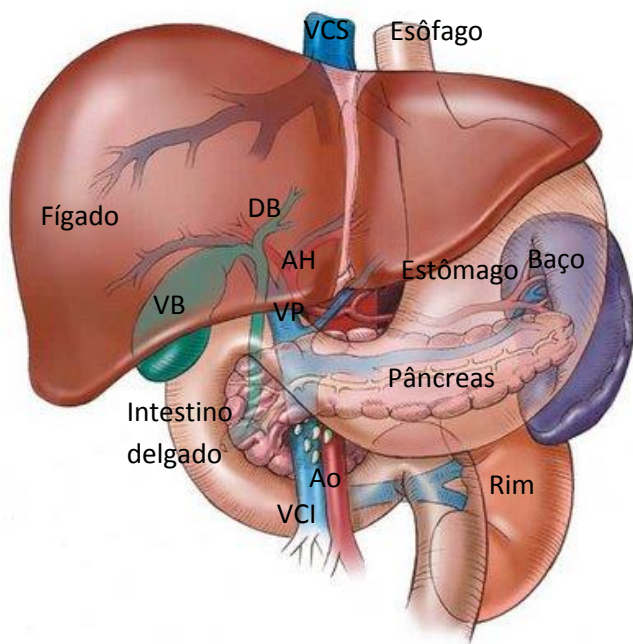


Figura 1 – anatomia do abdome superior.

Legenda: VB – vesícula Biliar; DB – ducto biliar; VP – veia porta; VCS – veia cava superior; VCI – veia cava inferior; Ao - aorta

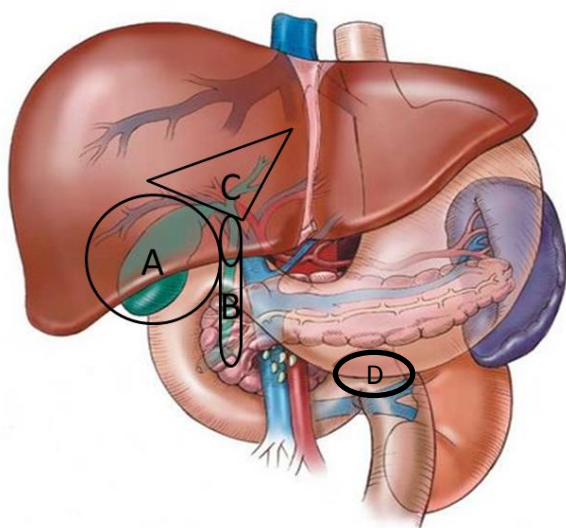


Figura 2 – representação esquemática dos locais de lesão da via biliar na AB e da anastomose biliodigestiva na cirurgia de Kasai (poroenterostomia).

Legenda: A – vesícula biliar ausente, atrésica ou presente; B - Ductos biliares atrésicos; C - *porta hepatis* (região da anastomose com a alça do jejuno - D)

Imagem de livre acesso na internet ([google images.com](https://www.google.com/images)) modificada com legendas pela autora.

Na evolução pós-operatória, há uma colangiopatia progressiva intra-hepática, de causa ainda não bem esclarecida. Isto permanece atuante mesmo nos pacientes operados em tempo hábil os quais podem apresentar hipertensão porta precocemente (OHI *et al.*, 1986). Nos estágios iniciais da doença já são observadas alterações patológicas na totalidade dos ductos biliares, ocorrendo alterações degenerativas progressivas do

epitélio biliar (ITO T *et al.*, 1983). Narayanaswamy *et al.* (NARAYANASWAMY *et al.*, 2007), ao dosar os níveis circulantes de fatores relacionados à inflamação, tais como as moléculas de adesão intercelular e vascular solúveis (sICAM e sVCAM-1, respectivamente), além interferon gama (IFN $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), reforçaram a noção de que a AB envolve um processo inflamatório persistente, atuante nas estruturas biliares e endoteliais.

A história natural dos pacientes com AB é a evolução para óbito próximo aos dois anos de vida. Após o advento da portoenterostomia, a sobrevida desses pacientes com o fígado nativo vem aumentando, mas, ainda assim, o índice de falha desse procedimento situa-se em torno de um terço dos casos. Mesmo quando o fluxo biliar é reestabelecido, ocorre progressão para fibrose hepática, cirrose e hipertensão porta em períodos variáveis. A idade por ocasião da portoenterostomia e a extensão da fibrose por ocasião do procedimento têm sido considerados fatores associados ao prognóstico pós-cirúrgico (WEERASOORIYA *et al.*, 2004; PAPE *et al.*, 2009).

Estes estudos correlacionaram variáveis como: a idade do paciente, etnia, sexo, níveis de bilirrubina conjugada no momento da portoenterostomia e três meses após, e tempo de sobrevivência do fígado nativo com o grau de fibrose no momento da portoenterostomia, analisado por escore específico. Em análise multivariada, as variáveis independentes para a sobrevivência do fígado nativo foram fibrose e o nível de bilirrubina conjugada no terceiro mês após a cirurgia de Kasai. A extensão da reação ductular, e não a extensão da fibrose ou a idade por ocasião da POE, foi a única variável independente associada à sobrevida com o fígado nativo em um ano pós portoenterostomia no estudo de Santos *et al.*, 2007. Outros fatores como a experiência e qualificação da equipe médica, manejo clínico no pós-operatório (STRINGER *et al.*, 2007; MCKIERNAN *et al.*, 2000) e o diâmetro dos ductos biliares remanescentes no

*porta-hepatis* também são determinantes do prognóstico pós operatório (SCHWEIZER P *et al.*, 1999).

### **2.3 Etiopatogenia da atresia biliar**

A AB ainda parece decorrer de um fator ambiental o qual age num indivíduo geneticamente suscetível resultando numa desordem imunológica que culmina num dano biliar com fibrose progressiva.

Sob o ponto da etiologia, vários agentes têm sido associados à etiopatogenia da AB (Quadro 2).

Quadro 2 – Fatores propostos na etiologia da Atresia biliar (baseado em SANTOS, *et al*, 2010)

### **A – Fatores genéticos**

- Mutação CFC1
- Polimorfismos: VEGF A, ICAM G241R; X proxyl aminopetidase 1 rs 17095355; +276G/T da adiponectina
- Mutação NFkappaB/c
- **Anormalidades cromossômicas numéricas**
  - Trissomia do 10q, 17, 18, 21

### **B – Fatores ambientais**

- **Drogas usadas durante a gravidez**
  - Anfetamina
  - Álcool
- **Infecções maternas/neonatais**
  - Citomegalovirose
  - Reovírus tipo 3
  - Papilomavírus
  - Rotavírus
- **Fitotoxinas, micotoxinas**
- **Toxina industrial**
  - 4,4' metileno-dianilina (DAPM, MDA)

### **C – Outras**

- **Anomalias estruturais**
  - BASM
  - Anormalidades da junção coledocopancreática
  - Malformação da placa ductal
  - Anomalias arteriais
- **Anormalidades metabólicas**
  - Defeitos do metabolismo dos ácidos biliares
  - L-prolina
- **Anormalidades imunológicas**
  - Auto-imunidade sorológica materna
- **Alterações imunogenéticas**
  - Expansão oclonal de linfócitos T
  - Linfócitos NK
  - Complexo MHC biliar aberrante
  - Microquimerismo
- **Diabete materno**
  - Diabete gestacional
- **Idade materna** (Fischler et al., 2001)

Shuang Cui S *et al.*, observaram um aumento estatisticamente significativo de deleções do 2q37.3 em pacientes com AB. Isto resulta na deleção de uma cópia do gene GPC1, o qual codifica glipican1, uma proteínoglicano sulfato de heparano (*heparan*

*sulfate proteoglycan*) que regula sinalizações *hedgehog* (cruciais na transmissão de informações em células embrionárias) e inflamação. Estudando zebrafish com silenciamento gênico para GPC1, foram observados defeitos no desenvolvimento biliar (SHUANG CUI *et al.*, 2013).

A ocorrência de AB exclusivamente no fígado neonatal e na árvore biliar extra-hepática sugere que o desenvolvimento contínuo pode ser uma chave a patogênese da doença. Assim, os genes que codificam o desenvolvimento biliar podem conferir suscetibilidade para AB (SHUANG CUI *et al.*, 2013).

Entretanto, segundo Silveira *et al.*, 1988: “nem todos os casos de AB parecem se limitar, simplesmente, ao esquema malformativo, de problema intrínseco à diferenciação embriológica. Há um padrão perfeitamente adaptável ao esquema disruptivo vascular, no qual as anomalias da artéria hepática desempenhariam papel decisivo”.

#### **2.4 Angiogênese e Doenças Hepatobiliares**

A expressão de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e a angiogênese, representam um papel muito importante em muitas doenças hepatobiliares. O estudo destes fatores pode ajudar no esclarecimento dos mecanismos envolvidos na sua patogênese e no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para estas doenças (SHANNON *et al.*, 2010).

A formação de novos vasos está associada à hipóxia e à isquemia. Uma redução no oxigênio leva a um aumento dos níveis dos fatores induzidos por hipóxia (HIFs) os quais estimulam a expressão dos fatores angiogênicos. Entre eles o VEGF, o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e as ANGPTs.



#### *2.4.1 O papel da hipóxia nas doenças hepatobiliares*

O gradiente de pressão de oxigênio presente no lóbulo hepático atua no funcionamento das células parenquimatosas e não parenquimatosas. Os hepatócitos periportais e perivenosos expressam enzimas diferentes envolvidas no transporte ou no metabolismo de glicose, incluindo o receptor de insulina, de glucagon, fosfogliceratoquinase, L-piruvatoquinase e muitas outras. Os hepatócitos periportais tendem a se subespecializar no metabolismo oxidativo de energia, na produção de glicose e na síntese de ureia e bile, enquanto os hepatócitos perivenosos são os maiores sítios de incorporação de glicose, formação de glutamina e de metabolismo xenobiótico. A hipóxia tem papel importante na patogênese de muitas doenças hepáticas. O fígado possui uma constituição anatômica e funcional única no corpo humano a qual afeta profundamente sua fisiologia e fisiopatologia, incluindo a homeostase de oxigênio. O sangue aferente ao fígado provém de sítios bem oxigenados como as artérias hepáticas e de sítios pobres em oxigênio como a veia porta. O fluxo direcional misto (sangue oxigenado e pouco oxigenado), através da veia central nos lóbulos hepáticos, cria um gradiente fisiológico de oxigênio. Este gradiente resulta numa pressão de oxigênio de 60-65 mmHg no sangue periportal e de 30-35mmHg nas porções perivenosas do parênquima hepático. A fim de comparação, a concentração de oxigênio arterial, na maioria dos tecidos do corpo humano, é em torno de 74-104 mmHg e a concentração de oxigênio nas veias é de 34-46mmHg. A hipóxia traz grandes consequências para os tecidos de um organismo aeróbico. Nas últimas décadas, o conhecimento relativo à resposta homeostática à hipóxia tem aumentado em direção a mecanismos genético-moleculares. (NATH, GYONGYI, 2012)

A hipóxia desempenha papel importante em alguns tipos de reação ductular. Desmet propõe a classificação das reações ductulares (RD) em tipo 1 e tipo 2. A RD

tipo 1 é predominante nas obstruções agudas e completas dos ductos biliares. Caracteriza-se pela proliferação de colangiócitos pré-existentes, resultando em alongamento, ramificação e alargamento luminal dos ductos biliares. Ela representa uma das inúmeras interações entre células inflamatórias, estromais e biliares. O alongamento dos ductos biliares na obstrução biliar aumenta a área de reabsorção dos colangiócitos favorecendo o ciclo cole-hepático dos ácidos biliares. A RD tipo 1 pode ocorrer em conjunto com outras RD de acordo com as necessidades estruturais.

Já a RD tipo 2 é dividida em tipo 2 A, preferencialmente periportal e 2B centrolobular. A tipo 2 A tem sido chamada de metaplasia ductular de hepatócitos. Ela representa uma mudança na polaridade secretora de horizontal (hepatocelular – canalicular) para vertical (colangiocítica apical-basal). Ela é tipicamente observada em regiões periportais, mais característica, mas não exclusivamente, em condições coleestáticas crônicas favorecendo a metaplasia ductular dos hepatócitos. A causa desta metaplasia é, aparentemente, o acúmulo de ácidos biliares retidos causando uma alteração no citoesqueleto de queratina. Estas células expressam progressivamente citoqueratina 7 (CK7), iniciando na área periportal e estendendo-se mais tarde para as zonas centrolobulares. Os hepatócitos coleestáticos ativam as células estreladas hepáticas para um fenótipo miofibroblástico responsável pelo aumento de produção do tecido conectivo. Assim, na colestase persistente, os ácidos biliares induzem um aumento na população de colangiócitos, contribuem para a formação de fibrose pericelular e promovem a metaplasia ductular dos hepatócitos. Tanto a RD tipo 1 quanto a tipo 2 A são reversíveis quando a injúria inicial é removida (DESMET, 2011).

A RD tipo 2 acontece em áreas com hipóxia. Na região centrolobular dos lóbulos hepáticos e na centronodular dos nódulos cirróticos. É mais lenta no desenvolvimento, mas, microscopicamente, assemelha-se à RD tipo 2 A ocorrendo

metaplasia ductular e fibrose induzida por miofibroblastos. Há uma indução do fator induzido por hipóxia (*Hypoxia – inducible fator HIF*) nos hepatócitos hipóxicos. Os HIFs são uma família de reguladores transcricionais evolutivamente conservados os quais afetam a resposta homeostática a baixas pressões de oxigênio e foram identificados como mediadores chave na angiogênese e na inflamação. (NATH B, GYONGYI S, 2012). Os hepatócitos hipóxicos apresentam, também, uma regulação aumentada dos fatores pró-fibróticos e vasoativos como fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet derived growth fator A and B, PDGF A e B*) e fator inibidor de plasminogênio 1 (*Plasminogen Activator Inhibitor – 1, PAI – 1*), os quais ativam as células estreladas hepáticas numa atividade pró-fibrogenética que resulta em fibrose centrolobular progressiva. Os hepatócitos passam a expressar CK7 e, na sequência, citoqueratina 19 (CK19) (um fenótipo mais primitivo) assumindo uma arquitetura tubular (metaplasia ductular centrolobular ou RD tipo 2 B). A diferenciação centrolobular avançada dos hepatócitos pode resultar na aquisição de características de células progenitoras e a hipóxia favorece a qualificação de célula bipontecial neste micro ambiente celular. A hipóxia também é responsável pelo recrutamento das células progenitoras hepáticas provenientes dos canais de Hering para zonas hipóxicas (DESMET JV, 2011).

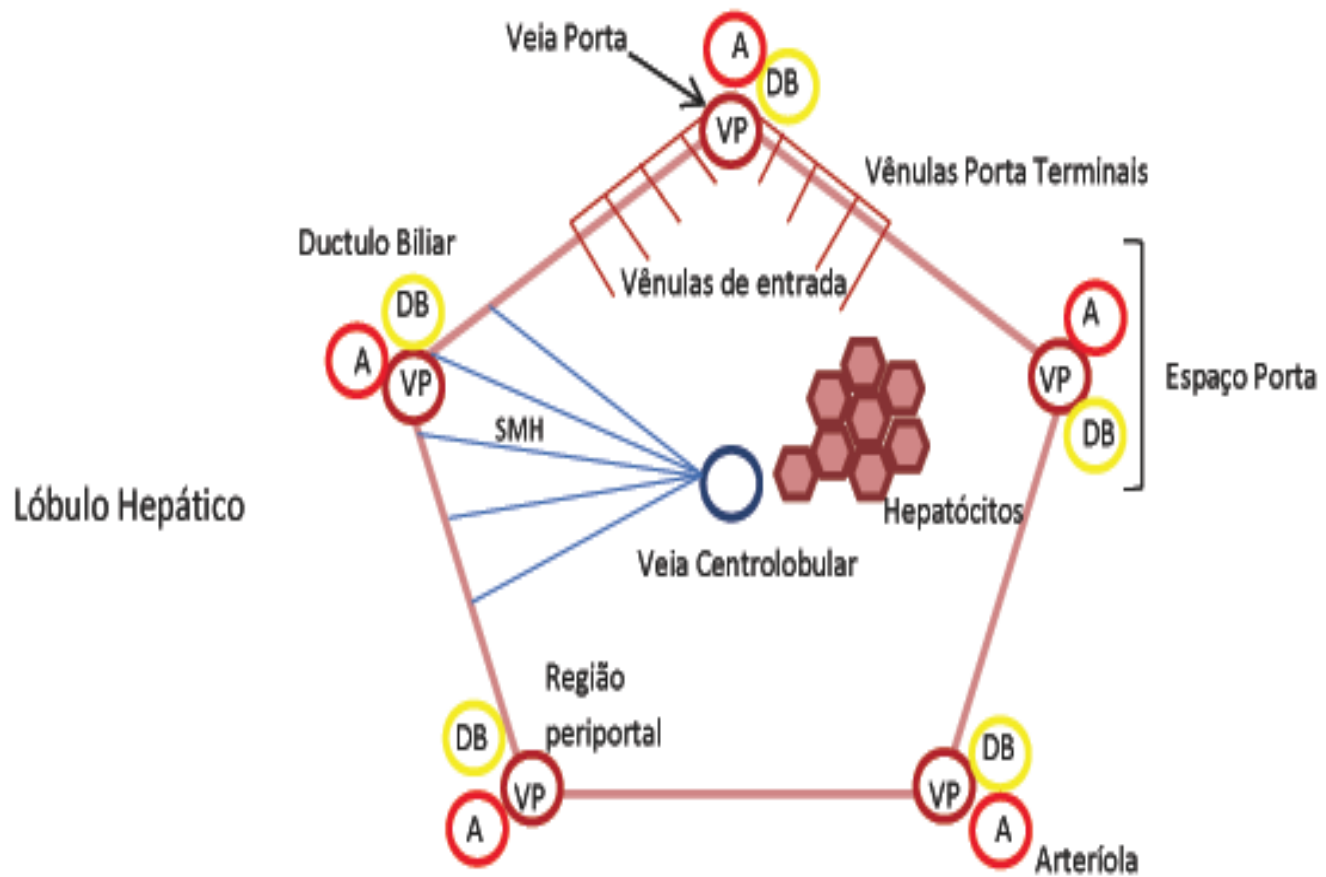


Figura 3 - Representação esquemática de um lóbulo hepático. Legenda: A – arteríola; VP – veia porta; DB – ducto biliar; SMH – subunidades microcirculatórias hepáticas. Figura confeccionada pela autora.

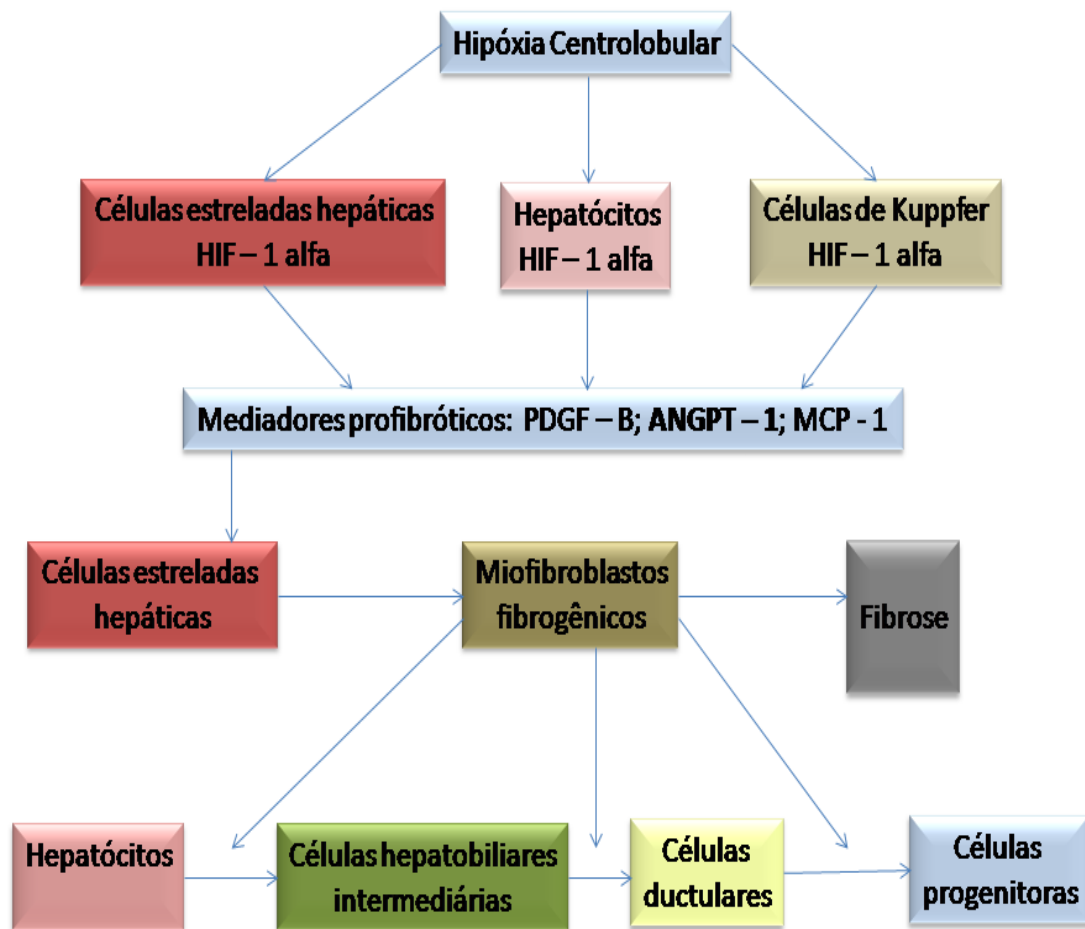


Figura 4 - Reação ductular tipo 2B. Esquema ilustrando o mecanismo de fibrogênese e metaplasia dos hepatócitos secundária à hipóxia centrolobular. Legenda: HIF 1 alfa - *hypoxia inducible fator 1 alpha*, PDGF B - *Platelet derived growth fator B*; MCP1 - *Monocyte chemoattractant protein*; ANGPT 1 - *angiopoietina 1*

Já é bastante conhecida a interação entre HIF e o VEGF A em situações de pouca oferta de oxigênio. Nestas condições, a hipóxia induz um aumento no VEGF A, por meio da sinalização do HIF, levando a um aumento da vascularização e consequente melhora na oferta de oxigênio. Quando a oferta de oxigênio é normalizada, ocorre um *feedback* negativo na produção de VEGF A (THOMAS *et al.*, 2011).

O HIF exerce um papel significativo no dano hepático colestático. Este efeito ocorre em diferentes tipos de células como hepatócitos, células de Kupffer e linfócitos T. Estas constatações sugerem fortemente que terapias anti-HIF podem ser intervenções terapêuticas promissoras no manejo de doenças hepáticas de várias etiologias. Dezenas, talvez centenas de genes são regulados pela hipóxia e por fatores induzidos por hipóxia. Notavelmente, a família desses genes incluem genes pró-inflamatórios e pró-fibróticos, bem como genes envolvidos na progressão de tumores. A hipóxia também ativa as células estreladas hepáticas e esta ativação é acompanhada da secreção de citocinas pró-angiogênicas como o VEGF e ANGPT 1 a qual é capaz de estimular a quimiotaxia de células estreladas num cenário autócrino ou parácrino. (NATH, GYONGYI, 2012)

Células estreladas isoladas de ratos HIF1 (-/-) demonstram que os genes envolvidos na fibrose, na angiogênese e na deposição de colágeno, são, pelo menos parcialmente, dependentes de HIF funcional (COPPLE *et al.*, 2011).

#### 2.4.2 Angiogênese e desenvolvimento de fibrose nas doenças hepatobiliares

A formação de novos vasos sanguíneos é um mecanismo essencial na doença hepática crônica a despeito de sua etiologia. As doenças hepáticas crônicas não podem ser consideradas como uma doença única, tendo em vista que o dano hepatocitário progride para inflamação, fibrose, cirrose e, em alguns casos, para hepatocarcinoma. A neovascularização e o estabelecimento de uma angioarquitetura anormal estão associados à progressão da doença. A evolução para cirrose é caracterizada pela neovascularização, capilarização dos sinusóides, fibrogênese e formação de colaterais intra-hepáticos. Uma das complicações mais comuns da cirrose é a hipertensão porta a qual resulta de uma resistência aumentada ao fluxo sanguíneo. Sua fisiopatologia está vinculada a um aumento da neovascularização hepática e esplâncnica (MEDINA *et al.*, 2004).

A angiogênese desorganizada está envolvida na progressão da fibrose hepática e é considerada um dos fatores determinantes na irreversibilidade da fibrose (SHANNON *et al.*, 2010).

TAURA *et al.*, 2008, estudaram a relação entre angiogênese e fibrose hepática através da análise de fígados de ratos com fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono ou pela ligação de ducto biliar, e de amostras de fígado de pacientes submetidos a transplante hepático. Foi encontrado um aumento da expressão da ANGPT 1 nas amostras com fibrose hepática. Demonstrou-se também que o bloqueio da atividade de ANGPT 1 inibe a ocorrência de angiogênese assim como a de fibrose hepática. Eles destacaram ainda que as células estreladas hepáticas, ativadas nos modelos animais, secretam ANGPT 1 mais abundantemente do que as células quiescentes. Os autores concluíram que angiogênese e fibrogênese são processos mutuamente estimulatórios, e que as células estreladas hepáticas, através da expressão

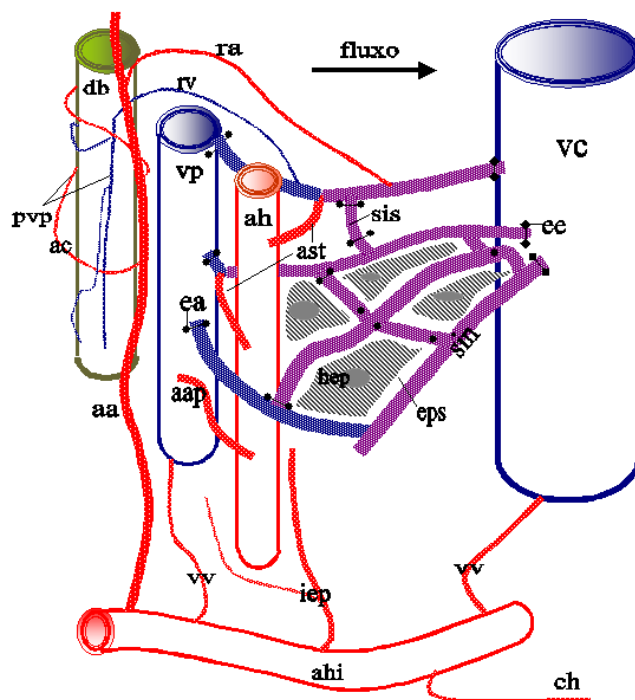
de ANGPT1, têm papel fundamental nesse processo.

Nos processos de fibrogênese hepática, os pericitos secretam ANGPT 1 e 2. A ANGPT 1 estabiliza os contatos intercelulares e inibe a permeabilidade endotelial. Quando em excesso, a ANGPT 1 impede o surgimento de novos vasos por tornar os contatos intercelulares endoteliais mais apertados. A ANGPT 2, na ausência de VEGF, desestabiliza os vasos e induz a morte das células endoteliais, atuando como antagonista da ANGPT 1, levando à regressão vascular. Em outro contexto, a ANGPT 2, na presença de VEGF, pode favorecer o surgimento de novos vasos (MEDINA *et al.*, 2004).



## 2.5 Arteriopatia na atresia biliar

Como o sistema biliar extra-hepático recebe seu suprimento sanguíneo arterial da artéria hepática e seus ramos, NORTHOVER, TERBLANCHE, 1980, sugeriram que a estenose dos ductos biliares extra-hepáticos pós-transplante de fígado fosse determinada pelo efeito fibrogênico da bile em terreno predisposto pela isquemia. Pode-se imaginar que um evento similar ocorra na AB em estágio precoce. Alguns modelos animais investigaram o possível papel do sistema arterial no desenvolvimento da obstrução extra-hepática. HASHIMOTO *et al.*, 1983, produziram atresia de colédoco por meio de desvascularização desta estrutura em fetos de ovelha. Segundo Appleby (APPLEBY, 1959), a bile determinaria necrose de ductos biliares extra-hepáticos previamente isquêmicos. Klippel, (KLIPPEL, 1972), sugeriu a possibilidade de a AB estar vinculada às modificações circulatórias do fígado e das vias biliares extra-hepáticas que ocorrem após o nascimento. Segundo esse autor, devido ao desvio da corrente sanguínea pelo ducto venoso permeável, haveria diminuição significativa de sangue arterial da árvore biliar extra-hepática, determinando, em indivíduos vulneráveis, necrose segmentar dos ductos.



aa - artéria acompanhante; aap - anastomose artério-portal; ac - artéria comunicante; ah - artéria hepática; ahi - artéria hepática isolada; ast - *arteriosinus twigs*; ch - ramo que nutre a cápsula hepática; db - ducto biliar; ea - esfíncter aferente; ee - esfíncter eferente; eps - espaço perisinusoidal; iep - ramo que nutre o interstício do espaço-porta; hep - hepatócitos; pvp - plexo vascular peribiliar; ra - rota arterial do PVP; rv - rota venular do PVP; sin - sinusóides; sis- sinusóide intersinusoidal com esfíncteres; VC - veia centrolobular; vp - veia porta; vv - ramos dos *vasa vasorum* para veia porta e veia centrolobular.

Figura 5 – Representação esquemática da microvasculatura hepática.

Autorizado: Tese de doutorado Jorge Luiz Santos

Alterações histopatológicas dos ramos arteriais hepáticos têm sido observadas em pacientes com AB. STOWENS, 1959, descreveu a ocorrência de hiperplasia e hipertrofia em ramos da artéria hepática nos espaços-porta em pacientes com AB. A hipertrofia desses ramos também foi observada por Brough, Bernstein, 1969. Ho C, *et al.*, 1993, avaliaram as alterações da artéria hepática em pacientes com AB, observando, de forma subjetiva, a ocorrência dilatação luminal e espessamento de parede vascular. Kobayashi, *et al.* (KOBAYASHI *et al.*, 1999) estudaram os níveis séricos da *interferon inducible protein-10* em pacientes com AB e observaram relação direta desses níveis com pior prognóstico pós-cirúrgico. No grupo de pior prognóstico foi encontrada

fibrose porta intensa, espessamento da túnica média dos ramos da artéria hepática, além de edema no endotélio da íntima. Os autores sugeriram que as alterações hiperplásicas e hipertróficas dos ramos arteriais nos espaços-porta de pacientes com AB poderiam ser causadas pela produção de *interferon-inducible protein-10*, secundária à expansão fibrogênica.

Em 2005, foi detectado, por estudo morfométrico: 1) a existência de espessamento da túnica média dos ramos arteriais hepáticos nos pacientes com AB por ocasião da portoenterostomia, 2) a progressão de tal espessamento entre a portoenterostomia e o transplante hepático, além de 3) uma aparente relação entre este espessamento e o desaparecimento dos ductos biliares interlobulares. No período entre portoenterostomia e transplante o espessamento da túnica média pareceu espalhar-se desde as artérias maiores para as arteríolas (SANTOS *et al.*, 2005). O espessamento progressivo da túnica média arterial pode ser explicado por um processo de remodelamento vascular associado à “disfunção endotelial” (GOLDBERG A., 2005).

Uma arteriopatia de tal tipo pode desarranjar a totalidade do sistema hepatobiliar, pois veias, ductos biliares e nervos são nutridos pelos ramos da artéria hepática. Pode, portanto, ser um elemento fundamental na patogênese da colangiopatia destrutiva da AB. UFLACKER, PARIENTE, 2004, estudando por ateriografia o fígado de pacientes com AB observaram artérias de contorno irregular, com oclusão periférica, cercadas por tufo de minúsculos ramos arteriais. Num estudo histopatológico hepático de cordeiros com AB realizado em 2007, um achado marcante foi a presença de artérias em número aumentado nos espaços-porta, apresentando espessamento de túnica média. Ainda, em 2007, dois estudos ultrassonográficos observaram que a artéria hepática própria dos pacientes com AB, em sua porção extra-hepática, apresenta dilatação

luminal, sendo este um achado específico da doença, útil como variável diferenciadora das outras causas de colestase neonatal (HUMPHREY, STRINGER, 2007. KIM, 2007).

No estudo de Edom *et al*, 2011 avaliou-se por imunohistoquímica a localização do VEGF A e seus receptores (VEGFRs) 1 e 2 em biópsias de fígados de pacientes com atresia biliar e com colestase intra-hepática. Na época da portoenterostomia, o VEGF A foi positivo na parede arterial, nos ductos biliares e nos hepatócitos. Já na época do transplante hepático, foi positivo no parênquima demonstrando um padrão de hipóxia tecidual característico da cirrose. Nas estruturas do *porta hepatis* foi positivo nos remanescentes biliares, nas paredes das artérias e nos hepatócitos. Sendo que todas essas marcações positivas foram maiores nos pacientes com AB quando comparado com pacientes com colestase intra-hepática. Já a positividade imunohistoquímica dos VEGFRs 1 e 2 foi menos frequente no grupo com AB que nos controles. Neste estudo, ficou clara a relação entre espessura da túnica média/diâmetro luminal (RMED) aumentada e a positividade para VEGF, reforçando a associação entre hipóxia e arteriopatia com a doença biliar. Entretanto, não se demonstrou associação do VEGF A positivo com densidade de colágeno (marcador de fibrose hepática), nem com a idade da biópsia hepática ou prognóstico (sobrevida do fígado nativo), mas se demonstrou relação entre a positividade do VEGF A e a percentagem de positividade para citoqueratina 7 a qual é um marcador da extensão da RD (EDOM *et al.*, 2011).

Variações genéticas do gene do VEGF A (principalmente o polimorfismo +983C/T e o alelo VEGF - C) são associados com AB e podem conferir suscetibilidade aumentada à doença (LEE *et al.*, 2010).

## 2.6 Angiogênese e o sistema ANPTs/Tie2

A formação do sistema vascular, ou vasculogênese, é um dos eventos mais precoces da embriogênese. Células mesodérmicas diferenciam-se em hemangioblastos, que são precursores tanto das células hematopoiéticas quanto das endoteliais. Os hemangioblastos sofrem nova diferenciação em angioblastos, os quais agregam-se formando “ilhas” de sangue. A fusão dessas estruturas forma os primeiros plexos vasculares, constituídos de finos capilares formados por células endoteliais, periendothelias e musculares lisas. Essa rede vascular primária é homogênea, com vasos de calibres semelhantes. Nessa etapa, os vasos já se caracterizam como venosos ou arteriais e acredita-se que essa caracterização seja geneticamente programada. A vasculogênese ocorre apenas na vida embrionária (YANCOPOPOULOS *et al.*, 2000. KARAMYSHEVA, 2008).

A angiogênese é o crescimento dos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. A primeira descrição histórica da angiogênese foi feita por um anatomista e cirurgião escocês, John Hunter, em 1794, o qual descreve a proporção entre vascularização e necessidades metabólicas, seguindo uma lei básica da natureza descrita por Aristóteles como: “a forma segue a função”. A história moderna da angiogênese começa em 1971 quando Judah Folkman descreve a dependência das células tumorais em relação à vascularização (THOMAS *et al.*, 2011).

Atualmente, as pesquisas sobre angiogênese avançaram muito. Isto porque as terapias angiogênicas representam potenciais fatores terapêuticos no tratamento do câncer, doenças cardiovasculares e outras. Todos os tecidos do corpo humano necessitam oxigênio para produzir energia e o oxigênio chega aos tecidos através dos capilares. Portanto, quando os capilares estão diminuídos, o suprimento de oxigênio aos

tecidos diminuí, prejudicando o crescimento dos mesmos. Já o tecido bastante vascularizado tem crescimento otimizado (THOMAS *et al.*, 2011).

Os novos vasos surgem inicialmente através da permeabilização da parede de um vaso preexistente, permitindo a proliferação e migração das células endoteliais para colonização de áreas carentes de oxigênio, formando assim uma rede vascular organizada, mais complexa, e com vasos de diferentes calibres (YANCOPOPOULOS *et al.*, 2000; KARAMYSHEVA, 2008).

Vários mecanismos estão envolvidos na formação e maturação dos vasos e dependem de estímulos ativadores e inibidores. O evento crítico para angiogênese é uma cascata de sinais envolvendo VEGF e seus receptores. O VEGF estimula o crescimento de células endoteliais de artérias, veias e linfáticos, além de regular a permeabilidade vascular (KARAMYSHEVA, 2008).

Até recentemente, o VEGF era o único fator de crescimento identificado com ação específica na formação vascular. Entretanto, identificou-se um novo sistema de receptores específicos para células endoteliais, incluindo os receptores tirosinaquinases, quais sejam Tie 1 e Tie 2 e seus ligantes ANGPT 1, ANGPT 2, ANGPT 3, ANGPT 4. (THURSTON, 2003).

Este sistema está envolvido na maturação da parede vascular (JIN, PATTERSON, 2009). Ratos transgênicos que tiveram os genes Tie2 inativado morreram no início do desenvolvimento. Nestes animais, o coração e a rede vascular foram formados, mas o coração não sofreu trabeculação e vascularização normais. Apesar de os vasos terem sido formados, alterações nos processos de maturação e estabilização dos capilares, com ausência da formação de uma rede vascular mais complexa foi detectada (THURSTON, 2003).

As ANGPTs 1 e 2 atuam como estabilizadoras das paredes vasculares, e sua ausência em modelo murino leva, além de anomalias cardíacas, a defeitos na remodelagem da vasculatura durante o desenvolvimento, tais como hipervascularização e aumento do calibre vascular (YANCOPOPOULOS *et al.*, 2000).

O Receptor Tie2 é um receptor tirosinaquinase e foi clonado por Dumont *et al* em 1992 e por Iwama *et al* em 1993. Ele é expresso nas células endoteliais e em algumas linhagens de células hematopoiéticas. Ele é formado por duas alças de tipo imunoglobulina, três domínios de tipo fator de crescimento endotelial e por três repetições de tipo fibronectina III nos domínios extracelulares e os domínios tirosinaquinase, incluindo um número de sítios de fosforilação e interação de proteínas, no citoplasma. (MORISADA *et al.*, 2006).

As ANGPTs 1 e 2 consistem estruturalmente de um domínio tipo de fibrinogênio que se liga ao Tie 2 e um domínio de bobina que serve para oligomerizar ou polimerizar monômeros para ativar o Tie 2 (MORISADA T *et al.*, 2006).

A ANGPT 1 induz a fosforilação do receptor Tie 2 nas células endoteliais, inibindo a apoptose e estimulando sua proliferação e estabilização dos vasos (MEDINA *et al.*, 2004).

Supõe-se que a ligação de ANGPT 1 com Tie 2 nas células endoteliais estabiliza o sistema vascular em maturação e a estimula a formação do plexo capilar primário. Embriões geneticamente modificados, com ausência de ANGPT 1, apresentaram uma rede vascular primária normalmente desenvolvida, mas não ocorreu o remodelamento posterior (SURI *et al.*, 1996).

Em algumas situações, a ação da ANPT 1 no receptor Tie é diminuída pela ação da ANGPT 2. A ANGPT 1 também age como um fator de diminuição da

permeabilidade vascular fortalecendo a associação entre células endoteliais adjacentes e entre as células endoteliais e as células murais perivasculares (MORISADA *et al.*, 2006).

Thurston demonstrou que a ANGPT1 promove um aumento do diâmetro dos vasos, devido à proliferação de células endoteliais, principalmente no período neonatal (THURSTON, 2003).

A ANGPT 2 foi encontrada no endotélio de vasos que estavam sendo submetidos a remodelamento, seja em expansão ou regressão vascular, como em ovários ou tumores. Esses achados geraram a hipótese de que a ANGPT 2 poderia atuar como um primeiro sinal de desestabilização no vaso, para que a partir de então ocorra o remodelamento através do processo de angiogênese (YANCOPOPOULOS *et al.*, 2000).

A ANGPT 2 induz a também induz fosforilação do Tie 2. Ela é responsável pela formação de túbulos em coágulos de fibrina e de ramificações de células endoteliais, demonstrando que sua ação na angiogênese é mais complexa que previamente descrita. Ela agiria como um sinal desestabilizador e seria expressa antes da ramificação ou da regressão vascular. (MORISADA *et al.*, 2006).

Estes fatores indicam que a ANGPT 1 e ANGPT 2 agem de forma complementar e coordenada com o VEGF e contribuem para a remodelação e estabilização dos vasos durante a angiogênese (MORISADA *et al.*, 2006).



### 3. JUSTIFICATIVA

A causa da AB permanece obscura e, independentemente da desobstrução do fluxo biliar através da portoenterostomia, mantém-se um desarranjo das estruturas hepatobiliares, que leva ao desaparecimento gradativo dos ductos biliares intra-hepáticos, à fibrogênese progressiva e, finalmente, à cirrose. Em estudo anterior, SANTOS *et al.*, 2005, detectaram, em pacientes com AB, a presença de espessamento progressivo da túnica média nos ramos da artéria hepática, caracterizando uma arteriopatia aparentemente relacionada ao desaparecimento dos ductos biliares interlobulares.

A caracterização de uma arteriopatia relacionada à AB pode levar à pesquisa de terapêuticas complementares à atualmente empregada, desencadeando mudanças no prognóstico da doença. Este estudo visa a buscar alterações na expressão de moléculas envolvidas em arteriopatia neste grupo de pacientes.

O sistema ANGPT/Tie 2 é da maior importância no desenvolvimento normal das estruturas vasculares, e seu desequilíbrio está implicado em distúrbios da embriologia vascular, na vascularização de tumores e em doenças do epitélio biliar. A análise de sua expressão na AB pode contribuir como valioso conhecimento sobre uma possível anomalia arterial presente na doença.

## 4. OBJETIVOS

**4.1 Objetivo Geral:** estudar o sistema ANGPTs/Tie2 no fígado de pacientes com AB.

### 4.2 Objetivos específicos:

4.2.1 Detectar a presença das ANGPTs 1 e 2 e do receptor Tie 2 em amostras de fígado de pacientes com AB e com CIH utilizando o método de PCR em tempo real para detecção de expressão gênica.

4.2.3 Comparar a expressão por PCRq quantitativo das ANGPTs 1 e 2 e de seu receptor Tie 2 em amostras de fígado de pacientes com AB e com CIH.

4.3.3 Mensurar a espessura da túnica média em amostras de fígado de pacientes com AB utilizando o método de morfometria.

4.2.4 Mensurar o percentual de RD em amostras de fígado de pacientes com AB utilizando o método de morfometria.

4.2.5 Mensurar a extensão da fibrose em amostras de fígado de pacientes com AB utilizando o método de morfometria.

4.2.6 Demonstrar a localização da ANGPT 1 no tecido hepático pela técnica de imunohistoquímica.

4.2.7 Verificar a correlação entre a expressão por PCR em tempo real das ANGPTs 1 e 2 e de seu receptor Tie 2 nas amostras de fígado de pacientes com AB e:

- a. espessamento da túnica média arterial.
- b. reação ductular.
- c. extensão da fibrose.
- d. idade dos pacientes por ocasião da biópsia.

4.2.8 Verificar o impacto na sobrevida do fígado nativo (definida como evolução ao óbito antes do transplante hepático ou ter o fígado transplantado) com dois anos de vida e na resolução da icterícia (bilirrubina total <2mg/dL) em seis meses pós – portoenterostomia das variáveis selecionadas neste estudo as quais se relacionam ao agravamento da doença hepática na AB pós portoenterostomia.

## **5. HIPÓTESE**

Na AB, devido à ação de um agente agressor ainda não esclarecido, ocorreria um processo de “disrupção vascular” desencadeando hipóxia/isquemia nas estruturas hepatobiliares e disfunção endotelial. A hipótese do presente estudo é que as ANGPTs 1 e 2 e seu receptor Tie 2 apresentem expressão aumentada nos pacientes com AB em relação a pacientes com outras causas de colestase neonatal. Esta expressão aumentada poderia estar relacionada com o espessamento da túnica média das arteríolas hepáticas e com variáveis histológicas associadas à gravidade da AB, marcadoras de RD e de extensão de fibrose, bem como com a idade do paciente na ocasião da biópsia hepática, sobrevida de fígado nativo e resolução da icterícia.

## 6. METODOLOGIA

### 6.1 Delineamento

O delineamento deste estudo é transversal, de série de casos.

### 6.2 Amostra

A amostra é de conveniência. Avaliamos 32 casos dos quais dispúnhamos de material ultracongelado para análise molecular dos fatores angiogênicos em estudo. O período da coleta deste material foi entre dezembro de 2006 e março de 2011.

6.2.1 *Critérios de inclusão:* crianças com menos de seis meses com colestase neonatal acompanhadas no Setor de Gastroenterologia Pediátrica do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que tivessem material biológico armazenado para análise molecular e histológica.

6.2.2 *Critérios de exclusão:*

1. Apresentar diagnóstico duvidoso quanto à causa da icterícia colestática.
2. Apresentar doenças associadas cuja presença fosse considerada fator de confusão na expressão dos fatores em estudo (uso de nutrição parenteral total, apresentar sorologia reagente IgM para citomegalovírus e sepse).
3. Apresentar material histológico insuficiente para análise (menos de cinco espaço-porta).

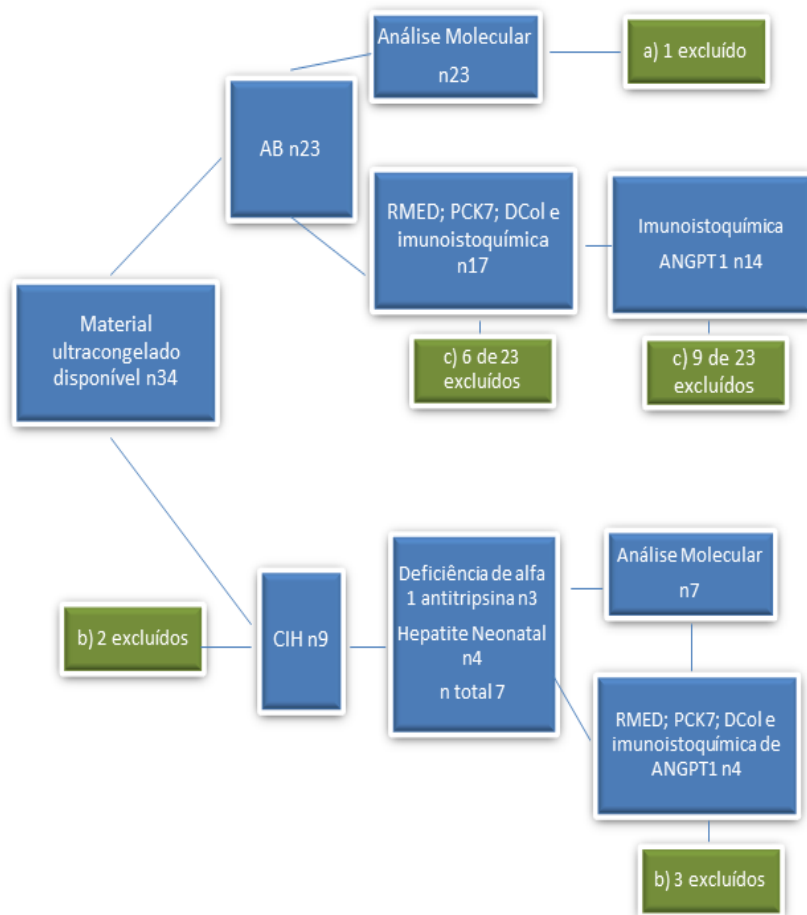


Figura 6 – Fluxograma de coleta de amostras histológicas e moleculares

- a) Valores fora dos parâmetros de análise para um paciente com AB – provável falha na técnica de PCR quantitativo.
- b) Doenças associadas (NPT, sepses e CMV IgM reagente).
- c) Material histológico insuficiente.

Legenda: ANGPT – angiopoietina; RMED – razão espessura da túnica média/diâmetro luminal; DCol – densidade de colágeno; PCK7 – percentual de citoqueratina 7.

### 6.3 Definição de variáveis

- Área de colágeno (ACOL): área de deposição de colágeno. Corresponde às áreas com fibrose.
- Percentagem de citoqueratina 7-positiva: áreas com citoqueratina 7 positiva (marcador de RD).
- Razão da espessura da parede vascular/diâmetro luminal (RMED): mede a espessura da túnica média das artérias.
- Resolução da icterícia em 6 meses após a portoenterostomia: apresentar bilirrubina total no sangue menor que 2mg/dL.
- Sistema ANGPT/Tie 2: sistema de fatores angiogênicos
- Sobrevida de fígado nativo em 2 anos após a portoenterostomia: não ter morrido nem ter sido transplantado neste período.

### 6.4 Coleta do material

O material histológico foi coletado por biópsia em cunha, durante a colangiografia transoperatória assistencial.

Foram coletados dois fragmentos de amostra de fígado, um deles foi colocado em um frasco contendo 1mL de RNA holder (BioAgency, Brazil) Este material foi armazenado ultracongelado a -80°C no Banco de Tecidos do LHEG para análise molecular. O outro fragmento foi colocado em formalina tamponada e parafinado no Serviço de Patologia do HCPA para análise histológica e imunohistoquímica.

## 6.5 Extração do RNA

Para a extração de RNA foi utilizado o reagente Brazol® (LGC Biotecnologia, Brasil). O material foi descongelado e cerca de 50 mg de fígado foram colocados em um homogeneizador de vidro juntamente com 1mL de Brazol® ou Trizol®. Foi feita a maceração completa do material, até não haver amostra visível (solução límpida). Todas as etapas do processo foram realizadas com temperatura próxima a 4°C. Após homogeneização completa, a solução foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5mL já contendo 166,66 µL de clorofórmio gelado. O tubo foi levado ao agitador do tipo vortéx por cerca de 2 minutos. O material foi centrifugado a 12.000xg a 4°C por 15 minutos. A seguir, foi retirado o sobrenadante, o qual foi transferido para um tubo eppendorf já contendo 1mL de isopropanol gelado. Foi repetida a etapa de agitação em vórtex. A amostra foi novamente centrifugada nas mesmas condições anteriores, porém por 20 min. O sobrenadante foi retirado, e o precipitado foi dissolvido com 30 µL de água livre de RNase.

## 6.6 Quantificação do RNA

A quantificação de RNA foi realizada no aparelho NanoDrop 1000 *Spectrophotometer*, (Thermo Scientific Unisciense, EUA). Foi utilizado 1 µL de amostra para a quantificação que foi expressa em ng de RNA/µL de solução. A amostra foi verificada em gel de agarose 1,5% para observar se não houve degradação do material.

## 6.7 DNA Complementar

Foi utilizado o *kit* cDNA *Superscript II e III RT*® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Em um tubo de 0,2 mL foi pipetado 1 µL de oligo(DT), 1 µL de DNTP 10mmol, 3µg de RNA e água de injeção até um volume final de 12 µL. O tubo foi levado ao termociclador a 65°C por 5 minutos. Após resfriamento rápido do tubo, foi pipetado 4

$\mu\text{L}$  de 5x first stand buffer, 2  $\mu\text{L}$  de DTT 0,1M e 1  $\mu\text{L}$  de RNase out. Novamente, a amostra foi levada ao termociclador a 42°C por 2 minutos. Adicionou-se 1  $\mu\text{L}$  de superscript II ou III e, então, o tubo foi incubado no termociclador à 42 °C por 50 minutos e à 70°C por 15 minutos.

### **6.8 Reação em cadeia da polimerase quantitativo – PCRq**

A PCR quantitativa é uma metodologia que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação de PCR. Durante a RQPCR, o acúmulo de amplicons é detectado em "tempo real", para cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas sequência-específicas ou primers usados na reação. O uso de transcrição reversa associada a PCR em tempo real tornou a quantificação de RNA mensageiro mais simples e precisa. A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação da fluorescência e captura da emissão, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação. Várias tecnologias de PCR em tempo real estão disponíveis no mercado. Os dois sistemas mais usados são o SYBR *Green* e o *TaqMan*. O SYBR *Green* é um corante que se liga ao sulco menor da fita dupla de DNA, tornando-o fluorescente. As vantagens de sua utilização incluem o fácil manuseio e o baixo custo. Durante os ciclos consecutivos de PCR, a quantidade de DNA de fita dupla se eleva de maneira exponencial, aumentando assim a quantidade de SYBR *Green* ligado e sua fluorescência. Entretanto, quando ocorre amplificação inespecífica ou amplificação de dímeros de *primers*, estes também são detectados, interferindo com a quantificação final dos produtos específicos da reação. Para avaliar se produtos de PCR inespecíficos foram formados na reação, uma curva de fusão é construída. Se apenas os produtos específicos de PCR foram amplificados, um único pico será visualizado no gráfico de fusão. Enquanto a reação de PCR se processa, a



polimerase sintetiza novas cadeias a partir dos *primers* e cliva a sonda correspondente, resultando em aumento do sinal fluorescente que é captado a cada ciclo até atingir um limiar (*threshold*), no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este limiar corresponde ao momento utilizado para análise da fluorescência. É um ponto definido pelo pesquisador e obrigatoriamente deve estar na faixa em que a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras torna-se significativamente maior que a fluorescência de base (*background*). O limiar é definido na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formada traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas molde de RNA mensageiro e de DNA complementar (mRNA/cDNA) amplificadas pela reação (ALMEIDA, SADDI, 2007).

Neste estudo foi utilizado o *kit SYBR Green ER SuperMix Universal® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)*. O procedimento foi realizado conforme protocolo do fabricante. Foram utilizados *primers* para Angiopietina 1 e 2 e para seu receptor TIE2 e para padrão interno S18. As sequências dos *primers* encontram-se no quadro 1. A reação de PCR foi conduzida no equipamento Step One (Life Technologies, USA) e a quantificação relativa foi feita através do método  $2^{\Delta\Delta CT}$  utilizando para cálculo o paciente com maior delta CT do grupo com colestase intra-hepática (menor expressão dos genes de interesse). (LYVAK, SCHMITTGEN, 2001)

## **6.9 Preparações histológica e imunohistoquímica**

As análises histológicas, imunohistoquímicas e de morfometria, foram feitas pelos autores em conjunto com um patologista do Laboratório de Patologia Experimental do HCPA (cegados para o diagnóstico dos casos em estudo). O material histológico hepático armazenado parafinizado foi utilizado na coloração com hematoxilina eosina (HE) na coloração de picrossirius. De cada amostra de tecido

também foram utilizados 3 secções de 5 µm de espessura, para reação com o anticorpo primário anti-citoqueratina7 (Dako, Glostrup, Denmark, diluição 1:100), empregado para delinear as estruturas biliares utilizando-se esta marcação para definir a extensão da reação ductular e anti ANGPT 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA diluição 1:100 – lâminas confeccionadas no Laboratório de Patologia Clínica da PUCRS). O anticorpo secundário utilizado foi anticorpo muliespécie, biotilado. A técnica imunohistoquímica, descrita a seguir, é a da avidina – biotina - peroxidase.

Inicialmente foi feita desparafinização do material e hidratação dos cortes, seguido de tratamento em microondas. Após a desparafinização foi feito:

- 1) bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada a 0,5% em água destilada;
- 2) exposição a leite desnatado a 5% em PBS
- 3) incubação com anticorpo primário e com anticorpo secundário em câmara úmida;
- 4) incubação com complexo avidina-biotina-peroxidase; revelação com substrato cromogênico (DAKO). A contra-coloração foi feita em hematoxilina.

### **6.10 Captura de imagens**

A captura de imagens foi feita por meio de um sistema de análise computadorizada de imagens presente no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas do HCPA. Essa estação inclui um fotomicroscópio (Olympus BX60) com captadores de posição, uma câmera CCD (Sony) com adaptador de câmera CNA-D2 (Sony), um computador com monitor em cores e mouse. A análise de imagem é processada com o *software Image-Pro Plus®*, da *Media Cybernetics*. São captadas aleatoriamente 10 imagens de cada lâmina e gravadas em dispositivo físico, no formato TIFF, para posterior mensuração. O aumento das imagens no microscópio para a avaliação das estruturas vasculares foi de 400x. A voltagem da lâmpada é mantida estável durante o processo de captura de imagens, permitindo a iluminação homogênea dos campos microscópicos.

### **6.11 Avaliação morfométrica das estruturas vasculares arteriais para medida de espessamento de parede arterial**

Após a captura de imagens de lâminas histopatologia coradas com hematoxilina - eosina (item 6.6), utilizando a ferramenta “extensão” (*length*) de programa específico, medimos a espessura de parede vascular a qual corresponde à média dos valores de 6 medidas de espessura obtidas a partir de uma linha traçada do eixo central e conectando um ponto localizado na interface média-adventícia e outro situado na interface média-íntima. O diâmetro luminal foi calculado como a média do comprimento de das linhas, cada uma traçada em dois pontos opostos cada um deles situado na interface média-intima representando o maior e o menor diâmetro.

A RMED foi baseada em Santos, et al.<sup>11</sup> e é utilizada para detectar o

espessamento da túnica média.

Na figura 7 estão grifadas as linhas utilizadas como medidas no cálculo da relação da espessura da túnica média com o diâmetro luminal (RMED).

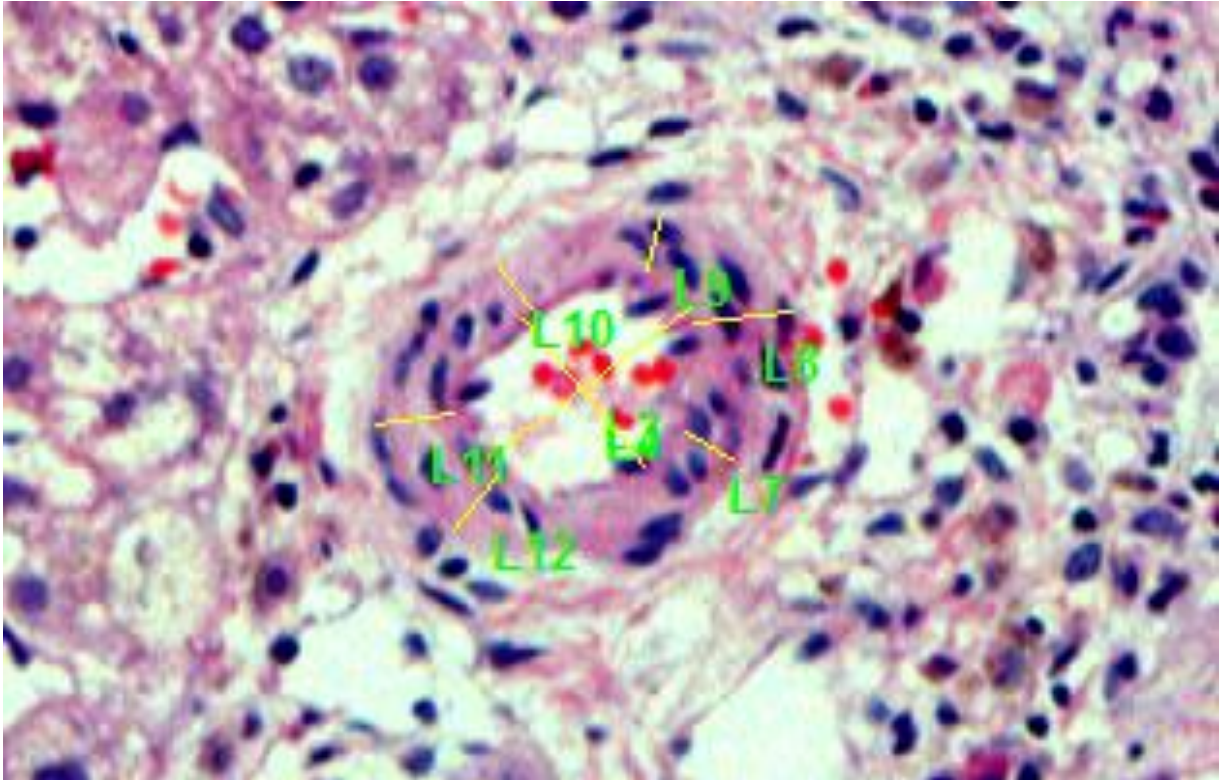


Figura 7 - cálculo da razão espessura da túnica média arterial/diâmetro luminal (RMED)

### **6.12 Análise da extensão da reação ductular por método morfométrico - quantificação da percentagem de estruturas CK7-positivas (PCK7)**

Este método foi previamente desenvolvido e descrito por Santos *et al*, 2005. A leitura do material marcado para CK-7 foi feita por método quantitativo. Medidas morfométricas foram analisadas usando o programa de computador Adobe *Photoshop CS3 Extended* 10.0 (Adobe Systems Inc., USA) em cada estrutura biliar de cada imagem salva. A área da imagem positiva para CK-7 foi medida em pixels. Para cada paciente, foi calculada a média de pixels encontrada nas 10 imagens. Em cada imagem foi calculada a relação da área de positividade com a área total medida em pixels utilizando-se a ferramenta *color range* do *software*. Foi selecionado um plano de fundo e um primeiro plano de cores, em seguida foi aplicada a ferramenta *grow* com o objetivo de amplificar o espectro da cor de interesse representando toda área positiva para CK7. A figura 8 demonstra uma imagem da interface do programa utilizado na análise morfométrica de uma lâmina onde os ductulos biliares estão marcados com citoqueratina 7.

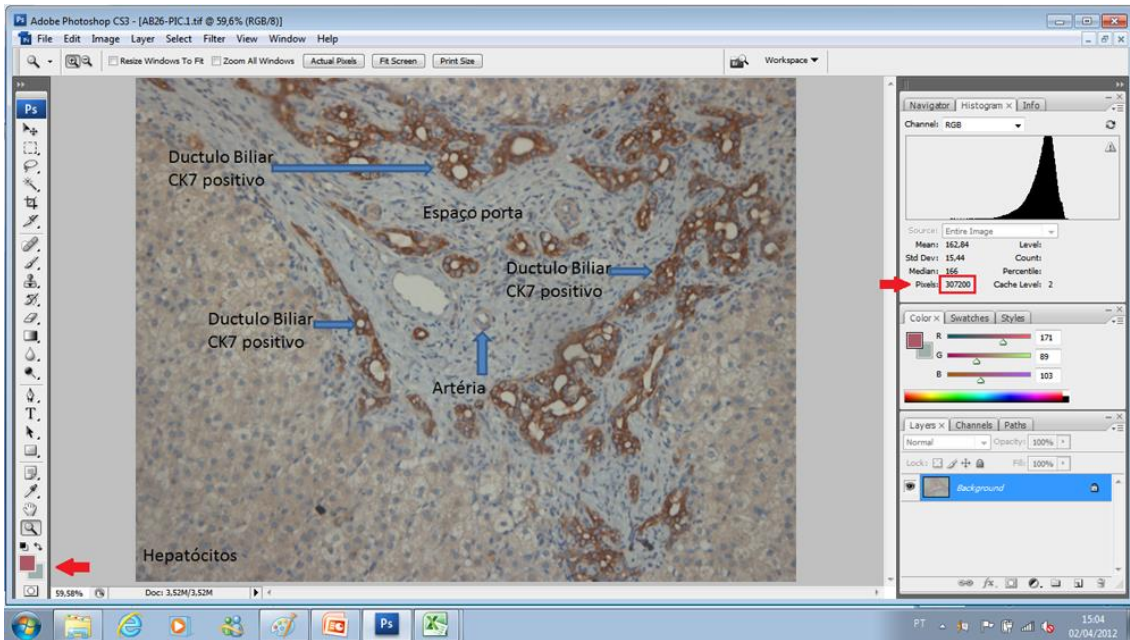


Figura 8 - interface do programa utilizado na análise morfométrica da reação ductular – PCK7. Estruturas biliares imunopositivas para citoqueratina 7 (cor marrom escura).

### 6.13 Escore histológico de fibrose – área de colágeno

A avaliação da extensão de fibrose, do ponto de vista histológico, foi realizada em lâminas marcadas com picrossírius de acordo com (MASSEROLI *et al*, 2000). A ACOL foi calculada através da razão entre a área corada com picrossírius (colágeno)/área total em pixels da imagem. Para cada imagem, utilizamos a ferramenta *color range* para marcar a coloração de picrossírius e o restante da coloração da imagem. Depois, foi aplicada a ferramenta *grow* para selecionar a área total com a coloração de picrossírius.

A seguir a figura 9 demonstra a interface do programa utilizado para análise morfométrica da extensão da deposição de colágeno.

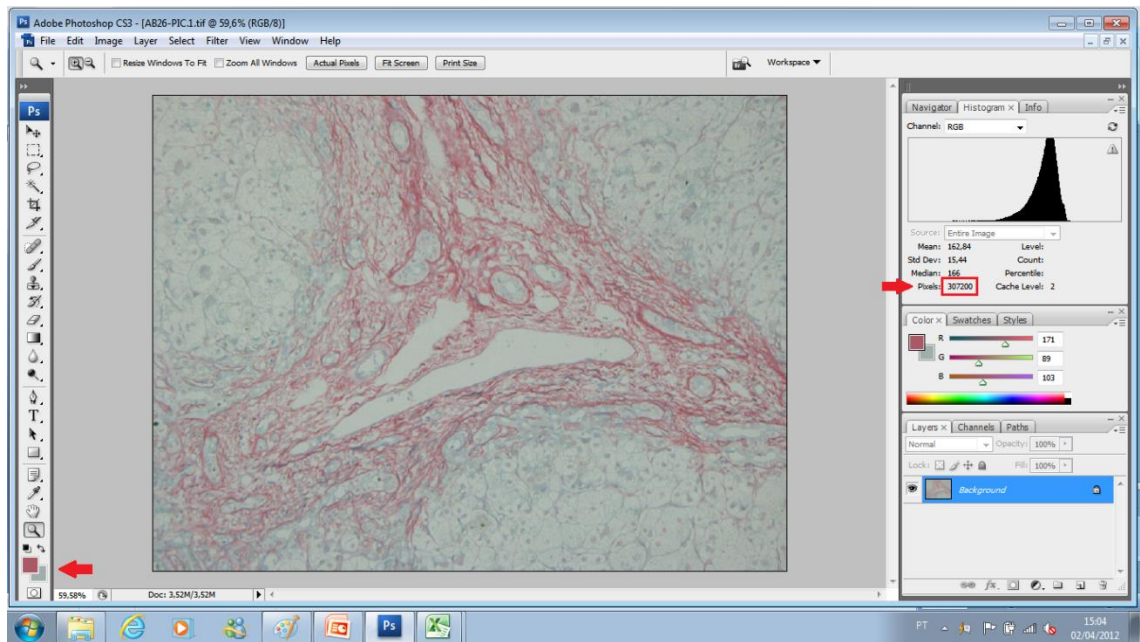


Figura 9 - interface do programa utilizado na análise morfométrica da extensão da área de deposição de colágeno – ACol. Cor vermelha.

### 6.14 Imunolocalização da Angiopietina 1

A intensidade da coloração de ANGPT 1 nas estruturas analisadas foi feita segundo WU, *et al.* 2004. Sendo zero sem coloração, 1 coloração fraca e 2 e 3 forte e muito forte respectivamente. Para fins de análise, consideramos como positivas as estruturas marcadas com coloração 2 ou 3.

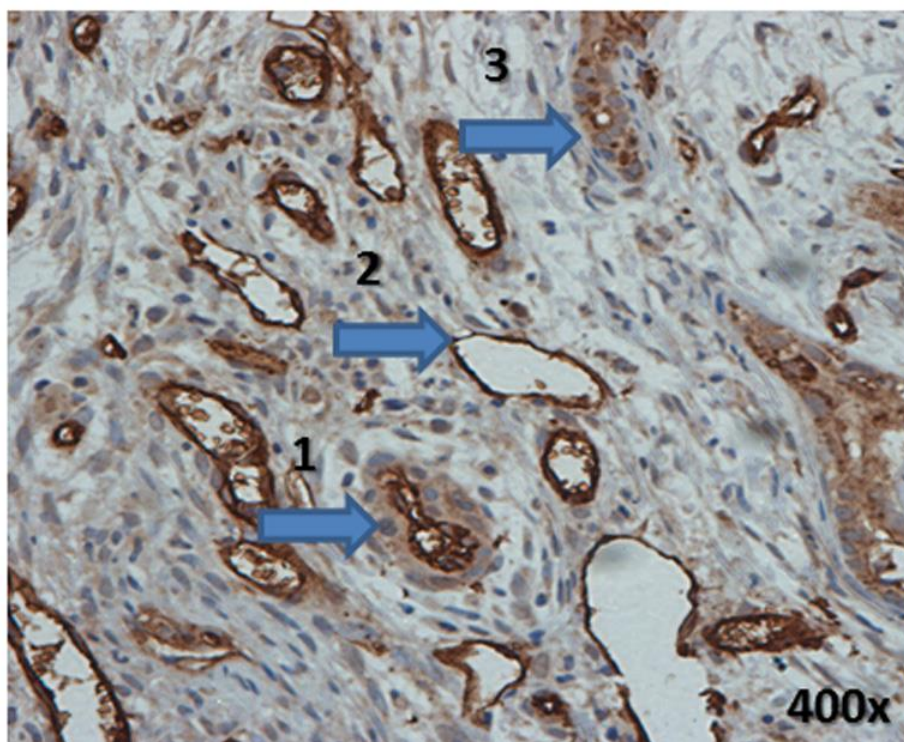


Figura 10 – Imunolocalização da ANGPT 1 na atresia biliar.

Legenda: 1 Túnica média (marcação 2); 2 endotélio venoso (marcação 3); 3 ducto biliar (marcação 2)



### **6.15 Análise estatística**

As variáveis qualitativas foram descritas com frequências e percentuais.

As variáveis quantitativas estão descritas em médias e desvio padrão ou medianas e mínimo/máximo.

Inicialmente os dados foram testados quanto à normalidade da distribuição pelo teste de Shapiro - Wilk.

O teste estatístico empregado na comparação entre grupos foi o teste não paramétrico de Mann Whitney. A interdependência entre variáveis foi avaliada pelo teste de correlação de Spearman.

A associação das variáveis em estudo com a perda de fígado nativo foi avaliada pela regressão de Cox, com *hazard ratio* e intervalo de confiança de 95%. Adicionalmente, utilizamos o teste exato de Fisher para avaliar o efeito das variáveis em estudo na perda de fígado nativo. Os dados foram transformados em escala logarítmica previamente à análise.

O nível de significância considerado foi de 5%.

Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas Excel (Windows) versão 2010 e (Statistical Package for Social Sciences) SPSS versão 20.0.

### **6.16 Considerações éticas**

Este trabalho foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós Graduação do Hospital Hospital de Clínicas de Porto Alegre (número 100023; data 20/04/2010). Os responsáveis pelos pacientes em estudo assinaram termo de consentimento livre e

esclarecido no momento da coleta do material e devido à utilização dos prontuários dos pacientes, os autores preencheram o termo de compromisso para utilização de dados.

### **6.17 Apoio Financeiro**

Este trabalho recebeu financiamento do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Evento (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adair TH, Montani JP. *Angiogenesis 2011* by Morgan & Claypool Life Sciences.
2. Alpert LI, Strauss L, Hirschhorn K. Neonatal hepatitis and biliary atresia associated with trisomy 17-18 syndrome. *N Engl J Med* 1969;280:16-20.
3. Altman RP, Lilly JR, Greenfeld J, Weinberg A, van Leeuwen K, Flanigan L. Altman RP. A multivariable risk factor analysis of the portoenterostomy (Kasai) procedure for biliary atresia. *Ann Surg* 1997;226:348–55.
4. Appleby J. Indwelling common duct tubes. *Journal of the International College of Surgeons* 1959; 31: 631–643.
5. Arıkan C, Berdeli A, Kilic M, Tıngor G, Yagci RV, Aydogdu S. Polymorphisms of the ICAM-1 gene are associated with biliary atresia. *Dig Dis Sci* 2008; 53:2000-4.
6. Balistreri WF, Bezerra JA, Jansen P, Karpen SJ, Shneider BL, Suchy FJ. Balistreri W. Intrahepatic cholestasis: summary of American Association for the study of liver diseases single-topic conference. *Hepatology* 2005; 42:222–234.
7. Balistreri WF, Grand R, Hoofnagle JH, Suchy FJ, Ryckman FC, Perlmutter DH, Sokol RJ. Biliary atresia: current concepts and research directions – summary of a symposium. *Hepatology* 1996; 23: 1682–1692.
8. Bharath N, Szabo G. Hypoxia and Hypoxia Inducible Factors: Diverse Roles in Liver Diseases. *Hepatology* 2012; 55(2): 622–633.
9. Bijil EJ, Bharwani RGJ, Houwen RA, Man de RA. The long term outcome of the Kasai operation in patients with biliary atresia: a systematic review. *Neth J Med* 2013, 71: 170-173.
10. Brough A, Bernstein J. Liver biopsy in the diagnosis of infantile obstructive jaundice. *Pediatrics* 1969; 43: 519–526.
11. Buffa V, Tancredi F, Pierro M, Guanti G. Case of trisomy of chromosome 18 associated with hypermethioninemia and biliary atresia. *Pediatrics (Napoli)*. 1972;80:159-69.
12. Caruso S, Miraglia R, Milazzo M, Maruzzelli L, Pasta A, Spada M, Riva S, Luca A, Gridelli B. Multidetector computed tomography hepatic findings in children with end-stage biliary atresia. *Eur Radiol* 2010; 20:1468–75.
13. Carvalho E, Ivantes CAP, Bezerra JA. Extrahepatic biliary atresia, etiopathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *J. Pediatr (Rio J)*. 2007; 83(2):105-120.
15. Carvalho E, Liu C, Shivakumar P, Sabla G, Aronow B, Bezerra JA. Analysis of the biliary transcriptome in experimental biliary atresia. *Gastroenterology* 2005;129:713-7.

16. Carvalho E, Santos JL, Seixas RBPM. Síndromes Colestáticas Familiares, em Hepatologia em Pediatria; 2012 296 – 328.
17. Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, Le Pommelet C, Golmard JL, Auvert B. Epidemiology of biliary atresia in France: a national study 1986-1996. *J Hepatology* 1999; 31: 1006-13.
18. Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, Pommelet C Le, Golmard JL, Reding R et al. Is the Kasai operation still indicated in children older than 3 months diagnosed with biliary atresia? *J Pediatr* 2001, 138 (2): 224-228.
19. Chu D, Sullivan CC, Du L, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, Weitzman MD, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. A new animal model for Pulmonary Hypertension based on the overexpression of a single gene, Angiopoietin-1. *Ann Thorac Surg* 2004;77:449–57.
20. Clajus C, Lukasz A, David S, Hertel B, Lichtinghagen R, Parikh SM, Simon A, Ismail I, Haller H, Kümpers P. Angiopoietin-2 is a potential mediator of endothelial barrier dysfunction following cardiopulmonary bypass. *Cytokine* 2012;60:352-9.
21. Copple BL, Bai S, Burgoon LD, Moon JO. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  regulates the expression of genes in hypoxic hepatic stellate cells important for collagen deposition and angiogenesis. *Liver Int* 2011;31:230-244.
22. Davenport M. Biliary atresia: clinical aspects. *Semin Pediatr Surg* 2012; 21(3):175-84.
23. Davenport M, Savage M, Mowat A, Howard E. Biliary atresia splenic malformation syndrome: an etiologic and prognostic subgroup. *Surgery* 1993;113: 662–668.
24. Davenport M, Tizzard SA, Underhill J, Mieli-Vergani G, Portmann B, Hadžic N. The biliary atresia splenic malformation syndrome: a 28-year single-center retrospective study. *J Pediatr* 2006;149:393-400.
25. Davenport M, Puricelli V, Farrant N, Hadzig N, Mieli-Vergani G, Portmann B et al. The outcome of the older ( $\geq 100$  days) infant with biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2004; 4: 575-581.
26. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87:1161-9.
27. De de Lorimier A A, Harrison MR, Adzick N. Pediatric Surgery. In: *Current Surgical Diagnoses & Treatment* 1994; 10th ed; 1228-1229.
28. Deltenre P, Valla DC. Ischemic cholangiopathy. *J Hepatol* 2006;44:806–17.
29. Desmet VJ. Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: variations on the theme ‘Ductal plate malformation’. *Hepatology* 1992;15:1069–83.

30. Desmet VJ; Ductal plates in hepatic ductular reactions. Hypothesis and implications. I. Types of ductular reaction reconsidered. In *Virchows Archives* 2011; 458; 251-259.
31. Drut R, Drut RM, Gómez MA, Cueto Rúa E, Lojo MM. Presence of human papillomavirus in extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 27:530-5.
32. 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;19:360–368
33. Fabris L, Cadamuro M, Fiorotto R, Roskams T, Spirli C, Melero S, Sonzogni A, Joplin RE, Okolicsanyi L, Strazzabosco M. Effects of angiogenic factor overexpression by human and rodent cholangiocytes in polycystic liver diseases. *Hepatology* 2006;43:1001–12.
34. 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; 27:57-64.
35. Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Ueno Y, Meininger CJ, Franchitto A, Onori P, Marzioni M, Taffetani S, Fava G, Stoica G, Venter J, Reichenbach R, De Morrow S, Summers R, Alpini G. Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology* 2006;130:1270–82.
36. Gelbmann CM, Rümmele P, Wimmer M, Hofstädter F, Göhlmann B, Endlicher E, Kullmann F, Langgartner J, Schölmerich J. Ischemic-like cholangiopathy with secondary sclerosing cholangitis in critically ill patients. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1221–9.
37. Goldberg A, Glotz D, Kalil J. Endotélio e sistema imune. In: Luz P, Laurindo F, Chagas A (eds.). *Endotélio e doenças cardiovasculares*. Atheneu: São Paulo. 2005. pp. 69-81.
38. Harpavat S, Finegold ML, Karpen SJ. Patients with biliary atresia have elevated direct/conjugated bilirubin levels shortly after birth. *Pediatrics* 2011; 128 (6): 1428-33.
39. Harper P, Plant JW, Unger DB. Congenital biliary atresia and jaundice in lambs and calves. *Aust Vet J* 1990; 67:18–22.
40. 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. In: Kasai M, editor. *Biliary Atresia and its Related Disorders- Proceedings of an International Symposium, Sendai, Japan*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1983. p.38–45
41. Hayashida M, Nishimoto Y, Matsuura T, Takahashi Y, Kohashi K, Souzaki R, Taguchi T. The evidence of maternal microchimerism in biliary atresia using fluorescent in situ hybridization. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 2097–101.

42. 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. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1993; 16: 53–60.
43. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284:1994-8.
44. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999;18:5356–62.
45. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-80.
46. Humphrey TM, Stringer MD. Biliary atresia: US diagnosis. *Radiology* 2007; 244:845.
47. Ikeda S, Sera Y, Ohshiro H, Uchino S, Akizuki M, Kondo Y. Gallbladder contraction in biliary atresia: a pitfall of ultrasound diagnosis. *Pediatr Radiol* 1998;28:451–3.
48. Ito T, Horisawa M, Ando H. Intrahepatic bile ducts in biliary atresia – a possible factor determining the prognosis. *J Ped Surg* 1983; 18: 124–130).
49. Jin S-W, Patterson C. The opening act vasculogenesis and the origins of circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:623-9.
50. Jin S-W, Patterson C. The opening act vasculogenesis and the origins of circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:623-9.
51. Kaewkiattiyot S, Honsawek S, Vejchapipat P, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. Association of X-prolyl aminopeptidase 1 rs17095355 polymorphism with biliary atresia in Thai children. *Hepatology Research*, 2011; 41: 1249-52.
52. Karamysheva A.F. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry* 2008; 73(7):751-762
53. Kasai M, Suzuki H, Ohashi E, Ohi R, Chiba T, Okamoto A. Technique and results of operative management of biliary atresia. *World J Surg* 1978;2:571–80.
54. Kim WS, Cheon JE, Youn BJ, Yoo SY, Kim WY, Kim IO, Yeon KM, Seo JK, Park KW. Hepatic arterial diameter measured with US: adjunct for US diagnosis of biliary atresia. *Radiology* 2007;245:549-55.
55. Klippel C. A new theory of biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1972; 7: 651–654.

56. Kobayashi H, Narumi S, Tamatani T, Lane GJ, Miyano T. Serum IFN-inducible protein-10: a new clinical prognostic predictor of hepatocyte death in biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1999; 34: 308–311.
57. Kobayashi K, Kubota M, Okuyama N, Hirayama Y, Watanabe M, Sato K. Mother-to-daughter occurrence of biliary atresia: a case report. *J Pediatr Surg* 2008; 43: 1566–68.
58. Kobayashi S, Nakanuma Y, Matsui O. Intrahepatic peribiliary vascular plexus in various hepatobiliary diseases: a histological survey. *Hum Pathol* 1994;25:940–6.
59. Kohsaka T, Yuan ZR, Guo SX, Tagawa M, Nakamura A, Nakano M, Kawasasaki H, Inomata Y, Tanaka K, Miyauchi J. The significance of human jagged 1 mutations detected in severe cases of extrahepatic biliary atresia. *Hepatology* 2002; 36:904-912.
60. Kono N, Nakanuma Y. Ultrastructural and immunohistochemical studies of the intrahepatic peribiliary capillary plexus in normal livers and extrahepatic biliary obstruction in human beings. *Hepatology* 1992;15:411–8.
61. Kory J, Lavine KJ, Long F, Choi K, Smith C, Ornitz DM. Hedgehog signaling to distinct cell types differentially regulates coronary artery and vein development. *Development* 2008;135:3161-3171.
61. Kume T. Specification of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells during embryonic development. *Histol Histopathol* 2010;25:637–646.
62. Landing B. Considerations of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst – the concept of infantile obstructive cholangiopathy. *Prog Pediatr Surg* 1974; 6:113–139.
63. Lee HC, Chang TY, Yeung CY, Chan WT, Jiang CB, Chen WF, Chan HW, Liu HF, Lin M, Lee YJ. Genetic variation in the vascular endothelial growth factor gene is associated with biliary atresia. *J. Clin Gastroentrol.* 2010; 44(2):135-9.
64. Lee MS, Kim MJ, Lee MJ, Yoon CS, Han SJ, Oh JT, Park YN. Biliary atresia: color Doppler US findings in neonates and infants. *Radiology* 2009; 252:282–89.
65. Li J, Bessho K, Shivakumar P, Mourya R, Mohanty SK, Dos Santos JL, Miura IK, Porta G, Bezerra JA. Th2 signals induce epithelial injury in mice and are compatible with the biliary atresia phenotype. *J Clin Invest.* 2011; 121(11):4244–4256.
66. Lilly J, Altman R. Hepatic portoenterostomy (the Kasai operation) for biliary atresia. *Surgery* 1975; 78: 76–86.
67. Linton M, Farrell P. Biliary atresia in newborn lambs in the Hume region. Faculty of Veterinary Science, University of Sydney (Comunicação pessoal).
68. Lykavieris P, Chardot C, Sokhn M, Gauthier F, Valayer J, Bernard O. Outcome in adulthood of biliary atresia: a study of 63 patients who survived for over 20 years with their native liver. *Hepatology* 2005, 41(2): 366-371.

69. Lysy PA, Sibille C, Gillerot Y, Smets F, Sokal EM. Partial proximal 10q trisomy: a new case associated with biliary atresia. *Hereditas* 2007; 144:191-4.
70. Maksem J. Polysplenia syndrome and splenic hypoplasia associated with extrahepatic biliary atresia. *Arch Pathol Lab Med* 1980; 104: 212–214.
71. Masseroli M, Caballero T, O'Valle F, Del Moral RM, Pérez-Milena A, Del Moral RG. Automatic quantification of liver fibrosis: design and validation of a new image analysis method: comparison with semi-quantitative indexes of fibrosis. *J Hepatol* 2000; 32:453-64.
72. McKiernan PJ, Baker AJ, Kelly DA. The frequency and outcome of biliary atresia in UK and Ireland. *Lancet*, 2000; 355: 25-9.
73. Medina J, Arroyo AG, Sánchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in Chronic Inflammatory Liver Disease. *Hepatology* 2004; 39 (5): 1185-1195.
74. Mieli-Vergani G.; Portmann B, Howard E, Mowat A. Late referral for biliary atresia- Missed opportunities for effective surgery. *Lancet* 1989; 25: 421–423.
75. Morisada T, Kubota Y, Urano T. Angiopoietins and Angiopoietin-Like Proteins in Angiogenesis. *Endothelium* 2006; 13:71-79
76. Moyer K, Kaimal V, Pacheco C, Mourya R, Xu H, Shivakumar P, Chakraborty R, Rao M, Magee JC, Bove K, Aronow BJ, Jegga AG, Bezerra JA et al. Research Staging of biliary atresia at diagnosis by molecular profiling of the liver. *Genome Medicine* 2010; 2:33, 1-13.
77. Moyer V, Freese DK, Whittington PF, Olson AD, Brewer F, Colletti RB, Heyman MB. Guidelines for the Evaluation of Cholestatic Jaundice in Infants: Recommendation of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 39:115-128.
78. Narayanaswamy B, Gonde C, Tredger JM, Hussain M, Vergani D, Davenport M. Serial circulating markers of inflammation in biliary atresia - evolution of the post-operative inflammatory process. *Hepatology* 2007; 46: 180-187.
79. Nath B, Gyongyi S. Hypoxia and Hypoxia Inducible Factors: Diverse Roles in Liver Diseases. *Hepatology* 2012; 55 (2):622–33.
80. Northover J. The anatomy of bile duct arterial supply and its surgical implications. *British Journal of Surgery* 1979; 66 (6): 379–384.
81. Novotny NM, Lahm T, Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, Wang Y, Tan J, Meldrum DR. Angiopoietin-1 in the treatment of ischemia and sepsis. *Shock* 2009; 31:335-41.
82. Nykänen AI, Pajusola K, Krebs R, Keränen MA, Raisky O, Koskinen PK, Alitalo K, Lemström KB. Common protective and diverse smooth muscle cell effects of AAV-



mediated Angiopoietin-1 and -2 Expression in rat cardiac allograft vasculopathy. *Circ Res* 2006;98:1373-80.

83. Ohi R, Mochizuki I, Komatsu K, Kasai M. Portal hypertension after successful hepatic portoenterostomy in biliary atresia. *J Ped Surg* 1986; 21: 271–274.

84. 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;35:745-7.

85. Pape L, Olsson K, Petersen C, von Wasilewski R, Melter M. Diagnostic value of computerized quantification of liver fibrosis in children with biliary atresia. *Liver Transplantation*, 2009, 15: 876-882.

86. Riepenhoff-Talty M, Schaekel K, Clark HF, Mueller W, Uhnnoo I, Rossi T, Fisher J, Ogra PL. Group A rotaviruses produce extrahepatic biliary obstruction in orally inoculated newborn mice. *Pediatr Res* 1993; 33:394-9.

87. Rosmorduc O, Wendum D, Corpechot C, Galy B, Sebbagh N, Raleigh J, Housset C, Poupon R. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am J Pathol* 1999;155:1065–73.

88. Rubin C, Gur G, Yarden Y. Negative regulation of receptor tyrosine kinases: unexpected links to c-Cbl and receptor ubiquitylation. *Cell Res* 2005;15:66-71.

89. Santos JL, Carvalho E, Seixas RBPM. Colestase Neonatal, em *Hepatologia em Pediatria*; 2012; cap 11: 219-26.

90. Santos JL, Carvallho E, Bezerra JA, 2010. Advances in biliary atresia: from patient care to research. *Braz Med Biol Res* 2010; 43: 522-7.

91. Santos JL, Choquette M, Bezerra JA. Cholestatic liver disease in children. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010; 12:30–39.

92. 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; 40:637-42.

93. Santos JL, Kieling CO, Meurer L, Vieira S, Ferreira CT, Lorentz A, Silveira TR 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.

94. Santos JL; Silveira TR. Atresia Biliar, *Hepatologia em Pediatria*; 2012 cap 12: 263-295.

95. Sinkai M, Ohhama Y, Tak H, Kitagawa N, Kudo H, Mochizuki K et al. Long term outcome of children with biliary atresia who were not transplanted after the Kasai

operation: >20- year experience at a children's hospital. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 48: 443-50.

96. Shneider BL, Brown MB, Haber B, Whittington PF, Schwarz K, Squires R, Bezerra J, Shepherd R, Rosenthal P, Hoofnagle JH, Sokol RJ. For the Biliary Atresia Research Consortium. A multicenter study of the outcome of the biliary atresia in the United States, 1997-2000. *J Pediatrics* 2006; 148: 467-74.

97. Schweizer P, Kiershner HV, Schittenhelm C. Anatomy of the porta hepatis as rational basis for the hepatoportoenterostomy. *Eur J Pediatr Surg* 1999; 9:13-18.

98. Serinet MO, Wildhaber BE, Broué P, Lachaux A, Sarles J, Jacquemin E, Gauthier F, Chardot C. Impact of age at Kasai operation on its results in late childhood and adolescence: a rational basis for biliary atresia screening. *Pediatrics* 2009; 123:1280-6.

99. Shuang Cui S, Leyva Veja M, Tsai EA, 2013. Evidence From Human and Zebrafish That GPC1 Is a Biliary Atresia Susceptibility Gene. *Gastroenterology* 2013; 144:1107-1115.

100. Silveira T, Salzano F, Donalson P, Mieli-Vergani G, Howard E, Mowat A. Association between HLA and extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16: 114-117.

101. Silveira T, Salzano F, Howard E, Mowat A. The relative importance of familial, reproductive and environmental factors in biliary atresia: etiological implications and effect on patient survival. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1992; 25: 673-681.

102. Silveira T. Atresia de vias biliares extra-hepática: epidemiologia, história clínica e associação com fatores genéticos [tese de doutorado]. Porto Alegre: Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1988.

103. Sokol RJ, Mack C. Etiopathogenesis of biliary atresia. *Semin Liver Dis* 2001; 21:517.

104. Steele MI, Marshall CM, Lloyd RE, Randolph VE. Reovirus 3 not detected by reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction analysis of preserved tissue from infants with cholestatic liver disease. *Hepatology* 1995; 21:697-702.

105. Stowens D. Congenital biliary atresia. *Am J Gastroenterol* 1959; 32: 577-590.

106. Stringer MD, Davison SM, Rajwal SR, McClean P. Kasay portoenterostomy:12 year experience with a novel adjuvante therapy regimen, *J Pediatr Surg*, 2007; 42: 1324-8.

107. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996, 87: 1171- 1180.

108. Taura K, De Minicis S, Seki E, Hatano E, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Miura K, Ikai I, Uemoto S, Brenner DA. Hepatic Stellate Cells Secrete Angiopoietin 1 That Induces Angiogenesis in Liver Fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 135: 1729-1738.
109. Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, Alitalo K, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Stewart DJ. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res* 2001; 49:659–70.
110. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999;286:2511–4.
111. Thurston G. Role of angiopoietin and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res*, 2003, 314: 61-68.
112. Tucker RM, Hendrickson RJ, Mukaida N, Gill RG, Mack CL. Progressive Biliary Destruction is Independent of a Functional Tumor Necrosis Factor- alpha Pathway in a Murine Model of Biliary atresia. *Viral Immunology*, 2007; 20(1): 34-43.
113. Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus SM, Le M, Karrer FM, Narkewicz MR, Tyson RW, Murphy JR, Low R, Brown WR. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology* 1998; 27:1475–82.
114. Udomsinprasert W, Tencomnao T, Honsawek S, Anomasiri W, Vejchapipat P, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. +276 G/T single nucleotide polymorphism of the adiponectin gene is associated with the susceptibility to biliary atresia. *World J Pediatr* 2012, 8 (4) 328-334.
115. Uflacker R, Pariente DM. Angiographic findings in biliary atresia. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2004; 27: 486-490.
116. Washington K, Clavien P, Killenberg P. Peribiliary vascular plexus in primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis. *Hum Pathol* 1997;28:791–5.
117. Weerasooriya V, White F, Shepherd R. Hepatic fibrosis and survival in biliary atresia. *J Pediatr* 2004; 144:123-115.
118. Wehrle C, Van Slyke P, Dumont DJ. Angiopoietin-1-induced ubiquitylation of Tie2 by c-Cbl is required for internalization and degradation. *Biochem J* 2009; 423:375-80.
119. Wong KK, Chung PH, Chan IH, Lan LC, Tam PK. Performing Kasai portoenterostomy beyond 60 days of life is not necessarily associated with a worse outcome. *JPGN* 2010; 51 (5): 01– 04.
120. Woo KV, Baldwin HS. Role of Tie1 in shear stress and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2011; 21:118–123.

121. Wu AW, Gu J, Li ZF, Ji JF, Xu GW. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10:2323-6.
122. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factor and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242–248.
123. Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Uemura M, Masaki T, Fukui H. Angiopoietin 2 displays a vascular endothelial growth factor dependent synergistic effect in hepatocellular carcinoma development in mice. *Gut* 2005; 54:1768-75.
124. Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Ikenaka Y, Kitade M, Kaji K, Yoshii J, Yanase K, Yamazaki M, Asada K, Tsujimoto T, Akahane T, Uemura M, Fukui H. Angiotensin-II and vascular endothelial growth factor interaction plays an important role in rat liver fibrosis *Hepatol Res* 2006; 36:124-9.

## 8. ARTIGO CIENTÍFICO

Angiopietina 1 e angiopietina 2 são associadas ao espessamento da túnica média de ramos arteriais hepáticos na atresia biliar

Aline F de Souza<sup>1,2</sup>, Luise Meurer<sup>3,4</sup>, Themis R da Silveira<sup>1,2</sup>, Cleandra Gregório<sup>2</sup>, Carolina Uribe<sup>5</sup>, Ursula Matte<sup>1,5</sup>, Jorge Luis dos Santos<sup>1,6</sup>.

<sup>1</sup> Curso de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Patologia, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Patologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>5</sup> Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>6</sup> Curso de Pós Graduação em Gastroenterologia e Hepatologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

## RESUMO

A atresia biliar (AB) é uma doença da infância caracterizada por uma colangiopatia esclerosante progressiva que leva à obstrução biliar. O tratamento de escolha é a portoenterostomia, cujo prognóstico é relacionado à idade do paciente na época da cirurgia e a variáveis histológicas como a extensão da fibrose e da reação ductular. O espessamento da túnica média (TM) sugere uma arteriopatia na patogenia da AB. Nós avaliamos a expressão do sistema angiopoietina (ANGPT)/receptor Tie2 no fígado de pacientes com AB e com colestase intra-hepática (CIH), correlacionando com espessamento da TM, com variáveis associadas a gravidade da doença e com o prognóstico pós operatório. **Métodos** - a expressão da ANGPT 1, ANGPT 2 e Tie 2 foi feita com o método de PCR quantitativo em amostras de fígado obtidas de pacientes com AB (n23) na ocasião da portoenterostomia e de crianças de idade semelhante com CIH (n7). As variáveis histológicas foram analisadas por método morfométrico. **Resultados** - a ANGPT 1 e a ANGPT 2 apresentaram expressão aumentada no grupo com AB em comparação com o grupo com CIH (P=0,024 e P=0,029, respectivamente). No grupo com AB, a expressão das ANPTs correlacionou-se positivamente com a espessura da TM (ANGPT 1:  $r_s=0,59$ , P=0,013; ANGPT 2:  $r_s=0,52$ , P=0,032) e não teve correlação com variáveis associadas a gravidade da doença. O Tie2 e as ANGPTs correlacionaram-se negativamente (ANGPT 1:  $r_s=-0,73$ , P<0,001; ANGPT 2:  $r_s=-0,054$ , P=0,007). **Conclusão** - Na AB há uma expressão aumentada da ANGPT 1 e da ANGPT 2 e uma correlação positiva desta expressão com a espessura da TM, mas, não com a idade na ocasião da portoenterostomia ou com variáveis histológicas associadas com a gravidade da doença na época do procedimento.

## INTRODUÇÃO

A AB é uma doença hepatobiliar infantil caracterizada por obstrução dos ductos biliares associada a uma colangiopatia esclerosante progressiva. O tratamento inicial da AB é a portoenterostomia, a qual deve ser realizada assim que possível tendo em vista que as chances de sucesso a longo prazo diminuem conforme aumenta a idade na qual a cirurgia é feita (1). Adicionalmente à idade da portoenterostomia, achados histológicos observados nas biópsias coletadas na época do procedimento, como as extensões da fibrose e da reação ductular representam variáveis associadas com a gravidade da doença e podem ajudar a prever o prognóstico pós-operatório (2).

Independente da portoenterostomia, a AB pode induzir cirrose devido ao processo de colangiopatia esclerosante contínuo, fazendo desta doença a principal causa de transplante hepático (TxH) infantil. A etiologia desta colangiopatia permanece desconhecida e a AB parece representar mais um fenótipo do que uma doença única. Nosso grupo está interessado na pesquisa do papel de uma arteriopatia no desenvolvimento da AB, tendo em vista que achados arteriográficos (3), ultrassonográficos (4-6), de tomografia computadorizada (7), histológicos (8) e imunoistoquímicos (9) evidenciam espessamento da túnica média nos ramos da artéria hepática levando a um remodelamento vascular associado a hipóxia/isquemia no espaço porta e no *porta hepatis*. O conhecimento do comportamento das moléculas angiogênicas no fígado de pacientes doentes pode ser um importante elemento na compreensão da AB e da sua resposta à portoenterostomia. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento do sistema Angiopietina (ANGPT)/receptor tirosinaquinase com domínios de imunoglobulina-*like* e de fator de crescimento epidermal (FCE)-*like* 2 (Tie 2), moléculas envolvidas na maturação da parede vascular, no fígado de pacientes com AB. Estes parâmetros biomoleculares foram

correlacionados também com a ocorrência de espessamento da túnica média, com variáveis clínicas e histológicas associadas com a gravidade da doença e com o desfecho pós operatório. Nossa hipótese era que a ANGPT 1 e seu receptor Tie 2 teriam expressão aumentada no fígado de pacientes com AB em comparação com casos de colestase intra-hepática (CIH) e que sua expressão na AB teria correlação positiva com o espessamento da TM e com variáveis associadas à gravidade da doença, afetando o prognóstico pós operatório.

## **PACIENTES E MÉTODOS**

Os pacientes em estudos foram 23 com AB e 7 com CIH, avaliados na data da laparotomia exploradora que precedeu a portoenterostomia nos casos de AB. As causas de CIH englobaram hepatite neonatal idiopática (n=4) e deficiência de alfa 1 antitripsina (n=3). Durante o procedimento, duas amostras de tecido foram coletadas do seguimento IV do fígado. A primeira foi imediatamente colocada em um tubo contendo 1mL de RNA *holder* (BioAgency, Brasil) e sequencialmente armazenado em freezer a -80°C para análise de expressão do RNA. A segunda amostra de tecidos foi colocada em formalina e posteriormente emblocada em parafina para análise histológica.

### **PCR quantitativo (PCR q)**

#### **Extração de RNA e confecção do DNA complementar (cDNA)**

O RNA foi extraído de 50 mg de tecido usando o Brazol (Labtrade, Brasil). Resumidamente, as amostras foram maceradas com 1mL de Brazol. O cDNA foi gerado usando 3 µg de RNA usando o *Kit cDNA Superscript I e II RT* (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo as instruções do fabricante.



## **PCRq**

O PCRq foi feito utilizando o *Kit cDNA Superscript II e III RT (Invitrogen, Carlsbad, CA)*. Os *primers* utilizados (ANGPT 1, ANGPT 2, Tie 2) e o gene de controle S18, sua temperatura de anelamento e o seu tamanho estão na tabela 1. A reação de cadeia de polimerase (PCR) foi conduzida no *StepOne (Life Technologies, Carlsbad, CA)* e a quantificação relativa foi feita pelo método  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .

## **Avaliação Morfométrica das variáveis histológicas**

### **Preparação das Amostras e Captura das imagens**

De cada amostra de tecido emblocada em parafina, secções de 5  $\mu\text{m}$  foram obtidas para a coloração de hematoxilina-eosina, picrossirius e para imunistoquímica de citoqueratina 7 (CK7; *Dako, Glostrup, Denmark*; diluição 1:100) e para ANGPT1 (*R&D Systems, Minneapolis, MN*; diluição 1:100). A imunomarcação foi amplificada usando o complexo avidina – biotina peroxidase, como descrito previamente (11), sendo o anticorpo secundário um anticorpo multi-espécie (Easy Path; Erviegas Ltd, São Paulo Brasil). Lâminas com coloração hematoxilina-eosina foram usadas para avaliar morfometricamente a razão “espessura da TM/diâmetro luminal” (RMED) com o objetivo de descrever espessamento de TM enquanto que aquelas coradas com picrossirius foram utilizadas para descrever a área de deposição de colágeno para analisar a extensão da fibrose. As lâminas coradas com CK7 foram utilizadas para determinar a reação ductular através do percentual de positividade de CK7 (PCK7). A captura de imagens foi feita no fotomicroscópio Olympus BX51 equipado com uma câmera digital (Olympus BX 60). Foram capturadas, randomicamente, 10 imagens de cada lâmina, em aumento de 200X, para análise morfométrica. Essas imagens

continham ramos arteriais, áreas de fibrose e de reação ductular. A análise morfométrica foi feita com o programa *Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0* (*Adobe Systems Inc., San Jose, CA*). O pesquisador responsável pela análise morfométrica permaneceu cegado para a condição clínica do paciente.

#### **Razão da espessura da túnica média/diâmetro luminal (RMED)**

A RMED foi avaliada como descrito previamente (8). A espessura da túnica média e o diâmetro luminal foram avaliados utilizando a ferramenta de media manual do *software*. Para cada vaso, a espessura arterial foi calculada como a média de 6 medidas da parede vascular, cada uma obtida por uma linha traçada do eixo central e conectando um ponto localizado na interface média-adventícia e outro situado na interface média-íntima. O diâmetro luminal foi calculado como a média do comprimento de das linhas, cada uma traçada em dois pontos opostos cada um deles situado na interface média-intima representando o maior e o menor diâmetro.

#### **Percentagem de positividade de citoqueratina 7 (PCK7)**

A avaliação da PCK7 foi feita como descrita previamente (2). A medida da PCK7 foi feita em pixels utilizando-se a ferramenta *color range* do programa de análise de imagem. Foi selecionado um plano de fundo e um primeiro plano de cores, em seguida foi aplicada a ferramenta *grow* com o objetivo de amplificar o espectro da cor de interesse representando toda área positiva para CK7. O total de pixels por imagem permaneceu constante em todos os campos para as amostras analisadas. A PCK7 foi calculada, em cada imagem, através da razão "área de positividade de CK7/total de pixels da imagem".

### **Área de deposição de colágeno**

A ACOL foi realizada em lâminas marcadas com picrossírius como previamente descrito (12). A ACOL foi calculada através da razão entre a área corada com picrossírius (colágeno)/área total em pixels da imagem. Para cada imagem, utilizamos a ferramenta *color range* para marcar a coloração de picrossírius e o restante da coloração da imagem. Foi selecionado um plano de fundo e um primeiro plano de cores (picrossírius), em seguida foi aplicada a ferramenta *grow* com o objetivo de amplificar o espectro da cor de interesse representando toda área positiva para picrossírius. O total de pixels por imagem permaneceu constante em todos os campos para as amostras analisadas.

### **Imunolocalização da ANGPT 1**

A imunolocalização histológica da ANGPT 1 foi feita por um patologista cego para a condição clínica do paciente, utilizando o método semi-quantitativo descrito previamente (13).

### **Avaliação do desfecho pós operatório**

O desfecho pós-portoenterostomia foi avaliado como resolução da icterícia nos primeiros 6 meses depois da cirurgia e pela perda do fígado nativo (transplante ou óbito) nos dois anos seguintes do procedimento. Os dados clínicos foram coletados retrospectivamente pelos autores deste estudo.

### **Análise estatística**

As variáveis quantitativas foram expressas com média  $\pm$  DP ou mediana (mínimo-máximo). Dados categóricos foram expressos como frequências e percentagens.

O teste estatístico empregado na comparação entre grupos foi o teste não paramétrico de Mann Whitney. A interdependência entre variáveis foi avaliada pelo teste de correlação de Spearman.

A associação das variáveis em estudo com a perda de fígado nativo foi avaliada pela regressão de Cox, com *hazard ratio* e intervalo de confiança de 95%. Adicionalmente, utilizamos o teste exato de Fisher para avaliar o efeito das variáveis em estudo na perda de fígado nativo. Os dados foram transformados em escala logarítmica previamente à análise.

O nível de significância considerado foi de 5%.

Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas Excel (Windows) versão 2010 e (*Statistical Package for Social Sciences*) SPSS versão 20.0.

### **Ética**

Este trabalho foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital Hospital de Clínicas de Porto Alegre em 20 de abril de 2010.

### **RESULTADOS**

Este estudo incluiu pacientes submetidos à laparotomia exploradora como parte da investigação de colestase neonatal entre dezembro de 2006 e março de 2011. O grupo de pacientes com AB foi composto por 7 meninos e 16 meninas com idades entre 68 (19-110) dias de vida por ocasião da portoenterostomia, enquanto que o grupo de CIH foi composto de 7 meninos com idade de 81 (39-147) dias de vida, sem diferença estatística entre os grupos quanto ao sexo e à idade em que forma submetido à biópsia hepática ( $P=0,381$ ). No grupo com AB, todos os pacientes apresentavam a forma isolada de AB e tinham sorologia para CMV IgM negativa no momento da coleta do

material. A idade da maioria dos pacientes do grupo com AB (n=13; 56%) esteve entre 60-89 dias de vida, enquanto que 8 (35%) tinham idade menor de 60 dias de vida e apenas 2 (8,5%) foram submetidos à cirurgia depois de 90 dias de vida. Nenhum paciente em estudo era prematuro, apresentava sepse ou fazia uso de nutrição parenteral total.

### **Expressão gênica**

A expressão gênica, avaliada pelo método exponencial  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , da ANGPT1, no grupo com AB, foi de 92,9 (2,1 - 23493,9) enquanto que no grupo com CIH foi de 14,6 (1 - 32,5), ocorrendo uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (P=0,024) (Figura1).

A expressão gênica da ANGPT2 foi 136,0 (0,1 - 14076,5) no grupo com AB e 14,6 (1 - 32,7) no grupo com CIH, havendo uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (P=0,029) (Figura2).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos AB [3444,3 (9,5 - 90147,5)] e CIH 10369 [(1,0 - 25521,7) (P=0,501)] com relação à expressão gênica do Tie 2.

### **Avaliação morfométrica**

A área de deposição de colágeno nos pacientes com AB foi de 24,1 (2,6 - 38,7)% enquanto que no grupo com CIH foi 13,1 (5,3 - 29,6) sem diferença estatística entre os grupos (P=0,275). A PCK7 foi de 7,5 (1,7 - 15,1)% no grupo com AB e de 3,1 (2,3 - 5,4)% no grupo com CIH também sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (P=0,065). Entretanto, os pacientes com AB pareceram apresentar valores mais altos (Tabela 2).

## **Correlação da expressão gênica com variáveis associadas à gravidade da AB**

Quando avaliamos a interdependência entre a expressão gênica do sistema ANGPT/Tie2 e a RMED bem como variáveis associadas à gravidade da AB (idade na portoenterostomia, ACOL e PCK7), o único parâmetro que apresentou correlação positiva com a expressão de ANGPT 1 e de ANGPT 2 foi a RMED, em ambos os casos apresentando correlação moderada positiva (ANGPT 1  $r_s=0,59$ ;  $P=0,013$  e ANGPT 2  $r_s=0,52$ ;  $P=0,032$ ). Não houve correlação entre o sistema ANGPT/Tie 2 e variáveis associadas à gravidade da AB (idade na portoenterostomia, ACOL e PCK7). Uma correlação inversa foi verificada entre a expressão do Tie 2 a expressão da ANGPT 1 ( $r_s=-0,73$ ;  $P<0,001$ ) e da ANGPT2 ( $r_s=-0,54$ ;  $P=0,007$ ). Relativamente às variáveis associadas à gravidade da AB, a PCK7 correlacionou-se positivamente com idade na portoenterostomia ( $r_s=0,7$ ;  $P=0,002$ ) e com a ACOL ( $r_s=0,55$ ;  $P=0,022$ ) (Tabela 3).

Adicionalmente, dividimos o grupo de pacientes com AB em dois grupos de acordo com uma expressão gênica de ANGPT 1 maior ou menor que 3 vezes o maior valor de expressão gênica da ANGPT 1 no grupo com CIH e comparamos a espessura da TM avaliada pela RMED entre esses dois grupos. Nós observamos que os pacientes com expressão de ANGPT 1 maior apresentaram valores de RMED de 1,2 (0,5 - 2,8), enquanto aqueles com expressão menor de ANGPT1 apresentaram valores menores de RMED 0,9 (0,4 - 1,5), sem diferença estatística entre os grupos, porém demonstrando uma significância limítrofe ( $P=0,068$ ) (Figura 3).

### **Efeito das variáveis em estudo sobre o prognóstico pós-portoenterostomia**

Neste estudo, 10 de 23 (43,5%) dos pacientes, morreram ou foram submetidos a TxH nos dois primeiros anos depois da portoenterostomia, com uma idade de 309 (189 - 512) dias. A sobrevida com seu fígado em dois anos foi de 46,5%. Nenhuma variável em estudo, incluindo o sistema ANGP/Tie 2, idade na portoenterostomia, RMED, PCK7 e ACOL influenciaram a ocorrência de morte ou TxH no segundo ano pós operatório (Tabela 4). Nove de 23 (39%) dos pacientes tinham bilirrubina total menor que 2,0 mg/dL em seis meses após a portoenterostomia. Este dado, não foi afetado por nenhuma das variáveis em estudo (Tabela 5).

### **Imunolocalização da ANGPT1**

A imunolocalização da ANGPT1 ocorreu no endotélio arterial, venoso e sinusoidal de 100% dos pacientes em ambos os grupos (AB e CIH). Esta positividade também ocorreu na TM e nas estruturas biliares de 14 e 50% dos pacientes com AB respectivamente, enquanto que apenas 1 paciente com CIH tinha estruturas biliares marcadas (Figura 4).

### **DISCUSSÃO**

A angiogênese é parte não apenas da embriogênese normal, mas também, da patogênese de diversas doenças, entre elas, as doenças hepáticas. O oxigênio (O<sub>2</sub>) desempenha um papel fundamental na regulação da angiogênese e do VEGF A, o principal fator angiogênico. Quando induzido por hipóxia, o VEGF estimula a formação de novos vasos procurando reestabelecer um fornecimento adequado de O<sub>2</sub> aos tecidos. No fígado, fibrogênese e angiogênese são processos intimamente relacionados. A cirrose desarranja a vasculatura normal dos hepatócitos limitados aos nódulos fibróticos, sofrendo de hipóxia constante e mantendo a produção de VEGF A. Adicionalmente, o

VEGF A induz reação ductular e fibrogênese (15). Alterações estruturais e mecânicas desencadeadas pela hiperplasia das células hepáticas promovem um bloqueio dos vasos hepáticos, perpetuando o processo cirrótico.

As colangiopatias apresentam comemorativos específicos em relação aos vasos sanguíneos, tendo em vista que os ductos biliares são nutridos exclusivamente pelo plexo vascular peribiliar formado por ramos da artéria hepática (16). O plexo vascular peribiliar é anormal em desordens como a colangite esclerosante (17) e algumas doenças atribuídas a colangiopatia isquêmica (18). Entretanto, em muitas doenças, o papel patogênico de distúrbios dos ramos arteriais persiste não esclarecido (19,20). A AB é uma colangiopatia de causa desconhecida. Ela afeta os ductos biliares intra- e extra-hepáticos e, geralmente, resulta em cirrose independente da realização da portoenterostomia em tempo hábil (1).

Nosso grupo avaliou o papel de uma arteriopatia na etiopatogenia da AB tendo em vista que pacientes com AB apresentam espessamento da TM em ramos arteriais hepáticos, o qual é progressivo desde a portoenterostomia até o TxH. As artérias apresentam-se espessadas e distorcidas no *porta hepatis* (8,9). Na AB, há evidências arteriográficas precoces de ramos arteriais hepáticos periféricos distróficos, com contornos irregulares e imagens sugestivas de oclusão (3). Estudos tomográficos e ultrassonográficos demonstram um lúmen arterial hepático alargado no *porta hepatis* sugerindo a presença de um bloqueio ao fluxo sanguíneo ao nível dos vasos intra-hepáticos (4-7). A expressão imunoistoquímica do VEGF A no fígado de pacientes com AB é localizada nas paredes das artérias e nos ductos biliares nos espaços porta e no *porta hepatis* sugerindo a presença de hipóxia nestes locais. A presença de VEGF A por ocasião da portoenterostomia é relacionada ao espessamento da TM (9). Os mecanismos envolvidos nas anormalidades vasculares arteriais da AB devem ser



completamente investigados, levando a uma definição do papel de uma colangiopatia isquêmica na etiologia da doença.

Nas condições normais e patológicas, seguindo a vasculogênese inicial induzida por VEGF, os novos vasos sofrem maturação adicional e estabilização da parede vascular através da ação de moléculas como as do sistema ANGPT/Tie2. A ANGPT 1 induz fosforilação do receptor Tie 2, promovendo sua ativação, enquanto a ANGPT 2 inibe competitivamente o Tie 2 (21,22). A ANGPT 1 promove interação entre as células endoteliais e as células de suporte, levando a um recrutamento de pericitos e de células musculares lisas para formar novos vasos. Ela também está envolvida da diminuição da inflamação e da permeabilidade vascular (23), agindo sinergicamente com o VEGF não somente na angiogênese como na imunidade com o intuito de integrar as respostas inflamatória e angiogênica.

Algumas citocinas induzidas pela ANGPT 1 estimulam a expressão de VEGF, potencializando a neovascularização de tecidos (24). Em modelos animais, a expressão aumentada de ANGPT 1 e VEGF promovem a proliferação de vasos alargados na pele (25). A expressão aumentada isolada da ANGPT 1 em ratos leva à hipertensão pulmonar com espessamento da TM em arteríolas. Angiografias pulmonares dos animais afetados demonstram bloqueio das arteríolas periféricas (26). Como estes achados se assemelham aos da AB evidenciados na histologia (8) e na arteriografia (3) dos pacientes afetados, conduzimos este estudo com o objetivo de verificar a expressão da ANGPT 1 no fígado de pacientes com AB.

Nós observamos que na AB há uma expressão aumentada de ANGPT 1 em relação aos pacientes com CIH e que a expressão desta molécula está associada ao espessamento da TM. Adicionalmente, dividindo o grupo de pacientes com AB em 2

subgrupos, um com alta e outro com baixa expressão de ANGPT 1, verificamos que o espessamento da TM parece ser diferente entre eles.

Na avaliação imunohistoquímica, encontramos expressão de ANGPT 1 no endotélio vascular e sinusoidal nos pacientes com CIH, enquanto que, em 50% dos pacientes com AB, verificamos esta expressão também no epitélio biliar, além do local habitual de expressão. Fabris et al. (2006) observaram expressão de ANGPT 1 nos colangiócitos de pacientes com doença policística renal autossômica dominante (ADPKD, do inglês *autosomal dominant polycystic kidney disease*), desordem que inclui uma malformação biliar, especificamente na placa ductal embrionária normal. Na ADPKD, a ANGPT 1 em conjunto com o VEGF induziu a proliferação de colangiócitos e da vasculatura, promovendo o crescimento de cistos e de seu suprimento vascular (27). No presente estudo, observamos, adicionalmente, a presença de ANGPT 1 nas TM de 14% dos pacientes com AB e este padrão específico de expressão da ANGPT 1 pode estar demonstrando a anormalidade vascular da AB associada a espessamento da TM. O insulto que promove o espessamento da TM na AB é desconhecido e pode envolver um processo imunomediado, uma expressão gênica local alterada ou, até mesmo, um *shear stress* cronicamente aumentado devido à hipertensão porta intra-hepática presente na AB.

Um achado inesperado deste estudo foi a associação da expressão aumentada da ANGPT 2 com o espessamento da TM na AB. Anteriormente, o efeito da ANGPT 2 era entendido como sendo competitivo ao efeito da ANGPT 1 em relação ao Tie 2. Atualmente, é sabido que a ANGPT 2 age na maturação de novos vasos na dependência das condições apresentadas pelo tecido em questão (28), particularmente na dependência da expressão do VEGF A. Na presença de VEGF A, a ANGPT 2 potencializa a ação da ANGPT 1 na maturação de novos vasos, enquanto que, na sua

ausência, ela promove a regressão vascular (29,30). Adicionalmente, a interação do VEGF com a ANGPT 2 é atuante tanto no desenvolvimento de fibrose hepática como de carcinoma hepatocelular (32). A ação aditiva da ANGPT 1 e da ANGPT 2 no espessamento da TM na AB, evidenciada em nosso estudo, pode ser explicada pelo fato de que o VEGF é fortemente expressado nas estruturas portais, incluindo a TM de ramos da artéria hepática (9).

Um segundo achado não esperado foi a correlação negativa entre a expressão das ANGPTs e a do receptor Tie 2. Isto pode ser resultado de um balanço competitivo do VEGF e da ANGPT 1 que ocorre em estados pró-angiogênicos com o intuito de evitar a estabilização vascular completa de modo a continuar a proliferação de novos vasos. Este balanço é atingido pela clivagem do Tie 2 pelo VEGF, criando um Tie 2 solúvel o qual, ao ligar-se a ambas ANGPTs, inibe a cadeia de sinalização molecular e assim regula a maturação dos vasos (24). Um processo similar pode ter afetado os níveis teciduais do receptor Tie 2 nos fígados de pacientes com AB, o que, provavelmente, representa um estado pró-angiogênico pronunciado devido ao processo fibrogênico. Outro mecanismo de atenuação da ativação do Tie 2 é a indução de seu *turnover* de forma dose-dependente pela ANGPT 1 e, menos marcadamente, pela ANGPT2, levando a ubiquitinação e degradação do receptor (33). A amplitude e a extensão da sinalização sobre os receptores tirosinaquinase, como o Tie2, parecem ter um papel decisivo no mecanismo de atenuação (34). Os altos níveis de expressão das ANGPTs, associados à natureza crônica da AB, podem explicar a correlação negativa evidenciada entre as ANGPTs e o receptor Tie2 neste estudo. Entretanto, tentando elucidar como as ANGPTs podem induzir espessamento da TM na presença de níveis normais do receptor Tie 2 e, inclusive, apresentando uma correlação negativa com seu receptor, será necessário avaliar na AB o papel do recentemente descrito receptor de ANGPT 1,

chamado Tie 1, cuja expressão aumentada associa-se com aterosclerose, aumento do *shear stress* e inflamação (35).

Outro achado inesperado foi a ausência de correlação entre as ANGPTs e as variáveis associadas com gravidade da AB (idade na portoenterotomia, ACOL e PCK7) desde que há relatos da associação da expressão destas moléculas com fibrogênese hepática e, conseqüentemente, com a gravidade da doença (36). Em relação, especificamente à ACOL, a falta de correlação pode dever-se às dificuldades inerentes de avaliação da fibrose hepática, tais como erros amostrais e variações fenotípicas idiossincrásicas em relação à fibrogênese (2). A ausência de correlação entre a expressão das ANGPTs e a extensão da fibrose contraria a suposição de que a expressão aumentada destas moléculas na AB e a associação com espessamento da TM possa ser totalmente explicada pelo *shear stress*. Entretanto, o pequeno número de pacientes em estudo pode ter contribuído para este achado e para a ausência de correlação entre a expressão das ANGPTs e as variáveis associadas à gravidade da doença, idade na portoenterostomia e PCK7.

Os achados do presente estudo sugerem que, na AB, a expressão aumentada das ANGPTs não está relacionada com a gravidade clínico-histológica da doença hepática no momento da portoenterostomia.

O que significa a expressão aumentada das ANGPTs associada ao espessamento da TM que evidenciamos nos casos com AB? Desmet (37) descreveu a ocorrência de hipoplasia venosa associada a hiperplasia de vasos arteriais nos fígados de pacientes com AB. Uma explicação para este achado e para os achados observados neste estudo é que estamos detectando uma alteração vascular secundária à hipertensão porta na AB. Em situações de muita fibrose hepática, o fluxo hepático torna-se marcadamente

arterializado. Na AB, uma doença caracterizada por fibrose hepática intensa e hipertensão porta, precoces, isto pode ser particularmente intenso, levando a um desequilíbrio dos fatores angiogênicos envolvidos na especificação artério-venosa e determinando os achados histológicos observados no fígado: diminuição dos ramos venosos porta associada a um aumento dos ramos arteriais. A hipoplasia da veia porta no hilo pode ser um evento secundário à diminuição do fluxo venoso e um *shear stress* aumentado pode explicar o espessamento da TM. O VEGF e as ANGPTs seriam moléculas sinalizadoras envolvidas neste processo fisiopatogênico. Outra explicação é que na AB haveria uma alteração primária na expressão gênica que controla a especificação artério-venosa e a maturação vascular como a do *Sonic Hedgehog* ou do *Notch* afetando moléculas angiogênicas como as ANGPTs (38,39). Neste caso, nossos achados podem refletir um efeito secundário na cascata de transcrição molecular devido uma desregulação gênica local.

Em conclusão, este estudo mostra que, na AB, há uma expressão aumentada da ANGPT 1 e da ANGPT 2 e que esta expressão está correlacionada ao espessamento da TM. Isto ocorre independentemente da idade por ocasião da portoenterostomia e de variáveis histológicas associadas com a gravidade da doença (extensão da fibrose e reação ductular) no momento do procedimento.

#### **AGRADECIMENTO**

Ao Dr Jorge Abdon Bezerra, do *Cincinnati Children's Hospital Medical Center*, Cincinnati, Ohio, EUA, pelo seu apoio inestimável nos primeiros passos deste estudo pela *triagem* das moléculas angiogênicas através da análise do transcriptoma de pacientes com colestase neonatal.

## REFERÊNCIAS

1. Santos JL, Carvalho E, Bezerra JA. Advances in biliary atresia: from patient care to research. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43: 522-7.
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. Uflacker R, Pariente D. Angiographic findings in biliary atresia. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2004; 27: 486-90.
4. Humphrey TM, Stringer MD. Biliary atresia: US diagnosis. *Radiology* 2007; 244: 845-51.
5. Kim WS, Cheon JE, Youn BJ, et al. Hepatic arterial diameter measured with US: adjunct for US diagnosis of biliary atresia. *Radiology* 2007; 245: 549-55.
6. Lee MS, Kim MJ, Lee MJ, et al. Biliary atresia: color Doppler US findings in neonates and infants. *Radiology* 2009; 252: 282–89.
7. Caruso S, Miraglia R, Milazzo M, et al. Multidetector computed tomography hepatic findings in children with end-stage biliary atresia. *Eur Radiol* 2010; 20: 1468–75.
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: 637-42.
9. 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;19:360-8.
10. Jin S-W, Patterson C. The opening act vasculogenesis and the origins of circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 623-9.

11. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-80.
12. Masseroli M, Caballero T, O'Valle F, et al. Automatic quantification of liver fibrosis: design and validation of a new image analysis method: comparison with semi-quantitative indexes of fibrosis. *J Hepatol* 2000; 32: 453-64.
13. Wu AW, Gu J, Li ZF, et al. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2323-6.
14. Rosmorduc O, Wendum D, Corpechot C, et al. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1065-73.
15. Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology* 2006;130:1270-82.
16. Kobayashi S, Nakanuma Y, Matsui O. Intrahepatic peribiliary vascular plexus in various hepatobiliary diseases: a histological survey. *Hum Pathol* 1994; 25:940-6.
17. Gelbmann CM, Rümmele P, Wimmer M, et al. Ischemic-like cholangiopathy with secondary sclerosing cholangitis in critically ill patients. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1221-9.
18. Deltenre P, Valla DC. Ischemic cholangiopathy. *J Hepatol* 2006; 44:806-17.
19. Kono N, Nakanuma Y. Ultrastructural and immunohistochemical studies of the intrahepatic peribiliary capillary plexus in normal livers and extrahepatic biliary obstruction in human beings. *Hepatology* 1992; 15: 411-8.

20. Washington K, Clavien P, Killenberg P. Peribiliary vascular plexus in primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis. *Hum Pathol* 1997; 28: 791-5.
21. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 87: 1161-9.
22. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87: 1171-80.
23. Nykänen AI, Pajusola K, Krebs R, et al. Common protective and diverse smooth muscle cell effects of AAV-mediated Angiopoietin-1 and -2 Expression in rat cardiac allograft vasculopathy. *Circ Res* 2006; 98: 1373-80.
24. Novotny NM, Lahm T, Markel TA, et al. Angiopoietin-1 in the treatment of ischemia and sepsis. *Shock* 2009; 31: 335-41.
25. Thurston G, Suri C, Smith K, et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999; 286: 2511-4.
26. Chu D, Sullivan CC, Du L, et al. A new animal model for Pulmonary Hypertension based on the overexpression of a single gene, Angiopoietin-1. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 449-57.
27. Fabris L, Cadamuro M, Fiorotto R, et al. Effects of angiogenic factor overexpression by human and rodent cholangiocytes in polycystic liver diseases. *Hepatology* 2006; 43:1001-12.
28. Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre P, Jones N, et al. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 659-70.



29. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18: 5356–62.
30. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284:1994-8.
31. Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, et al. Angiotensin-II and vascular endothelial growth factor interaction plays an important role in rat liver fibrosis development. *Hepato Res* 2006;36:124-9.
32. Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, et al. Angiopoietin 2 displays a vascular endothelial growth factor dependent synergistic effect in hepatocellular carcinoma development in mice. *Gut* 2005; 54: 1768-75.
33. Wehrle C, Van Slyke P, Dumont DJ. Angiopoietin-1-induced ubiquitylation of Tie2 by c-Cbl is required for internalization and degradation. *Biochem J* 2009; 423:375.
34. Rubin C, Gur G, Yarden Y. Negative regulation of receptor tyrosine kinases: unexpected links to c-Cbl and receptor ubiquitylation. *Cell Res* 2005; 15: 66-71.
35. Woo KV, Baldwin HS. Role of Tie1 in shear stress and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2011;21:118–123.
36. Taura K, De Minicis S, Seki E, et al. Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;135: 1729–38.
37. Desmet V. Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: variations on the theme “Ductal Plate Malformation”. *Hepatology* 1992; 16: 1069–83.
38. Kume T. Specification of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells during embryonic development. *Histol Histopathol* 2010; 25: 637–46.

39. Kory J, Lavine K, Long F, et al. Hedgehog signaling to distinct cell types differentially regulates coronary artery and vein development. *Development* 2008; 135:3161-71.

---

**Tabela 1: *Primers* utilizados no PCR q**


---

<b>Moléculas</b>	<b><i>Primers</i></b>	<b>TA</b>	<b>Tamanho</b> (PB)
ANGPT 1	F: GGTCACACTGGGACAGCAG	58 °C	134
	R: CATCAAACCACCATCCTCCTG	58 °C	
ANGPT 2	F: GCAGCATCAGCCAACCAGG	59.5°C	106
	R: GCATCAAACCACCAGCCTCC	59.0 °C	
TIE 2	F: CGGAGATGTGAAGCCCAGAAG	57.8 °C	123
	R: CCTTCCCATAAACCCAGGAGG	57.3 °C	
RNA18S	F: GACGGACCAGAGCGAAAGC	58.6°C	113
	R: GTCGGCATCGTTTATGGTCGG	58.4°C	

---

Abreviações: TA – temperatura de anelamento; PB – pares de bases; PCRq – PCR quantitativo

**Tabela 2- Comparação entre os grupos com AB e com CIH de acordo com a área de colágeno e com o percentual de citoqueratina 7**

Variáveis	Grupos		<i>P</i>
	Atresia Biliar	Colestase Intra-hepática	
	mediana (min-máx)		
<b>ACol (%)</b>	24,11 (2,6 – 38,7)	13,05 (5,32 – 29,62)	0,275
<b>PCK7 (%)</b>	7,45 (1,74 – 15,05)	3,05 (2,3 – 5,35)	0,065

Estatística: Mann-Whitney

**Tabela 3: Correlação entre a expressão gênica do sistema ANGPT/Tie2, a razão espessura TM/diâmetro luminal – RMED e as variáveis associadas com a gravidade da doença (idade na portoenterostomia, área de deposição de colágeno e percentagem de citoqueratina 7).**

<b>Variáveis</b>	<b>ANGPT 1</b>	<b>ANGPT 2</b>	<b>Tie 2</b>	<b>RMED</b>	<b>PCK7</b>	<b>ACol</b>
<b>ANGPT 2</b>	0,69 (<0,001)	-				
<b>Tie 2</b>	-0,73 (<0,001)	-0,54 (0,007)	-			
<b>RMED</b>	0,59 (0,013)	0,52 (0,032)	-0,46 (0,063)	-		
<b>PCK7</b>	-0,15 (0,955)	0,09 (0,743)	0,23 (0,384)	0,33 (0,202)	-	
<b>ACOL</b>	0,06 (0,808)	-0,07 (0,779)	0,14 (0,599)	0,39 (0,125)	0,55 (0,022)	-
<b>Idade biópsia</b>	0,18 (0,428)	-0,02 (0,934)	0,05 (0,805)	0,03 (0,907)	0,70 (0,002)	0,33 (0,195)

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.

**Tabela 4 - Associação das variáveis em estudo com a sobrevida de fígado nativo (morte ou transplante hepático) em 2 anos após a portoenterostomia**

Variável	Ocorrência de Morte ou transplante hepático		
	HR	95%IC	P
ANGPT1	0,88	(0,59 – 1,33)	0,553
ANGPT2	1,2	(0,72 – 2,01)	0,491
Tie2	0,84	(0,44 – 1,57)	0,576
RMED	2,5	(0,08 – 84,44)	0,599
ACOL	1,02	(0,09 – 12,30)	0,988
PCK7	1,32	(0,09 – 19,84)	0,843
Idade	1,01	(0,98 – 1,05)	0,428
biópsia			

Estatística: regressão de Cox, *hazard ratio* (HR) e intervalo de confiança (IC) de 95%. Os dados foram transformados em escala logarítmica antes da análise, com exceção da idade na portoenterostomia.

**Tabela 5: Associação das variáveis estudadas e a resolução da icterícia (bilirrubina total <2mg/dL) em 6 meses após a portoenteostomia**

Variáveis	Resolução da icterícia		<i>P</i>
	sim	não	
ANGPT1	97,1 (2,7 – 4770,8)	48,5 (2,1 - 13216)	0,673
ANGPT2	162 (2,7 – 6905,4)	48,5 (0,1 - 1644)	0,387
Tie2	2896,3 (268 - 80126)	3444 (9,5 - 90147)	0,730
Idade biópsia	66 (32 - 88)	60 (48 - 109)	0,605
RMED	1,2 (0,4 – 1,6)	1,1 (0,5 – 1,9)	0,620
PCK7	8,1 (5,1-13,1)	6,1 (1,7-15,1)	0,456
ACOL	19,8 (14,3 – 37,4)	25,3 (2,6 – 38,7)	0,620

Estatística: Mann-Whitney. Os dados são apresentados em mediana (min-máx).

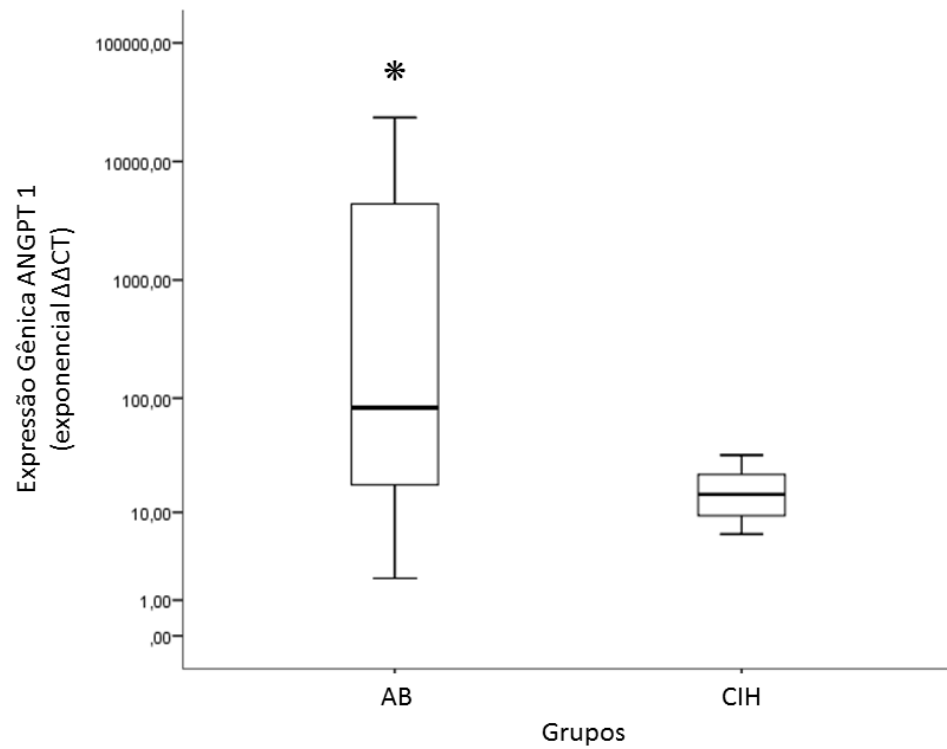


Figura 1 – Expressão da Angiopoietina 1 em pacientes com atresia biliar e com colestase intra-hepática. Dados apresentados em mediana e intervalos interquartis. Teste estatístico Mann-Whitney. \*P=0,024



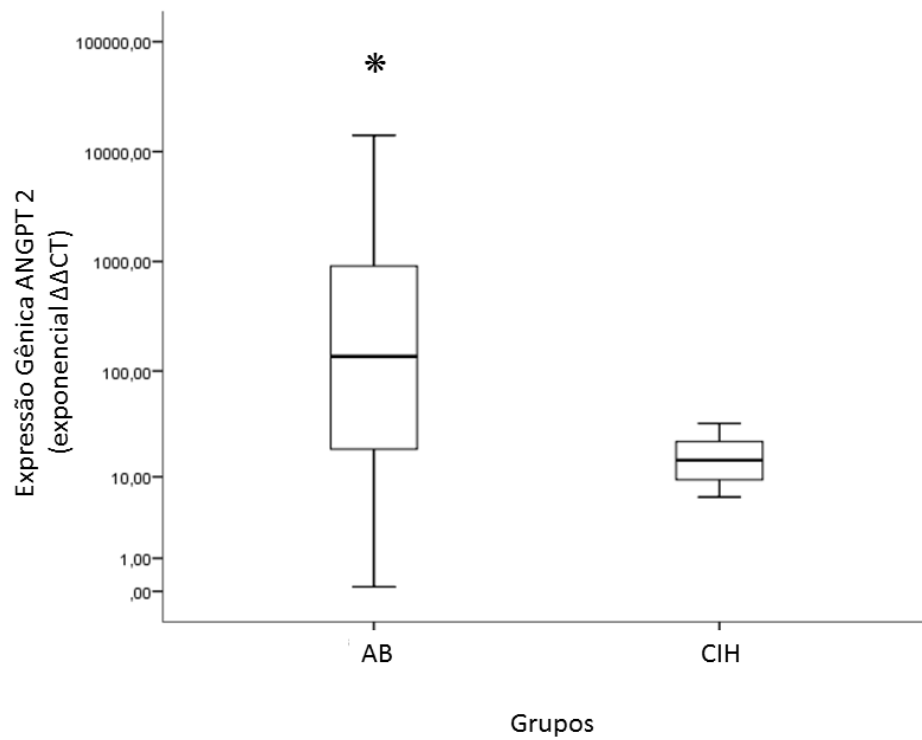


Figura 2 – Expressão da Angiopoietina 2 em pacientes com atresia biliar e com colestase intra-hepática. Dados apresentados em mediana e intervalos interquartis. Teste estatístico Mann-Whitney. \*P=0,029

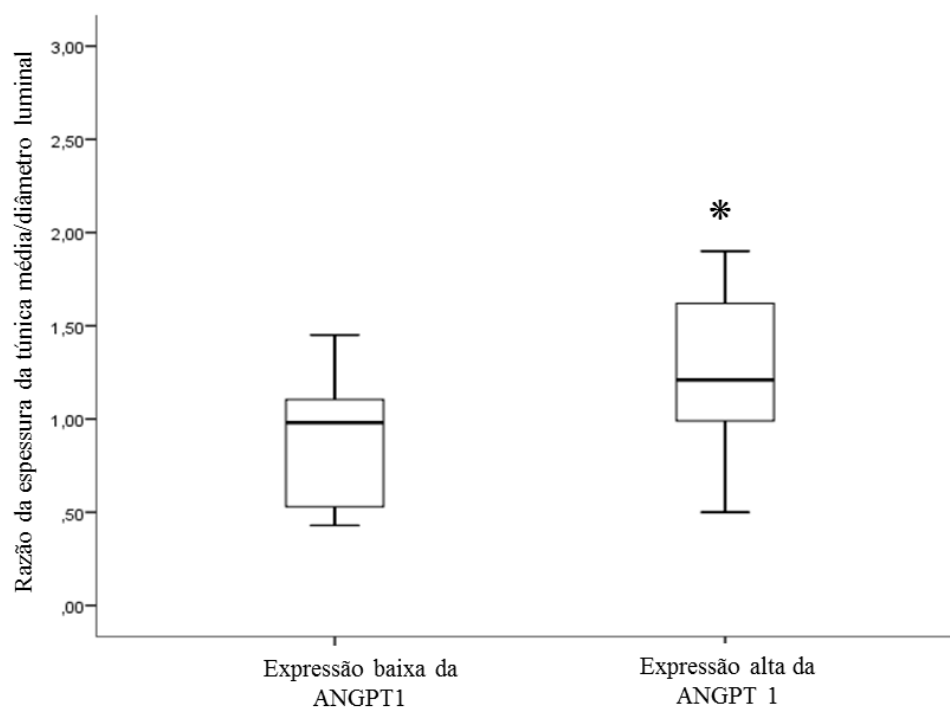


Figura 3 – Comparação dos valores da razão espessura da túnica média/diâmetro luminal (RMED) entre subgrupos com atresia biliar conforme os valores de expressão gênica da angiopoietina 1 avaliados pelo método de exponencial  $2^{\Delta\Delta CT}$ , considerando um valor de corte de 3X o valor máximo da expressão gênica desta molécula no grupo com colestase intra-hepática. Dados apresentados em mediana e intervalos interquartis. Teste estatístico Mann-Whitney. \*P=0,068

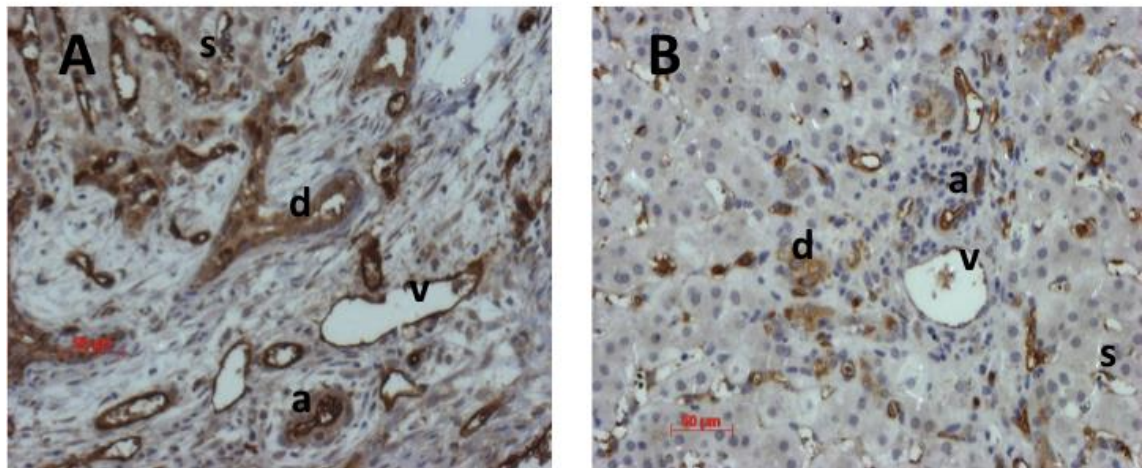


Figura 4 – Imunolocalização da angiopoietina 1 nos pacientes em estudo (400X). Observa-se positividade no endotélio venoso (v), arterial (a) e sinusoidal (s), ductulos neoformados (d) e na túnica média (a) em paciente do grupo com AB (A) e no endotélio (v,s,a) e ductulos neoformados (d), sem positividade na TM (a), em paciente do grupo com CIH (B).

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

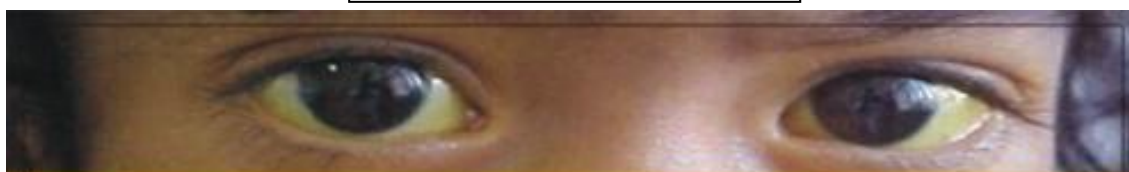
A AB é a doença hepatobiliar crônica mais prevalente na infância e é a principal causa de transplante hepático em crianças. O fator desencadeante desta desordem biliar é desconhecido. Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de elucidar a etiopatogenia e os fatores envolvidos na progressão da doença que cursa com uma colangiopatia, fibrose e, finalmente, cirrose. Uma arteriopatia poderia estar envolvida na progressão desta doença. Este fato motivou o estudo do comportamento de fatores angiogênicos em pacientes com AB.

Neste estudo, verificamos a presença e o grau de expressão gênica de ANGPT1, ANGPT2 e de seu receptor Tie2 no fígado de pacientes com atresia biliar e com colestase intra-hepática. Evidenciamos uma correlação positiva da expressão gênica da ANGPT1 com espessura aumentada de túnica média em amostras de fígados de pacientes com AB, somando nossos achados a outros achados nesta linha de pesquisa. Não encontramos correlação da expressão destes fatores angiogênicos com marcadores histológicos de fibrose e de reação ductular, nem com perda de fígado nativo em dois anos ou resolução da icterícia em 6 meses.

Uma limitação de nosso estudo é a quantidade pequena de indivíduos incluídos na amostra, tendo em vista a raridade da AB e de a disponibilidade de material biológico para todos os fatores em estudo ter sido limitada.

Isto reforça a necessidade de colaboração multicêntrica e de padronização de bancos de tecido (nas diversas formas necessárias para pesquisa histológica, bioquímica e molecular) em condições raras como a AB.

## Anexo 1 – Alerta Amarelo

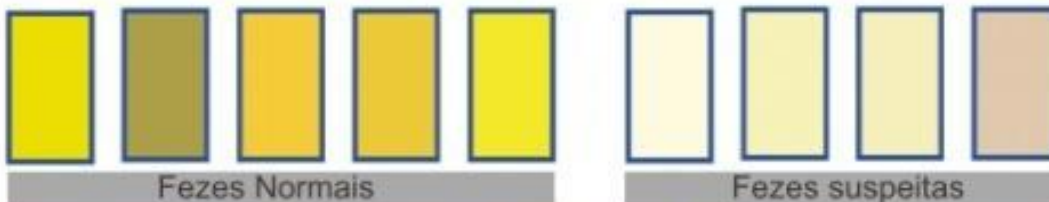


# ALERTA AMARELO

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.



**A COLESTASE NEONATAL É UMA URGÊNCIA EM PEDIATRIA!**

Departamento Científico de  
Gastroenterologia Pediátrica  
**SBP**



Anexo 2 – Protocolo de Coleta de Dados
--

Nome: \_\_\_\_\_

AP

Registro


Grupo:

1. AB
2. colestase intra-hepática (CIH)

Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Idade da biópsia: \_\_\_\_\_ dias

Idade do transplante: \_\_\_\_\_ dias

Idade do óbito: \_\_\_\_\_ dias

HISTOPATOLOGIA I:

FÍGADO

PCK7 \_\_\_\_\_ %

Densidade superficial de colágeno: \_\_\_\_\_ %

Escore de fibrose: \_\_\_\_\_

Razão espessura da túnica média / diâmetro luminal: \_\_\_\_\_

RTPCR Ang1 (exponencial DDCT): \_\_\_\_\_

RTPCR Ang2 (exponencial DDCT): \_\_\_\_\_

RTPCR Tie2 (exponencial DDCT): \_\_\_\_\_

**MARCADOR IMUNOISTOQUÍMICO:**

**Angiopietina I**

Artérias:

Endotélio: 0 ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( )

Túnica média: 0 ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( )

**Outras estruturas:**

*Dúctulos biliares:* 0 ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( )

*Hepatócitos:* 0 ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( )

*Veias*

*centrolobulares:* 0 ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( )

*ramos portais:* 0 ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( )

*Estruturas da matriz:* 0 ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( )

*Estruturas dos sinusóides:* 0 ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( )

## Anexo 3 – Dados Brutos

Pac	RMED	Acol	PCK7	ANGPT1	ANGPT2	Tie2	IdBio	Perda Fig Nat 2a	anic 6 meses
101	,88	21,56	14,53	17,75	17,82	90147,50	77	sim	não
102	,46	2,60	2,59	2,06	2,05	13307,94	48	sim	não
103	,60	25,95	13,39	50,56	25,55	18432,95	110	sim	
104	1,11	37,39	7,03	19,29	19,51	80126,95	82	não	sim
105				41,93	42,15	20594,90	71	não	
107	1,45	24,11	9,93	6,68	6,68	5556,65	66	não	sim
112	1,08	25,30	6,07	6,82	6,84	3444,31	60	sim	não
116	,43	24,83	8,09	2,68	2,68	15076,35	69	não	sim
119				32,22	32,39	3821,70	63	não	sim
120	1,10	25,36	4,79	48,50	48,49	11993,79	56	sim	não
117	1,21	30,62	7,45	2452,44	,10	304,43	58	não	não
123				31525152,20	587,12	2896,30	32	não	sim
121				2,64	1644,01	9345,13	54	sim	não
106	,50	16,43	8,62	162,02	162,24	2503,96	88	não	sim
108	1,90	38,72	15,05	424,61	580,84	9,51	109	sim	sim
109	2,76	35,35	13,10	23493,92	14076,49	484,38	65	sim	
110	1,54	14,33	6,32	4770,75	3220,35	491,14	66	não	não
111	1,15	19,76	5,10	4640,29	6905,36	268,72	56	não	não
113	1,62	16,06	13,07	4451,27	1498,70	501,46	88	não	não
114	,99	12,06	1,82	2646,74	252,65	26,53	44	sim	
115	,72	14,28	1,74	4389,98	156,06	79,34	75	não	não
122				13216,02	1406,12	75,06	79	sim	não
124				135,30	136,00	5148,72	19	não	
101	,41	5,32	3,26	14,62	14,63	25531,66	60	não	não
201				30,48	30,70	18951,17	67	não	
202	1,40	18,59	2,30	15,67	15,73	3396,89	80	sim	
203	,97	7,52	2,85	1,00	1,00	1,00	77	sim	
204				32,45	32,67	10369,07	147		
205	1,30	29,62	5,35	6,19	6,21	14164,57	39	não	
208				13,83	13,90	1009,90	98	sim	
209	,88	21,56	14,53	17,75	17,82	90147,50	77	sim	

Legenda: RMED – razão espessura da parede/diâmetro luminal; Acol – área de colágeno; PCK7 – percentagem de positividade de citoqueratina 7; ANGPT1 e 2 – expressão gênica das angiopoietinas; Tie2 – expressão gênica do receptor Tie2; IdBio – idade da coleta de material; Perda Fig Nat 2a – Tx ou óbito até 2 anos; anic 6meses – resolução da icterícia em 6 meses



Anexo 4 – Carta de aceite do artigo científico para publicação

Subject: Ped Res MS# 13-PR-01-0014R2 - Decision

Dear Dr dos Santos,

RE: MS#13-PR-01-0014R2 - Angiopoietin 1 and angiopoietin 2 are associated with medial thickening of hepatic arterial branches in Biliary atresia

On behalf of Dr. Olaf Dammann, Editor-in-Chief, and Dr. Pierre Gressens, Associate Editor-in-Chief, I am pleased to advise you that your manuscript has been accepted for publication in an upcoming issue of Pediatric Research.

Within the next 6-8 weeks, you will receive a follow-up email to this one. In that email, I will provide specific instructions regarding changes that are needed to your files to ready them for publication. You will then email me the files after you've incorporated the needed changes. After reviewing the changes, I will then forward your paper along for typesetting/layout. Two to three weeks later you will receive via email a set of page proofs for review.

It is our intention to continue to do all we can to speed the publication of important research, and provide the best possible forum for the presentation of research findings in the study of childhood disease and development.

Thank you for submitting your interesting and important work to Pediatric Research. We look forward to the publication of your manuscript. I will be back in touch with you shortly regarding the final changes that are needed.

Congratulations,  
Stephanie Dean  
Managing Editor  
Pediatric Research

You can now use a single sign-on for all your Nature Publishing Group accounts, view the status of all your manuscript submissions and reviews, access usage statistics for your published articles and download a record of your refereeing activity.

Click here to be directed to your login page: <http://mts-pr.nature.com/cgi-bin/main.plex>

In addition, NPG encourages all authors and reviewers to associate an Open Researcher and Contributor Identifier (ORCID) to their account. ORCID is a community-based initiative that provides an open, non-proprietary and transparent registry of unique

identifiers to help disambiguate research contributions.

PR - This email has been sent through the NPG Manuscript Tracking System NY-610A-NPG&MTS

*Confidentiality Statement:*

*This e-mail is confidential and subject to copyright. Any unauthorised use or disclosure of its contents is prohibited. If you have received this email in error please notify our Manuscript Tracking System Helpdesk team at <http://npgapps.custhelp.com/app/ask>.*

*Details of the confidentiality and pre-publicity policy may be found here <http://www.nature.com/authors/policies/confidentiality.html>*

[Privacy Policy](#) | [Update Profile](#)

Pediatric Research (2013); doi:10.1038/pr.2013.177.

