

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E

HEPATOLOGIA

**EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES ANGIOGÊNICOS NA ATRESIA BILIAR E
SUA RELAÇÃO COM O AGRAVAMENTO DA LESÃO TECIDUAL**

Giovana Regina Weber

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E

HEPATOLOGIA

**EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES ANGIOGÊNICOS NA ATRESIA BILIAR E
SUA RELAÇÃO COM O AGRAVAMENTO DA LESÃO TECIDUAL**

Giovana Regina Weber

Orientador: Dr. Jorge Luiz dos Santos

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

Porto Alegre, Brasil

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Weber, Giovana Regina

Expressão Gênica de Fatores Angiogênicos na
Atresia Biliar e sua Relação com o Agravamento da
Lesão Tecidual / Giovana Regina Weber. -- 2015.
110 f.

Orientador: Jorge Luiz dos Santos.

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

1. Atresia Biliar. 2. Colangiopatia Isquêmica. 3.
Expressão Gênica. I. dos Santos, Jorge Luiz, orient.
II. Título.

AGRADECIMENTOS

É muito bom ter a quem agradecer ao final deste trabalho, que não reflete apenas meses de estudo e pesquisa, mas sim uma formação e jornada ao aprimoramento acadêmico.

Primeiramente, agradeço a Deus que é Senhor, Luz e Direção em cada dia. Agradeço pela calma, tranquilidade e confiança de que tudo está correndo de acordo com o planejado. Agradeço pelas oportunidades que encontrei e experiências que tive e que hoje formam a profissional que sou.

Agradeço a meus pais Tarcisio e Cléris Weber, pelo apoio incondicional aos meus sonhos e anseios, além de orgulho que sempre demonstraram, e auxílio em cada pequena necessidade que tive.

Agradeço a meu orientador Dr. Jorge, mentor que transmitiu muito de seu conhecimento teórico e prático. Ele que cuidou de detalhes, esperou por resultados e explicações, argumentos para fortalecer nossa teoria, mas também sempre se preocupou conosco, com nosso bem estar, realização e satisfação no trabalho a ser feito. Obrigada por seu cuidado e encorajamento, além de seu incrível exemplo de pesquisador. Da mesma forma, agradeço à Dra. Themis por sua instrução, direcionamento, supervisão e aconselhamento em cada artigo, cada importante decisão.

Agradeço aos meus professores, colegas no pós, no laboratório, amigos e companheiros no dia a dia. Em especial às jorgetes, Leila Xavier Sinigaglia Fratta e Larisse Longo, pela companhia diária, suporte nos experimentos, e amizade construída. Agradeço às colegas de Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: Ana Cláudia, Carol Uribe, Maria Inês, Thaís Hammes, Laura Alencastro, Jacqueline Bonfanti, Jéssica Ferrari, Juliana Abdalla, Laisa Beduschi, Thayssa Escobar, Renata Leke, Andrea Moreira, Silvia Bona e Graziella Rodrigues, pelo apoio, discussões de ideias e amizade.

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

Também ao meu querido noivo, Cristiano, que sempre me ouviu e tentou ajudar na medida do possível, me aconselhando e incentivando em tudo que precisei. Muito obrigada Cris, é muito bom ter e certeza de que sempre posso contar contigo pra me apoiar.

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

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

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
2.1 COLESTASE NEONATAL INTRA E EXTRA-HEPÁTICA.....	12
2.2 ATRESIA BILIAR.....	13
2.3 PORTOENTROSTOMIA E PROGNÓSTICO	17
2.4 CLASSIFICAÇÕES DA AB	19
2.4.1 Classificação Anatômica.....	19
2.4.1.1 Forma cística.....	20
2.4.2 Classificação clínica	21
2.4.3 Variante Inflamatória versus Fibrótica de AB	21
2.5 ETIOPATOGENIA DA AB	22
2.5.1 Agente Ambiental	22
2.5.2 Infecções	23
2.5.3 Alterações Genéticas e Epigenéticas.....	24
2.5.4 Arteriopatia na Atresia Biliar.....	26
2.5.4.1 Plexo vascular peribiliar - PVP.....	27
2.6 ANGIOGÊNESE.....	28
2.6.1 Angiogênese e Fibrogênese nas Doenças Hepáticas	30
2.7 VEGFA	33
2.8 VEGFR1 E VEGFR2.....	34
2.9 REGULAÇÃO DE VEGFA E SEUS RECEPTORES.....	36
2.10 FATORES MOLECULARES ENVOLVIDOS NA FIBROGÊNESE E NA REAÇÃO DUCTULAR	36
3 JUSTIFICATIVA	38
4 QUESTÃO DE PESQUISA	38
5 HIPÓTESE	38
6 OBJETIVOS	39
6.1 OBJETIVO GERAL.....	39
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	40
CONCLUSÕES	68
PERSPECTIVAS.....	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO I – ALERTA AMARELO.....	83
APÊNDICE I – Termo de Compromisso.....	84
APÊNDICE II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	85
Apêndice III – Dados abordados na dissertação não apresentados no artigo original em inglês	87

RESUMO

Introdução: A atresia biliar (AB) é uma doença que se inicia na infância e caracteriza-se por obstrução das vias biliares extra-hepáticas, e por colangiopatia progressiva, de etiologia desconhecida. Seu tratamento consiste numa portoenterostomia, cujo sucesso é variável. Fatores como a idade na portoenterostomia e normalização de bilirrubinas séricas influenciam a sobrevida do paciente com seu próprio fígado. Nosso grupo estuda o envolvimento de uma arteriopatia na etiologia da AB. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 participam da angiogênese em situações de distúrbio vascular. **Objetivo:** Quantificar a expressão gênica de VEGFA e seus receptores, relacionando com variáveis moleculares, morfométricas e clínico-laboratoriais associadas com a gravidade da AB e o prognóstico pós-portoenterostomia. **Métodos:** Estudo de amostras de biópsias em cunha coletadas na laparotomia exploradora de pacientes com AB, na sua forma isolada IgM- para citomegalovírus (n= 32), comparando com lactentes com colestase intra-hepática (CIH, n= 09), pareados por idade. Uma amostra foi ultracongelada (análise molecular) e outra, parafinizada (análises histológica e imunoistoquímica). A expressão dos genes angiogênicos (VEGFA, VEGFR1 e VEGFR2), fibrogênico (MCP1, proteína quimiotática de monócitos) e de reação ductular (CK19, citoqueratina 19), além do gene normalizador, ribossomal 18S, foi medida por PCRq com sondas TaqMan®. As análises morfométricas, a partir de material parafinado, incluindo extensão de fibrose e reação ductular foram mensuradas através do programa Image Pro Plus 6.0. Variáveis clínico-laboratoriais foram prospectivamente coletadas no banco de dados da Unidade de Hepatologia Pediátrica do HCPA. **Resultados:** VEGFR2 foi menos expresso na AB em comparação com CIH (P <0,001), enquanto não houve diferença significativa na expressão de VEGFR1 (P= 0,086) e apenas uma tendência de menor expressão do VEGFA (P= 0,060) no grupo AB. Quanto à expressão de VEGFA e VEGFR2, dois subgrupos de AB foram observados: um com expressão levemente superior ou igual à CIH e outro com expressão 3 vezes menor que a mediana do grupo CIH. Os subgrupos com menor expressão foram denominados loVEGFA e loVEGFR2. Na AB, a expressão do VEGFA teve correlação positiva com a de seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 ($r_s=0,8$; $P<0,001$ e $r_s=0,5$; $P=0,001$). A expressão de VEGFR2 teve uma forte correlação negativa com a idade na portoenterostomia ($r_s=-0,6$; $P=0,001$). As bilirrubinas séricas total e direta foram negativamente correlacionadas com VEGFA ($r_s=-0,5$; $P=0,007$ e $r_s=-0,4$; $P=0,033$) e VEGFR2 ($r_s=-0,5$; $P=0,004$ e $r_s=-0,6$; $P=0,001$). No subgrupo loVEGFR2 a expressão de CK19 estava diminuída, e a de MCP1 não se associou à expressão gênica das moléculas angiogênicas. **Conclusões:** Na AB há um subgrupo com diminuição na expressão de VEGFA e VEGFR2. A expressão de ambas as moléculas correlacionou-se ao comportamento das variáveis associadas a gravidade da doença e obstrução do fluxo biliar na portoenterostomia, incluindo bilirrubinas séricas e idade. O subgrupo de baixa expressão do VEGFR2 apresentou diminuição da massa de colangiócitos, segundo a expressão do CK 19, mas foi independente da expressão do marcador de fibrose, MCP1.

Palavras-chave: Atresia Biliar; Colangiopatia Isquêmica; Expressão Gênica.

ABSTRACT

Background: Biliary atresia (BA) is a disease that begins in infancy and is characterized by complete obstruction of extrahepatic biliary ducts and a progressive cholangiopathy of undefined etiology. Treatment of BA consists of a portoenterostomy, whose success is variable. Factors such as age at portoenterostomy and post-operative normalization of serum bilirubin influence the native liver survival. Our group studies the role of an arteriopathy, and thus of hypoxia, in the etiology of BA. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) A and its receptors, VEGFR1 and VEGFR2, induce angiogenesis in response to hypoxia. **Aim:** To assess gene expression of VEGFA and its receptors in BA, correlating with molecular, morphometric and clinical-laboratory variables associated with the disease severity and the post-portoenterostomy prognosis of BA. **Methods:** Liver biopsy specimens collected at exploratory laparotomy of age-matched patients with isolated, cytomegalovirus IgM-negative BA (n=32) and intrahepatic cholestasis (IHC, n=9) were evaluated. A sample was ultrafrozen (for molecular analysis) and the other was paraffin-embedded (for histological and morphometric analyzes). The expression of genes involved in angiogenic (VEGFA, VEGFR1 and VEGFR2), biliary fibrosis (MCP1 - monocyte chemotaxis protein 1) and cholangiocyte phenotype (CK19 – cytokeratin 19), was measured by TaqMan® probes with qPCR, using ribosomal 18S as the normalizing gene. Extents of fibrosis and ductular reaction were morphometrically assessed using the Image Pro Plus 6.0. Clinical-laboratory variables were collected from the database of the Pediatric Hepatology Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Results:** VEGFR2 was less expressed in BA compared with IHC ($P < 0.001$), whereas there was no significant difference in the expression of VEGFR1 ($P = 0.086$) and only a trend of a lower expression of VEGFA ($P = 0.060$) in the BA group. Regarding VEGFA and VEGFR2, two subgroups of BA were defined: low expression, with values 3 times lower than the median of the IHC group, and high expression. In BA, VEGFA expression was positively correlated with that of VEGFR1 and VEGFR2 ($r_s = 0.8$, $P < 0.001$; $r_s = 0.58$, $P = 0.001$). The expression of VEGFR2 had a strong negative correlation with age at portoenterostomy ($r_s = -0.6$, $P = 0.001$). Total and direct reacting bilirubins were both negatively correlated with VEGFA expression ($r_s = -0.5$, $P = 0.007$; $r_s = -0.4$, $P = 0.033$) and VEGFR2 ($r_s = -0.5$, $P = 0.004$; $r_s = -0.6$, $P = 0.001$). In the low VEGFR2 expression (loVEGFR2) subset, gene expression of CK19, marker of cholangiocyte phenotype, was decreased. MCP1, marker of fibrosis, was not associated with the expression of the angiogenic factors. **Conclusion:** In BA there is a subset of patients with decreased expression of VEGFA and VEGFR2. The expression of these molecules is correlated with variables associated to disease severity and bile flow obstruction at portoenterostomy, including age and serum bilirubin levels. The loVEGFR2 expression is associated with a decreased cholangiocyte mass as evaluated by CK19 expression, and is independent of the expression of the fibrosis marker MCP1.

Keywords: Biliary Atresia; Ischemic Cholangiopathy; Gene Expression.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AB - Atresia Biliar
- BASM - Malformação Esplênica Associada à AB (do inglês *Biliary Atresia Splenic Malformation*)
- BD - Bilirrubina de Reação Direta
- BT - Bilirrubina Total
- CIH - Colestase Intra-Hepática
- CK - Citoqueratina
- CMV - Citomegalovírus
- ETM - Espessamento da Túnica Média
- GGT - Gama Glutamil Transferase
- HAP - Hipertensão Arterial Pulmonar
- HI- subgrupo de alta expressão gênica
- HIF – Fator Induzido por Hipóxia (do inglês *Hypoxia Inducible factor*)
- LAH - Ligadura de Artéria Hepática
- LDB - Ligadura de Ducto Biliar
- LO- subgrupo de baixa expressão gênica
- MCP1 – Proteína Quimiotática de Monócitos (do inglês *Monocyte chemotaxis protein 1*)
- O₂ - Oxigênio
- PVP - Plexo Vascular Peribiliar
- SFN – Sobrevida com o Fígado Nativo
- TGO - Aminotransferase Oxalacética
- TGP - Aminotransferase Pirúvica
- TxH - Transplante Hepático
- VEGFA - Fator de Crescimento Vascular Endotelial A (do inglês *Vascular endothelial growth factor*)
- VEGFR1 e VEGFR2 - Receptor 1 e 2 de VEGF

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Complicações na AB.....	15
Figura 2. Alterações histopatológicas indicativas de colestase neonatal com obstrução extra-hepática.....	16
Figura 3. Representação esquemática de uma portoenterostomia.....	17
Figura 4. Representação da classificação anatômica da AB.....	20
Figura 5. Anatomia do plexo vascular peribiliar intra e extra-hepático.....	28
Figura 6. Esquema de angiogênese.....	30
Figura 7. Representação dos modelos de LDB e LBD+LAH e suas consequências.....	32
Figura 8. Estrutura do gene do VEGFA.....	39
Figura 9. Morfometria para área de positividade de colágeno.....	96
Figura 10. Morfometria para área de positividade para CK7.....	97
Figura 11. Morfometria para mensuração do ETM.....	97
Figura 12. Curva de SFN em dois anos nos pacientes com AB.....	100
Figura 13. Curva de SFN em dois anos, conforme idade, ≤ 45 e >45 dias de vida.....	101
Figura 14. Curva de SFN em dois anos, conforme idade, ≤ 60 e >60 dias de vida.....	101
Figura 15. Curva de SFN em dois anos, conforme idade, ≤ 71 e >71 dias de vida.....	102
Figura 16. Curva de SFN em dois anos, conforme BT $\leq 2,0$ e $>2,0$ mg/dL em seis meses pós-portoenterostomia.....	103
Figura 17. Curva de SFN em dois anos, conforme BD $\leq 0,7$ e $>0,7$ mg/dL em dois meses pós-portoenterostomia.....	104
Figura 18. Curva de SFN em dois anos, conforme loVEGFA ou hiVEGFA.....	105
Figura 19. Curva de SFN em dois anos, conforme loVEGFR2 ou hiVEGFR2.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre pacientes com atresia biliar e colestase intra-hepática, quanto às variáveis laboratoriais estudadas por ocasião da laparotomia exploradora.....	96
Tabela 2. Comparação entre o grupo colestase intra-hepática (CIH) e o grupo atresia biliar (AB) quanto às variáveis morfométricas por ocasião da portoenterostomia.....	98
Tabela 3. Comparação entre o sub-grupo hipóxico-isquêmico atresia biliar (HIAB) e grupo atresia biliar (AB) quanto às variáveis morfométricas por ocasião da portoenterostomia.....	98

1 INTRODUÇÃO

A atresia biliar (AB) é uma doença que se inicia na infância e caracteriza-se por obstrução completa de parte ou da totalidade das vias biliares extra-hepáticas, além de uma colangiopatia progressiva (1, 2). Do ponto de vista clínico, caracteriza-se por icterícia colestática que inicia no nascimento ou nas primeiras semanas de vida, além de hepatomegalia, acolia e colúria persistentes. A incidência de AB é maior no Japão, China (~ 1 em 8000 a 9000 nascidos vivos) do que na Europa e nos EUA (~ 1 em cada 12000 - 15000) (3, 4). De modo geral, a incidência é de 1: 10000 a 1: 15000 nascidos vivos (1).

Até o momento, o tratamento para AB é a portoenterostomia ou cirurgia de Kasai, um procedimento paliativo que visa restabelecer o fluxo biliar. No entanto, mesmo após a desobstrução das vias biliares extra-hepáticas, cerca de 70 a 80% dos pacientes requerem transplante hepático (TxH) (5). Diversos estudos apontam que quanto mais cedo ocorrer a portoenterostomia, maior será a sobrevida com o fígado nativo (SFN) (6), ressaltando que a AB é a principal indicação de TxH em crianças (2, 7-9).

A etiologia ainda permanece obscura (10, 11). A existência de duas formas diferentes de AB, uma sindrômica, associada com anormalidades de determinação da lateralidade, englobando 12 a 37%, e outra isolada, responsável pelos 80% dos casos restantes sugere que a AB constitua um fenótipo decorrente de distintas desordens (1, 12).

O distúrbio causal da AB poderia incidir no período embrionário, decorrendo da ação de algum agente externo, como um teratógeno, de alterações genéticas, epigenéticas ou cromossômicas, ou, por outro lado, tratar-se de um processo disruptivo, no qual o insulto atuaria sobre as estruturas hepatobiliares após a organogênese estar completa.

Nosso grupo tem investigado o papel de uma arteriopatia na AB. As estruturas biliares, diferentemente dos hepatócitos, recebem suprimento sanguíneo apenas de ramos

arteriais, por meio do plexo vascular peribiliar (PVP) (13), e uma arteriopatia afetaria a integridade da árvore biliar. Ho *et al.* (1993) (14) observou a presença de espessamento de túnica média nos ramos da artéria hepática em pacientes com AB e sugeriu a hipótese de uma arteriopatia progressiva. Santos *et al.* (2005) confirmaram, através de método morfométrico, a existência de espessamento da túnica média dos ramos arteriais hepáticos em pacientes com AB. Em pacientes com AB, no *porta hepatis* observam-se artérias espessadas e com paredes distorcidas (15, 16). Há evidências arteriográficas de ramos arteriais periféricos hepáticos disformes, com irregularidades no contorno e imagens sugestivas de oclusão vascular (17). Análises com ultrassonografia e tomografia computadorizada demonstram, precocemente no momento do diagnóstico, um alargamento do lúmen arterial hepático no *porta hepatis* específico da AB, sugestivo de um bloqueio do fluxo de sangue nos vasos intra-hepáticos (18-20). Mecanismos fisiopatológicos e implicações de uma anomalia vascular arterial na AB devem ser cuidadosamente investigados, com o objetivo de definir o envolvimento de uma colangiopatia isquêmica em sua etiologia.

A análise da expressão gênica do fator de crescimento vascular endotelial A (VEGFA) e de seus receptores VEGFR1 e VEGFR2, relacionando ao comportamento de variáveis moleculares, morfométricas e clínico-laboratoriais associadas com a gravidade da doença e ao prognóstico pós-portoenterostomia, é de fundamental relevância para melhor compreensão do processo fisiopatológico da AB.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 COLESTASE NEONATAL INTRA E EXTRA-HEPÁTICA

Colestase é o termo utilizado para descrever os estados patológicos que levam à redução do fluxo biliar, por alterações anatômicas ou funcionais do sistema biliar (21). Essa

condição atinge aproximadamente um em cada 2500 bebês nascidos a termo; a causa mais comum de colestase neonatal é a atresia biliar (11).

A hiperbilirrubinemia indireta, comum nos recém-nascidos normais, em geral, atinge o pico no terceiro dia de vida e melhora em torno do final da primeira semana (22), podendo permanecer até o final da segunda semana. Após esse período, não se pode mais considerar a icterícia como fisiológica. Icterícia neonatal com duração superior a duas semanas, em crianças nascidas a termo, ou maior que 21 dias em prematuros, precisa ser investigada com urgência, através das dosagens séricas de bilirrubina total (BT) e bilirrubina de reação direta (BD), visando identificar um quadro de colestase. Os principais achados clínicos que indicam colestase em um bebê icterício são hipocolia, ou acolia e colúria, enquanto os laboratoriais são aumento dos níveis séricos de sais biliares, colesterol e BD (21, 23).

Visando aprimorar a investigação e o diagnóstico precoce da colestase neonatal foi criada em 1993 a Campanha do “Alerta Amarelo” (ANEXO I) na Inglaterra (24), com objetivo de esclarecer os médicos de atenção primária sobre urgência da definição etiológica da icterícia em bebês com idade acima de duas semanas de vida. O “Alerta Amarelo” permitiu que o índice de crianças submetidas ao tratamento cirúrgico antes dos 60 dias de vida passasse de 15%, em 1974, para 60% em 1995 (25).

2.2 ATRESIA BILIAR

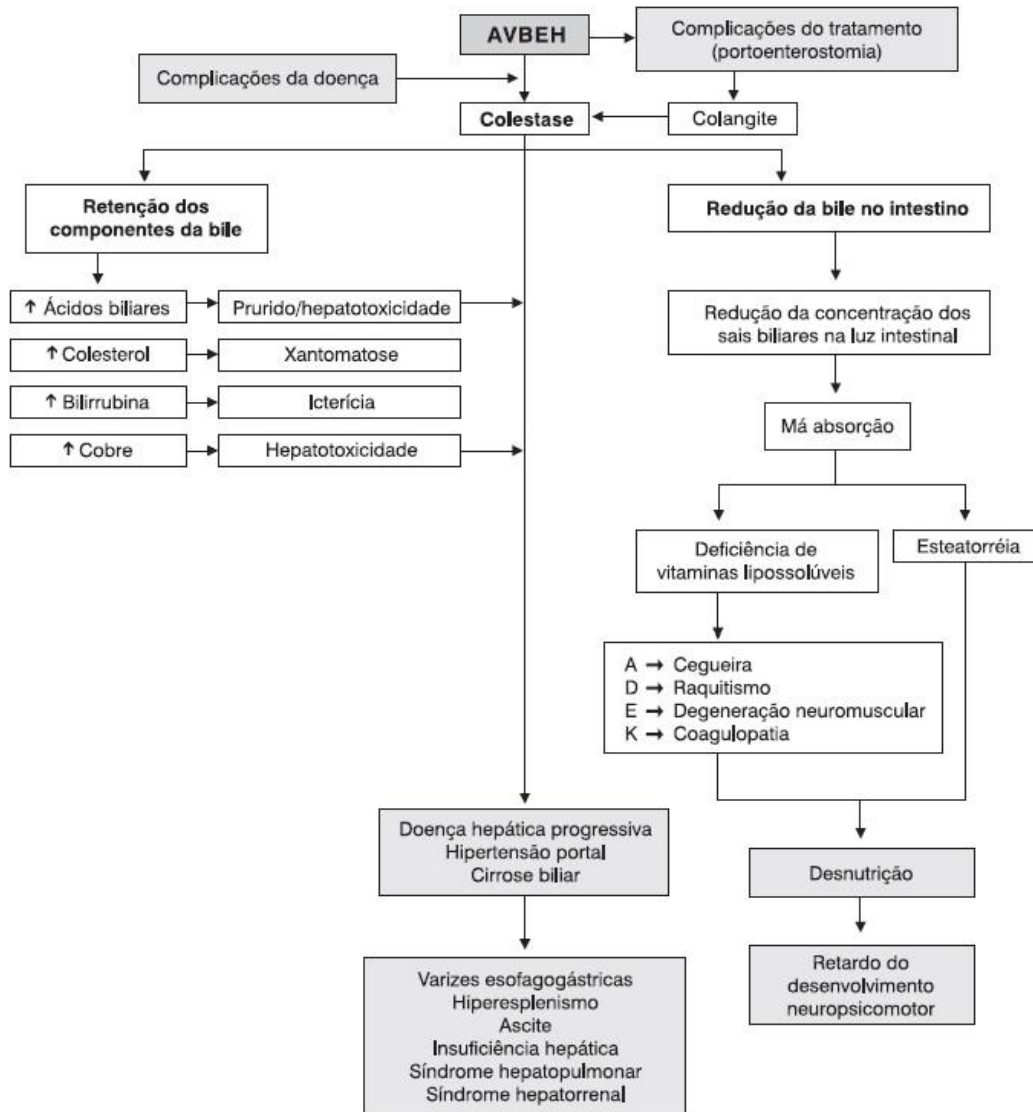
A AB é uma doença relativamente rara que afeta crianças e apresenta etiologia ainda obscura, constituindo a causa mais frequente de colestase neonatal. Constitui como obstrução completa de parte ou da totalidade das vias biliares extra-hepáticas, acompanhada por colangiopatia esclerosante intra-hepática progressiva. O perfil clínico da AB caracteriza-se por uma icterícia colestática, que inicia no nascimento ou nas primeiras semanas de vida,

associada a hepatomegalia, acolia e colúria persistentes. Seu tratamento, a portoenterostomia, busca reestabelecer o fluxo biliar (1). Pacientes sem tratamento apresentam fibrose hepática progressiva evoluindo para insuficiência hepática e morte em até dois ou três anos, com uma sobrevida média de 19 meses. Mesmo após a correção cirúrgica, porém, devido à colangiopatia crônica, a AB cursa frequentemente com fibrose hepática, cirrose, hipertensão portal, com apresentações clínicas e tempo para desfecho variáveis (12, 26, 27).

Do ponto de vista histórico, as primeiras referências sobre AB foram publicadas no século XIX, descrevendo a natureza incurável e fatal nos primeiros anos de vida (28). Em 1892, Thomson sugeriu que a AB era uma malformação congênita, progressiva, iniciada após o nascimento e levando à completa obstrução dos ductos biliares (29). Holmes, em 1916, analisando 120 casos de AB observou que a doença não era extremamente rara e a caracterizou em duas formas: corrigível e não corrigível, de acordo com a possibilidade, teórica naquele momento, de haver um tratamento cirúrgico (30). Morio Kasai, ao estudar a região do hilo hepático dos pacientes portadores da forma não corrigível de AB, observou que, mesmo nesses casos, ductulos biliares microscópicos residuais, de tamanho e número variáveis, mantêm continuidade com o sistema biliar intra-hepático. Partindo dessa observação, Kasai realizou, no Japão, as primeiras portoenterostomias. Inicialmente, uma portoduodenostomia, em quatro de maio de 1955, e, posteriormente, uma portojejunostomia, em oito de março de 1957, com sucesso (31), concretizando o grande feito de “corrigir a forma não corrigível” de AB.

As complicações da hepatopatia crônica não resolvida frequentemente estão presentes após a portoenterostomia, incluindo a má absorção intestinal de moléculas lipossolúveis, a hipertensão porta e a perda funcional sintética do fígado, desencadeando desnutrição e desordens decorrentes da deficiência das vitaminas lipossolúveis (32); esplenomegalia com

hiperesplenismo, circulação colateral, ascite, hemorragia digestiva alta, além da perda da síntese proteica hepática (Figura 1) (33).



AVBEH = atresia das vias biliares extra-hepáticas.

Fig. 1 Complicações na AB. **Fonte:** De Carvalho, Ivantes e Bezerra, 2007

Em relação ao diagnóstico da AB, o “padrão-ouro” continua sendo uma biópsia percutânea, para averiguar características indicativas de obstrução mecânica, que incluem: expansão portal devido à presença de edema e infiltrado inflamatório, reação ductular e tampões biliares em ductos neoformados (Figura 2) (34, 35). A fibrose hepática contribui com a expansão portal e, ao ultrapassar a placa limitante, leva à formação de pontes fibrosas

legando espaços porta entre si, ou unindo espaços porta com as veias centro-lobulares. O processo inflamatório destrutivo da AB não se limita ao epitélio biliar extra-hepático, vindo a acometer a árvore biliar em toda sua extensão (36).

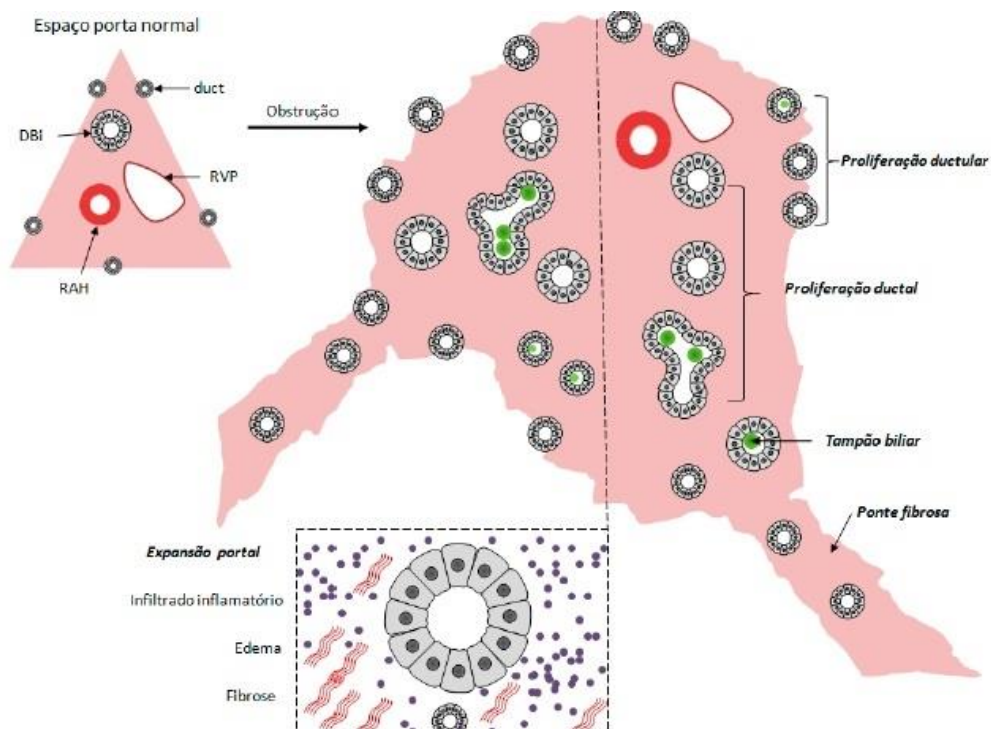


Fig 2. Alterações histopatológicas indicativas de colestase neonatal com obstrução extra-hepática. No espaço porta normal, observa-se a tríade portal incluindo ductos biliares interlobulares (DBI), ramos da veia porta (RVP) e da artéria hepática (RAH). Na periferia do espaço porta, há ductulos biliares (duct). Em doenças obstrutivas biliares há uma expansão portal causada por reação ductular, infiltrado inflamatório, edema e fibrose. Neoductos e ductulos tornam-se obstruídos com tampões biliares. Fibrose e reação ductular superam os limites do espaço porta, formando pontes fibrosas (portal-portal e portal-venosa). **Fonte:** Santos e Silveira, 2012 (21)

Na presença de um quadro clínico-laboratorial sugestivo de AB, especialmente com a presença de acolia num bebê de aparência hígida, apesar de icterício, com achados histopatológicos indicativos de obstrução mecânica, está indicada a realização de uma laparotomia exploradora, visando identificar a lesão biliar nos ductos extra-hepáticos, quando possível acompanhada de uma colangiografia transoperatória (21).

2.3 PORTOENTROSTOMIA E PROGNÓSTICO

A portoenterostomia (Figura 3), desenvolvida por Kasai, foi descrita em publicação no Japão, em 1959 (37), mas chegou ao Ocidente vários anos mais tarde, e foi lentamente sendo aceita como um tratamento paliativo viável e adequado. A realização consecutiva de portoenterostomia e TxH associado à adequada imunossupressão tem propiciado elevadas taxas de sobrevida em longo prazo para pacientes de qualquer tipo anatômico de AB (38).

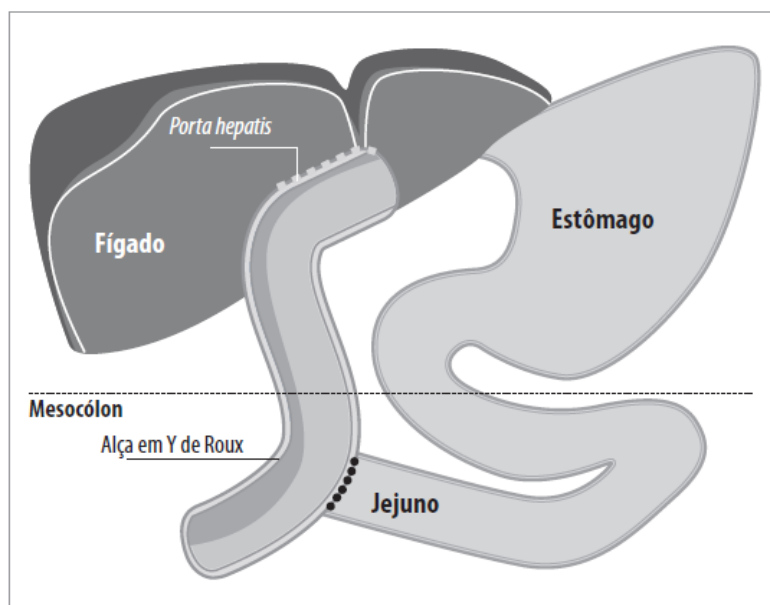


Fig. 3 Representação esquemática de uma portoenterostomia.
Fonte: Santos e Silveira, 2012 (21)

Os pacientes submetidos à portoenterostomia podem apresentar, basicamente, três padrões de evolução pós-operatória: 1) resposta satisfatória, na qual o paciente tem boa evolução clínica, embora possa apresentar alterações das enzimas hepáticas; 2) resposta parcial, na qual o paciente apresenta drenagem biliar satisfatória, mas evolui com fibrose hepática progressiva; e 3) falha terapêutica, situação em que a criança apresenta evolução igual ou mesmo pior à dos pacientes não tratados (5).

A portoenterostomia alcança sucesso em restaurar o fluxo biliar em cerca de 80% dos pacientes submetidos operados antes de 90 dias de vida, e em apenas 10% a 20% dos lactentes operados em torno dos 4 meses de idade (39). Quando há uma boa drenagem biliar, as fezes tornam-se coradas e a icterícia desaparece em semanas ou meses (2). Porém, se a operação não consegue restaurar o fluxo biliar, a progressiva cirrose biliar exige TxH. O TxH geralmente é realizado após o segundo ano de vida, mas pode ser necessário mais cedo, a partir dos 6 meses, quando há um rápido agravamento da doença hepática. A AB representa mais da metade das indicações para o TxH infantil. Pode ser necessário nos casos de recorrência de icterícia ou por complicações da cirrose, que ocorrem apesar de um resultado inicialmente bem sucedido da portoenterostomia (2).

Como regra geral, metade dos pacientes com AB precisam de TxH nos primeiros dois anos de vida (40). Um terço dos pacientes sobrevivem com seu próprio fígado até os 10 anos de idade e um quarto até 20 anos (41, 42). No entanto, mesmo os pacientes que chegam à vida adulta com seu fígado nativo, costumam apresentar desordens que indicam redução nas chances de SFN como hipertensão portal secundária e colangites (43, 44).

Os fatores que influenciam o prognóstico pós-portoenterostomia incluem: 1) fatores modificáveis através de melhorias no sistema de saúde, tais como a idade do paciente no momento da cirurgia e a experiência do cirurgião, e 2) fatores não modificáveis, por exemplo a extensão da fibrose hepática na portoenterostomia, o grau de destruição dos ductos biliares intra-hepáticos, o número de episódios de colangite ascendente, o local da obliteração das vias biliares e a presença de malformação esplênica associada à AB (BASM, do inglês *biliary atresia splenic malformation*), ou cistos biliares extra-hepáticos (45, 46).

Quanto à idade ideal para a realização da portoenterostomia, atualmente não há consenso. Uma idade menor que 60 dias de vida (24), tem sido frequentemente considerada adequada, enquanto, segundo alguns autores, uma idade menor que 71 dias seria suficiente

(47). Serinet *et al.*, (48) porém, observaram que a realização de portoenterostomias antes de 45 dias de vida, aumentam a SFN e evitam a necessidade de TxH até a adolescência (49, 50).

O prognóstico piora nos pacientes com BASM em relação aos pacientes com AB de forma isolada, especialmente quando ocorre atraso na realização da portoenterostomia (51). Nos pacientes com BASM a SFN de 2 anos situa-se em torno de 43%, e a de 4 anos, em 34%, enquanto que em pacientes com forma isolada de AB as SFN de 2 e 4 anos são, respectivamente, em torno de 46% e 37% (52).

2.4 CLASSIFICAÇÕES DA AB

A hipótese de que a AB representa um fenótipo resultante de distintas desordens (53), ainda não foi completamente corroborada. Classificações da AB têm sido descritas em relação a aspectos anatômicos, clínicos, microanatômicos e moleculares. Esta diversidade de variantes tem servido como dado que reforça a hipótese da heterogeneidade etiológica da doença.

2.4.1 Classificação Anatômica

A classificação de acordo com o segmento de obstrução dos ductos biliares extra-hepáticos independe da idade e, segundo os critérios da Associação Japonesa de Cirurgias Pediátricas, há três tipos de AB, ilustrados na figura 4:

Tipo 1 (cerca de 5 %): atresia limitada ao ducto biliar comum com ductos proximais pérvios – forma corrigível (9);

Tipo 2 (cerca de 2 %): obstrução ocorre ao nível do ducto hepático comum, com ductos proximais pérvios – forma considerada não corrigível antes do desenvolvimento da portoenterostomia (54);

Tipo 3 (> 90 %): atresia envolvendo os ductos hepáticos direito e esquerdo e ainda o *porta hepatis* – forma considerada não corrigível antes do desenvolvimento da portoenterostomia (53).

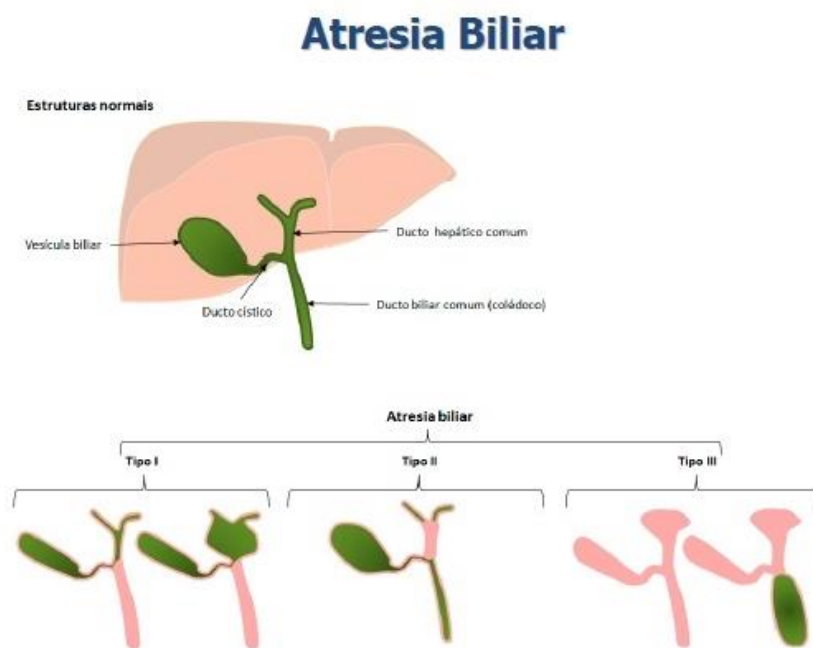


Fig. 4 Representação da classificação anatômica da AB, conforme o segmento das vias biliares extra-hepáticas obstruídas, segundo a Japanese Society of Pediatric Surgeons. **Fonte:** Santos e Silveira, 2012(21)

2.4.1.1 Forma cística

Como pode-se observar na Classificação da Sociedade Japonesa de Cirurgia Pediátrica, pode haver cistos nas estruturas extra-hepáticas nos diferentes tipos anatômicos de AB. A presença de uma variante cística é um dado importante, pois: 1) a forma cística é a única forma da doença que pode ser identificada no período pré-natal por meio de técnicas comuns de imagem, como a ultrassonografia; 2) é preciso estar atento ao diagnóstico diferencial com um cisto de colédoco com obstrução a jusante; e 3) a forma cística parece implicar um prognóstico diferenciado, com melhor resultado pós-cirúrgico, provavelmente devido à melhor qualidade da continuidade luminal com os ductos intra-hepáticos (55). Cerca

de 10 % dos casos de AB podem apresentar cistos extra-hepáticos (56), visto que esta forma parece não ter quaisquer peculiaridades raciais, genéticas ou epidemiológicas.

2.4.2 Classificação clínica

A apresentação de variantes clínicas da AB sugere a existência de duas modalidades de aquisição: uma em que os fatores determinantes agiriam durante o período embrionário (forma embriônica), envolvendo cerca de 10 % dos casos e na outra, durante o período perinatal (forma isolada), englobando os restantes 90 %. A forma embriônica pode apresentar-se como BASM (57) associada à anomalia de lateralidade, incluindo polisplenia ou asplenia, *situs inversus*, veia porta pré-duodenal, ausência de veia cava inferior retro-hepática, anomalias cardíacas, malrotação intestinal, malformações pancreáticas e malformações pulmonares (52, 58). Há, em relação a estes casos, uma alta incidência de desordens no primeiro trimestre de gestação, tais como diabetes gestacional, permitindo supor que essas anomalias sejam desencadeadas durante o período crítico de organogênese, em torno da 5ª semana gestacional (51, 59).

2.4.3 Variante Inflamatória versus Fibrótica de AB

Segundo Moyer *et al.*, (2010) a AB poderia ser dividida em três grupos de acordo com um perfil molecular e padrões histopatológicos observados no tecido hepático:

- Forma inflamatória: há aumento do número de linfócitos T e células NK, com sobre-expressão de genes relacionados com o sistema imune e à inflamação.
- Forma fibrótica: há sobre-expressão de genes relacionados à fibrose, bem como pronunciada extensão fibrótica.

- Forma mista: sem desequilíbrio entre inflamação e fibrose.

Pacientes do grupo fibrótico apresentaram menor SFN. Porém, há diferenças na idade por ocasião do diagnóstico entre os grupos: pacientes com padrão inflamatório apresentaram uma mediana de 55 dias de vida, e os pacientes com padrão fibrótico, mediana de 71 dias, o que levanta a possibilidade de que os padrões histopatológicos e de expressão gênica representem fases consecutivas de um mesmo processo (60).

2.5 ETIOPATOGENIA DA AB

A etiopatogenia da AB ainda permanece obscura, mas é possível que se trate de uma desordem multifatorial, com interação de alterações gênicas e exposições ambientais.

2.5.1 Agente Ambiental

Uma das observações que sugeriria a ação de um agente ambiental como causa da AB é a existência de sazonalidade na aquisição da doença, mas este assunto permanece controverso. A variação sazonal na incidência da AB, demonstrada por Yoon, *et al* (1997) constituiu uma premissa de que a AB poderia ser ocasionada por fatores ambientais, provavelmente um vírus, durante o período perinatal (61). Caton, *et al* (2004) observaram variações nos padrões sazonais, com maior risco de desenvolvimento da AB em bebês nascidos em Nova York durante a primavera (62). The, *et al* (2007), por sua vez, observaram que bebês concebidos durante a primavera eram mais propensos a ter AB do que os nascidos no inverno (63). Ayas, *et al* (1996), Chardot, *et al* (1999), Wada, *et al* (2007) e Wildhaber, *et al* (2008), por outro lado, não identificaram variação sazonal na incidência de casos de AB (40, 49, 64, 65).

Entre os agentes agressores que poderiam relacionar-se à etiologia da AB incluem-se micotoxinas e fitotoxinas. Em modelo animal espontâneo de AB entre as ovelhas, observado na Austrália, foi sugerido a possibilidade de que micotoxinas ou fitotoxinas, presentes nos lagos da região, e em maior concentração durante a estiagem, seriam os responsáveis pela doença nos animais observadas nos períodos de seca (66).

2.5.2 Infecções

Em relação a agentes exógenos, porém, a maioria das pesquisas tem relacionado a AB a um processo imune desencadeado por infecção viral. Sokol *et al.* (2001) referem que, do ponto de vista molecular, antígenos virais podem apresentar reação cruzada com antígenos biliares, desencadeando uma resposta imune contra o vírus, bem como contra antígenos dos ductos biliares (67) e a persistência da agressão imune contra células biliares explicaria a natureza progressiva da doença. No caso de um vírus ser responsável pelo desencadeamento da AB, evidências diretas de sua ação parecem apagar-se restando as características da reação inflamatória desencadeada por eles (68). O mecanismo da persistência do processo lesivo na ausência do vírus, poderia incluir uma desordem autoimune local, contra o epitélio biliar, desencadeada pela exposição à epítomos crípticos dos colangiócitos como à α -enolase, que se assemelham ao VP4 (Partícula Viral 4) (69), com posterior liberação de autoantígenos contra colangiócitos, ativação de linfócitos T autorreativos e desencadeamento de uma colangiopatia esclerosante crônica (70).

Entre os vírus implicados na etiologia da AB incluem-se:

- Vírus sincicial respiratório: (71);
- Herpes vírus: (72);
- Papilomavírus:(72, 73).

- Reovírus: (74-78);
- Rotavírus: (79);
- Citomegalovírus (CMV): (80-85);

Entre os reovírus, o CMV tem sido relacionado à AB de modo especial, sendo que bebês com AB frequentemente apresentam sorologia IgM positiva para o vírus. Atualmente sugere-se que pacientes com IgM positiva para CMV no soro representam uma variante específica da AB (86). Shen *et al.*,(2008) observaram 48 % de positividade para CMV em pacientes com AB, encontrando uma correlação entre a infecção pelo vírus e uma menor taxa de desaparecimento da icterícia pós-portoenterostomia (87).

Os casos de AB com infecção por CMV apresentam diminuição nos níveis de Tregs no sangue periférico. Um déficit na quantidade e/ou função de Treg em pacientes com AB, poderia resultar em uma resposta inflamatória exacerbada no contexto de uma infecção viral recente, permitindo piora do processo lesivo. Além disso, 56 % dos pacientes com AB têm uma resposta imune montada especificamente contra o CMV (88).

No entanto, até o momento nenhuma pesquisa conseguiu estabelecer, definitivamente, o papel de um vírus específico como agente etiológico da AB, tampouco explicar por que agentes que acometem milhões de crianças, ocasionam lesão biliar em apenas um pequeno percentual destas (5).

2.5.3 Alterações Genéticas e Epigenéticas

Silveira *et al.*,(1992) sugeriram a existência de um ambiente uterino alterado nos pacientes com malformações extra-hepáticas (89). É possível que a alteração do ambiente uterino possa levar a marcações epigenéticas, e ao surgimento de AB associada a anomalias

com características da BASM, ou sem características sindrômicas (90). Alterações epigenéticas de metilação do DNA podem demonstrar herança não mendeliana. Possíveis causas ambientais de AB, tais como drogas, toxinas, vírus, além dos defeitos genéticos podem induzir alterações na metilação do DNA (91). Foi demonstrado em modelo de zebrafish que a inibição de metilação do DNA conduz a defeitos de formação dos ductos biliares intra-hepáticos. Matthews *et al.*,(2011) sugeriram a possibilidade de uma etiologia unificadora para AB, na qual variados insultos primários poderiam levar a um efeito epigenético comum nas células biliares, resultando em um processo inflamatório crônico destrutivo voltado contra o sistema biliar (92).

O papel dos fatores epigenéticos na etiologia da AB também foi avaliado por Zhang *et al.*, (2004), em pesquisa que estudou o transcriptoma hepático de crianças portadoras da doença, tanto na variante isolada quanto na embrionária (93). Esses autores demonstraram o aumento da expressão de genes relacionados ao controle da estrutura da cromatina (SMARCA-1, HDAC3 e RYBP), o que evidencia a influência de fatores epigenéticos na obliteração das vias biliares.

Algumas mutações parecem estar associadas a anomalias de lateralidade, na qual a BASM está incluída, porém não há aumento de sua frequência nos pacientes com AB (58). Outros dados sugestivos da relação da AB com anormalidades genéticas são polimorfismos observados com maior frequência em amostras de AB, como gene CFC1: variante c.433G>A; (94) gene ICAM-1: variante G241R; (95) gene VEGF A: variante +936C/T; (96) entre genes XPNPEP1 e ADD3: variante rs17095355 (97).

Além da possibilidade de que um grupo de AB se associe a alterações genéticas ou epigenéticas, a frequência aumentada de casos da doença em pacientes com anormalidades cromossômicas (98-101), síndrome de Turner (102) e anormalidades cromossômicas estruturais (103) sugerem que, nestes casos, a etiologia da AB esteja incluída numa síndrome

multiorgânica associada a alteração cromossômica. De modo geral, anomalias cromossômicas são encontradas em 1 % a 2 % dos casos de AB, muitas vezes observadas nas trissomias 13 e 18 (9).

2.5.4 Arteriopatia na Atresia Biliar

Nosso grupo estuda a contribuição de uma anomalia nos ramos da artéria hepática, ou seja, uma arteriopatia, no desencadeamento e manutenção da doença (15, 16, 104). Ho *et al.*, (1993) observou a presença de espessamento de túnica média nos ramos da artéria hepática em pacientes com AB e sugeriu a hipótese de uma arteriopatia progressiva (14). Santos *et al.*, (2005) confirmaram através de método morfométrico, a existência de espessamento da túnica média (ETM) dos ramos arteriais hepáticos em pacientes com AB. Os autores buscaram acompanhar a progressão dessas alterações vasculares até o TxH e seus dados sugerem um espessamento progressivo (15).

A hipótese de uma arteriopatia na etiologia da AB pode sugerir, entre outras possibilidades, que a ação lesiva de um agente a ser determinado produza disfunção endotelial e desordem no plexo vascular peribiliar, ocasionando hipóxia local/isquemia nas estruturas hepatobiliares, ou seja, uma colangiopatia isquêmica.

Fisiologicamente o VEGFA, fator angiogênico fundamental em situações de hipóxia, é expresso por estimulação de fatores induzidos por hipóxia (HIF, do inglês *hypoxia inducible factor*) (105). Outras moléculas angiogênicas podem colaborar para o desenvolvimento da arteriopatia. Souza *et al.* (2014), observaram sobre expressão gênica das angiopoietinas 1 e 2 nos fígados de pacientes com AB positivamente correlacionada com o ETM dos ramos arteriais hepáticos, mas não associada a variáveis histológicas indicativas da progressão da doença tais como a extensão da fibrose hepática e extensão da reação ductular (104). Este

último aspecto é surpreendente, pois os fatores angiogênicos relacionam-se à fibrogênese hepática (106) e talvez indique que o ETM, dependente do comportamento das angiopoietinas, não é um fenômeno puramente secundário à fibrogênese hepática.

2.5.4.1 Plexo vascular peribiliar - PVP

O epitélio biliar é nutrido exclusivamente por uma rede de capilares localizados em estreita proximidade com as vias biliares, o PVP (figura 5) (15). O PVP está incluído nas subunidades microvasculares hepáticas (107), e deriva-se dos ramos arteriais portais, formando um plexo composto de: 1) arteríolas acompanhantes, que cursam paralelamente aos ductos, e 2) arteríolas comunicantes, as quais se ramificam das primeiras e se comunicam com o epitélio biliar (107, 108).

O fato de os colangiócitos serem exclusivamente nutridos por sangue arterial, explica o envolvimento das estruturas biliares em caso de lesão isquêmica em quadros de comprometimento dos ramos da artéria hepática, caracterizando uma colangiopatia isquêmica (109).

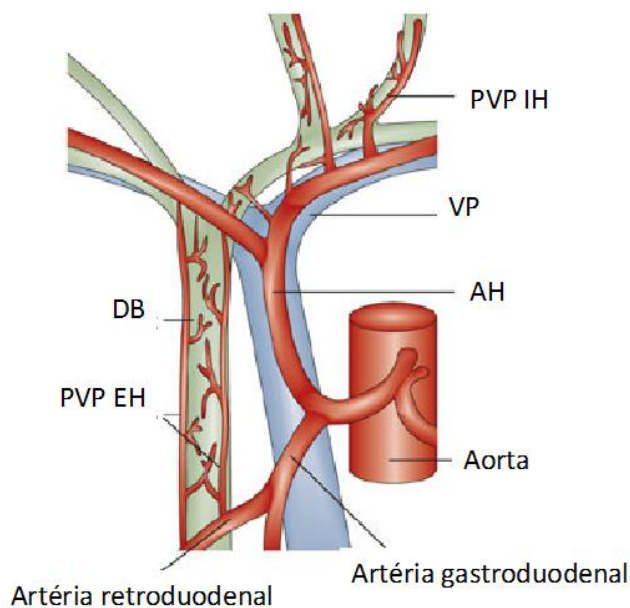


Fig. 5 Anatomia do plexo vascular peribiliar intra e extra-hepático.

O ducto biliar (DB) comum é vascularizado pelas artérias do PVP extra-hepático, que correm ao longo de sua extensão, irrigando-o. A maior parte do sangue do PVP extra-hepático origina-se da artéria retroduodenal inferior. Uma parte menor do PVP extra-hepático é suprida pela artéria hepática direita (AH). Os ductos biliares intra-hepáticos são irrigados pelo PVP intra-hepático, derivado das artérias hepáticas direita e esquerda. Abreviaturas: VP- veia porta; IH- intra-hepática; EH- extra-hepática.

Fonte: Ruemmele, Hofstaedter e Gelbmann, 2009 (110).

2.6 ANGIOGÊNESE

O termo angiogênese é comumente utilizado em referência ao processo de proliferação e crescimento vasculares, implicando na formação de novos vasos a partir de outros pré-existentes (111). Angiogênese fisiológica é restrita principalmente à cicatrização de feridas e ao ciclo reprodutor feminino. As citocinas derivadas de leucócitos, em conjunto com o TGF- β liberado pelas plaquetas e fatores solúveis são capazes de induzir a expressão de VEGFA nos queratinócitos nas margens da ferida. Nas mulheres os estrogênios estimulam a transcrição de VEGFA ao estabilizar seu RNAm, prolongando sua meia-vida e estimulando assim a angiogênese (112-114).

O processo de angiogênese envolve a divisão das células endoteliais, degradação seletiva da membrana basal e da matriz extracelular, migração de células endoteliais, e a

formação de uma estrutura tubular (115). Cada etapa desse processo incorpora complexas cascatas moleculares, estimuladoras ou inibidoras, envolvidas na construção e maturação dos vasos, bem como da formação de redes vasculares visando nutrir os tecidos e assim resolver a hipóxia local (116).

Walti *et al.*, (2013) detalharam o processo de angiogênese (figura 6) (117). O passo inicial ocorre através da ativação das células endoteliais por moléculas pró-angiogênicas, especialmente o VEGF. Situações de hipóxia tecidual induzem a expressão de VEGF nas células adjacentes a endoteliócitos chamados “células ponta”, dando início à formação de um novo vaso, sob o controle da via de sinalização Notch1 (118). Os HIFs induzem a expressão de VEGFR2 na superfície das “células ponta” permitindo a elas perceber os níveis de VEGF (118, 119). Junções intercelulares e membrana basal são remodeladas em conjunto com descolamento de perícitos, permitindo que “células ponta” migrem em resposta aos sinais de orientação através da estimulação de VEGFR2 ativado pelo VEGF.

Em seguida, este broto se alonga através da proliferação de “células pedunculares” que formam um lúmen e recrutam perícitos para a estabilização. Este sistema permite a migração vascular, com direcionamento, por meio da “célula ponta”, e o alongamento do eixo, através da proliferação de células pedunculares. Quando ocorre o encontro entre estas duas células, elas sofrem anastomose, num mecanismo assistido por macrófagos que se acumulam e estimulam o brotamento através da produção de fatores angiogênicos ou proteolíticos libertando-os da matriz extracelular. Uma vez que ocorre a fusão celular, um lúmen é formado para permitir o fluxo de sangue, o qual perfunde o tecido hipóxico, diminuindo os níveis de sinais angiogênicos, inativando os sensores de oxigênio (O₂) das células endoteliais, e aumentando as moléculas pró-quiescentes que levam à quiescência do endotélio (117).

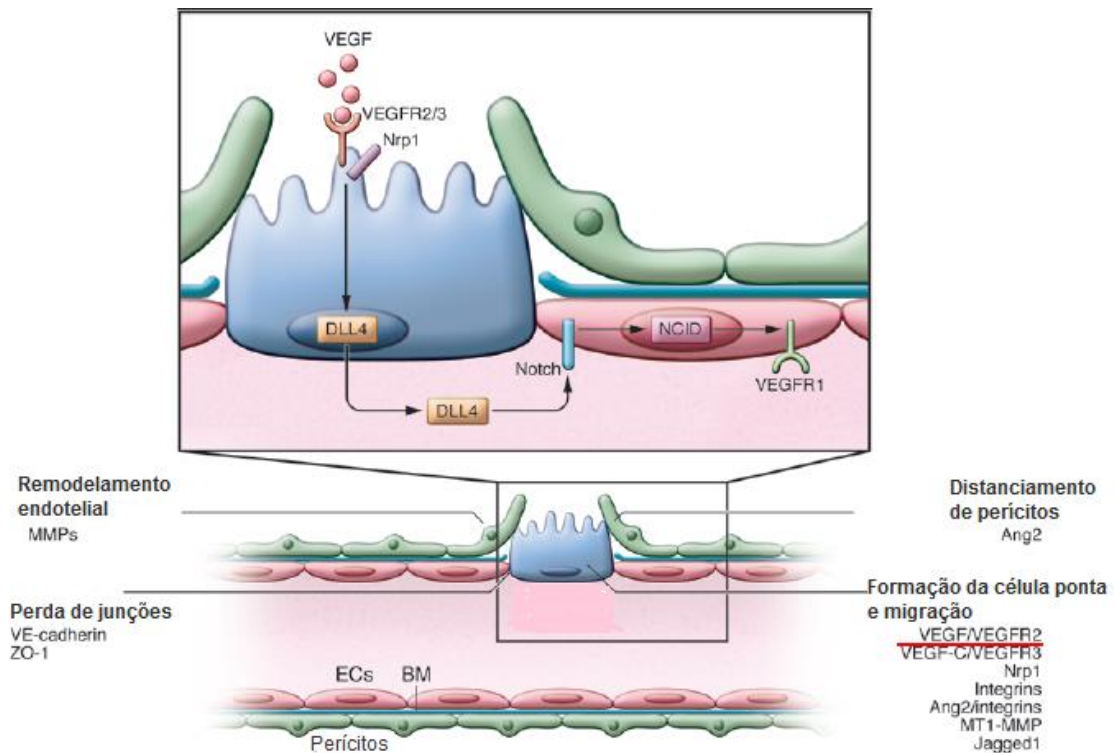


Fig. 6. Esquema de angiogênese. Formação de um novo vaso é iniciada por fatores pró-angiogênicos (incluindo o VEGF). Células endoteliais aguardam para “brotar” e estender o lúmen na dependência dos sinais angiogênicos. O VEGF ativa o VEGFR2 para estimular a migração de células “ponta”. O complexo co-receptor Nrp1 aumenta a sinalização do VEGFR2. A migração celular requer: degradação de membrana (parcialmente pela ação de metaloproteínas na matriz extracelular), afrouxamento da junção entre células endoteliais causada, entre outros fatores, pela VE-caderina, e descolamento de pericitos (regulado por angiopoetina 2). O VEGF aumenta a permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de proteínas do plasma (por exemplo, fibronectina e fibrinogênio) que são depositadas como uma camada de matriz provisória, enquanto a matriz intersticial preexistente é remodelada por proteases. **Fonte:** Welte *et al.*, (2013)

2.6.1 Angiogênese e Fibrogênese nas Doenças Hepáticas

A AB inclui uma colangiopatia esclerosante intra-hepática crônica que, frequentemente, induz uma cirrose de padrão biliar (35). Segundo Ankoma-Sey *et al.*, (2000), durante a fibrogênese, o excesso de matriz extracelular oferece resistência ao fluxo sanguíneo e ao transporte de O₂, induzindo à hipóxia tecidual e levando à sobre-expressão do VEGFA, o qual, por sua vez também induz fibrogênese, pois as células estreladas ativadas secretam VEGF (120). A distorção arquitetônica do tecido hepático devida à fibrose, culminando com a formação de nódulos regenerativos, associa-se à hipóxia-isquemia. Nas hepatopatias crônicas, caracterizadas pela presença de fibrose e inflamação, o VEGFA é sobre-expresso,

contribuindo para o agravamento do dano histológico e funcional do órgão (121, 122) e, em longo prazo, associa-se com o desenvolvimento de ascite (123) e do hepatocarcinoma (121, 122).

Terapêuticas anti-VEGFA foram propostas para controlar a fibrogênese (124, 125). Contudo, se é verdade que a angiogênese participa da fibrogênese, também tornou-se evidente que o bloqueio do processo angiogênico leva à piora da fibrose (126), pois o aumento da permeabilidade vascular induzido por VEGFA permite a atração e recrutamento de monócitos, macrófagos, plaquetas, mastócitos e outros leucócitos, capazes de produzir citocinas, assim auxiliando na resolução da lesão (127).

Em modelo animal de ligadura de ducto biliar (LDB) com posterior desbloqueio cirúrgico do fluxo biliar, numa situação semelhante a uma AB pós-portoenterostomia, foi observado que a neutralização do VEGFA foi prejudicial para a reparação tecidual e a resolução da fibrose. O processo da ação deletéria secundária ao bloqueio do VEGFA incluiu a redução da permeabilidade sinusoidal, desencadeando diminuição do recrutamento e infiltração de monócitos no tecido fibroso, sem o qual não há resolução do processo fibrogênico (128).

No modelo de LDB há aumento da expressão imunistoquímica do VEGFA nos ductos biliares intrahepáticos, observando-se que colangiócitos secretam VEGFA e seu receptor VEGFR2, mas não o VEGFR1. O bloqueio do VEGFA pela administração de anti-VEGFA, por outro lado, aumenta a apoptose de colangiócitos e reduz a quantidade de colangiócitos CK19+, além de inibir a proliferação do PVP (129) (Figura 7).

Em animais submetidos a um modelo de dupla ligadura, incluindo LDB + ligadura de artéria hepática (LAH), há desaparecimento do PVP. Nesta situação, não há uma artéria hepática fonte permeável. Do ponto de vista molecular, o que se observa é um bloqueio da expressão do VEGFA e de seu receptor VEGFR2, inibindo a formação de novos vasos. Os

colangiócitos, então, tem a proliferação inibida e sofrem apoptose. A administração de VEGFA recombinante aos animais submetidos à dupla ligadura previne a lesão das células biliares, mantendo sua capacidade proliferativa, além de conservar a integridade e proliferação do PVP (130, 131) (Figura 7).

A figura 7 apresenta o comportamento molecular e suas consequências histológicas na hepatopatia crônica e em modelo animal envolvendo LDB e dupla ligadura (LDB+LAH).

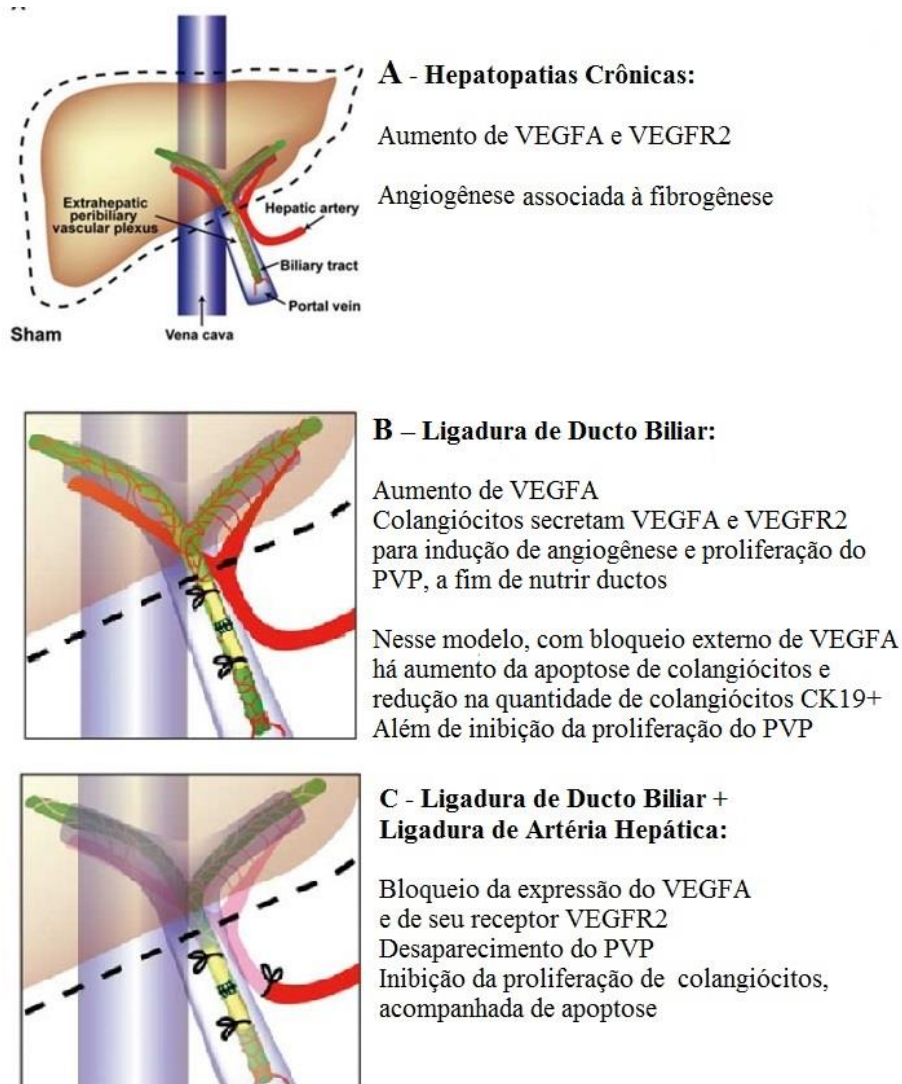


Fig. 7 Representação dos modelos de LDB e LDB+LAH e suas consequências.
 Fonte: Modificado de Beaussier *et al.*, 2005 (132).

Reforçando a importância da regulação do VEGFA, doenças que envolvem arteriopatias, tais como hipertensão pulmonar e a doença arterial periférica caracterizam-se por redução da expressão tecidual do VEGFA (133-135). Adicionalmente, um dos modelos animais para desenvolvimento de hipertensão pulmonar consiste no bloqueio do VEGFA por meio de tratamento com o antagonista do receptor do VEGF/tirosina quinase Su5416, com ou sem indução de hipóxia (133).

2.7 VEGFA

O VEGFA promove o crescimento endotelial em artérias, veias e em vasos linfáticos, além de responsabilizar-se pela manutenção da sobrevivência dos endoteliócitos, prevenindo sua apoptose. *In vitro* causa vasodilatação dependente de óxido nítrico derivado do endotélio; estimula o recrutamento de células inflamatórias e a expressão de proteases implicadas na degradação da matriz extracelular durante a angiogênese (124).

Os VEGFs são reguladores cruciais do desenvolvimento vascular durante a embriogênese (vasculogênese), bem como da formação dos vasos sanguíneos (angiogênese) no adulto (136). A expressão de VEGFA, fisiologicamente aumenta em situações de hipóxia, induz a angiogênese atuando diretamente nas células endoteliais ao se ligar e ativar seus receptores específicos (VEGFR1 e VEGFR2) do tipo tirosina quinase, promovendo uma cascata de eventos intracelulares, que incluem a proliferação, invasão e atividade quimiotática endotelial (137, 138).

Em estado fisiológico, os níveis mais altos de VEGFA mRNA são encontrados em adultos nos pulmões, rim, coração, e glândula adrenal. Níveis de mRNA um pouco menores estão no fígado, baço, e na mucosa gástrica. O VEGFA existe em pelo menos sete isoformas homodiméricas, representadas na figura 8, derivadas de *splicing* alternativo. E seus

monômeros consistem em 121, 145, 148, 165, 183, 189, ou 206 aminoácidos, os quais diferem quanto à solubilidade e capacidade de ligação aos receptores.

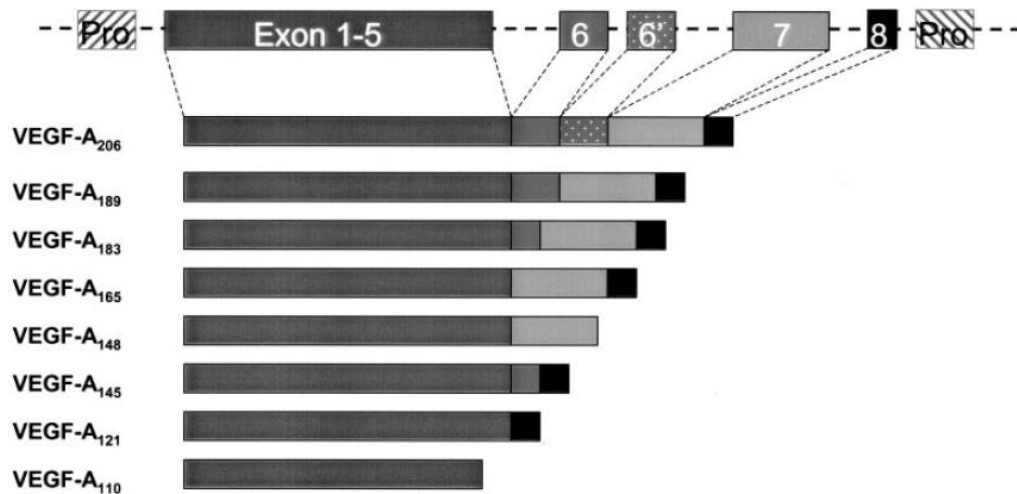


Fig. 8 Estrutura do gene do VEGFA: oito *exons* que dão origem a sete isoformas de: 121, 145, 148, 165, 183, 189, e 206 aminoácidos através de *splicing* alternativo, além de uma isoforma adicional de 110 aminoácidos resultante de clivagem proteolítica. Todos os membros da família VEGF compartilham um domínio homólogo altamente preservado, codificado pelos *exons* 1-5. **Fonte:** Hoeben *et al.*, 2004

O VEGFA tem papel central na angiogênese e neovascularização, aumentando a disponibilidade de oxigênio e substratos energéticos. A expressão de VEGFA pode ser induzida tanto quando as células estão expostas à hipóxia quanto à hipoglicemia ou à acidose (139-141). Em situações de hipóxia, o complexo HIF1 α / HIF1 β liga-se ao “*enhancer*” do gene do VEGFA. HIF1 β é constitutivamente expresso e estável. No entanto, o HIF1 α é degradado em condições de normóxia por ubiquitinação (142).

2.8 VEGFR1 E VEGFR2

A afinidade de ligação do VEGFA com o VEGFR2 é mais baixa do que com o VEGFR1, no entanto as atividades biológicas do VEGFA são sinalizadas principalmente através do VEGFR2 (143). O VEGFR2 é considerado o principal mediador dos efeitos

mitogênico, angiogênico, de aumento da permeabilidade e de proteção das células endoteliais contra a apoptose, produzidos pelo VEGFA (137). Gaudio *et al.*, (2006) demonstraram que a expressão do VEGFR2 no epitélio biliar associa-se à proliferação das células endoteliais, e que o bloqueio de sua expressão leva à apoptose de colangiócitos (144).

Embora o VEGFR1 tenha maior afinidade com o VEGFA, ele possui uma atividade de quinase muito fraca e não é capaz de gerar uma resposta mitogênica em células endoteliais quando estimuladas por VEGF (145). Assim, a função primordial da sinalização pelo VEGFR1 no endotélio parece não ser a regulação da angiogênese, mas a liberação de fatores necessários ao desenvolvimento e à sobrevivência de determinados tecidos como pâncreas e fígado embrionários (146). Atua também na regulação positiva da inflamação e carcinogênese, por influenciar a atividade de macrófagos (147).

O VEGFR1 possui uma forma solúvel (sFlt-1) com atividade inibidora ao aprisionar VEGFA (148). Kearney *et al.*, (2002) sugeriram que VEGFR1 modula o ciclo celular endotelial, principalmente nas fases iniciais, afetando uma ou mais vias de sinalização molecular; e relataram que camundongos nocaute para VEGFR1 morrem durante a gestação com aumento de vascularização desorganizada (149). Dessa forma, podemos especular que o VEGFR1 modularia negativamente a vascularização patológica ao minimizar o efeito pró-angiogênico de VEGFR2 (150).

VEGFR1 e VEGFR2 são expressos principalmente por células endoteliais vasculares e são sobre-regulados durante a angiogênese (151). Edom *et al.*, (2011) ao analisar por imunistoquímica os fígados de pacientes com AB observaram VEGFR1 imunolocalizado em estruturas hepatobiliares, com distribuição semelhante na AB e em pacientes CIH. Porém, surpreendentemente, a presença de expressão do VEGFR2 na AB foi muito diminuída em comparação ao grupo CIH, tanto em ductos biliares quanto em hepatócitos.

2.9 REGULACÃO DE VEGFA E SEUS RECEPTORES

Diversos fatores estão relacionados à formação e regulação da angiogênese. O PPAR β é um regulador da oxidação de lipídios (152) e estimula a maturação de microvasos (153). O PPAR β induz a expressão do VEGF, resultando num aumento da proliferação de células endoteliais, proliferação de microvasos, e a formação do vaso/lúmen (154, 155). Em contraste, PPAR α e PPAR γ inibem a angiogênese. Ligantes seletivos de PPAR α suprimem o crescimento de tumores por inibição da angiogênese (156), em parte através da supressão de proliferação de células endoteliais, direta ou indiretamente, por uma redução da expressão de VEGF ou de seu receptor VEGFR2, e aumentando a trombospondina-1 (TSP-1) e outros inibidores (157). O PPAR γ , um regulador do desenvolvimento adiposo e da sensibilidade à insulina (158), é expresso em células endoteliais de tumores. Ligantes seletivos de PPAR γ inibem a proliferação de células endoteliais *in vitro* e exibem propriedades anti-angiogênicas *in vivo* (159). No entanto, os mecanismos precisos de ação do PPAR γ permanecem obscuros, pois efeitos distintos na expressão do VEGF e seus receptores têm sido relatados (160).

A adiponectina também regula a angiogênese, apesar de resultados contraditórios terem sido relatados. Na verdade, ela pode atuar como um regulador negativo da angiogênese através da indução de apoptose de células endoteliais (161), ou ainda estimular a formação e remodelamento de vasos por aumento da atividade da eNOS (162).

2.10 FATORES MOLECULARES ENVOLVIDOS NA FIBROGÊNESE E NA REAÇÃO DUCTULAR

O processo de colangiopatia inerente à AB associa-se a uma reação ductular e à fibrogênese progressiva (35), a qual é intensa desde as etapas precoces da doença. A extensão da reação ductular avaliada pela análise digital da porcentagem de positividade

imunoistoquímica para citoqueratina 7 (CK7), marcador de epitélio biliar, demonstrou ser útil na predição de SFN em um ano, de forma independente de idade e grau de fibrose (163). Portanto, serve como uma variável sugestiva da gravidade da doença por ocasião da portoenteostomia (15).

Do ponto de vista molecular, entre os marcadores indicativos da gravidade de hepatopatias tem sido usados a expressão da CK19, marcador de epitélio biliar imaturo, e da proteína quimiotática para monócitos 1 (do inglês *monocyte chemotaxis protein 1*, MCP1), potente citocina ativadora dos miofibroblastos portais e no recrutamento de células estreladas hepáticas (8).

A CK19 é normalmente expressa na mucosa do trato gastrointestinal e hepatobiliar, servindo como marcador de célula biliar (164, 165). A expressão da CK19 aumenta na cirrose, correlacionando-se ao estágio da doença (166), e na hepatite C com fibrogênese acelerada (167). A MCP1, por sua vez, participa da migração e infiltração de monócitos/macrófagos, fenômeno fundamental na resposta à inflamação (168). Ramm *et al.*, (2009) observaram elevada expressão gênica de MCP1, assim como seus níveis séricos da proteína de MCP1 elevados, no fígado de pacientes com AB (8). Adicionalmente, Harada, Edamatsu e Kataoka, (2011) relataram que células do epitélio biliar são capazes de produzir, além de CK19, também MCP1(169).

3 JUSTIFICATIVA

O mecanismo causal da atresia biliar ainda não está totalmente esclarecido. Entre as hipóteses etiológicas, nosso grupo estuda o envolvimento de uma arteriopatia no surgimento e progressão da doença. O estudo de Edom *et al.*, (2011) sugeriu a existência de uma colangiopatia isquêmica no processo patológico da AB. Portanto, a investigação de um comportamento específico da AB quanto à expressão de fatores angiogênicos induzidos por hipóxia, correlacionando com o agravamento da doença analisado em termos de fibrogênese e extensão da reação ductular é a etapa seguinte de pesquisa.

A confirmação de uma arteriopatia causadora de colangiopatia isquêmica na AB poderia levar à utilização de terapêuticas complementares à atualmente empregada, desencadeando mudanças no prognóstico da doença e, talvez, a outras opções em longo prazo distintas do transplante hepático.

4 QUESTÃO DE PESQUISA

Há um processo de colangiopatia isquêmica envolvido na etiopatogenia da atresia biliar?

5 HIPÓTESE

Há uma colangiopatia isquêmica na AB, detectável pela expressão gênica de fatores angiogênicos induzidos por hipóxia.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

Averiguar os níveis de expressão gênica de fatores angiogênicos induzidos por hipóxia em tecido hepático de pacientes com AB e CIH, correlacionando-os a variáveis histológicas e clínico-laboratoriais indicadoras da gravidade da doença e prognóstico.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar os níveis de expressão gênica do fator angiogênico VEGFA e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2, em tecido hepático de pacientes com AB e CIH;
- Mensurar os níveis de expressão gênica dos fatores associados com fibrogênese biliar (MCP1) e reação ductular (CK19) em tecido hepático de pacientes com AB e CIH;
- Coletar dados clínico-laboratoriais relacionados à gravidade da doença por ocasião da portoenterostomia, prospectivamente e sequencialmente no pós-operatório;
- Avaliar por análise digital de imagem as variáveis morfométricas: área da positividade da CK7 que avalia a extensão ductular; a área de positividade do colágeno, que avalia a extensão da fibrose e a espessura da túnica média que, sendo relacionada ao diâmetro luminal vascular, indica o espessamento da parede arterial;
- Correlacionar as medidas de expressão gênica com as variáveis clínico-laboratoriais e morfométricas;
- Avaliar a relação da variável expressão gênica das diferentes moléculas sobre a normalização da BD aos dois meses e da BT aos seis meses, bem como sobre a SFN no segundo ano de vida.

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

Artigo submetido à – The American Journal of Gastroenterology

ScholarOne Manuscripts™ Leila Fratta ▾ Instructions & Forms Help Log Out

 THE AMERICAN JOURNAL OF Gastroenterology

[Main Menu](#) / [Author Dashboard](#) / [Submission Confirmation](#)

Submission Confirmation

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

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

[Print](#) [Return to Dashboard](#)

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

Authors

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

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

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

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

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

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

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

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

Affiliation

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

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

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

**These authors contributed equally to this work.*

Study Highlights:

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

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

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

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

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

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

ABSTRACT

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

INTRODUCTION

Biliary atresia (BA) is a pediatric hepatobiliary disorder characterized by bile duct obstruction and progressive sclerosing cholangiopathy. The primary treatment for BA is portoenterostomy, which should be performed as soon as possible, since postoperative results are affected by age.⁽²⁴⁾ Additionally, the extents of fibrosis and ductular reaction have been used to infer disease severity, and help predict postoperative outcomes.⁽¹⁶³⁾ Regardless of a timely portoenterostomy, BA induces cirrhosis by ongoing cholangiopathy, constituting the leading cause of pediatric liver transplantation.⁽¹⁷⁰⁾ An immune disorder induced by virus appears to be implicated in BA etiology,⁽¹⁷¹⁾ but pathophysiological details are not fully elucidated. Distinct clinical variants, such as BA-associated splenic malformation (BASM), isolated BA, cystic BA, and cytomegalovirus IgM-positive BA, suggest distinct patterns of disease acquisition.⁽⁵³⁾ Our group is interested in the putative role of an arteriopathy in BA etiology. Histology,^(14, 172) morphometry,⁽¹⁵⁾ arteriography,⁽¹⁷⁾ ultrasound,⁽¹⁹⁾ and immunohistochemical studies⁽¹⁶⁾ reinforce such a hypothesis. Evaluating hypoxia and the correlated angiogenic response in livers of patients with BA is thus of major interest. This study aimed to assess gene expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α , vascular endothelial growth factor A (VEGFA), and its receptors (VEGFRs), VEGFR1 and VEGFR2, in livers from infants with the isolated variant of BA, comparing findings to those observed in infants with intrahepatic cholestasis (IHC), and correlating with variables associated with disease severity.

METHODS

The study sample comprised infants with BA (n=32) and IHC (n=9) who underwent exploratory laparotomy between 2006 and 2014. In BA group, exploratory laparotomy preceded portoenterostomy; in IHC, it was performed to rule out this diagnosis. The causes of IHC encompassed idiopathic neonatal hepatitis (n=7) and alpha-1 antitrypsin deficiency (n=2). Infants with BA had no associated extrahepatic anomalies and were IgM-negative for cytomegalovirus. During surgery, a tissue sample was collected from hepatic segment IV, immediately placed in a tube containing 1 mL of RNAholder (BioAgency, Brazil), and stored at -80°C.

In the BA group, we evaluated the association between the expression of the genes of interest and: 1) age at portoenterostomy, aiming to infer disease severity; 2) laboratory parameters indicative of bile flow impairment, including total and direct-reacting bilirubin (TB and DB, respectively) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT); and 3) gene expression in the liver of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1), a marker of biliary fibrosis,⁽⁸⁾ and cytokeratin 19 (CK19), a marker of cholangiocyte phenotype. Blood samples were also prospectively collected at portoenterostomy.

Quantitative PCR (qPCR) procedures

RNA extraction and cDNA generation

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

qPCR

The qPCR was performed using TaqMan® probes (shown in **TABLE 1** with their respective amplicon sizes). Annealing temperature was 60°C for every molecule. The PCR reaction was performed using TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), in a StepOne system (Life Technologies, Carlsbad, CA). Ribosomal 18S was chosen as normalizing gene because it is not affected by hypoxia.⁽¹⁷³⁾ Relative quantification was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Statistical analysis

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

Ethical considerations

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

RESULTS

Patient profile

Patients with BA had a median age of 65 (52–86.8) days at surgery, with no significant difference compared to IHC. The only laboratory result that was significantly different between groups was GGT, serum levels of which were higher in BA ($P=0.003$) (**TABLE 2**).

At portoenterostomy, 14 (43.8%) BA patients were younger than 60 days; 12 (37.5%) were aged 61–90 days; and only 6 (18.7%) were older than 90 days.

Regarding markers associated with liver disease severity, MCP1 gene expression was higher in BA than in IHC ($P=0.014$). CK19 expression was similar in both groups (**TABLE 2**).

Intensity of liver hypoxia in patients with biliary atresia

Gene expression of both HIF-1 α and HIF-2 α was higher in BA than in IHC patients ($P=0.001$ and $P<0.001$, respectively), and the lowest percentile values of both molecules in BA group were higher than the medians of IHC (**TABLE 2**).

HIF-1 α and HIF-2 α expressions were strongly and positively correlated ($r_s=0.62$; $P<0.001$), and HIF-1 α expression correlated with TB ($r_s=0.44$; $P=0.021$) (**TABLE 3**).

Figures 1a and 1b demonstrate the presence of two distinct subsets of BA in terms of HIF- α expression, which we named the higher HIF (hiHIF) and lower HIF (loHIF) subsets. Patients in the hiHIF subset exhibited HIF gene expression values threefold higher than the median observed in IHC. The hiHIF-1 α subset ($n=20$, 63% of BA) exhibited significantly higher gene expression than loHIF-1 α ($P<0.001$), and gene expression in hiHIF-2 α subset ($n=19$, 59% of BA) was higher than in loHIF-2 α ($P<0.001$) (**TABLE 4a, 4b**).

Patients in the hiHIF-1 α subset had a median age of 66 (58.5–86.7) days at portoenterostomy, whereas those in the loHIF-1 α were aged 51 (36.3–83.3) days ($P=0.045$). Levels of both TB

and DB were significantly higher in hiHIF-1 α than in loHIF-1 α (P=0.005 and P=0.037, respectively) (**TABLE 4a**). There were no differences in age or bilirubin levels at portoenterostomy between the hiHIF-2 α and loHIF-2 α subsets (**TABLE 4b**). CK19 gene expression was lower in hiHIF-2 α than in loHIF-2 α patients (P=0.040). MCP1 was not associated with intensity of liver hypoxia in the HIF subsets (**TABLES 4a, 4b**).

Angiogenic response to hypoxia

VEGFA gene expression

VEGFA gene expression seemed to be lower in BA than in IHC, but there was not significant difference between the groups (**FIGURE 1c**). Analysis of VEGFA behavior in BA revealed (**FIGURE 1d**) two distinct subsets, with lower (loVEGFA) and higher (hiVEGFA) expression in comparison with IHC. VEGFA expression in the loVEGFA subset (n=21, 66% of BA) was threefold lower than the median of IHC patients, with a significant difference in relation to IHC (P<0.001).

The median age at portoenterostomy was 66 (59–88) days in loVEGFA patients, versus 48 (34–69) days in hiVEGFA (P=0.016) (**TABLE 4c**). Only 28.6% of the loVEGFA patients were less than 60 days old at portoenterostomy, versus 72.7% of the hiVEGFA infants (P=0.027).

Both TB and DB were significantly increased in the loVEGFA subset as compared with hiVEGFA (P=0.001 and P=0.012, respectively) (**TABLE 4c**).

Regarding molecular markers of disease severity, CK19 expression was positively correlated with VEGFA ($r_s=0.48$, P=0.006) (**TABLE 3**), but there were no differences in CK19 or MCP1 expression between loVEGFA and hiVEGFA (**TABLE 4c**).

Association between VEGFA and HIF expression

Strikingly, the hiHIF-1 α and loVEGFA subsets included essentially the same patients: only one infant in the loVEGFA subset was not included in hiHIF-1 α (**FIGURE 2**).

VEGFA expression correlated negatively with HIF-1 α ($r_s=-0.62$; $P<0.001$) and HIF-2 α ($r_s=-0.40$; $P=0.022$) (**TABLE 3**).

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

Gene expression of VEGFA receptors

VEGFR1 expression was not significantly different between the BA and IHC groups (**FIGURE 1e**). VEGFR1 expression exhibited strong positive correlations with expression of VEGFA ($r_s=0.81$, $P<0.001$) and VEGFR2 ($r_s=0.71$, $P<0.001$) (**TABLE 3**). In the loVEGFA subset, VEGFR1 expression was lower than in hiVEGFA ($P<0.001$) (**TABLE 4c**).

Regarding variables associated with disease severity at portoenterostomy, VEGFR1 expression correlated negatively with TB ($r_s=-0.53$, $P=0.005$) and DB ($r_s=-0.5$, $P=0.008$), and positively with MCP1 expression ($r_s=0.53$; $P=0.002$) (**TABLE 3**).

VEGFR2 expression was significantly lower in BA than in IHC ($P<0.001$) (**FIGURE 1f**).

VEGFR2 expression presented a strong positive correlation with VEGFA expression ($r_s=0.62$, $P<0.001$) and a negative correlation with HIF-1 α expression ($r_s=-0.47$, $P=0.007$) (**TABLE 3**).

Figure 1f demonstrates the existence of two distinct subsets of BA patients in terms of VEGFR2 expression: one featuring higher expression (hiVEGFR2) and one with lower expression (loVEGFR2). The loVEGFR2 subset ($n=23$, 72% of BA) presented VEGFR2 gene expression levels threefold lower than the median levels of IHC patients.

Two patients (8.7%) of the loVEGFR2 subset did not belong to loVEGFA, and three patients (13%) did not belong to hiHIF-1 α (**FIGURE 2**).

VEGFR2 expression correlated negatively with age ($r_s=-0.52$, $P=0.002$), TB ($r_s=-0.54$; $P=0.004$), and DB ($r_s=-0.58$, $P=0.001$) (**TABLE 3**).

Patients in the loVEGFR2 subset had a median age of 66 (56–88) days at portoenterostomy, versus 45 (33–80.5) days in hiVEGFR2 ($P=0.040$). Furthermore, patients in the loVEGFR2 subset exhibited increased TB and DB levels compared to hiVEGFR2 ($P=0.014$ and $P=0.043$, respectively) (**TABLE 4d**).

Regarding molecular markers of disease severity, CK19 expression was lower in the loVEGFR2 subset than in the hiVEGFR2 ($P=0.020$). MCP1 gene expression did not differ between VEGFR2 subsets (**TABLE 4d**).

DISCUSSION

Inadequate cellular access to oxygen is a crucial component of many diseases. Local hypoxia can result from ischemia secondary to a blockade of tissue blood supply, causing a shortage of oxygen required for cell metabolism.⁽¹⁷⁴⁾ HIFs are heterodimeric transcription factors critical to oxygen homeostasis. Levels of HIF-1 α and HIF-2 α are downregulated in normoxic cells, but increase during hypoxia,⁽¹⁷⁵⁾ when they translocate to the nucleus and induce transcription of hypoxia-inducible genes.⁽¹⁷⁶⁾ They play a central role in diseases characterized by hypoxia-ischemia.⁽¹⁷⁷⁾ Their overexpression generally results in increased transcription of VEGFA,⁽¹⁷⁸⁾ whose signaling represents the rate-limiting step to angiogenesis.⁽¹¹⁷⁾

This study evaluated gene expression of HIF-1 α , HIF-2 α , VEGFA, VEGFR1, and VEGFR2 in liver tissue from infants with BA and from age-matched IHC patients. We selected a homogeneous sample of BA patients in terms of clinical variants and cytomegalovirus serology. BA and IHC patients exhibited a similar cholangiocyte mass, as assessed by CK19 expression, but BA patients had a greater intensity of fibrosis as evaluated by MCP1.⁽¹⁷⁹⁾

Hepatic artery medial thickening (MT) has been reported in livers from BA patients,⁽¹⁷²⁾ and Ho et al.⁽¹⁴⁾ proposed that it is indicative of an arteriopathy. Our group confirmed by morphometry that progressive MT occurs in BA.⁽¹⁵⁾ Hepatic arteriopathy could lead to derangement of the whole biliary tree, as the bile ducts are nourished exclusively by hepatic artery branches through the peribiliary vascular plexus (PVP), and inadequate arterial blood flow leads to ischemic cholangiopathy.⁽¹⁰⁹⁾

Hypoxia induces liver fibrosis. The markedly increased HIF expression we observed in BA may be attributable to the degree of disease severity, since MCP1 expression was higher in BA (**TABLE 2**). In the bile duct ligation (BDL) model, HIF-1 α is activated early in liver cells, inducing fibrosis.⁽¹⁸⁰⁾

In the hypoxic liver, HIF-2 α is expressed to a lesser extent than HIF-1 α .⁽¹⁸¹⁾ In this study, HIF-1 α and HIF-2 α expressions were strongly correlated (**TABLE 3**), and, when categorizing BA patients in relation to HIF expression subsets, we observed that the hiHIF-1 α and hiHIF-2 α subsets comprised virtually the same patients (**FIGURE 2**).

VEGFA participates in the response to hypoxia whenever induced by HIFs.⁽¹⁸²⁾ Cirrhosis features increased expression of VEGFA, which induces angiogenesis, and VEGFA receptor blockade suppresses angiogenesis and associated fibrogenesis.⁽¹⁸³⁾

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

VEGFR2 blockade suggests hepatobiliary ischemia, as the required angiogenic response to oxygen deprivation cannot be mounted. The hiHIF-1 α /hiHIF-2 α /loVEGFA/loVEGFR2 subsets (**FIGURE 2**), therefore, may represent a hypoxic/ischemic form of BA (HIBA). HIBA features a molecular pattern of arteriopathy observed in other systems, such as pulmonary arterial hypertension (PAH) and peripheral artery disease, both of which present with decreased VEGFA tissue levels.⁽¹³⁴⁾ One feature of PAH is an arteriole MT similar to that observed in BA.⁽¹⁸⁴⁾ Blood flow abnormalities associated with secondary triggers, including inflammation, genetic predisposition, drugs and toxins are crucial for PAH development,⁽¹⁸⁵⁾ and one animal model of PAH consists of blocking VEGFA expression through treatment with the VEGF-R antagonist/tyrosine kinase inhibitor semaxanib in the presence of hypoxia.⁽¹³³⁾

We focused on arterial vessels because, in a previous study of VEGFA immunolocalization in livers from patients with BA at portoenterostomy and transplantation,⁽¹⁶⁾ we observed in explants a lobular pattern of VEGFA positivity characteristic of cirrhosis,⁽¹⁸⁶⁾ while at portoenterostomy, we detected VEGFA in portal structures, such as arterial walls and bile ducts, suggesting a reduction in blood supply by the PVP similar to that seen in the animal model of complete arterial blood deprivation to bile ducts.⁽¹³²⁾ At the *porta hepatis*, VEGFA positivity was detected in artery branches and biliary remnants. Interestingly, by immunohistochemistry VEGFR2 was virtually absent in livers with BA,⁽¹⁶⁾ agreeing with the depressed VEGFR2 gene expression of BA patients observed in the present study. In turn, VEGFR1 positivity rates were similar to those observed in IHC.⁽¹⁶⁾ In the present study, VEGFR1 expression correlated positively with VEGFA and VEGFR2 (**TABLE 3**), but did not differ in the BA and IHC groups (**FIGURE 1e**). While VEGFR2 is induced in long-lasting hypoxic situations, such as ischemia,⁽¹⁸⁷⁾ VEGFR1 is not primarily a pro-angiogenic effector, but rather acts as a positive regulator of inflammation and carcinogenesis by

influencing macrophage activity.⁽¹⁴⁷⁾ The similar VEGFR1 expression in BA and IHC may reflect the inflammatory process common to both diseases.

Besides its role in angiogenesis, VEGFA regulates cholangiocyte proliferation.

Cholangiocytes express VEGFA and VEGFR2 but not VEGFR1 mRNA, and secrete VEGFA protein.⁽¹²⁹⁾ In the BDL model, there is increased VEGFA secretion, which autocrinally induces cholangiocyte proliferation, followed by PVP proliferation to irrigate neoductules.⁽¹⁸⁸⁾

In turn, in the animal model of BDL plus hepatic artery ligation (BDL+HAL), the observed features are: effacement of PVP, increased apoptosis and decreased proliferation of cholangiocytes, decreased secretin-induced bile flow, and reduced secretion of VEGFA by cholangiocytes. Administration of recombinant VEGFA to animals subjected to BDL+HAL prevents development of HAL-related biliary disorder by maintaining PVP integrity and enabling cholangiocyte proliferation.⁽¹³⁰⁾ The decreased VEGFA gene expression observed in BA patients in the present study appears similar to the features induced by BDL+HAL, perhaps representing the effect of PVP disruption associated with bile duct obstruction. Most of the BA patients in our study shared the HIBA molecular profile (hiHIF-1 α /hiHIF-2 α /loVEGFA/loVEGFR2) (**FIGURE 2**), with minimal variation in which patients belonged to each of these subsets. The frequency of HIBA ranged from 59% of the BA group for hiHIF-2 α to 72% for loVEGFR2, and the loVEGFR2 subset included all patients that composed the other HIBA subsets. The HIBA subsets apparently represented the same hypoxic/ischemic process, exhibiting similar features. Every one of these subsets, except hiHIF-2 α , included older infants presenting with the most elevated TB and DB levels at portoenterostomy, suggesting that this hypoxic/ischemic process affects all or nearly all BA patients over time, at least in the isolated variant of BA, and contributes to bile flow impairment. Uflacker & Pariente⁽¹⁷⁾ conducted an arteriographic evaluation of the livers of 46 children with BA and observed, in every patient, enlarged hepatic arteries with encasement,

strictures, dilatation, and angulation, as well as imaging findings suggestive of peripheral occlusion. Vascular “tuft-like” blush surrounding occluded peripheral arteries was observed in 82% of patients, apparently representing arterial-portal connections within portal tracts. Interestingly, VEGFR2 blockade causes sprouting defects during vessel formation.⁽¹¹⁷⁾ All of these findings suggest that a chronic, progressive ischemic process, with associated vascular disruption, is implicated in BA.

Unlike the other HIBA subsets, hiHIF-2 α showed no associations with age, TB, or DB at portoenterostomy (**TABLE 4b**). HIF-1 α and HIF-2 α show some overlap between their target genes,⁽¹⁸⁹⁾ and during embryogenesis, they offset one another in response to hypoxia. In adult angiogenesis, they display different roles: HIF-2 α is triggered in chronic adaptation to hypoxia, while HIF-1 α activity is amplified in the presence of acute hypoxia.^(190, 191) In this study, the behavior of the hiHIF-2 α subset, unrelated to age and bile flow impairment, may represent a nonspecific hypoxic response to chronic liver disease, while hiHIF-1 α behavior may arise from an additional hypoxic aggression developing over time and impairing bile flow, such as a superimposed vascular disruption.

We assessed gene expression of CK19 and MCP1 in an attempt to analyze the effect of hypoxia/ischemia on liver disease severity. CK19 is used to assess severity of liver disease and fibrosis deposition in some hepatic disorders.^(166, 167) In the present study, CK19 gene expression was lower in the hiHIF-2 α and loVEGFR2 subsets. It was positively correlated with VEGFA expression, but no difference in CK19 was observed between the hiVEGFA and loVEGFA subsets.

Cholangiocytes and the PVP share interrelated behaviors. In the BDL model, they proliferate together,⁽¹⁸⁸⁾ while in BDL+HAL, PVP effacement induces hypoxic/ischemic injury of the biliary tree, resulting in decreased proliferation and increased apoptosis of cholangiocytes.⁽¹³⁰⁾ The lower CK19 expression observed in HIBA subsets probably represents a decrease in

cholangiocyte mass, prompted by increased apoptosis and decreased proliferation of these cells. In the long run, BA represents a vanishing biliary disorder,⁽¹⁹²⁾ and the reduced CK19 expression and hypoxia/ischemia we observed in patients with this condition suggests that bile duct disappearance in BA is the result of an ischemic cholangiopathy.

MCP1 is associated with biliary fibrosis.⁽⁸⁾ Thus, it was surprising that, in patients with BA, MCP1 was not associated with expression of any of the studied molecules, except for a positive correlation with VEGFR1 (**TABLE 3**), which acts more on induction inflammation and fibrosis than on angiogenesis.⁽¹⁴⁷⁾ The absence of a correlation between MCP1 and the other studied molecules suggests that the bulk of hypoxia/ischemia in BA is not dependent merely on fibrosis.

Finally, we considered whether decreased VEGFA-VEGFR2 expression in BA could have a protective role, since modulation of these molecules is a proposed treatment for liver diseases.⁽¹⁹³⁾ Recent studies have shown that blocking VEGFA expression in fact aggravates liver fibrosis.^(126, 194) In an animal model of BDL followed by bile flow surgical decompression,⁽¹²⁸⁾ VEGFA neutralization impaired resolution of fibrosis by decreasing sinusoidal permeability and precluding recruitment and infiltration of monocytes to fibrous tissues, which is a crucial mechanism for fibrosis reabsorption. The decreased VEGFA and VEGFR-2 gene expression observed in BA patients in the present study does not imply a protective role against liver impairment; conversely, it seems to be associated with worsening disease.⁽¹⁹⁵⁾

This is a single center study evaluating a limited amount of patients, and the molecular analysis is restricted to the determination of steady-state mRNA levels of seven selected genes. Additional steps of investigation were not feasible due to technical limitations, including the amount of liver tissue for protein expression and immunohistochemistry studies. It is eventually necessary to elucidate in larger samples: the protein expression of molecules

involved with hypoxia; the involvement of inflammatory cells, including macrophages, of angiogenic pathways alternative to VEGFA and VEGFR2, such as those involving other tyrosine kinase receptors,^(104, 111) and the participation of the signaling by other molecules such as Notch and Hedgehog.⁽¹¹¹⁾

In conclusion, this study suggests a role for hypoxia-ischemia in the development of the isolated BA variant, describing a gene expression profile reminiscent of an arteriopathy in the affected patients, similar to the animal model of bile duct plus hepatic artery ligation.

Hypoxia-ischemia in BA seems to evolve over time, lead to a decreasing cholangiocyte mass and to be independent of fibrosis.

ACKNOWLEDGMENTS

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

REFERENCES

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

10. Kim WS, Cheon JE, Youn BJ, Yoo SY, Kim WY, Kim IO, et al. Hepatic arterial diameter measured with US: adjunct for US diagnosis of biliary atresia. *Radiology* 2007;245:549-555.
11. Edom PT, Meurer L, da Silveira TR, 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.
12. Ramm GA, Shepherd RW, Hoskins AC, Greco SA, Ney AD, Pereira TN, et al. Fibrogenesis in pediatric cholestatic liver disease: role of taurocholate and hepatocyte-derived monocyte chemoattractant protein-1 in hepatic stellate cell recruitment. *Hepatology* 2009;49:533-544.
13. Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:523-526.
14. Shay JE, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: crosstalk between inflammation and metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23:389-394.
15. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000;157:411-421.
16. Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 2000;203:1253-1263.
17. Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev* 2000;14:1983-1991.

18. Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 1995;95:1798-1807.
19. Welte J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest* 2013;123:3190-3200.
20. Kobayashi H, Tamatani T, Tamura T, Kusafuka J, Koga H, Yamataka A, et al. The role of monocyte chemoattractant protein-1 in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2006;41:1967-1972.
21. Deltenre P, Valla DC. Ischemic cholangiopathy. *J Hepatol* 2006;44:806-817.
22. Moon JO, Welch TP, Gonzalez FJ, Copple BL. Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G582-G592.
23. Copple BL, Bustamante JJ, Welch TP, Kim ND, Moon JO. Hypoxia-inducible factor-dependent production of profibrotic mediators by hypoxic hepatocytes. *Liver Int* 2009;29:1010-1021.
24. Nath B, Szabo G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver diseases. *Hepatology* 2012;55:622-633.
25. Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, Miquel R, Bosch J, Fernandez M. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* 2009;49:1245-1256.
26. Gardner AW, Parker DE, Montgomery PS, Sosnowska D, Casanegra AI, Ungvari Z, et al. Greater endothelial apoptosis and oxidative stress in patients with peripheral artery disease. *Int J Vasc Med* 2014;2014:160534.

27. Dickinson MG, Bartelds B, Borgdorff MA, Berger RM. The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013;305:L1-L14.
28. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2012;122:4306-4313.
29. Nicolls MR, Mizuno S, Taraseviciene-Stewart L, Farkas L, Drake JI, Al Hussein A, et al. New models of pulmonary hypertension based on VEGF receptor blockade-induced endothelial cell apoptosis. *Pulm Circ* 2012;2:434-442.
30. Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis* 2010;30:258-270.
31. Beaussier M, Wendum D, Fouassier L, Rey C, Barbu V, Lasnier E, et al. Adaptive bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia. *J Hepatol* 2005;42:257-265.
32. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* 1996;270:H1803-H1811.
33. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:469-478.
34. Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Ueno Y, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology* 2006;130:1270-1282.
35. Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Alvaro D. Hepatic microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: a morphological study. *Gastroenterology* 1996;111:1118-1124.

36. Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Franchitto A, et al. Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G307-G317.
37. Kim WY, Safran M, Buckley MR, Ebert BL, Glickman J, Bosenberg M, et al. Failure to prolyl hydroxylate hypoxia-inducible factor alpha phenocopies VHL inactivation in vivo. *EMBO J* 2006;25:4650-4662.
38. Skuli N, Liu L, Runge A, Wang T, Yuan L, Patel S, et al. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood* 2009;114:469-477.
39. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, et al. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 2006;10:413-423.
40. Meriden Z, Forde KA, Pasha TL, Hui JJ, Reddy KR, Furth EE, et al. Histologic predictors of fibrosis progression in liver allografts in patients with hepatitis C virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:289-296.
41. Guimei M, Baddour N, Elkaffash D, Abdou L, Taher Y. Gremlin in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma complicating chronic hepatitis C: an immunohistochemical and PCR study of human liver biopsies. *BMC Res Notes* 2012;5:390-400.
42. Nietgen GW, Vacanti JP, Perez-Atayde AR. Intrahepatic bile duct loss in biliary atresia despite portoenterostomy: a consequence of ongoing obstruction? *Gastroenterology* 1992;102:2126-2133.
43. Shah VH, Bruix J. Antiangiogenic therapy: not just for cancer anymore? *Hepatology* 2009;49:1066-1068.

44. Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Schneider V, Ledermann M, Sägesser H, et al. Pharmacological inhibition of integrin α v β 3 aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis. *Hepatology* 2009;50:1501-1511.
45. Kaur S, Anita K. Angiogenesis in liver regeneration and fibrosis: ‘‘a double-edged sword’’. *Hepatology International* 2013;7:10.
46. Yang L, Kwon J, Popov Y, Gajdos GB, Ordog T, Brekken RA, et al. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology* 2014;146:1339-1350.
47. Iwakiri Y, Shah V, Rockey DC. Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis - Current status and future directions. *J Hepatol* 2014;61:912-924.
48. de Souza AF, Meurer L, da Silveira TR, Gregório C, Reus N, Uribe C, et al. Angiopoietin 1 and angiopoietin 2 are associated with medial thickening of hepatic arterial branches in biliary atresia. *Pediatr Res* 2014;75:22-28.
49. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 2011;146:873-887.

FIGURE 1

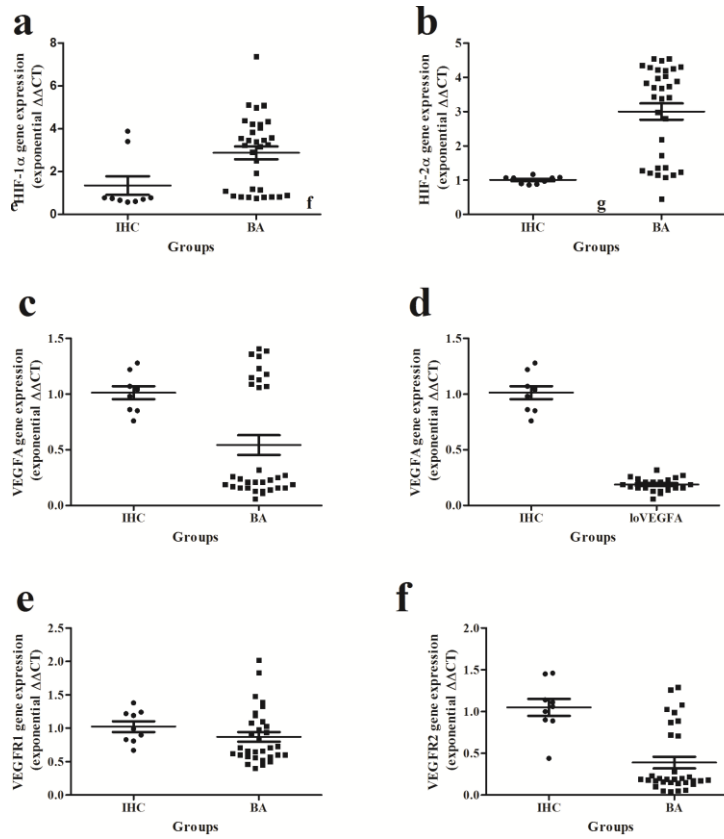


Fig. 1. Gene expression of the studied molecules in patients with biliary atresia (BA) and in patients with intrahepatic cholestasis (IHC). Between-group differences in gene expression were as follows: a) HIF-1 α : $P= 0.001$; b) HIF-2 α : $P<0.001$; c) VEGFA: $P=0.060$; d) specifically, loVEGFA vs.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

FIGURE 2

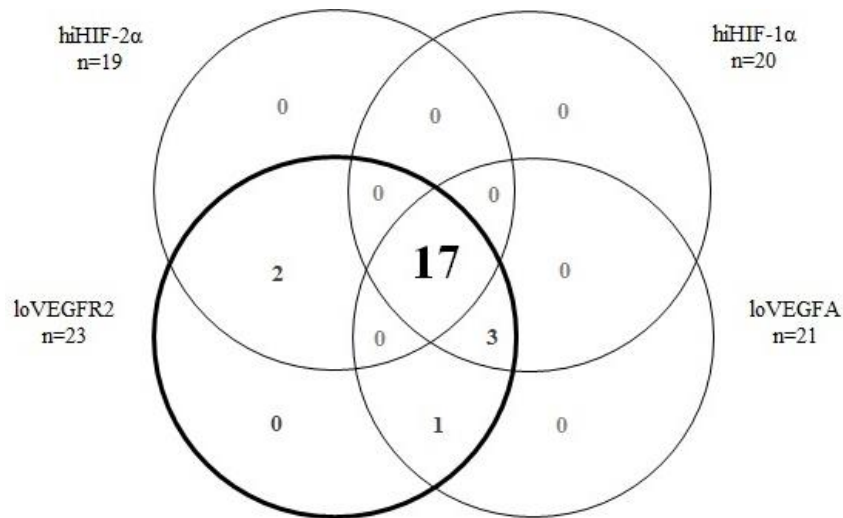


Fig. 2. Venn diagram showing the interrelation between hypoxic/ischemic biliary atresia (HIBA) subsets. All patients from the HIBA subsets were included in the lower VEGFR2 (loVEGFR2) subset (n= 23, 72 % of BA). Seventeen patients (53 % of BA) were included in all HIBA subsets. Abbreviations: lo, subset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

TABLE 1. Probes used in this study

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

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

TABLE 2. Comparison of variables of interest in the biliary atresia and intrahepatic cholestasis groups

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

Mann-Whitney *U* test. Abbreviations: BA, biliary atresia; IHC, intrahepatic cholestasis; HIF, hypoxia-inducible factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; MCP, monocyte chemotactic protein; CK19, cytokeratin 19; AGEP, age at portoenterostomy; TB, total bilirubin; DB, direct-reacting bilirubin; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase.

TABLE 3. Correlation among variables of interest in the biliary atresia group

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

Data expressed as the Spearman correlation coefficient and its statistical significance (within parentheses).

Empty cells represent correlations displayed at the complementary sites of the table. (-) denotes correlation of the given parameter with itself. Abbreviations: HIF, hypoxia-inducible factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; MCP, monocyte chemotactic protein; CK19, cytokeratin 19; TB, total bilirubin; DB, direct-reacting bilirubin; AGEP, age at portoenterostomy.

TABLE 4. Comparison of biliary atresia subsets

VARIABLES	4a. HIF-1 α		P
	hiHIF-1 α (n=20)	loHIF-1 α (n=12)	
	<i>Median (IQR)</i>	<i>Median (IQR)</i>	
HIF-1 α	3.7 (3.3–4.4)	0.8 (0.8–1.1)	<0.001
HIF-2 α	3.9 (3.4–4.3)	1.3 (1.2–2.1)	0.003
VEGFA	0.2 (0.2–0.3)	1.2 (1.1–1.4)	<0.001
VEGFR1	0.6 (0.6–0.7)	1.2 (1–1.5)	<0.001
VEGFR2	0.2 (0.1–0.2)	0.9 (0.3–1.1)	<0.001
MCP 1	1.6 (1.2–2.3)	2.2 (1–3.8)	0.669
CK 19	1 (0.5–3.6)	3.8 (1.3–9.7)	0.056
AGEP (days of life)	66 (58.5–86.7)	51 (36.3–83.3)	0.045
TB (mg/dL)	10 (8.3–12.7)	6.9 (5.4–9.2)	0.005
DB (mg/dL)	6.8 (5.8–9.3)	5.4 (4.3–7)	0.037
GGT (U/L)	731 (590.5–1246)	840 (576.5–1399)	1.000
	4b. HIF-2 α		
	hiHIF-2 α (n=19)	loHIF-2 α (n=13)	
	<i>Median (IQR)</i>	<i>Median (IQR)</i>	
HIF-1 α	3.8 (3.4–4.4)	1.1 (0.8–2.2)	<0.001
HIF-2 α	4.0 (3.7–4.3)	1.3 (1.2–1.9)	<0.001
VEGFA	0.2 (0.1–0.3)	1.2 (0.2–1.4)	0.001
VEGFR1	0.7 (0.6–0.8)	1.1 (0.6–1.4)	0.074
VEGFR2	0.2 (0.1–0.2)	0.9 (0.1–1.1)	0.020
MCP1	1.7 (1.4–2.4)	1.6 (0.7–3.4)	0.347
CK19	0.9 (0.5–2.3)	3.8 (1.3–7.9)	0.040
AGEP (days of life)	65 (56–75)	69 (38.5–92.5)	0.744
TB (mg/dL)	9.8 (7.4–12.7)	8 (5.4–10.2)	0.071
DB (mg/dL)	6.6 (5.4–9.3)	6.1 (4.3–7.7)	0.237
GGT (U/L)	714 (584.5–1182)	1030.5 (576.5–1399)	0.366
	4c. VEGFA		
	loVEGFA (n=21)	hiVEGFA (n=11)	
	<i>Median (IQR)</i>	<i>Median (IQR)</i>	
HIF-1 α	3.6 (3.2–4.4)	0.8 (0.8–1.1)	<0.001
HIF-2 α	3.8(3.4–4.3)	1.3 (1.2–1.7)	0.004
VEGFA	0.2 (0.2–0.2)	1.2 (1.1–1.4)	<0.001
VEGFR1	0.6 (0.5–0.7)	1.2 (1.1–1.5)	<0.001
VEGFR2	0.2 (0.1–0.2)	0.9 (0.7–1.1)	<0.001
MCP1	1.6 (1.1–2.2)	2.2 (1.3–4.2)	0.307
CK19	1.2 (0.5–4.1)	3.8 (1.3–4.6)	0.168
AGEP (days of life)	66 (59–88)	48(34–69)	0.016
TB (mg/dL)	10.2 (8.6–12.6)	6.7 (5.2–8)	0.001
DB (mg/dL)	6.9 (5.9–9.1)	5.3 (4.2–6.1)	0.012
GGT (U/L)	726 (547–1229)	1001 (621–1459)	0.631
	4d. VEGFR2		
	loVEGFR2 (n=23)	hiVEGFR2 (n=9)	
	<i>Median (IQR)</i>	<i>Median (IQR)</i>	
HIF-1 α	3.6 (3.2–4.3)	0.7 (0.8–1.1)	<0.001
HIF-2 α	3.9 (3.4–4.3)	1.2 (1.2–1.4)	<0.001
VEGFA	0.2 (0.2–0.3)	1.2 (1.1–1.4)	<0.001
VEGFR1	0.6 (0.6–0.7)	1.3 (1–1.7)	<0.001
VEGFR2	0.2 (0.1–0.2)	0.9 (0.8–1.2)	<0.001
MCP1	1.6 (1.2–2.3)	2.2 (1.3–4.4)	0.249
CK19	0.9 (0.5–3.9)	3.8 (2.1–7.9)	0.020
AGEP (days of life)	66 (56–88)	45 (33–80.5)	0.040
TB (mg/dL)	9.9 (7.6–12.3)	6.7 (4.7–8.6)	0.014
DB (mg/dL)	6.8 (5.5–8.9)	4.4 (4–6.6)	0.043
GGT (U/L)	717.5 (565.7–1197)	1060 (620–1579)	0.268

Mann-Whitney *U* test. Abbreviations: lo, lower; hi, higher; HIF, hypoxia-inducible factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; MCP, monocyte chemotactic protein; CK19, cytokeratin 19; AGEP, age at portoenterostomy; TB, total bilirubin; DB, direct-reacting bilirubin; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase.

CONCLUSÕES

- A expressão gênica de VEGFA, mensurada em tecido hepático, não mostrou diferença entre os grupos AB e CIH. Porém, revelou a presença de dois subgrupos de AB, um com maior expressão do que CIH e outro com expressão 3x menor que a mediana do grupo CIH, ambos com diferença estatística. Quanto ao VEGFR1, os grupos AB e CIH não diferiram e a expressão de VEGFR2 foi menor no grupo AB, quando comparado a CIH, também apresentando dois subgrupos de AB;
- Nas medidas de expressão gênica de MCP1 o grupo AB apresentou maiores valores, indicando um intenso processo de fibrogênese biliar. Na medida de CK19 não houve diferença estatística ao comparar AB e CIH;
- Ao comparar AB e CIH na avaliação de: idade, GGT, TGO, TGP, BT e BD no momento da laparotomia exploradora, a única variável distinta foi GGT com maiores níveis séricos no grupo AB; A dosagem de BT aos seis meses, pós portoenterostomia, pareceu ser um importante fator na SFN em dois anos, bem como a dosagem de BD em dois meses pós portoenterostomia;
- Na análise morfométrica, CK7 apresentou maior área positiva nos pacientes AB, indicando maior proliferação ductular. Por picrossírius, a área de positividade também foi maior no grupo AB, indicando maior área de fibrose. E na análise do espessamento da túnica média, com coloração HE, não houve diferença estatística entre os grupos AB e CIH;

- Pelo teste de Spearman, destacaram-se as correlações positivas entre VEGFA e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2. Correlação positiva de CK19 com VEGFA e R1. Correlação negativa entre VEGFR2 e idade na portoenterostomia. E correlações negativas entre VEGFA, VEGFR1, VEGFR2 e BT e BD;
- As variáveis de expressão gênica não pareceram ter impacto sobre a evolução clínica dos pacientes, não tendo relação com valores séricos de BT: 2 mg/dL aos seis meses, e na SFN em dois anos.

PERSPECTIVAS

Uma vez que a etiopatogenia da AB ainda não está totalmente elucidada, e ao fato de termos observado, a nível molecular, hipóxia/isquemia no tecido hepático destes pacientes, se faz necessário outras técnicas com o objetivo de confirmar estes achados. O desenvolvimento de modelos mecanísticos pode fornecer detalhes do momento e ação do processo hipóxico-isquêmico no desenvolvimento da lesão hepatobiliar. Outra opção interessante parece ser a avaliação do padrão de metilação nos genes VEGFA e VEGFR2. Além disso, são necessárias mais pesquisas para elucidar o envolvimento de células inflamatórias, incluindo os macrófagos, bem como de outras vias angiogênicas alternativas.

REFERÊNCIAS

1. Santos JL, Carvalho E, Bezerra JA. Advances in biliary atresia: from patient care to research. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(6):522-7.
2. Chardot C. Biliary atresia. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:28.
3. Nio M, Ohi R, Miyano T, Saeki M, Shiraki K, Tanaka K, et al. Five- and 10-year survival rates after surgery for biliary atresia: a report from the Japanese Biliary Atresia Registry. *J Pediatr Surg.* 2003;38(7):997-1000.
4. McKiernan PJ, Baker AJ, Kelly DA. The frequency and outcome of biliary atresia in the UK and Ireland. *Lancet.* 2000;355(9197):25-9.
5. de Carvalho E, Ivantes CA, Bezerra JA. Extrahepatic biliary atresia: current concepts and future directions. *J Pediatr (Rio J).* 2007;83(2):105-20.
6. Sokol RJ, Shepherd RW, Superina R, Bezerra JA, Robuck P, Hoofnagle JH. Screening and outcomes in biliary atresia: summary of a National Institutes of Health workshop. *Hepatology.* 2007;46(2):566-81.
7. Shneider BL, Mazariegos GV. Biliary atresia: a transplant perspective. *Liver Transpl.* 2007;13(11):1482-95.
8. Ramm GA, Shepherd RW, Hoskins AC, Greco SA, Ney AD, Pereira TN, et al. Fibrogenesis in pediatric cholestatic liver disease: role of taurocholate and hepatocyte-derived monocyte chemotaxis protein-1 in hepatic stellate cell recruitment. *Hepatology.* 2009;49(2):533-44.
9. Cauduro SM. [Extrahepatic biliary atresia: diagnostic methods]. *J Pediatr (Rio J).* 2003;79(2):107-14.
10. Bessho K, Bezerra JA. Biliary atresia: will blocking inflammation tame the disease? *Annu Rev Med.* 2011;62:171-85.
11. Fischler B, Lamireau T. Cholestasis in the newborn and infant. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2014;38(3):263-7.
12. Lefkowitz JH. Biliary atresia. *Mayo Clin Proc.* 1998;73(1):90-5.
13. 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(3):411-8.
14. Ho CW, Shioda K, Shirasaki K, Takahashi S, Tokimatsu S, Maeda K. The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the hepatobiliary system and the hepatic artery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1993;16(1):53-60.
15. dos Santos JL, da Silveira TR, da Silva VD, Cerski CT, Wagner MB. Medial thickening of hepatic artery branches in biliary atresia. A morphometric study. *J Pediatr Surg.* 2005;40(4):637-42.
16. Edom PT, Meurer L, da Silveira TR, Matte U, dos Santos JL. Immunolocalization of VEGF A and its receptors, VEGFR1 and VEGFR2, in the liver from patients with biliary atresia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2011;19(4):360-8.
17. Uflacker R, Pariente DM. Angiographic findings in biliary atresia. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2004;27(5):486-90.

18. Humphrey TM, Stringer MD. Biliary atresia: US diagnosis. *Radiology*. 2007;244(3):845-51.
19. Kim WS, Cheon JE, Youn BJ, Yoo SY, Kim WY, Kim IO, et al. Hepatic arterial diameter measured with US: adjunct for US diagnosis of biliary atresia. *Radiology*. 2007;245(2):549-55.
20. Caruso S, Miraglia R, Milazzo M, Maruzzelli L, Pasta A, Spada M, et al. Multidetector computed tomography hepatic findings in children with end-stage biliary atresia. *Eur Radiol*. 2010;20(6):1468-75.
21. Santos JL, Silveira TR. Atresia Biliar. In: Silva LR, Ferreira CT, Carvalho E, editors. *Hepatologia em Pediatria*. Barueri: Editora Manole Ltda; 2012. p. 804.
22. Porta G, Hirschfeld A. Icterícia. In: Porta G, Koda Y, editors. *Gastroenterologia e Hepatologia*. Pediatria ICr – HC-FMUSP. Barueri: Manole; 2011. p. 80-7.
23. McKiernan P. Neonatal jaundice. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012;36(3):253-6.
24. Mieli-Vergani G, Howard ER, Portman B, Mowat AP. Late referral for biliary atresia--missed opportunities for effective surgery. *Lancet*. 1989;1(8635):421-3.
25. Davenport M, Kerkar N, Mieli-Vergani G, Mowat AP, Howard ER. Biliary atresia: the King's College Hospital experience (1974-1995). *J Pediatr Surg*. 1997;32(3):479-85.
26. Hadzić N, Davenport M, Tizzard S, Singer J, Howard ER, Mieli-Vergani G. Long-term survival following Kasai portoenterostomy: is chronic liver disease inevitable? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003;37(4):430-3.
27. Nakamura K, Tanoue A. Etiology of biliary atresia as a developmental anomaly: recent advances. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2013;20(5):459-64.
28. Mowat AP. Biliary atresia into the 21st century: a historical perspective. *Hepatology*. 1996;23(6):1693-5.
29. Battaglin C. Atresie des voies biliaires extra -hepatiques: revue des cas genevois sur 12 ans: Faculté de Médecine de l'Université de Genève; 2002.
30. Holmes, J.B. *Congenital obliteration of the bile ducts. Diagnosis and suggestion of treatment. The American Journal Of Diseases Of Children*. 1916;XI(06):405-31.
31. Masaki N. Chefe do Departamento de Cirurgia Pediátrica ed: Tohoku University Graduate School of Medicine.
32. Davenport M. Biliary atresia. *Semin Pediatr Surg*. 2005;14(1):42-8.
33. Narkewicz MR. Biliary atresia: an update on our understanding of the disorder. *Curr Opin Pediatr*. 2001;13(5):435-40.
34. Zerbini MC, Gallucci SD, Maezono R, Ueno CM, Porta G, Maksoud JG, et al. Liver biopsy in neonatal cholestasis: a review on statistical grounds. *Mod Pathol*. 1997;10(8):793-9.
35. Santos JL, Almeida H, Cerski CT, Silveira TR. Histopathological diagnosis of intra- and extrahepatic neonatal cholestasis. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31(7):911-9.
36. Landing BH. Considerations of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst--the concept of infantile obstructive cholangiopathy. *Prog Pediatr Surg*. 1974;6:113-39.
37. Kasai M, Suzuki S. A new operation for "non -correctable" biliary atresia: hepatic portoenterostomy. In: Shujutsu, editor. 1959. p. 13:733.

38. Kieling CO, Santos JL, Vieira SM, Ferreira CT, Linhares AR, Lorentz AL, et al. Biliary atresia: we still operate too late. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(5):436-41.
39. Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, Le Pommelet C, Golmard J, 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):224-8.
40. Wildhaber BE, Majno P, Mayr J, Zachariou Z, Hohlfeld J, Schwoebel M, et al. Biliary atresia: Swiss national study, 1994-2004. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008;46(3):299-307.
41. 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):366-71.
42. Howard ER, MacLean G, Nio M, Donaldson N, Singer J, Ohi R. Survival patterns in biliary atresia and comparison of quality of life of long-term survivors in Japan and England. *J Pediatr Surg*. 2001;36(6):892-7.
43. Kumagi T, Drenth JP, Guttman O, Ng V, Lilly L, Therapondos G, et al. Biliary atresia and survival into adulthood without transplantation: a collaborative multicentre clinic review. *Liver Int*. 2012;32(3):510-8.
44. Chung PH, Wong KK, Tam PK. Predictors for failure after Kasai operation. *J Pediatr Surg*. 2015;50(2):293-6.
45. Sokol RJ, Mack C, Narkewicz MR, Karrer FM. Pathogenesis and outcome of biliary atresia: current concepts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003;37(1):4-21.
46. Davenport M, Caponcelli E, Livesey E, Hadzic N, Howard E. Surgical outcome in biliary atresia: etiology affects the influence of age at surgery. *Ann Surg*. 2008;247(4):694-8.
47. Wildhaber BE, Coran AG, Drongowski RA, Hirschl RB, Geiger JD, Lelli JL, et al. The Kasai portoenterostomy for biliary atresia: A review of a 27-year experience with 81 patients. *J Pediatr Surg*. 2003;38(10):1480-5.
48. Serinet MO, Broué P, Jacquemin E, Lachaux A, Sarles J, Gottrand F, et al. Management of patients with biliary atresia in France: results of a decentralized policy 1986-2002. *Hepatology*. 2006;44(1):75-84.
49. Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, Le Pommelet C, Golmard JL, Auvert B. Epidemiology of biliary atresia in France: a national study 1986-96. *J Hepatol*. 1999;31(6):1006-13.
50. Nio M, Ohi R. Biliary atresia. *Semin Pediatr Surg*. 2000;9(4):177-86.
51. Davenport M, Savage M, Mowat AP, Howard ER. Biliary atresia splenic malformation syndrome: an etiologic and prognostic subgroup. *Surgery*. 1993;113(6):662-8.
52. Guttman OR, Roberts EA, Schreiber RA, Barker CC, Ng VL, Group CPHR. Biliary atresia with associated structural malformations in Canadian infants. *Liver Int*. 2011;31(10):1485-93.
53. Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia. *Lancet*. 2009;374(9702):1704-13.
54. Shimadera S, Iwai N, Deguchi E, Kimura O, Ono S, Furukawa T, et al. Predicting factors on the occurrence of cystic dilatation of intrahepatic biliary system in biliary atresia. *Pediatr Surg Int*. 2010;26(6):611-4.
55. Hinds R, Davenport M, Mieli-Vergani G, Hadzić N. Antenatal presentation of biliary atresia. *J Pediatr*. 2004;144(1):43-6.

56. Caponcelli E, Knisely AS, Davenport M. Cystic biliary atresia: an etiologic and prognostic subgroup. *J Pediatr Surg.* 2008;43(9):1619-24.
57. Davenport M. A challenge on the use of the words embryonic and perinatal in the context of biliary atresia. *Hepatology.* 2005;41(2):403-4; author reply 4-5.
58. Davenport M, Tizzard SA, Underhill J, Mieli-Vergani G, Portmann B, Hadzić N. The biliary atresia splenic malformation syndrome: a 28-year single-center retrospective study. *J Pediatr.* 2006;149(3):393-400.
59. Chandra RS. Biliary atresia and other structural anomalies in the congenital polysplenia syndrome. *J Pediatr.* 1974;85(5):649-55.
60. Moyer K, Kaimal V, Pacheco C, Mourya R, Xu H, Shivakumar P, et al. Staging of biliary atresia at diagnosis by molecular profiling of the liver. *Genome Med.* 2010;2(5):33.
61. Yoon PW, Bresee JS, Olney RS, James LM, Khoury MJ. Epidemiology of biliary atresia: a population-based study. *Pediatrics.* 1997;99(3):376-82.
62. Caton AR, Druschel CM, McNutt LA. The epidemiology of extrahepatic biliary atresia in New York State, 1983-98. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2004;18(2):97-105.
63. The NS, Honein MA, Caton AR, Moore CA, Siega-Riz AM, Druschel CM, et al. Risk factors for isolated biliary atresia, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2002. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(19):2274-84.
64. Ayas MF, Hillemeier AC, Olson AD. Lack of evidence for seasonal variation in extrahepatic biliary atresia during infancy. *J Clin Gastroenterol.* 1996;22(4):292-4.
65. Wada H, Muraji T, Yokoi A, Okamoto T, Sato S, Takamizawa S, et al. Insignificant seasonal and geographical variation in incidence of biliary atresia in Japan: a regional survey of over 20 years. *J Pediatr Surg.* 2007;42(12):2090-2.
66. Harper P, Plant JW, Unger DB. Congenital biliary atresia and jaundice in lambs and calves. *Aust Vet J.* 1990;67(1):18-22.
67. Sokol RJ, Mack C. Etiopathogenesis of biliary atresia. *Semin Liver Dis.* 2001;21(4):517-24.
68. Oetzmann von Sochaczewski C, Pintelon I, Brouns I, Dreier A, Klemann C, Timmermans JP, et al. Rotavirus particles in the extrahepatic bile duct in experimental biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 2014;49(4):520-4.
69. Wang W, Donnelly B, Bondoc A, Mohanty SK, McNeal M, Ward R, et al. The rhesus rotavirus gene encoding VP4 is a major determinant in the pathogenesis of biliary atresia in newborn mice. *J Virol.* 2011;85(17):9069-77.
70. Mack CL, Tucker RM, Lu BR, Sokol RJ, Fontenot AP, Ueno Y, et al. Cellular and humoral autoimmunity directed at bile duct epithelia in murine biliary atresia. *Hepatology.* 2006;44(5):1231-9.
71. Nadal D, Wunderli W, Meurmann O, Briner J, Hirsig J. Isolation of respiratory syncytial virus from liver tissue and extrahepatic biliary atresia material. *Scand J Infect Dis.* 1990;22(1):91-3.
72. R D-S, DB D, LR M, MJ F, AG W, BB R. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia. *Pediatric and Developmental Pathology.* 2000;3(4):367-73.

73. Drut R, Drut RM, Gómez MA, Cueto Rúa E, Lojo MM. Presence of human papillomavirus in extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998;27(5):530-5.
74. Bangaru B, Morecki R, Glaser JH, Gartner LM, Horwitz MS. Comparative studies of biliary atresia in the human newborn and reovirus-induced cholangitis in weanling mice. *Lab Invest.* 1980;43(5):456-62.
75. Morecki R, Glaser JH, Cho S, Balistreri WF, Horwitz MS. Biliary atresia and reovirus type 3 infection. *N Engl J Med.* 1982;307(8):481-4.
76. Glaser JH, Balistreri WF, Morecki R. Role of reovirus type 3 in persistent infantile cholestasis. *J Pediatr.* 1984;105(6):912-5.
77. 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(3):697-702.
78. Dussaix E, Hadchouel M, Tardieu M, Alagille D. Biliary atresia and reovirus type 3 infection. *N Engl J Med.* 1984;310(10):658.
79. Riepenhoff-Talty M, Gouvea V, Evans MJ, Svensson L, Hoffenberg E, Sokol RJ, et al. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *J Infect Dis.* 1996;174(1):8-15.
80. Tarr PI, Haas JE, Christie DL. Biliary atresia, cytomegalovirus, and age at referral. *Pediatrics.* 1996;97(6 Pt 1):828-31.
81. Fischler B, Ehrnst A, Forsgren M, Orvell C, Nemeth A. The viral association of neonatal cholestasis in Sweden: a possible link between cytomegalovirus infection and extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998;27(1):57-64.
82. Fischler B, Woxenius S, Nemeth A, Papadogiannakis N. Immunoglobulin deposits in liver tissue from infants with biliary atresia and the correlation to cytomegalovirus infection. *J Pediatr Surg.* 2005;40(3):541-6.
83. Jevon GP, Dimmick JE. Biliary atresia and cytomegalovirus infection: a DNA study. *Pediatr Dev Pathol.* 1999;2(1):11-4.
84. De Tommaso AM, Andrade PD, Costa SC, Escanhoela CA, Hessel G. High frequency of human cytomegalovirus DNA in the liver of infants with extrahepatic neonatal cholestasis. *BMC Infect Dis.* 2005;5:108.
85. Soomro GB, Abbas Z, Hassan M, Luck N, Memon Y, Khan AW. Is there any association of extra hepatic biliary atresia with cytomegalovirus or other infections? *J Pak Med Assoc.* 2011;61(3):281-3.
86. Davenport M. Biliary atresia: clinical aspects. *Semin Pediatr Surg.* 2012;21(3):175-84.
87. Shen C, Zheng S, Wang W, Xiao XM. Relationship between prognosis of biliary atresia and infection of cytomegalovirus. *World J Pediatr.* 2008;4(2):123-6.
88. Brindley SM, Lanham AM, Karrer FM, Tucker RM, Fontenot AP, Mack CL. Cytomegalovirus-specific T-cell reactivity in biliary atresia at the time of diagnosis is associated with deficits in regulatory T cells. *Hepatology.* 2012;55(4):1130-8.
89. Silveira TR, Salzano FM, Howard ER, Mowat AP. The relative importance of familial, reproductive and environmental factors in biliary atresia: etiological implications and effect on patient survival. *Braz J Med Biol Res.* 1992;25(7):673-81.

90. Carmi R, Magee CA, Neill CA, Karrer FM. Extrahepatic biliary atresia and associated anomalies: etiologic heterogeneity suggested by distinctive patterns of associations. *Am J Med Genet.* 1993;45(6):683-93.
91. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res.* 2008;647(1-2):30-8.
92. Matthews RP, Eauclore SF, Mugnier M, Lorent K, Cui S, Ross MM, et al. DNA hypomethylation causes bile duct defects in zebrafish and is a distinguishing feature of infantile biliary atresia. *Hepatology.* 2011;53(3):905-14.
93. Zhang DY, Sabla G, Shivakumar P, Tiao G, Sokol RJ, Mack C, et al. Coordinate expression of regulatory genes differentiates embryonic and perinatal forms of biliary atresia. *Hepatology.* 2004;39(4):954-62.
94. Davit-Spraul A, Baussan C, Hermeziu B, Bernard O, Jacquemin E. CFC1 gene involvement in biliary atresia with polysplenia syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;46(1):111-2.
95. Arikan C, Berdeli A, Kilic M, Tumgor G, Yagci RV, Aydogdu S. Polymorphisms of the ICAM-1 gene are associated with biliary atresia. *Dig Dis Sci.* 2008;53(7):2000-4.
96. Lee HC, Chang TY, Yeung CY, Chan WT, Jiang CB, Chen WF, et al. Genetic variation in the vascular endothelial growth factor gene is associated with biliary atresia. *J Clin Gastroenterol.* 2010;44(2):135-9.
97. Tsai EA, Grochowski CM, Loomes KM, Bessho K, Hakonarson H, Bezerra JA, et al. Replication of a GWAS signal in a Caucasian population implicates ADD3 in susceptibility to biliary atresia. *Hum Genet.* 2014;133(2):235-43.
98. Alpert LI, Strauss L, Hirschhorn K. Neonatal hepatitis and biliary atresia associated with trisomy 17-18 syndrome. *N Engl J Med.* 1969;280(1):16-20.
99. Buffa V, Tancredi F, Pierro M, Guanti G. [Case of trisomy of chromosome 18 associated with hypermethioninemia and biliary atresia]. *Pediatria (Napoli).* 1972;80(2):159-69.
100. Ikeda S, Sera Y, Yoshida M, Ohshiro H, Ueno M, Izaki T, et al. Extrahepatic biliary atresia associated with trisomy 18. *Pediatr Surg Int.* 1999;15(2):137-8.
101. Pameijer CR, Hubbard AM, Coleman B, Flake AW. Combined pure esophageal atresia, duodenal atresia, biliary atresia, and pancreatic ductal atresia: prenatal diagnostic features and review of the literature. *J Pediatr Surg.* 2000;35(5):745-7.
102. .
103. Lam FW, Chan WK, Lam ST, Chu WP, Kwong NS. Proximal 10q trisomy: a new case with anal atresia. *J Med Genet.* 2000;37(9):E24.
104. de Souza AF, Meurer L, da Silveira TR, Gregório C, Reus N, Uribe C, et al. Angiopoietin 1 and angiopoietin 2 are associated with medial thickening of hepatic arterial branches in biliary atresia. *Pediatr Res.* 2014;75(1-1):22-8.
105. Konisti S, Kiriakidis S, Paleolog EM. Hypoxia--a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(3):153-62.
106. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008;134(6):1655-69.

107. Takemura M, Oguma S, Mori S, Ishii M, Starzl TE, Demetris AJ, et al. Peribiliary vascular diseases in rejected livers; computer-aided three-dimensional reconstruction and morphometry. *Transplant Proc.* 1991;23(1 Pt 2):1409-12.
108. Yamamoto K, Sherman I, Phillips MJ, Fisher MM. Three-dimensional observations of the hepatic arterial terminations in rat, hamster and human liver by scanning electron microscopy of microvascular casts. *Hepatology.* 1985;5(3):452-6.
109. Deltenre P, Valla DC. Ischemic cholangiopathy. *J Hepatol.* 2006;44(4):806-17.
110. Ruemmele P, Hofstaedter F, Gelbmann CM. Secondary sclerosing cholangitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009;6(5):287-95.
111. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011;146(6):873-87.
112. Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest.* 1993;91(5):2235-43.
113. Hyder SM, Stancel GM, Chiappetta C, Murthy L, Boettger-Tong HL, Makela S. Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen. *Cancer Res.* 1996;56(17):3954-60.
114. Ruohola JK, Valve EM, Karkkainen MJ, Joukov V, Alitalo K, Härkönen PL. Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;149(1-2):29-40.
115. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004;56(4):549-80.
116. Fraisl P, Mazzone M, Schmidt T, Carmeliet P. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell.* 2009;16(2):167-79.
117. Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest.* 2013;123(8):3190-200.
118. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 2003;161(6):1163-77.
119. Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T, et al. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem.* 2003;278(9):7520-30.
120. Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Ikenaka Y, Kitade M, Kaji K, et al. Angiotensin-II and vascular endothelial growth factor interaction plays an important role in rat liver fibrosis development. *Hepatol Res.* 2006;36(2):124-9.
121. Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2000;31(1):141-8.
122. El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, et al. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology.* 1998;27(6):1554-62.

123. Melgar-Lesmes P, Tugues S, Ros J, Fernández-Varo G, Morales-Ruiz M, Rodés J, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 play a major role in the pathogenesis of vascular leakage in cirrhotic rats. *Gut*. 2009;58(2):285-92.
124. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.
125. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, et al. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut*. 2003;52(9):1347-54.
126. Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Schneider V, Ledermann M, Sägeser H, et al. Pharmacological inhibition of integrin α v β 3 aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis. *Hepatology*. 2009;50(5):1501-11.
127. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995;146(5):1029-39.
128. Yang L, Kwon J, Popov Y, Gajdos GB, Ordog T, Brekken RA, et al. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology*. 2014;146(5):1339-50.e1.
129. .
130. Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Franchitto A, et al. Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291(2):G307-17.
131. Glaser S, Onori P, Gaudio E, Ueno Y, Pannarale L, Franchitto A, et al. Taurocholic acid prevents biliary damage induced by hepatic artery ligation in cholestatic rats. *Dig Liver Dis*. 2010;42(10):709-17.
132. Beaussier M, Wendum D, Fouassier L, Rey C, Barbu V, Lasnier E, et al. Adaptive bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia. *J Hepatol*. 2005;42(2):257-65.
133. Nicolls MR, Mizuno S, Taraseviciene-Stewart L, Farkas L, Drake JI, Al Hussein A, et al. New models of pulmonary hypertension based on VEGF receptor blockade-induced endothelial cell apoptosis. *Pulm Circ*. 2012;2(4):434-42.
134. Gardner AW, Parker DE, Montgomery PS, Sosnowska D, Casanegra AI, Ungvari Z, et al. Greater endothelial apoptosis and oxidative stress in patients with peripheral artery disease. *Int J Vasc Med*. 2014;2014:160534.
135. Gien J, Seedorf GJ, Balasubramaniam V, Markham N, Abman SH. Intrauterine pulmonary hypertension impairs angiogenesis in vitro: role of vascular endothelial growth factor nitric oxide signaling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(11):1146-53.
136. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(5):359-71.
137. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*. 2001;2001(112):re21.
138. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudła B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology. *Endokrynol Pol*. 2011;62(5):444-55.

139. Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer*. 2000;36(13 Spec No):1649-60.
140. Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res*. 2000;60(15):4010-5.
141. Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuysen B, Koike C, Carmeliet P, Jain RK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha--> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res*. 2000;60(22):6248-52.
142. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*. 1998;12(2):149-62.
143. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187(3):1579-86.
144. Gaudio E, Franchitto A, Pannarale L, Carpino G, Alpini G, Francis H, et al. Cholangiocytes and blood supply. *World J Gastroenterol*. 2006;12(22):3546-52.
145. Terman B, Khandke L, Dougher-Vermazan M, Maglione D, Lassam NJ, Gospodarowicz D, et al. VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor. *Growth Factors*. 1994;11(3):187-95.
146. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science*. 2003;299(5608):890-3.
147. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*. 2006;39(5):469-78.
148. Chappell JC, Taylor SM, Ferrara N, Bautch VL. Local guidance of emerging vessel sprouts requires soluble Flt-1. *Dev Cell*. 2009;17(3):377-86.
149. Kearney JB, Ambler CA, Monaco KA, Johnson N, Rapoport RG, Bautch VL. Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division. *Blood*. 2002;99(7):2397-407.
150. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002;20(21):4368-80.
151. Ortega N, Hutchings H, Plouët J. Signal relays in the VEGF system. *Front Biosci*. 1999;4:D141-52.
152. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004;10(4):355-61.
153. Müller-Brüsselbach S, Kömhoff M, Rieck M, Meissner W, Kaddatz K, Adamkiewicz J, et al. Deregulation of tumor angiogenesis and blockade of tumor growth in PPARbeta-deficient mice. *EMBO J*. 2007;26(15):3686-98.
154. Piqueras L, Reynolds AR, Hodivala-Dilke KM, Alfranca A, Redondo JM, Hatae T, et al. Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(1):63-9.

155. Wang D, Wang H, Guo Y, Ning W, Katkuri S, Wahli W, et al. Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and VEGF stimulates cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(50):19069-74.
156. Panigrahy D, Kaipainen A, Huang S, Butterfield CE, Barnés CM, Fannon M, et al. PPARalpha agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(3):985-90.
157. Meissner M, Stein M, Urbich C, Reisinger K, Suske G, Staels B, et al. PPARalpha activators inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 expression by repressing Sp1-dependent DNA binding and transactivation. *Circ Res*. 2004;94(3):324-32.
158. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(12):885-96.
159. Panigrahy D, Singer S, Shen LQ, Butterfield CE, Freedman DA, Chen EJ, et al. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest*. 2002;110(7):923-32.
160. Chintalgattu V, Harris GS, Akula SM, Katwa LC. PPAR-gamma agonists induce the expression of VEGF and its receptors in cultured cardiac myofibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2007;74(1):140-50.
161. Bråkenhielm E, Veitonmäki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(8):2476-81.
162. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, et al. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004;279(2):1304-9.
163. Santos JL, Kieling CO, Meurer L, Vieira S, Ferreira CT, Lorentz A, et al. The extent of biliary proliferation in liver biopsies from patients with biliary atresia at portoenterostomy is associated with the postoperative prognosis. *J Pediatr Surg*. 2009;44(4):695-701.
164. Isic Dencic T, Cvejic D, Paunovic I, Tatic S, Havelka M, Savin S. Cytokeratin19 expression discriminates papillary thyroid carcinoma from other thyroid lesions and predicts its aggressive behavior. *Med Oncol*. 2013;30(1):362.
165. Jain R, Fischer S, Serra S, Chetty R. The use of Cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18(1):9-15.
166. Guimei M, Baddour N, Elkaffash D, Abdou L, Taher Y. Gremlin in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma complicating chronic hepatitis C: an immunohistochemical and PCR study of human liver biopsies. *BMC Res Notes*. 2012;5:390.
167. Meriden Z, Forde KA, Pasha TL, Hui JJ, Reddy KR, Furth EE, et al. Histologic predictors of fibrosis progression in liver allografts in patients with hepatitis C virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(3):289-96, 96.e1-8.
168. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313-26.
169. Harada Y, Edamatsu H, Kataoka T. PLCε cooperates with the NF-κB pathway to augment TNFα-stimulated CCL2/MCP1 expression in human keratinocyte. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;414(1):106-11.

170. Carvalho E, Santos JL, Silveira TR, Kieling CO, Silva LR, Porta G, et al. Biliary atresia: the Brazilian experience. *J Pediatr (Rio J)*. 2010;86(6):473-9.
171. Bessho K, Mourya R, Shivakumar P, Walters S, Magee JC, Rao M, et al. Gene expression signature for biliary atresia and a role for interleukin-8 in pathogenesis of experimental disease. *Hepatology*. 2014;60(1):211-23.
172. Brough AJ, Bernstein J. Liver biopsy in the diagnosis of infantile obstructive jaundice. *Pediatrics*. 1969;43(4):519-26.
173. Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;259(3):523-6.
174. Shay JE, Celeste Simon M. Hypoxia-inducible factors: crosstalk between inflammation and metabolism. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23(4):389-94.
175. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol*. 2000;157(2):411-21.
176. Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol*. 2000;203(Pt 8):1253-63.
177. Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev*. 2000;14(16):1983-91.
178. Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest*. 1995;95(4):1798-807.
179. Kobayashi H, Tamatani T, Tamura T, Kusafuka J, Koga H, Yamataka A, et al. The role of monocyte chemoattractant protein-1 in biliary atresia. *J Pediatr Surg*. 2006;41(12):1967-72.
180. Moon JO, Welch TP, Gonzalez FJ, Copple BL. Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(3):G582-92.
181. Copple BL, Bustamante JJ, Welch TP, Kim ND, Moon JO. Hypoxia-inducible factor-dependent production of profibrotic mediators by hypoxic hepatocytes. *Liver Int*. 2009;29(7):1010-21.
182. Nath B, Szabo G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver diseases. *Hepatology*. 2012;55(2):622-33.
183. Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, Miquel R, Bosch J, Fernandez M. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology*. 2009;49(4):1245-56.
184. Dickinson MG, Bartelds B, Borgdorff MA, Berger RM. The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;305(1):L1-14.
185. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4306-13.

186. Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis.* 2010;30(3):258-70.
187. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol.* 1996;270(5 Pt 2):H1803-11.
188. Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Alvaro D. Hepatic microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: a morphological study. *Gastroenterology.* 1996;111(4):1118-24.
189. Kim WY, Safran M, Buckley MR, Ebert BL, Glickman J, Bosenberg M, et al. Failure to prolyl hydroxylate hypoxia-inducible factor alpha phenocopies VHL inactivation in vivo. *EMBO J.* 2006;25(19):4650-62.
190. Skuli N, Liu L, Runge A, Wang T, Yuan L, Patel S, et al. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood.* 2009;114(2):469-77.
191. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, et al. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell.* 2006;10(5):413-23.
192. Nietgen GW, Vacanti JP, Perez-Atayde AR. Intrahepatic bile duct loss in biliary atresia despite portoenterostomy: a consequence of ongoing obstruction? *Gastroenterology.* 1992;102(6):2126-33.
193. Shah VH, Bruix J. Antiangiogenic therapy: not just for cancer anymore? *Hepatology.* 2009;49(4):1066-8.
194. Kaur S, Anita K. Angiogenesis in liver regeneration and fibrosis: “a double-edged sword”. *Hepatology International.* 2013;7:10.
195. Iwakiri Y, Shah V, Rockey DC. Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis - Current status and future directions. *J Hepatol.* 2014;61(4):912-24.
196. Inoué S, Spring KR. *Microscope Image Formation. Video Microscopy.* New York: Plenum Press; 1997. p. 13-117.
197. Chevallier M, Guerret S, Chossegros P, Gerard F, Grimaud JA. A histological semiquantitative scoring system for evaluation of hepatic fibrosis in needle liver biopsy specimens: comparison with morphometric studies. *Hepatology.* 1994;20(2):349-55.
198. Lee MS, Kim MJ, Lee MJ, Yoon CS, Han SJ, Oh JT, et al. Biliary atresia: color doppler US findings in neonates and infants. *Radiology.* 2009;252(1):282-9.
199. Robie DK, Overfelt SR, Xie L. Differentiating biliary atresia from other causes of cholestatic jaundice. *Am Surg.* 2014;80(9):827-31.
200. Davenport M, De Ville de Goyet J, Stringer MD, Mieli-Vergani G, Kelly DA, McClean P, et al. Seamless management of biliary atresia in England and Wales (1999-2002). *Lancet.* 2004;363(9418):1354-7.
201. López Santamaría M, Gámez M, Murcia J, Díez-Pardo J, Vázquez J, Migliazza L, et al. [Kasai operation in the age of liver transplantation. Healing or merely palliative technique?]. *Cir Pediatr.* 2000;13(3):102-5.

202. van Heurn LW, Saing H, Tam PK. Portoenterostomy for biliary atresia: Long-term survival and prognosis after esophageal variceal bleeding. *J Pediatr Surg.* 2004;39(1):6-9.
203. Shteyer E, Ramm GA, Xu C, White FV, Shepherd RW. Outcome after portoenterostomy in biliary atresia: pivotal role of degree of liver fibrosis and intensity of stellate cell activation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;42(1):93-9.
204. Ohhama Y, Shinkai M, Fujita S, Nishi T, Yamamoto H. Early prediction of long-term survival and the timing of liver transplantation after the Kasai operation. *J Pediatr Surg.* 2000;35(7):1031-4.
205. Goda T, Kawahara H, Kubota A, Hirano K, Umeda S, Tani G, et al. The most reliable early predictors of outcome in patients with biliary atresia after Kasai's operation. *J Pediatr Surg.* 2013;48(12):2373-7.
206. Gauthier F, Luciani JL, Chardot C, Branchereau S, de Dreuzy O, Lababidi A, et al. Determinants of life span after Kasai operation at the era of liver transplantation. *Tohoku J Exp Med.* 1997;181(1):97-107.
207. Davenport M, Ong E, Sharif K, Alizai N, McClean P, Hadzic N, et al. Biliary atresia in England and Wales: results of centralization and new benchmark. *J Pediatr Surg.* 2011;46(9):1689-94.

ANEXOS

ANEXO I – 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 sobrevida e na qualidade de vida de muitos pacientes, como nos portadores de atresia biliar e alguns erros inatos do metabolismo.

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

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

							
Fezes Normais					Fezes suspeitas		

A COLESTASE NEONATAL É UMA URGÊNCIA EM PEDIATRIA!

Departamento Científico de
Gastroenterologia Pediátrica
SBP



APÊNDICES

APÊNDICE I – Termo de Compromisso



Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas

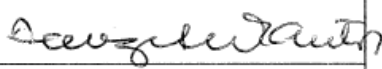
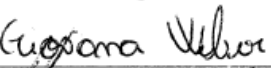
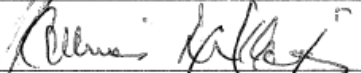
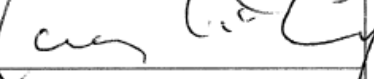
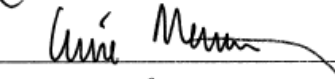


Título do Projeto

**Estudo de Expressão e Quantificação de Fatores Angiogênicos e de Fibrose na
Atresia Biliar**

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos materiais biológicos estão mantidos em biorepositórios, bem como de suas respectivas informações associadas, contidas em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 26 de março de 2013.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Jorge Luiz dos Santos	
Giovana Regina Weber	
Themis Reverbel da Silveira	
Carlos Oscar Kieling	
Luise Meurer	
Ursula da Silveira Matte	
Carolina Uribe Cruz	

APÊNDICE II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Seu filho está sendo convidado a participar do estudo de expressão gênica de fatores angiogênicos na atresia biliar e sua relação com o agravamento da lesão tecidual a ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A participação de seu filho neste estudo implicará na análise de materiais biológicos coletados durante o procedimento cirúrgico, que serão posteriormente analisados em suas diversas características. Como já é do seu conhecimento, seu filho é portador do diagnóstico colestase neonatal, necessitando um procedimento cirúrgico para diagnosticar atresia biliar.

Se você aceitar que seu filho participe do estudo, será analisada uma amostra de material do fígado, coletada durante este procedimento cirúrgico indicado para seu filho. A coleta será realizada da seguinte forma: durante o procedimento cirúrgico a que seu filho será submetido, sob anestesia geral, uma pequena parte do fígado, será coletada e utilizada para análise da doença de seu filho e será, também, aproveitada nesta pesquisa. Estes procedimentos envolvem alguns riscos e desconfortos, tais como um risco de sangramento no fígado, embora todos estes procedimentos sejam realizados independentemente desta pesquisa. Esta pequena quantidade de material utilizado para a pesquisa não afetará a saúde do seu filho.

Este estudo poderá trazer algum benefício para seu filho, pois estuda os processos causadores da doença, podendo ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos, além de auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos da atresia biliar.

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

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

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

Todos os dados de identificação pessoal de você e de seu filho não serão divulgados, permanecendo confidenciais. Os demais dados serão utilizados para fins científicos.

Os pesquisadores responsáveis pela condução deste projeto são o Prof. Jorge Luiz dos Santos e a mestrandia Giovana Regina Weber, que podem ser contatados pelo telefone 51-33598847. Este projeto foi submetido e aprovado para ser realizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que também pode ser acessado (51-33598304) no caso de necessitar algum esclarecimento.

A seguir são feitas algumas perguntas no sentido de verificar o que você está autorizando:

- 1) Você autoriza a coleta de material biológico do fígado e da região *porta hepatitis* de seu filho? Sim Não
- 2) Você deseja saber os resultados dos exames realizados com os materiais biológicos coletados de seu filho? Sim Não
- 3) Você autoriza o contato da equipe de pesquisa para solicitar o uso futuro do material biológico e das informações associadas para outros estudos a serem realizados?
 Sim Não

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

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

Pesquisador que obteve o TCLE

Nome: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

Apêndice III – Dados abordados na dissertação não apresentados no artigo original em inglês

PACIENTES E MÉTODOS

DELINEAMENTO DO ESTUDO

Esse estudo trata-se de uma coorte de série de casos controlado. Avaliou material histológico coletado por ocasião da laparotomia exploratória, armazenado tanto sob ultracongelamento quanto parafinado de pacientes com AB e CIH. Os responsáveis pelas crianças, cujo material biológico foi analisado neste estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) permitindo sua análise na pesquisa.

VARIÁVEIS EM ESTUDO

Os fatores em estudo foram:

- Expressão gênica de VEGFA; VEGFR1; VEGFR2; MCP1 e CK19;
- Extensão da reação ductular (área positiva para CK7, marcado com citoqueratina 7);
- Extensão da área de fibrose (área de positividade do colágeno, corado com picrossírius);
- Espessamento da túnica média (ETM, corado com hematoxilina-eosina);
- Variáveis Laboratoriais (TGO, TGP, GGT, BT, BD), por ocasião da portoenterostomia;
- Idade por ocasião da portoenterostomia;
- SFN em dois anos pós-portoenterostomia.
- Normalização dos valores de bilirrubinas séricas aos dois e seis meses pós-portoenterostomia.

AMOSTRAS

Devido à raridade da doença em análise, a amostra no estudo foi de conveniência, incluindo pacientes atendidos prévia e posteriormente ao início desta pesquisa. Desse modo, nas análises histológicas utilizou-se material anatomopatológico de tecido hepático conservado em parafina e as análises de expressão gênica foram avaliadas por PCRq em amostras de biópsias em cunha sob ultracongelamento (-80°C), obtidas no momento da laparotomia exploratória, que precedeu à portoenterostomia em pacientes com AB (n=32), e casos de CIH (n=9). Os casos de CIH, com idades semelhantes aos pacientes com AB, foram à laparotomia por apresentar doença hepatobiliar indistinguível da AB sem o procedimento cirúrgico. As amostras analisadas foram coletadas entre os anos de 2006 e 2014 e armazenadas em um banco de tecidos disponível no departamento de Patologia e no Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia (LEGH) do HCPA. Os dados clínicos e laboratoriais foram armazenados no Banco de Dados dos pacientes com colestase neonatal da Unidade de Gastroenterologia Pediátrica do HCPA.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Colestase neonatal, por ocasião da laparotomia exploratória;
- Idade de no máximo 120 dias de vida;
- AB de forma isolada, sem malformações extra-hepáticas, e com CMV IgM negativo no soro;
- Presença de tecido ultracongelado no banco de tecidos do LEGH.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Não consentimento dos pais ou responsáveis através do TCLE;
- Nutrição Parenteral Total;
- Infecção Aguda.

VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAIS

Os pacientes que seguiram seu acompanhamento no HCPA tiveram seus prontuários revisados por dois pesquisadores independentes para a coleta de dados prospectivamente coletados pela equipe clínica envolvida no projeto. Essa pesquisa buscou pelos valores de bilirrubina total (BT), bilirrubina de reação direta (BD), gama glutamil transferase (GGT), aminotransferase oxalacética (TGO) e aminotransferase pirúvica (TGP), na data mais próxima e anterior ao momento da portoenterostomia. A mesma busca foi realizada para coleta dos valores de exames bioquímicos aos seis meses pós-portoenterostomia. Os pacientes também foram acompanhados a fim de registrar e analisar: 1) idade em dias de vida no momento da portoenterostomia; 2) idade em dias de vida em que o paciente alcançou valor de BT menor que 2,0 mg/dL (BT considerada normal); 3) idade em dias de vida em que o paciente alcançou valor de BD menor que 0,7 mg/dL; 4) idade em dias de vida em que o paciente foi a óbito ou TxH. Todos os dados coletados foram registrados de modo padronizado, nos programas *Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp, Redmond, USA)* e *SPSS 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)*

ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Morfometria é um método de avaliação histológica que permite mensurar imagens microscópicas através de programas de computação. De cada amostra de tecido obtida, foram utilizadas três secções de 5 µm de espessura, para produção das lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina, marcadas por imunohistoquímica com CK7 e por histoquímica com picrossírius, aplicadas nas respectivas avaliações morfométricas: mensuração do espessamento de parede arterial, análises da extensão da reação ductular e da área de colágeno.

Descrição do equipamento e calibração

As imagens foram capturadas em um microscópio de pesquisa Zeiss modelo Axioskop 40 (Oberkochen, Alemanha), equipado com módulo de polarização e óptica neofluar, acoplado a videocâmera Retiga 2000R (QImaging, British Columbia, Canada) e programa de análise de imagens: Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) em microcomputador padrão IBM-PC. O sistema foi calibrado antes de cada sessão através do método de Koehler (196), calibração da intensidade de iluminação, abertura de diafragma do condensador do microscópio e ajuste manual de branco (*white balance*) da videocâmera. Dez imagens foram capturadas de forma aleatória e sequencial para evitar sobreposição de áreas. Todas as imagens foram capturadas em 200X e gravadas em formato TIFF sem compressão.

Estudo do espessamento da túnica média dos ramos arteriais hepáticos

Obtida por método proposto por Santos *et al.*, (2005), a partir da mensuração morfométrica da espessura da túnica média arterial e do diâmetro luminal arterial. Foram selecionadas, aleatoriamente, 10 imagens de cada lâmina corada com HE, de vasos arteriais em corte transversal (perpendiculares ao vaso). A mensuração foi manual através de ferramenta do programa de análise digital (Image J - Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland). Para cada vaso, a espessura da túnica média foi calculada como a média de seis mensurações da parede vascular, cada uma delas obtida por uma linha traçada na direção do centro do vaso e conectando um ponto localizado na interface média-adventícia e outro situado na interface média-íntima. O diâmetro luminal foi calculado como a média das medidas de comprimento de duas linhas, cada qual traçada entre dois pontos opostos localizados na interface média-íntima e medindo o maior e o menor diâmetro. O valor de espessamento da túnica média foi calculado pela razão: espessura de túnica média/diâmetro luminal, através do programa Microsoft Excel 2010.

Área de positividade de colágeno

Expressa a extensão da fibrose tecidual. Conceituada como média dos valores da área de colágeno quantificados por método morfométrico, presentes em dez imagens obtidas do corte histológico corado com picrossírius, segundo Chevallier *et al.*, (1994) (197). Usamos a ferramenta faixa de cores do programa de análise digital (Image J - Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland) para escolher um espectro que incluía toda área positiva para picrossírius. As regiões de positividade para picrossírius nos espaços porta e septos fibrosos foram selecionadas aleatoriamente, evitando a área

subcapsular. A cada lâmina foi feita a medida da área total em micrômetros e, posteriormente foi realizada a média de medidas das 10 imagens.

Área de positividade para citoqueratina 7 (CK7)

Conceituada como média dos valores da área de CK7, quantificadas por método morfométrico, presentes em dez imagens obtidas do corte histológico marcadas com anticorpo CK7 (Dako, Glostrup, Dinamarca; diluição, 1: 100) objetivando expressar a extensão da reação ductular. Para as análises imunoistoquímicas foi utilizado o sistema ABC peroxidase, sendo que os controles negativos foram produzidos utilizando o mesmo protocolo imunoistoquímico, exceto pela ausência dos anticorpos primários, e os controles positivos, selecionados segundo as indicações dos fabricantes. Cada lâmina teve a gama de tonalidades para DAB previamente selecionada por dois observadores, gravada e aplicada a cada imagem subsequente (vale também para a polarização). Os resultados foram exportados para uma planilha em Excel (Microsoft, Redmond, EUA). A área de positividade para CK7 foi medida em micrometros através da ferramenta de faixa de cor da imagem no programa de análise, selecionando um espectro de interesse de modo a que toda a área positiva para CK7 ficasse representada. As imagens da microscopia sob luz polarizada foram obtidas das mesmas áreas através da aquisição sequencial de imagens sem e com polarização com ajustes de calibração fixos de tempos de aquisição da videocâmera determinados por controle do programa.

LOCAIS

A análise do material hepático foi realizada no LEGH, na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) e no Centro de Terapia Gênica (CTG) do Centro de

Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). As análises morfométricas se deram no Serviço de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS. Os dados clínicos foram obtidos na Unidade de Gastroenterologia Pediátrica do HCPA e através do sistema (intranet HCPA) de prontuário eletrônico.

ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo utilizou material biológico obtido durante a investigação de pacientes com colestase neonatal rotineiramente realizada na Unidade de Gastroenterologia Pediátrica do Serviço de Pediatria do HCPA. Assim, não resultou no aumento do período de permanência hospitalar dos pacientes, não produziu aumento de desconforto aos pacientes, não os colocou em maior risco de morbimortalidade e também não teve implicações terapêuticas, além das esperadas pelos procedimentos de rotina.

Devido à utilização de dados dos prontuários dos pacientes, foi utilizado um termo de compromisso para utilização de dados (APÊNDICE I). Já a utilização do material histológico passou por aprovação da comissão de ética do grupo de pesquisa e pós-graduação do HCPA sob o número 13-0177, assim como por aprovação mediante a Plataforma Brasil sob número 15420413.4.0000.5327. As coletas e armazenamento de material foram autorizados pelos pais ou responsáveis pela criança através da assinatura do TCLE, conforme protocolo estabelecido no LEHG (APÊNDICE II).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os pacientes foram divididos em dois grupos: CIH e AB. As variáveis quantitativas foram expressas como mediana (intervalo interquartil) e dados categóricos foram descritos

como frequências absolutas e relativas. Foi calculado, quanto à expressão gênica teste Mann-Whitney e usada a Correlação de Spearman, para investigar correlações entre expressão gênica e parâmetros histopatológicos, assim como com variáveis clínico/laboratoriais. O teste de Qui-quadrado foi usado na relação de variáveis contínuas e categóricas. O prognóstico foi avaliado por método de Kaplan-Meier, a partir de curvas de sobrevida. $P < 0,05$ foi aceito como significativo. Os dados foram armazenados e processados utilizando os programas *Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp, Redmond, USA)*, *SPSS 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)* e *GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA)*.

RESULTADOS

Este estudo analisou biópsias em cunha de pacientes submetidos à laparotomia exploradora entre abril de 2006 e abril de 2014. O grupo de pacientes com AB foi composto por 18 meninas e 14 meninos (1,3: 1), com idade de 65 (52 - 86,7) dias de vida por ocasião da portoenterostomia, enquanto que o grupo de CIH foi composto de 1 menina e 8 meninos com idade de 67 (52,5 - 89) dias de vida. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à idade em que foram submetidos à biópsia hepática ($P= 0,571$). Quanto ao sexo houve uma significativa diferença ($P= 0,024$), havendo maior número de meninas no grupo AB.

No grupo com AB, todos os pacientes apresentavam a forma isolada e tinham sorologia IgM- para CMV no momento da coleta do material. No momento da portoenterostomia, grande parte dos pacientes do grupo AB ($n=14$, 43,8 %) tinha menos de 60 dias de vida, enquanto que 12 (37,5 %) tinham idade entre 61 - 90 dias e apenas 6 (18,8 %) foram submetidos a cirurgia depois de 91 dias de vida. Nenhum paciente em estudo era prematuro, apresentava sepse ou fazia uso de nutrição parenteral total.

VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAIS AB e CIH

Em relação às variáveis laboratoriais analisadas, comparando os grupos AB e CIH, o único marcador com diferença estatística foi a GGT, sendo maiores os valores na AB do que na CIH (Tabela 1).

Tabela 1- Comparação entre pacientes com atresia biliar e colestase intra-hepática, quanto às variáveis laboratoriais estudadas por ocasião da laparotomia exploradora

VARIÁVEIS	AB n= 27	CIH n= 05	P
	Mediana (P25 - P75)	Mediana (P25 - P75)	
TGP U/L	104 (67 - 216)	70 (54,5 - 209,5)	0,378
TGO U/L	203 (132 - 285)	151 (75 - 273,5)	0,311
BT mg/dL	9,5 (7 - 11,6)	9,2 (3,9 - 15,7)	0,835
BD mg/dL	6,6 (5,2 - 8,6)	6,4 (2,9 - 11,9)	0,959
GGT U/L	853 (622 - 1280)	368 (145 - 703)	0,003

Método Estatístico- Mann-Whitney. Abreviaturas: AB- atresia biliar; CIH- Colestase Intra-hepática; TGP - Aminotransferase pirúvica; TGO - Aminotransferase oxalacética; BT - Bilirrubina total; BD - Bilirrubina de reação direta; GGT - Gama glutamil transferase.

VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS

Na comparação entre o grupo CIH e AB, observou-se uma maior área de positividade de colágeno, tanto total, quanto com luz polarizada, e maior área de positividade para CK7 no grupo de pacientes com AB, ilustrados nas figuras 9 e 10.

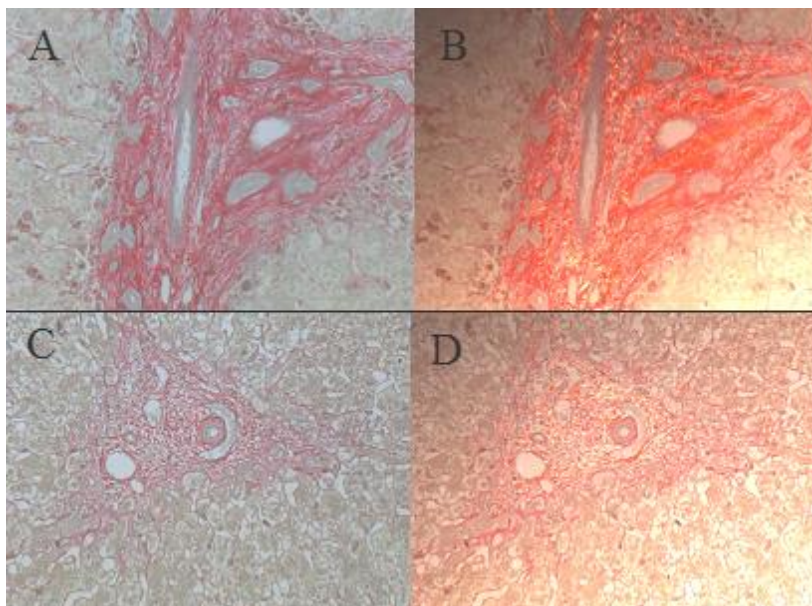


Fig. 9 Morfometria para área de positividade de colágeno. Coloração com picrossírius, aumento de 200X. A e C: tecido hepático de paciente com AB (A), e CIH (B), mostrando áreas positivas em colágeno coradas em vermelho. B e D: mesma área de tecido hepático, representado em A e C, exposto a luz polarizada, mostrando em dourado fluorescente áreas positivas para colágeno, em paciente com AB (B) e paciente com CIH (D).

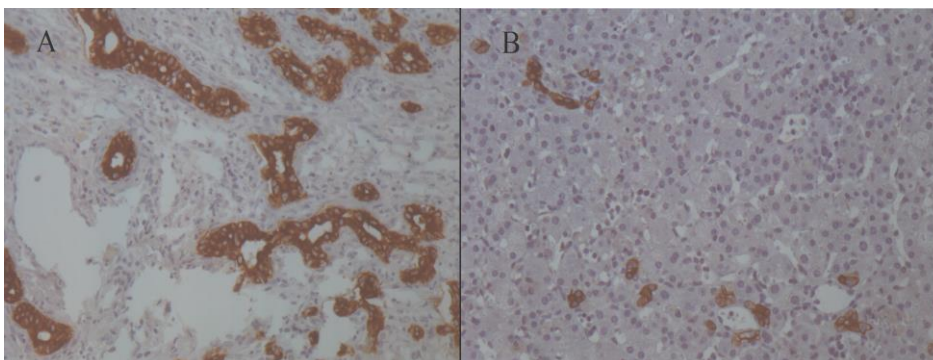


Fig. 10 Morfometria para área de positividade para CK7 Tecido hepático marcado com CK7. Aumento de 200X. A: biópsia hepática de paciente com AB. B: biópsia hepática de paciente com CIH.

Não houve diferença estatística entre os grupos AB e CIH quanto ao espessamento da túnica média (figura 11). Todos os valores, distribuídos em mediana e intervalo interquartil, estão representados na tabela 2.

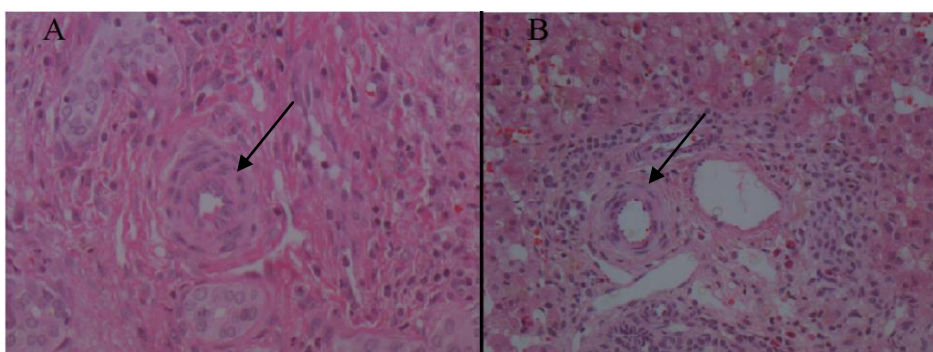


Fig. 11. Morfometria para mensuração da espessura arterial. Tecido hepático corado com hematoxilina-eosina. A: paciente com AB, com artéria indicada pela seta preta. B: paciente com CIH, com artéria indicada pela seta preta. Aumento de 200X.

Tabela 2 - Comparação entre o grupo colestase intra-hepática e o grupo atresia biliar quanto às variáveis morfométricas por ocasião da portoenterostomia

VARIÁVEIS			P
	CIH n= 05 <i>Mediana (P25 - P75)</i>	AB n= 22 <i>Mediana (P25 - P75)</i>	
Colágeno (mm)	2,7 (2,6-11,6)	40,0(20,5-58,9)	< 0,001
Colágeno Bi (mm)	4,3 (0,07-15,0)	24,4 (16,6-62,1)	0,001
CK7 (mm)	2,5 (1,6-6,4)	9,2 (4,6-17,8)	0,006
ETM (µm)	0,63 (0,59 – 0,78)	0,58 (0,41 – 0,78)	0,402

Método Estatístico- Mann-Whitney. Abreviaturas: CIH – Colestase Intra Hepática; AB – atresia biliar; Colágeno – Área de Positividade de Colágeno; Colágeno Bi – Área de Positividade de Colágeno com luz polarizada; CK7 – Área de Positividade para citoqueratina 7; ETM – Espessura da Túnica Média.

Ao comparar os subgrupos loVEGFA e loVEGFR2 com os demais pacientes em AB, não houve diferença estatística em nenhuma das análises morfométricas, conforme tabela 3.

Tabela 3 - Comparação entre os subgrupos loVEGFA/hiVEGFA e loVEGFR2/hiVEGFR2 quanto às variáveis morfométricas por ocasião da portoenterostomia

VARIÁVEIS			P
	loVEGFA n= 15 <i>Mediana (P25 - P75)</i>	hiVEGFA n= 07 <i>Mediana (P25 - P75)</i>	
Colágeno (mm)	42,5(16,8 - 105,4)	37,9 (25,6 - 56,0)	0,948
Colágeno Bi (mm)	19,6 (15,6 - 55,6)	29,4 (20,0 - 78,2)	0,235
CK7 (mm)	12,3 (4,6 - 19,2)	8,1 (4,3 - 15,4)	0,365
ETM (µm)	0,60 (0,38 – 0,76)	0,51 (0,43 – 0,96)	0,770
	loVEGFR2 n= 14	hiVEGFR2 n= 09	
Colágeno (mm)	42,5 (17,9 - 134,8)	37,9(20,7 - 47,3)	0,783
Colágeno Bi (mm)	24,2 (15,9 - 58,1)	29,4 (16,8 - 68,6)	0,630
CK7 (mm)	9,9 (4,8 - 18,6)	8,5 (3,4 - 17,5)	0,535
ETM (µm)	0,60 (0,37 – 0,74)	0,51 (0,45 – 1,02)	0,494

Método Estatístico- Mann-Whitney. Abreviaturas: Colágeno – Área de Positividade de Colágeno; Colágeno Bi - Área de Positividade de Colágeno com luz polarizada; CK7 – Área de Positividade para citoqueratina 7; ETM – Espessura da Túnica Média.

RELAÇÕES DAS VARIÁVEIS GÊNICAS E CLÍNICO-LABORATORIAS SOBRE A SOBREVIDA COM O FÍGADO NATIVO

Dentre os pacientes com AB (n = 32) incluídos nesse estudo, ao fim do acompanhamento, permaneceram vivos 22/32 (68,7 %). Os que permaneceram com o fígado nativo foram 15/32 (46,8 %).

Dos 32, em 14 (43,7 %) foi indicada a realização de TxH. Dentre os 14 indicados, 10 foram submetidos ao procedimento, e dos quais 3/10 faleceram, devido a 1) retransplante em uma semana seguido de hemorragia; 2) edema cerebral, secundário ao TxH; 3) falência ou rejeição do enxerto hepático. Os demais 7/10 permanecem vivos, enquanto que os quatro indicados que não concretizaram o procedimento foram a óbito segundo as seguintes causas: 1) sepse (n=2); 2) insuficiência hepática e 3) coagulação intravascular disseminada.

O tempo médio de espera na fila de transplante foi de 196 dias, e dos 11 transplantes realizados, incluindo neste caso um retransplante, quatro se deram por doação intervivos. Ainda, três pacientes não foram indicados a TxH, e faleceram segundo as seguintes causas: 1) encefalopatia e 2) septicemia (dois casos).

Ao realizar análises com tempo de corte de dois anos pós-portoenterostomia, de modo geral, a taxa de SFN nos pacientes com AB, foi de 53 %, conforme figura 12.

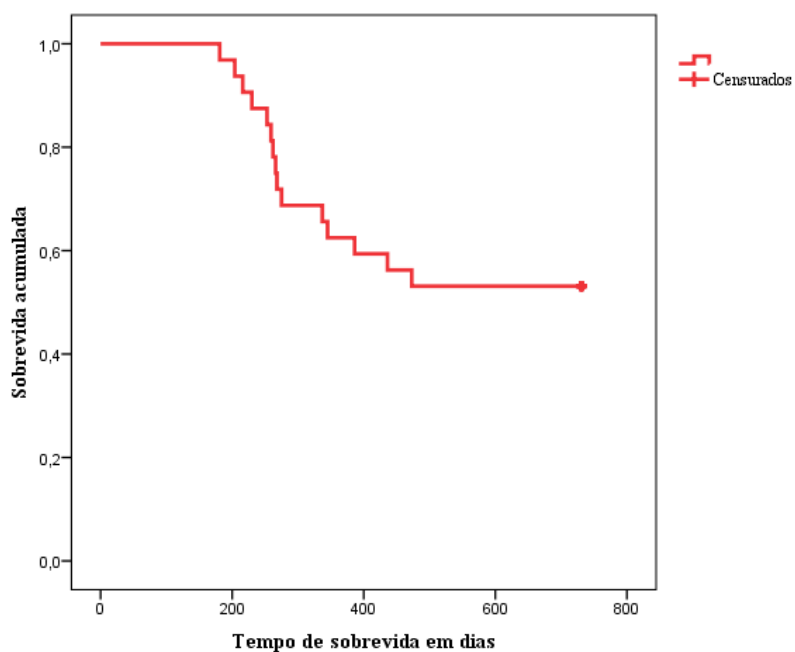


Fig. 12 Curva de sobrevivência com o fígado nativo em dois anos nos pacientes com AB.

De acordo com a idade de realização da portoenterostomia, avaliamos os pacientes com AB conforme as seguintes categorias: ≤ 45 e >45 ; ≤ 60 e >60 e ≤ 71 e >71 dias de vida. Na avaliação de SFN em dois anos, não houve diferença estatística de acordo com a idade de realização da portoenterostomia, conforme as figuras 13, 14 e 15.

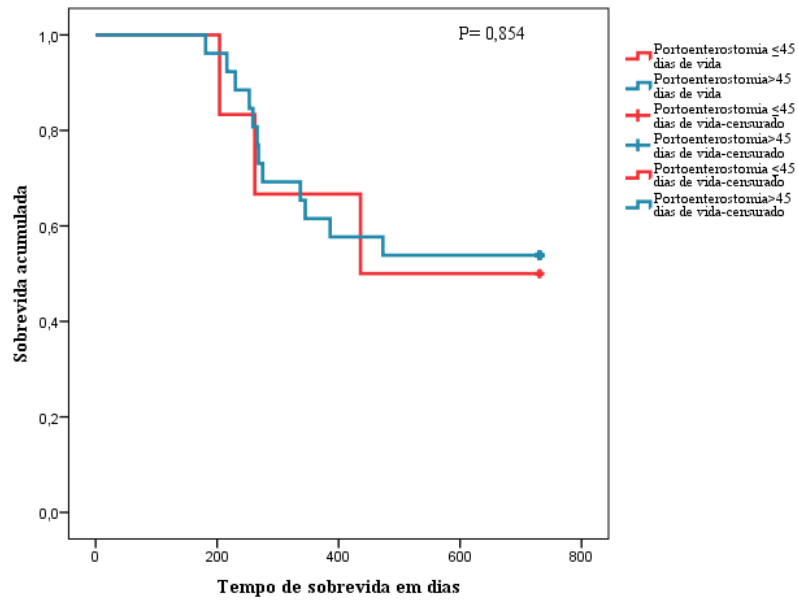


Fig. 13 Curva de sobrevida com o fígado nativo em dois anos nos pacientes com AB, conforme idade no momento da portoenterostomia, ≤ 45 e >45 dias de vida.

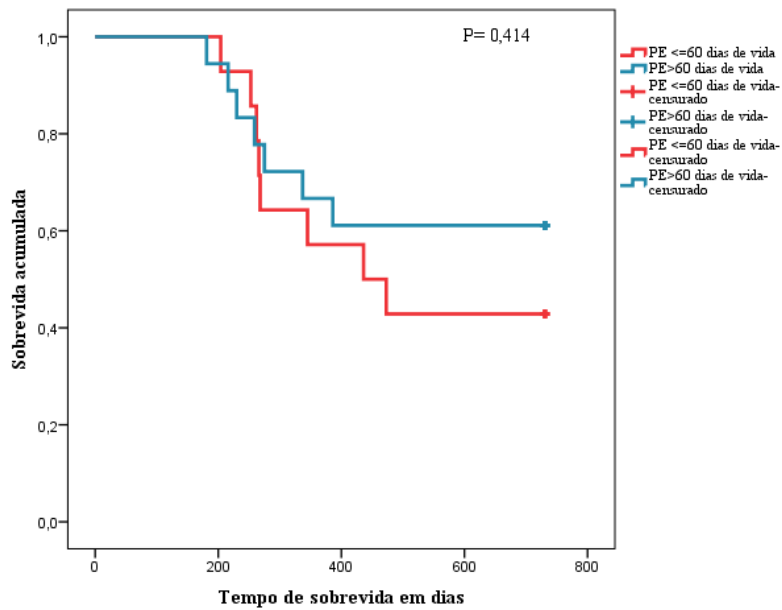


Fig. 14 Curva de sobrevida com o fígado nativo em dois anos nos pacientes com AB, conforme idade no momento da portoenterostomia, ≤ 60 e >60 dias de vida.

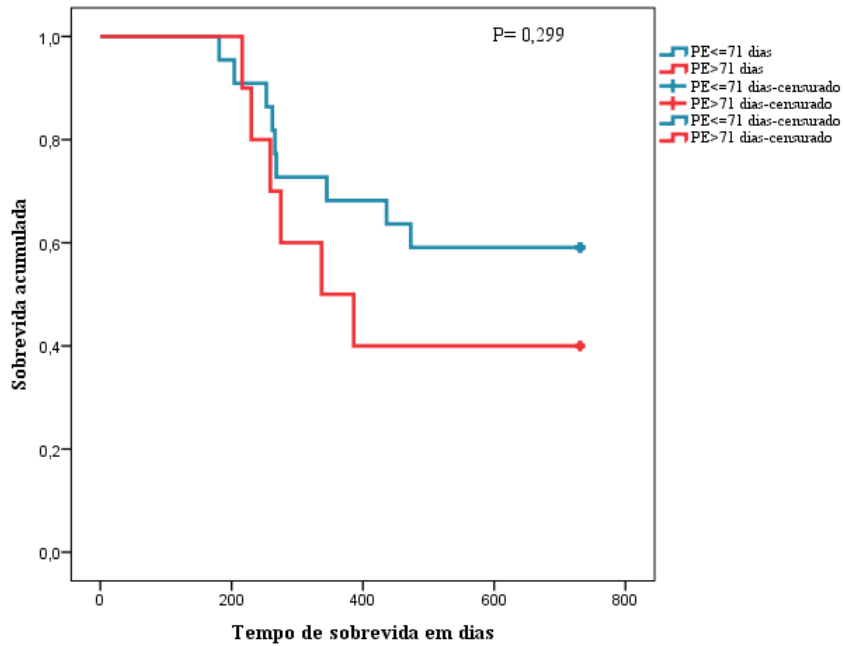


Fig. 15 Curva de sobrevivência com o fígado nativo em dois anos nos pacientes com AB, conforme idade no momento da portoenterostomia, ≤ 71 e > 71 dias de vida.

De acordo com o nível sérico de BT aos seis meses pós portoenterostomia, avaliamos os pacientes com AB conforme a seguintes categoria: $< 2,0$ e $> 2,0$ mg/dL. Na avaliação de SFN em dois anos, houve diferença estatística com maior sobrevivência nos pacientes que alcançaram níveis séricos de BT $< 2,0$ mg/dL em seis meses pós portoenterostomia ($P = 0,007$), com 90 % de SFN, enquanto nos pacientes com BT $> 2,0$ mg/dL, apenas 31 % alcançaram a SFN, conforme figura 16.

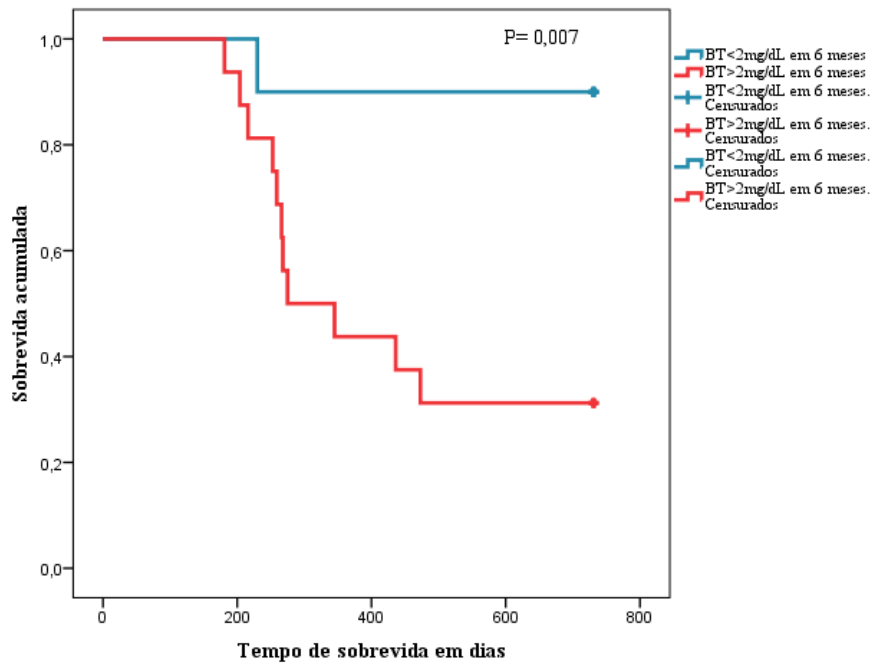


Fig. 16 Curva de sobrevida com o fígado nativo em dois anos nos pacientes com AB, conforme BT $\leq 2,0$ e $> 2,0$ mg/dL em 6 meses pós-portoenterostomia.

Na mesma linha, a avaliação de BD em 2 meses pós portoenterostomia (BD $\leq 0,7$ e $> 0,7$ mg/dL) mostrou melhor SFN em dois anos nos pacientes com BD $\leq 0,7$ mg/dL. Dos 26 pacientes com a mensuração de BD aos dois meses, apenas 5 alcançaram valores $< 0,7$ mg/dL e todos persistiram com SFN em dois anos, respresentados na figura 17.

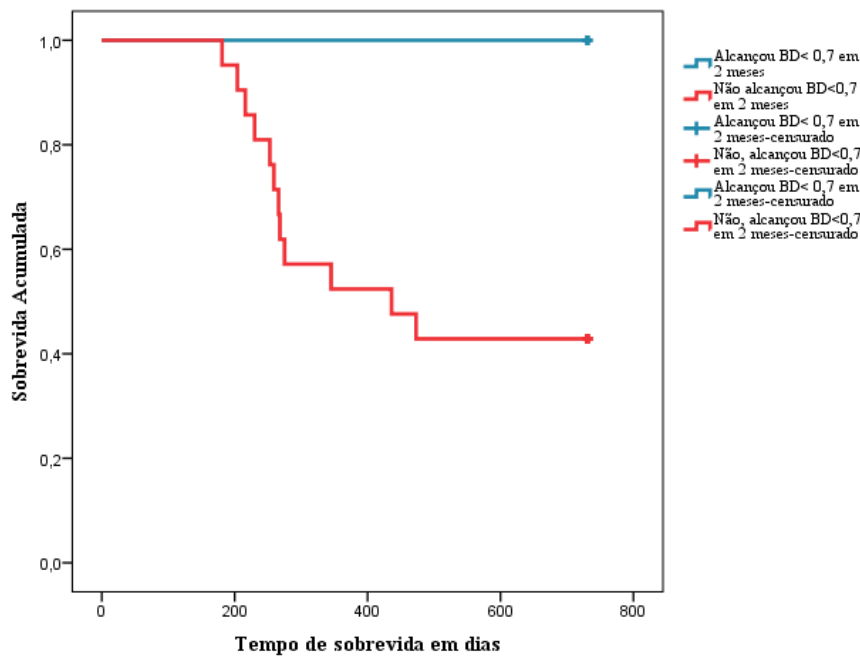


Fig. 17 Curva de sobrevivida com o fígado nativo em dois anos nos pacientes com AB, conforme $BD \leq 0,7$ e $>0,7$ mg/dL em 2 meses pós-portoenterostomia.

Coforme a expressão gênica de fatores angiogênicos no momento da portoenterostomia, avaliamos os pacientes com AB conforme as seguintes categorias: loVEGFA e hiVEGFA; e loVEGFR2 e hi VEGFR2. Na avaliação de SFN em dois anos, não houve diferença estatística de acordo com a baixa ou alta expressão gênica do VEGFA ou VEGFR2, conforme figuras 18 e 19.

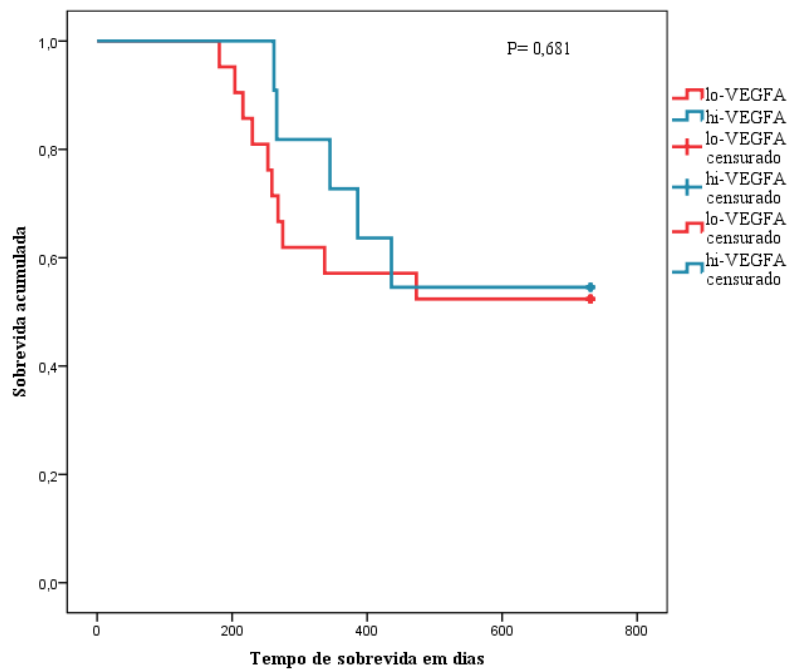


Fig. 18 Curva de sobrevida com o fígado nativo em dois anos nos pacientes com AB, conforme loVEGFA ou hiVEGFA.

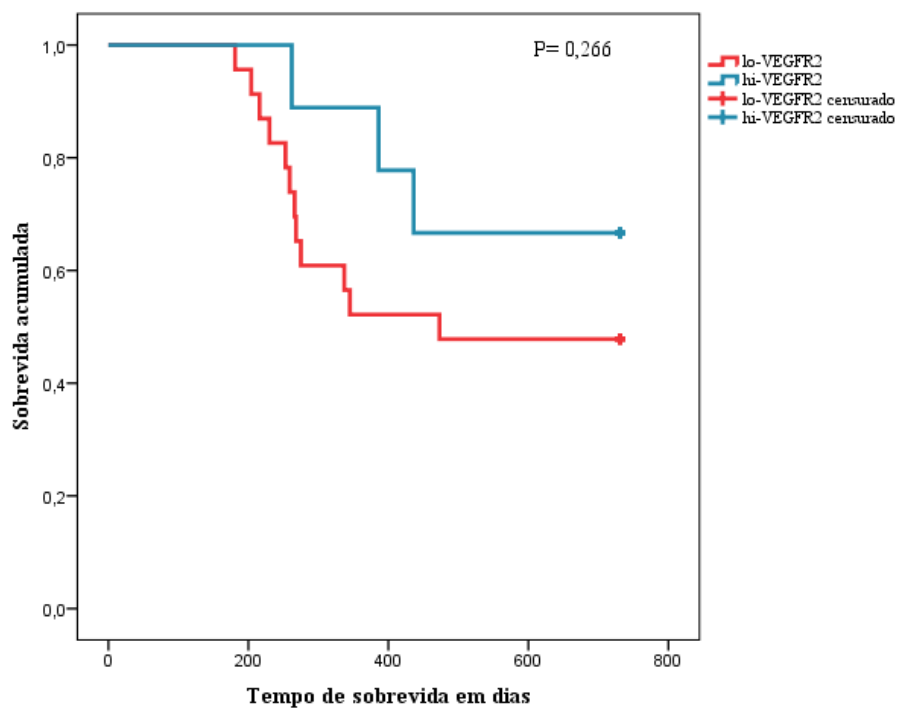


Fig. 19 Curva de sobrevida com o fígado nativo em dois anos nos pacientes com AB, conforme loVEGFR2 ou hiVEGFR2.

DISCUSSÃO

A hipóxia consiste no inadequado acesso ao oxigênio (O₂), contribuindo para diversas doenças. Hipóxia local pode ocorrer devido à isquemia, ou seja, bloqueio do fluxo sanguíneo a um tecido específico, levando à carência do O₂ requerido pelo metabolismo celular (174). Os níveis teciduais de O₂ tem papel fundamental na regulação da angiogênese e do VEGFA, o principal fator angiogênico. Em situações fisiológicas, o VEGF é induzido por hipóxia, por meio da sinalização do HIF (182), e estimula a formação de novos vasos procurando reestabelecer um fornecimento adequado de O₂ aos tecidos (117, 178).

Nosso grupo tem investigado o papel de uma arteriopatia na AB. Ho *et al.*, (1993) observou a presença de espessamento de túnica média nos ramos da artéria hepática em pacientes com AB e sugeriu a hipótese de uma arteriopatia progressiva. Santos *et al.*, (2005) confirmaram através de método morfométrico, a existência de espessamento da túnica média dos ramos arteriais hepáticos em pacientes com AB. No *porta hepatis* é observado espessamento de artérias com paredes distorcidas (15, 16).

Nos fígados de pacientes com AB há evidências arteriográficas de ramos arteriais periféricos hepáticos disformes, com irregularidades no contorno e imagens sugestivas de oclusão vascular (17). Análises com ultrassonografia e tomografia computadorizada demonstraram, precocemente no momento do diagnóstico, um alargamento do lúmen arterial hepático no *porta hepatis* específico da AB, sugestivo de um bloqueio do fluxo de sangue nos vasos intra-hepáticos (18-20, 198). Uma arteriopatia hepática poderia evoluir com um desarranjo de toda a árvore biliar, pois o suprimento sanguíneo desta estrutura é apenas arterial, pelo PVP e o inadequado fluxo sanguíneo aos ductos biliares leva a uma colangiopatia isquêmica (109). Mecanismos fisiopatológicos e implicações de uma anomalia

vascular arterial na AB devem ser cuidadosamente investigados, com o objetivo de definir o envolvimento de uma colangiopatia isquêmica em sua etiologia.

Nesse estudo, nós avaliamos a expressão gênica do VEGFA e seus receptores, VEGFR1 e VEGFR2, em tecido hepático de pacientes com AB, comparando com controles doentes, portadores de CIH, pareados por idade. Selecionamos uma amostra homogênea de pacientes com AB de forma isolada, e sorologia IgM- para CMV. Adicionalmente, visando relacionar a expressão destes marcadores angiogênicos com a gravidade da AB, avaliamos a expressão de marcadores de fibrogênese biliar e de proliferação de colangiócitos, MCP1 e CK19, bem como análises histológicas e de evolução clínica. Na composição da amostra com AB, houve uma maior prevalência de meninas (1,3: 1), porém sem diferença estatística. Esta incidência diferencial é comumente descrita na literatura como Bessho & Bezerra (2011) que relataram prevalência de 1,25: 1.

Na avaliação da massa de colangiócitos, por meio da expressão gênica de CK19, os pacientes com AB e CIH foram semelhantes. Contudo, achados morfométricos da quantificação de CK7 indicaram maior área positiva no pacientes com AB, característica de intensa reação ductular. Quanto à intensidade de fibrose, os pacientes com AB apresentaram maiores índices, atestados tanto pela expressão gênica de MCP1 como pela análise morfométrica do material corado com picrossírius (179), corroborando estudos anteriores (8).

Sobre as variáveis laboratoriais no momento da portoenterostomia, a GGT sérica mostrou-se aumentada no grupo AB, sem haver diferença estatística nas comparações de TGO, TGP, BT e BD. Esse resultado está de acordo com outras descrições como a de Robie, Overfelt e Xie, (2014) e de Tang *et al.*, (2007) que compararam pacientes com AB e pacientes com CIH (199).

Na comparação entre HIAB e AB sem padrão hipóxico/isquêmico não houve nenhuma diferença estatística na mensuração de área de reação ductular (CK7), área de fibrose

(picrossírius) e espessura da túnica média (HE), indicando que a reação hipóxico-isquêmica seja independente destas vias de resposta a injúria. Parece que o ETM tenha maior relação com moléculas associadas ao comportamento dos perícitos de pacientes com AB, como as angiopoetinas (104).

Em nosso estudo, a sobrevida global foi de 68,8 %, semelhante a de 67,6 % descrita por Carvalho *et al.*, (2010) em relação a outros centros brasileiros. A SFN ao final do acompanhamento de oito anos, entre 2006 e 2014, foi de 46,9 %, superior a de 36,8 % descrita por Carvalho *et al.*, (2010). Dos 32 pacientes estudados, 14 (43,75 %) foram indicados a TxH e 10/14 (71,43 %) concretizaram a operação, com sobrevida pós transplante de 70 %. Desse modo, após oito anos 31,25 % dos pacientes vivos foram submetidos a TxH. Valores inferiores aos descritos na experiência internacional, incluindo Suíça onde 60 % dos pacientes vivos após quatro anos foram submetidos a TxH (40), França (51 %) (48), e Reino Unido (43 %) (200).

Ao considerar um seguimento de dois anos, a SFN foi de 53 %, um achado semelhante ao observado na experiência internacional. Na França, uma SFN de 48 % foi descrita num seguimento de quatro anos (48); e 51 % em centros Britânicos (200). E num seguimento de cinco anos, 49 % na Espanha (201); e 37,4 % na Suíça (40).

No que se refere às variáveis clínicas, nosso estudo não mostrou diferença na SFN em dois anos, de acordo com a idade na portoenterostomia, ao analisar as classificações: ≤ 45 e >45 ; ≤ 60 e >60 e ≤ 71 e >71 dias de vida. Não há uma clara definição no ponto de corte quanto à idade na portoenterostomia influenciando na evolução clínica (58). Assim, este resultado possivelmente se deva ao complexo conjunto de variáveis que afetam a SFN, dentre elas a extensão da fibrose hepática; o grau de destruição dos ductos biliares intra-hepáticos; a experiência do cirurgião; o local da obliteração das vias biliares e a forma clínica de AB, se embrionária ou perinatal (45).

Quanto aos fatores preditivos de SFN, o nível de BT nos primeiros três e seis meses pós-operatórios é excelente indicador de sobrevida em longo prazo (202, 203). Nosso estudo mostrou um significativo incremento da SFN nos pacientes que alcançaram BT <2 mg/dL em seis meses pós-portoenterostomia, bem como nos pacientes com BD <0,7 mg/dL em dois meses pós-portoenterostomia (Figuras 14 e 15). Níveis menores que 1,0 mg/dL, após três meses da cirurgia, associam-se a bom prognóstico, sendo pouco provável a necessidade futura de transplante (204). Goda *et al.*, (2013) sugeriram um ponto de corte de 0,7 mg/dL de BD dois meses após Kasai, e a análise da combinação de AST e BD como preditor de SFN (205). Em países ocidentais cerca de 50 % a 60 % dos pacientes com AB alcançam precocemente níveis de BT<2 mg/dL após a portoenterostomia (200, 206, 207).

Na análise de SFN, em dois anos, categorizada quanto aos subgrupos loVEGFA/hiVEGFA e loVEGFR2/hiVEGFR2 não houve diferença estatística (Figura 18 e 19). Possivelmente, não haja associação com a SFN, porque o processo que atinge a vasculatura do PVP, não seja afetado pelo procedimento da portoenterostomia, vindo a ocorrer em todos, ou quase todos os pacientes com AB precocemente, independente do momento do procedimento.

Como conclusão, os resultados deste estudo sugerem um papel de hipóxia/isquemia na patogênese da variante isolada da AB, pois um perfil de expressão gênica reminiscente de uma arteriopatia, similar ao modelo animal de ligaduras associadas de ducto e artéria hepática, foi observado nos pacientes afetados. A hipóxia/isquemia na AB parece evoluir ao longo do tempo, prejudicando o fluxo biliar e levando a uma diminuição da massa de colangiócitos, num processo independente da fibrose. São necessárias mais pesquisas para elucidar: o envolvimento de células inflamatórias, incluindo os macrófagos; as vias angiogênicas alternativas ao VEGFA e VEGFR2.