

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

**Avaliação quantitativa de VEGF A por qRT-PCR
em fígados de pacientes com Atresia Biliar**

Patrícia Ponce de Leon Lima

Porto Alegre, junho de 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

**Avaliação quantitativa de VEGF A por qRT-PCR
em fígados de pacientes com Atresia Biliar**

Patrícia Ponce de Leon Lima

**Trabalho de conclusão da disciplina de Estágio Curricular em
Farmácia**

Prof^a Dr Simone Martins de Castro

Orientadora

Prof^o Dr Jorge Luiz dos Santos

Co-orientador

Porto Alegre, junho de 2010.

“Este artigo foi elaborado conforme as normas da Revista da
AMRIGS apresentadas em anexo”

SUMÁRIO

Artigo.....	5
Resumo.....	6
Introdução.....	8
Materiais e Métodos.....	10
Resultados.....	14
Discussão.....	16
Agradecimentos.....	20
Referências.....	21
Tabelas.....	24
Figura.....	27
Anexos	
Anexo 1: Normas da Revista	
Anexo 2: Termo de Consentimento	

Título: Avaliação quantitativa de VEGF A por qRT-PCR em fígados de pacientes com Atresia Biliar

Título: The quantitative evaluation of VEGF A by qRT-PCR in livers of patients with Biliary Atresia

Patrícia Ponce de Leon Lima¹, Jorge Luiz dos Santos², Themis Reverbel da Silveira³, Simone Martins de Castro⁴

- 1- Aluna do curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 2- Médico contratado, pesquisador do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
- 3- Professora da Pós-Graduação em Medicina: Gastroenteologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- 4- Professora do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituição: Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Endereço para correspondência:

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2.350 Bairro Santa Cecília Porto Alegre / RS Brasil

CEP 90035-903. Telefone: (51) 3359-8847 email:lima_ppatricia@yahoo.com.br

APOIO FINANCEIRO: Fundo de Incentivos à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA).

RESUMO

A Atresia Biliar, principal causa de transplante hepático em crianças, tem causa obscura. Para avaliar a presença de uma arteriopatia como causa da doença investigamos a expressão do *vascular endothelial growth factor A* (VEGF A) em fígados de pacientes afetados. Amostras de fígados de pacientes com Atresia Biliar (n=21) e controles com outras causas de colestase neonatal (n=6) foram analisadas por qRT-PCR para quantificar a expressão do VEGF A. As amostras foram marcadas por imunistoquímica com anti-CK7 e analisadas por morfometria quanto à percentagem de citoqueratina 7(PCK7), que define a extensão da proliferação biliar. Não houve diferença da expressão do VEGF A entre o grupo com Atresia Biliar e os controles (P=0,199). Não houve diferença na expressão do VEGF A em pacientes com Atresia biliar com mais ou menos 60 (P=0,881), 70 (P=0,128) ou 90 dias (P=0,801) de vida no momento da Portoenterostomia. Os pacientes com PCK7 maior que 10,18% tiveram um menor valor de expressão de VEGF A quando comparados com os pacientes com um PCK7 menor que este valor (P=0,044). A variável que distinguiu os subgrupos de Atresia biliar não foi a idade por ocasião da Portoenterostomia, mas sim a extensão da proliferação biliar. A diminuição da expressão do VEGF A em fígados diminui em quadros de obstrução mecânica ao fluxo biliar e obstrução ao fluxo arterial associados. Nossos dados sugerem que na AB, haja um componente isquêmico atuando nas estruturas biliares, que se torna evidente nos pacientes com maior extensão da proliferação biliar.

Palavras-chave: Atresia Biliar; arteriopatia; VEGF A; colestase neonatal.

Abstract

Biliary atresia, the main indication for pediatric liver transplantation, has an elusive etiology. We investigated the expression of VEGF A in order to evaluate the putative role of an arteriopathy as an etiologic factor in Biliary Atresia. Tissue samples from patients with biliary atresia (n=21) and controls with other causes of neonatal cholestasis (n=6) were analyzed through qRT-PCR to assess VEGF A expression. They were also stained with anti-CK7 by immunohistochemistry to evaluate through morphometry the percentage of CK7 (PCK7), which indicates the extent of biliary proliferation. Our results showed no difference between VEGF A expression between patients with biliary Atresia and controls ($P=0,199$); no differences in VEGF A expression between patients with biliary atresia with age groups higher and lower than 60 ($P=0,881$), 70 ($P=0,128$) and 90 days ($P=0,801$) of life at portoenterostomy. Patients with Biliary Atresia presenting PCK7 higher than 10.18% showed a lower VEGF A than those patients with a lower PCK7 ($P=0,044$). The variable that differentiated subgroups regarding VEGF A expression among patients with biliary Atresia was not age, but the extent of biliary proliferation. A decreased VEGF A expression in liver occurs in pictures of obstruction for both bile and arterial blood flows obtained by mechanical obstruction of bile ducts associated with hepatic arterial ligation. Our data suggest that in biliary Atresia the biliary structures are affected by an ischemic process, which becomes evident in patients with a greater extent of biliary proliferation.

Palavras-chave: biliary Atresia; arteriopathy; VEGF A; neonatal cholestasis.

INTRODUÇÃO

Colestase neonatal consiste em distúrbio do sistema hepatobiliar de um bebê nos primeiros meses de vida, caracterizada por bloqueio ao fluxo biliar. Caracteriza-se por icterícia, colúria e graus variados de hipocolia até acolia. Do ponto-de-vista laboratorial observa-se aumento da dosagem sérica de bilirrubina de reação direta (1) e do histopatológico, a presença de pigmento biliar em hepatócitos e canalículos biliares. Pode decorrer de diversas causas, anatômicas ou funcionais, extra- ou intra-hepáticas. Entre elas, as mais freqüentes são a Atresia Biliar (AB) (2,3), doença obstrutiva extra-hepática, e a hepatite neonatal idiopática, distúrbio de localização intra-hepática, seguidas de doenças metabólicas como Deficiência de α -1 antitripsina e infecções.

A AB, obliteração completa de parte ou da totalidade das vias biliares extra-hepáticas (4), inicia exclusivamente na infância e é responsável pela maior parte dos transplantes hepáticos em crianças. É uma doença relativamente rara, com maior incidência em países asiáticos, onde a taxa pode chegar a 3,07 para cada 10.000 nascidos vivos (5). Se não tratada a tempo, por meio da desobstrução ao fluxo biliar através da Portoenterostomia, leva à morte ou à necessidade de transplante hepático. A Portoenterostomia deve ser realizada preferencialmente nos primeiros dois meses de vida (6) e a idade por ocasião do procedimento afeta o prognóstico pós-cirúrgico. Outros fatores estão associados ao prognóstico pós-operatório, como extensão da proliferação biliar observada na biópsia por ocasião da Portoenterostomia (7). Contudo, mesmo ocorrendo desobstrução eficaz das vias biliares, a destruição progressiva das vias biliares intra-hepáticas se mantém, associando-se à fibrogênese e, posteriormente, cirrose (8). A AB inicialmente é caracterizada por um quadro histopatológico de proliferação biliar, mas ao longo do processo, ocorre rarefação biliar sem que até o momento se tenha a explicação para o processo (9,10).

A colangiopatia progressiva da AB parece ter etiologia multifatorial (11). Em 2005, nosso grupo realizou um estudo (12) que demonstrou a existência de uma arteriopatia relacionada à AB. Em conjunto com o Departamento de Pediatria do Cincinnati Children's Hospital Medical Center (Ohio, Estados Unidos), analisamos a expressão do transcriptoma, usando o método de *Microarray*, de uma série de 48 moléculas associadas com angiogênese em pacientes com AB, buscando identificar quais fatores poderiam estar relacionados às alterações arteriais nestes pacientes. Nesta avaliação, observou-se sobre-expressão do *vascular endothelial growth factor A* (VEGF A), o mais importante fator de crescimento angiogênico.

Com base nos dados apresentados, os objetivos deste trabalho foram avaliar a expressão do VEGF A em fígados de pacientes com Atresia Biliar, comparando esta expressão com a observada em fígados de pacientes com outras causas de colestase neonatal (OCN) e avaliar a associação da expressão do VEGF A com a proliferação biliar através da percentagem de citoqueratina 7 (PCK7) nos pacientes com AB.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliadas amostras de fígados (n=21) de pacientes com Atresia Biliar, sendo 7 do sexo masculino e 14 do sexo feminino. No grupo controle, foram avaliadas amostras de fígados (n=6) de pacientes com outras causas de colestase neonatal. Esse grupo era composto por 3 casos de deficiência de α -1 antitripina, 2 hepatites neonatais, e uma colestase ideopática. Dos 6 pacientes, 5 eram do sexo masculino e 1 do sexo feminino. A idade dos pacientes com AB variou entre 50 e 109 dias de vida [(mediana 65) (média 72)] dias de vida. Já a idade dos pacientes do grupo controle variou entre 34 e 80 [(mediana 63) (média 59)] dias de vida. Não houve diferença estatística entre a idade dos grupos estudados (P=0,559).

A coleta foi realizada por meio de biópsia em cunha no momento da laparotomia exploratória, cirurgia à qual todos os pacientes foram submetidos. Os procedimentos foram realizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de dezembro de 2006 à março de 2010. As amostras foram colocadas em tubos já identificados, contendo 1 mL de *RNA holder* (BioAgency, Brasil) e, a seguir, armazenadas em freezer a -80°C para posterior análise. Todos os responsáveis legais dos pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo 2). O projeto foi aprovado pelo comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA (nº 07-479).

Extração do RNA

Para a extração de RNA das amostras de fígado previamente ultracongeladas foi utilizado o reagente Brazol (LGC Biotecnologia, Brasil). O material histológico foi descongelado e cerca de 50 mg de fígado foi utilizado para análise. O restante do material voltou a ser congelado. O material foi colocado em um homogeneizador de vidro juntamente com 1mL de Brazol. Foi feita a maceração completa do material, até não haver amostra visível (solução límpida). Todas as etapas do processo foram

realizadas com temperatura próxima a 4°C. Após homogeneização completa, a solução foi transferida para um tubo *ependorf* de 1,5mL já contendo 166,66 µL de clorofórmio gelado. O tubo foi levado ao agitador do tipo vortéx por cerca de 2 minutos. O material foi centrifugado a 12.000xg a 4°C por 15 minutos. A seguir, foi retirado o sobrenadante, o qual foi transferido para um tubo *ependorf* já contendo 1mL de isopropanol gelado. Foi repetida a etapa no agitador vórtex. A amostra foi novamente centrifugada nas mesmas condições anteriores, porém por 20 min. O sobrenadante foi retirado, e o precipitado foi dissolvido com 30 µL de água livre de RNase.

Quantificação do RNA

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

cDNA (*complementary DNA*)

Foi utilizado o kit cDNA *Superscript II RT* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Em um tubo de 0,2 mL foi pipetado 1 µL de oligo(DT), 1 µL de DNTP 10mmol, RNA (quantidade varia conforme concentração) e q.s.p. de água de injeção para um volume final de 12 µL. O tubo foi levado ao termociclador à 65°C por 5 minutos. Após resfriamento rápido do tubo, foi pipetado 4 µL de 5x *first stand buffer*, 2 µL de DTT 0,1M e 1 µL de *RNAse out*. Novamente a amostra foi levada ao termociclador a 42°C por 2 minutos. Adicionou-se 1 µL de *superscript II* e então o tubo foi incubado no termociclador à 42 °C por 50 minutos e à 70°C por 15 minutos.

qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real)

Foi utilizado o kit *SYBR GreenER SuperMix Universal* (Invitrogen, Carlsbad, CA). O procedimento foi realizado conforme protocolo do kit. Foram utilizados *primers* para VEGF A e para padrão interno, GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). As seqüências dos *primers* encontram-se na tabela 1. A reação foi composta pelas seguintes etapas: 1 ciclo de 2 minutos a 50°C, 1 ciclo de 10 minutos a 95°C e 40 ciclos na seguinte seqüência: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C e 1 minuto a 60°C. O último ciclo foi de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C e 15 segundos a 60°C. As amostras foram analisadas em quadruplicatas com um volume final do PCR de 12 µL. Foi utilizado o termociclador *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System* (Foster City, Calif., USA).

Avaliação do PCK7

As amostras para análise da expressão imuno-histoquímica foram coletadas da mesma maneira, através da laparotomia exploratória. As amostras examinadas foram fixadas com formalina e embebidas com parafina. Cortes com cinco micrômetros de espessura foram obtidos e submetidos à imunoistoquímica para marcação de anti-citoqueratina 7 (CK7, *DAKO A / S, Glostrup, Denmark*; 1:100). A anti-citoqueratina 7 (CK7), marcador do epitélio biliar, foi usado para delinear estruturas biliares, a fim de avaliar o percentual de positividade de CK7 (PCK7). A imunomarcação foi amplificada usando o complexo avidina-biotina peroxidase. Como anticorpo secundário foi usado um reagente multiespecífico (*EasyPath*; *Erviagas Ltd, São Paulo, Brasil*). A imunoistoquímica foi realizada conforme método descrito anteriormente (22). Análise morfométrica de imagens foi utilizada para a avaliação de PCK7. De cada lâmina, 10 imagens foram selecionadas aleatoriamente em áreas de positividade pra PCK7 sendo capturadas (campos de ampliação, 200x) e salvas no formato TIFF para posterior análise. A tensão de lâmpada halógena foi mantida constante através da estabilização

adequada. As imagens foram analisadas quantitativamente. As medidas morfométricas foram realizadas utilizando o programa de computador Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0 (*Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA*). Para cada paciente, os valores obtidos em cada medição PCK7 foram registrados e a média de cada caso, calculada. O avaliador responsável pela morfometria desconhecia os dados clínicos dos pacientes. A avaliação foi feita de acordo com Santos et al. (2009)(7), expressando a extensão de proliferação biliar nas biópsias. Resumindo, todas as imagens exibidas no monitor foram ajustadas para o mesmo *threshold* e, nas regiões que continham estruturas CK7 positivas, a área de positividade foi medida em *pixels*. O PCK7 em cada imagem foi então calculado pela razão entre a área CK7-positiva e a quantidade total de *pixels* por imagem. O limiar de PCK7 utilizado foi de 10,18% conforme descrito por Santos et al, 2009 (7).

Modelo matemático e Análise estatística

A quantificação da expressão gênica foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para cada amostra, o valor do ΔCt foi obtido subtraindo o valor de Ct do GAPDH do valor do Ct do VEGF A (13).

Os dados foram armazenados em planilhas utilizando o programa EXCEL versão 2007. Os dados foram expressos em mediana (máximo e mínimo). Para a comparação da expressão do mRNA do VEGF A nos diferentes grupos estudados, foi utilizado teste U de *Mann-Whitney*. Para a correlação entre VEGF A e PCK7 foi utilizada a correlação não paramétrica *Spearman's rho*. Para análise estatística foi utilizado o programa SPSS 15.0 (*SPSS Inc, Chicago, IL, USA*).

RESULTADOS

Foram avaliadas amostras de fígados de 27 pacientes que foram submetidos à laparotomia exploratória no Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre os anos de 2006 e 2010. Destes 27 pacientes, 21 tinham Atresia Biliar e 6 apresentavam outras causas de colestase neonatal. No momento da Portoenterostomia, a média da idade dos pacientes do grupo com Atresia Biliar foi de 72 (50;109) dias de vida e a média da idade dos pacientes do grupo controle foi de 59 (34;80) dias de vida. Não houve diferença estatística entre a idade dos grupos estudados ($P=0,559$).

A **Tabela 2** apresenta a expressão do VEGF A nos diferentes grupos estudados. A expressão relativa do mRNA em fígados de pacientes com AB não apresentou diferença se comparada com a expressão em fígados de pacientes com OCN ($P=0,199$). Para observarmos se essa falta de diferença foi devida à heterogeneidade intrínseca do grupo controle, foi comparada a expressão do grupo AB com a de um subgrupo de pacientes dentro das OCN que apresentavam especificamente deficiência de α -1 antitripsina ($n=3$), porém também não houve diferença significativa entre estes grupos ($P=0,176$).

Buscou-se, então avaliar se os fatores prognósticos relacionados à AB afetaram a expressão do VEGF A neste grupo de pacientes. Inicialmente avaliou-se a idade por ocasião da Portoenterostomia com ponto de corte de 60 dias de vida, sem detectar-se diferença entre os grupos com menos de 60 dias e aqueles com 61 ou mais dia de vida ($P=0,881$). O emprego de outro ponto de corte, 70 dias de vida, também não definiu diferenças entre os pacientes com AB em relação à expressão do VEGF A ($P=0,128$). Foi utilizado o ponto de corte de 90 dias de vida para avaliação da expressão do VEGF A que também não apresentou diferença ($P=0,801$).

Utilizamos a percentagem de citoqueratina 7 (PCK7) para relacionar com a expressão do VEGF A nos pacientes com Atresia Biliar. Os pacientes foram

classificados de acordo com o limiar de 10,18% em dois grupos: um com menos de 10,18% (n=6) e outro com mais de 10,18% (n=11). Quatro pacientes do presente estudo não entraram nessa análise pois não obtivemos material para a imunohistoquímica. Houve diferença da expressão nesses grupos, sendo que o grupo com maior PCK7 apresentou menor expressão do VEGF A (P=0,044). Comparamos o grupo que apresentou menor PCK7 com o grupo de pacientes com outras causas de colestase neonatal (n=6). Houve maior expressão do VEGF A no primeiro grupo (P=0,070).

A **Tabela 3** apresenta a comparação da idade dos pacientes dos subgrupos da Atresia Biliar em relação à percentagem de citoqueratina 7. Os pacientes com menor PCK7 (n=6) tem idade menor se comparados com os pacientes com maior PCK7 (n=11) (P=0,078). A correlação entre os valores da expressão do VEGF A e os valores de PCK7 encontrada foi negativa moderada ($r=-0,55$; P=0,021). Na figura 1 podemos observar dois padrões de expressão de PCK7 em relação ao limiar de 10,18%. Em 1a: PCK7=6,07%; expressão VEGF A=5,193. Em 1b: PCK7=18,13%; expressão de VEGF A=0,369.

DISCUSSÃO

Independente da desobstrução mecânica ao fluxo biliar permanece na Atresia Biliar uma colangiopatia destrutiva, progressiva, de etiologia obscura (11). Entre os diversos mecanismos propostos, a existência de uma arteriopatia (12), comprometendo inclusive a rede de vasos que nutre de sangue os ductos biliares, o plexo vascular peribiliar (PVP), tem sido considerada. Um distúrbio deste tipo poderia levar à isquemia progressiva da árvore biliar, explicando porque, após um estágio inicial de proliferação biliar, os pacientes afetados vêm a apresentar rarefação de ductos (9,10). A possível existência dessa arteriopatia (12) comprometendo as estruturas biliares, nos levou a estudar a expressão de moléculas relacionadas com a angiogênese. Entre os fatores angiogênicos que estudamos incluiu-se o VEGF A, o qual é o principal regulador da angiogênese. Ele promove o crescimento endotelial em artérias e veias; responsabiliza-se pela manutenção da sobrevivência dos endoteliócitos, prevenindo sua apoptose; aumenta a permeabilidade vascular, indispensável para a angiogênese; estimula o recrutamento de células inflamatórias e a expressão de proteases implicadas na degradação da matriz extracelular durante a angiogênese (14). Durante o desenvolvimento embrionário, o VEGF A é o principal estimulador da migração dos brotamentos capilares que originam a rede vascular. Além da angiogênese fisiológica, o VEGF A atua na angiogênese patológica, como na neovascularização tumoral, cicatrização e artrite reumatóide (15-17). O VEGF A é o principal fator angiogênico induzido por hipóxia, sendo, nesse caso, o HIF-1 o mediador das respostas hipoxêmicas (18). Além da hipóxia, hipoglicemia e acidose sobrerregulam a expressão do VEGF.

A evolução pós-cirúrgica da Portoenterostomia não é homogênea nos pacientes com Atresia biliar e alguns fatores têm sido associados ao prognóstico pós-operatório, entre eles a idade [6] e a extensão da proliferação biliar (7) observada na biópsia hepática, ambos por ocasião da Portoenterostomia. A extensão da proliferação

biliar foi analisada por nosso grupo através de análise morfométrica da porcentagem de citoqueratina 7 (PCK7), um marcador de estruturas biliares, na biópsia, e um valor de PCK7 igual ou maior a 10,18 foi capaz de classificar o prognóstico dos pacientes em termos de óbito ou necessidade de transplante hepático no primeiro ano pós-cirúrgico(7). Na maioria dos estudos (19,6) observou-se que a idade ideal para um bom prognóstico varia entre 45 e 60 dias de vida, sendo que alguns autores empregaram 71 dias como limiar de inferência prognóstica (20). A influência da idade, porém, não é um fenômeno linear (21), parecendo sofrer influência de outras variáveis, como a extensão da proliferação biliar (7), a extensão da fibrose (22), a presença de malformações extra-hepáticas associadas e/ou de cistos extra-hepáticos (23). Cirurgias realizadas após 90 dias de vida, porém, tem claramente pior prognóstico (24).

No presente estudo, não observamos diferença na comparação da expressão do VEGF A entre a amostra total de pacientes com AB e os pacientes com outras causas de colestase neonatal ($P=0,199$). Isto poderia se dever à ausência real de diferenças, ou a heterogeneidades inerentes aos dois grupos. Ao selecionarmos um grupo de controles específico, no caso pacientes com deficiência de alfa-1 AT, o que diminuiria a heterogeneidade dos controles, manteve-se a ausência de diferença ($P=0,176$).

Buscamos, a seguir, segregar subgrupos dentro da amostra de AB, com base nos estudos que avaliam prognóstico, visando analisar se esses fatores influenciariam a expressão de VEGF A. A primeira análise considerou a idade limite de 60 dias como critério de seleção, sem observar-se diferença entre o subgrupo de AB com mais de 60 dias de vida e aquele outro com menos ($P=0,881$). Também a utilização do limiar de 70 dias de vida não foi capaz de demonstrar diferenças na expressão do VEGF A ($P=0,128$). Nem mesmo a idade maior que 90 dias determinou diferentes expressões do VEGF A entre os pacientes com AB ($P=0,801$).

Porém, ao dividirmos a amostra dos pacientes com AB em relação ao limiar prognóstico de PCK7 utilizado em nosso estudo anterior (PCK7=10,18), observamos a segregação de dois subgrupos dentro da amostra de AB: pacientes com PCK7 maior que o limiar apresentaram menor expressão de VEGF A que os pacientes com menor PCK7 (P=0.044). Houve correlação negativa moderada entre os valores do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de expressão do VEGF A e os valores do PCK7 (r=0,55; P=0,021).

Desta forma, a variável que distinguiu os subgrupos de Atresia biliar não foi a idade por ocasião da Portoenterostomia, mas sim a extensão da proliferação biliar, havendo menor expressão do VEGF no grupo com maior porcentagem de PCK7. Gaudio et al (25) em 2006 avaliaram por análise morfométria e qRT-PCR, a expressão do VEGF A em ratos submetidos a ligadura de ducto biliar(LDB).Nesse modelo de ligadura tem-se aumento da expressão do VEGF A. Porém, num modelo de dupla ligadura, ou seja, ligadura de ducto biliar mais ligadura arterial hepática (LHA), realizado por este mesmo grupo (26), demonstrou diminuição da expressão do VEGF A e desaparecimento do PVP. A adição de VEGF A recombinante ao modelo de dupla ligadura, previniu o desaparecimento do PVP, prevenindo o agravamento da lesão biliar devido à isquemia. Nossos dados sugerem que na AB, há um componente isquêmico atuando nas estruturas biliares, que se torna evidente nos pacientes com maior extensão da proliferação biliar, semelhante a um modelo de LDB associada a LAH, que causa diminuição da expressão do VEGF A no tecido hepático.

Ao selecionarmos o grupo com menor PCK7 e compararmos com as outras causas de colestase neonatal, observamos uma tendência a maior expressão do VEGF A no primeiro grupo (P=0.070), sugerindo que, neste caso, a obstrução mecânica biliar seja o fenômeno preponderante. Observamos que a idade do grupo com menor PCK7 tendeu a ser menor que a do grupo com maior PCK7 (mediana de 59 dias, em comparação com mediana de 84 dias, P=0,078). O primeiro grupo aproximou-se da faixa etária de 60 dias e o segundo, à faixa de 90 dias. É possível

que na Atresia Biliar a alteração dos ramos arteriais hepáticos seja progressiva, associada a um distúrbio imunológico, e que o quadro isquêmico biliar venha a surgir mais tardiamente.

Novos estudos devem ser realizados para melhor esclarecer os achados do presente estudo, tais como a expressão dos receptores do VEGF e do marcador de hipóxia tecidual, HIF-1. Atualmente nosso grupo está envolvido na quantificação desses marcadores por qRT-PCR em pacientes com Atresia Biliar.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Fundo de Incentivos à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA por financiar este trabalho. Agradecemos também aos Serviços de Patologia e de Cirurgia Pediátrica do HCPA, bem como ao Grupo de pesquisa do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS

1. Moyer V, Freese D, Whittington P, Olson A, Brewer F, Colletti R, et al. Guideline for the Evaluation of Cholestatic Jaundice in Infants: Recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39:115–128.
2. Hessel G, Sawamura R. Colestase do lactente. In: Barbieri D, Palma D, editors. *Gastroenterologia e Nutrição. Série Atualizações Pediátricas*. São Paulo: Atheneu; 2001:143-57.
3. de Carvalho E, Ivantes CA, Bezerra JA. Extrahepatic biliary atresia: current concepts and future directions. *J Pediatr* 2007;83:105-20.
4. Balistreri W, Grand R, Hoofnagle JH, Suchy FJ, Ryckman FC, Perlmutter DH et al. Biliary atresia: current concepts and research directions – summary of a symposium. *Hepatology* 1996;23:1682–1692.
5. Chen SM, Chang MH, Du JC, Lin CC, Chen AC, Lee HC , et al. Screening of biliary atresia by infant stool color card in Taiwan. *Pediatrics* 2006;117:1147-1154.
6. Santos JL, Cerski CT, da Silva VD, et al. Factors related to the post-portoenterostomy prognosis of biliary atresia. *J Pediatr (Rio J)* 2002;78:341-6.
7. 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?. *Journal of Pediatric Surgery* 2009;44:695-701.
8. Lilly J, Altman R. Hepatic portoenterostomy (the Kasai operation) for biliary atresia. *Surgery* 1975;78:76–86.
9. Santos JL, Almeida H, Cerski CT, et al. Histopathological diagnosis of intra- and extrahepatic neonatal cholestasis. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:911-9.

10. Li M, Crawford J. The pathology of cholestasis. *Semin Liver Dis* 2004;24:21-42.
11. Mieli-Vergani G.; Portmann B, Howard E, Mowat A. Late referral for biliary atresia- Missed opportunities for effective surgery. *Lancet* 1989;25:421–423.
12. Santos J, Silveira T, Silva V, Cerski C, Wagner M. Medial layer thickening of hepatic artery branches in biliary atresia patients. A morphometric study. *J Ped Surg* 2005;40:637-42.
13. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 2001;25:402-408.
14. Ferrara N, Gerber H, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 2003;9:669-676
15. Geiger R, Berger RMF, Hess J, Bogers A, Sharma HS, W. J. Mooi WJ. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease. *Journal of Pathology* 2000;191:202-207.
16. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, et al. The biology of vascular endothelial growth factors *Cardiovascular Research* 2005;65:550– 563.
17. Xia YP et al. Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to inflammatory condition resembling human psoriasis. *Blood* 2003;102:161-168.
18. Tsuzuki Y, Fukumura D, Oostheuyse B, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1 α →hypoxia response element →VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Research* 2000;60:6248-6252.
19. Subramaniam R, Doig CM, Bowen J, et al: Initial response to portoenterostomy determines long-term outcome in patients with biliary atresia. *J Pediatr Surg* , 2000;35:593-597
20. Schoen BT, Lee H, Sullivan K, et al: The Kasai portoenterostomy:When is it too late. *J Pediatr Surg*, 2001;36:97-99

21. Wildhaber EB, Coran A, Drongowski RA, Hirschl R B, Geiger JD, Lelli JL, et al. The Kasai Portoenterostomy for Biliary Atresia: A Review of a 27-Year Experience With 81 Patients, *Journal of Pediatric Surgery*, 2003;10:1480-1485.
22. Ramm GA, Nair VG, Bridle KR, Shepherd RW, Crawford DHG. Contribution of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells to hepatic fibrogenesis in biliary atresia. *Am J Pathol* 1998;153:527-35.
23. Caponcelli E, Knisely AS, Davenport M. Cystic biliary atresia: an etiologic and prognostic subgroup. *J Pediatr Surg* 2008;43:1619–1624.
24. Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, et al. Is the Kasai operation still indicated in children of more than 3 months diagnosed with biliary atresia? *J Pediatr* 2001;138:224-8.
25. 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.
26. Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Ueno Y. 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 Physi*, 2006; 291:G307–G317.

Tabela 1: *Primers* utilizados no qRT PCR, de 5' para 3'.

Gene	Sequência
VEGF A	Forward: CCAATCGAGACCCTGGTT
	Reverse: CACACAGGATGGCTTGAAGA
GAPDH	Forward: CCCATCACCATCTTCCAGG
	Reverse: GAGATGATGACCCTTTTGGC

Abreviaturas: VEGF A, Vascular Endothelial Growth Factor; GAPDH, Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Tabela 2: Comparação da expressão do VEGF A por PCR quantitativo entre os grupos estudados

Grupos	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	P
	mediana (mínimo;máximo)	
Atresia Biliar (n=21)	1,780(0,264;5,193)	0,199
Colestase Neonatal (n=6)	1,162(0,298;2,306)	
Atresia Biliar (n=21)	2,389(0,354;6,969)	0,176
Deficiência α-1 antripsina (n=3)	1,201(0,400;2,090)	
AB (POE<60 dias) (n=7)	1,519(0,171;3,360)	0,881
AB (POE\geq61 dias) (n=14)	1,116(0,239;2,677)	
AB (POE<70 dias) (n=13)	2,049(0,231;4,533)	0,128
AB (POE\geq71 dias) (n=8)	0,966(0,322;3,255)	
AB (POE<90 dias) (n=14)	1,188(0,219;2,789)	0,801
AB (POE\geq91 dias) (n=3)	0,739(0,599;0,660)	
PCK7<10,18 (n=6)	0,469(0,137;1,397)	0,044
PCK7>10,18 (n=11)	1,215(0,211;2,689)	
AB com PCK7<10,18 (n=6)	2,347(0,407;5,193)	0,070
Colestase Neonatal (n=6)	1,162(0,298;2,307)	

Abreviaturas: VEGF A, *Vascular Endothelial Growth Factor*; AB, Atresia Biliar; POE, portoenterostomia; PCK7, percentagem de citoqueratina 7.

Tabela 3: Comparação da idade dos subgrupos de AB em relação à quantidade de PCK7

Grupos	Idade	P
	mediana (mínimo;máximo)	
AB com PCK7<10,18 (n=6)	59(50;93)	0,078
AB com PCK7>10,18 (n=11)	84,5(52;109)	

Abreviaturas: AB, Atresia Biliar; PCK7, percentagem de citoqueratina 7.

Método Estatístico: Mann-Whitney.

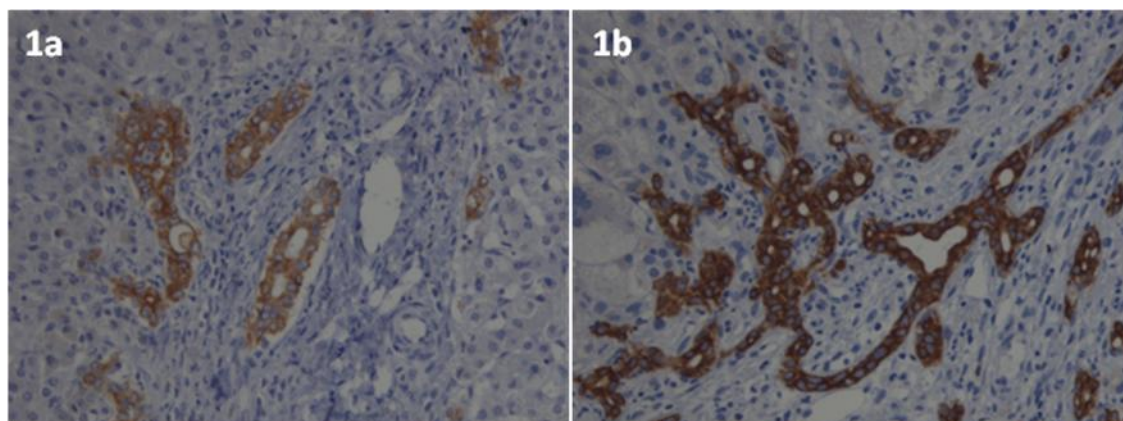


Figura 1- Estruturas biliares de pacientes com Atresia biliar marcadas com citoqueratina 7. Em 1a: PCK7= 6,07%; em 1b: PCK7= 18,13%. Imuno-histoquímica; 200X.

INSTRUÇÕES REDATORIAIS

Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul Instruções redatoriais

Instruções aos autores

A revista da AMRIGS (ISSN 0102-2105) aceita para publicação artigos da comunidade científica Nacional e Internacional. Publica regularmente artigos originais de pesquisa clínica e experimental, artigos de revisão sistemática de literatura sob convite, metanálises, artigos de opinião, relatos de caso e cartas ao editor. A revista da AMRIGS apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), reconhecendo a importância dessas iniciativas para o registro e divulgação internacional de informação sobre estudos clínicos, em acesso aberto. Sendo assim, somente serão aceitos para publicação, a partir de 2007, os artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido um número de identificação em um dos Registros de Ensaios Clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE, cujos endereços estão disponíveis no site do ICMJE (<http://www.icmje.org>). O número de identificação deverá ser informado no final do resumo.

Regras do artigo:

O artigo pode ser enviado nas seguintes línguas: português, espanhol, italiano, francês (sempre com resumo na língua natal e em inglês) ou na íntegra na língua inglesa. O tamanho do artigo completo não deverá exceder 24 páginas (laudas do Word) para artigos originais e artigos de revisão, 15 páginas para relatos de caso e artigos de opinião e 2 páginas para as cartas ao editor. As margens não precisam ser definidas, pois o sistema SGP as definirá. A seleção baseia-se no princípio da avaliação pelos pares (peer review). Os trabalhos são encaminhados aos Editores Associados que selecionarão os relatores de reconhecida competência na temática abordada. Os trabalhos publicados são propriedades da Revista, sendo vedada a reprodução total ou parcial e a tradução para outros idiomas sem a autorização da mesma. Os trabalhos deverão ser acompanhados da Declaração de Transferência dos Direitos Autorais e Declaração de Conflitos de Interesses assinadas pelos autores. Os conceitos emitidos nos trabalhos são de responsabilidade exclusiva dos autores.

A submissão on-line deverá ser feita através do Sistema de Gestão de Publicações na internet no link: www.revistadaamrigs.org.br/sgp.

Conteúdo do artigo:

Deverá ser obedecida a seguinte ordem: página de rosto, resumo em português ou na língua nativa, resumo em inglês, palavras-chave em português e inglês, texto, agradecimentos, referências bibliográficas, gráficos, tabelas e legendas de figuras. Cada tópico deve ser iniciado em uma nova página e deve conter:

Na página de rosto - o título do artigo em português e inglês, curtos e objetivos; nome dos autores com titulação mais importante de cada um; instituição à qual o trabalho está vinculado; nome, endereço, telefone, e-mail e fax do autor responsável pela correspondência; se o trabalho foi apresentado em congresso, especificar nome do evento, data e cidade; fonte de suporte ou financiamento se houver e se há alguma espécie de conflito de interesses.

Na segunda página - o resumo estruturado em português e inglês, com o máximo de 250 palavras cada. Para artigos originais, incluir dados de introdução, objetivos, métodos, resultados e conclusões. Para artigos de revisão, incluir introdução, objetivos, síntese dos dados e conclusões. Para relatos de caso, incluir introdução, objetivos, relato resumido e conclusões. Abaixo do resumo, fornecer três a seis descritores em português e inglês, selecionados da lista de "Descritores em Ciências da Saúde" da BIREME, disponível no site <http://decs.bvs.br>.

Da terceira página em diante, o texto do artigo, assim dividido:

- **Artigos Originais:** a) introdução com objetivo; b) material e métodos; c) resultados; d) discussão; e) conclusões; f) referências bibliográficas. As informações contidas em tabelas e figuras não devem ser repetidas no texto. Estudos envolvendo seres humanos e animais devem fazer referência ao número do protocolo de aprovação pelo respectivos Comitês de Ética em Pesquisa da instituição à qual está vinculada a pesquisa. Artigos originais são definidos como relatórios de trabalho original com contribuições significativas e válidas. Os leitores devem extrair de um artigo geral conclusões objetivas que vão ao encontro dos objetivos propostos.

- **Artigos de Revisão da Literatura:** Deverão ser feitos sob convite do Editor e

conter na sua estrutura os seguintes itens: a) introdução; b) revisão de literatura; c) discussão; d) comentários finais; e) referências bibliográficas. Artigos de revisão devem abranger a literatura existente e atual sobre um tópico específico. A revisão deve identificar, confrontar e discutir as diferenças de interpretação ou opinião.

Relato de Caso: a) introdução; b) revisão de literatura com diagnóstico diferencial c) apresentação de caso clínico; d) discussão; e) comentários finais; f) referências bibliográficas. Relatos de caso deverão apresentar características inusitadas ou cientificamente relevantes. Será dada prioridade a relatos de cunho multidisciplinar, interdisciplinar e/ou prático.

Cartas ao Editor - Deve expressar de forma sucinta a opinião do autor sobre diferentes assuntos de interesse médico/profissional, com um número máximo de 350 palavras (aproximadamente uma página e meia de texto) e com número de referências bibliográficas não superiores a 10.

Artigos de Opinião: deverão ser feitos sob convite do Editor.

Referências bibliográficas:- as referências devem ser apresentadas em ordem de aparecimento no texto e identificadas no texto em numerais arábicos entre parênteses. As abreviaturas dos periódicos devem ser baseadas no "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", disponível pelo site <http://www.icmje.org>. Todos os autores deverão ser incluídos quando houver até seis; quando houver sete ou mais, os primeiros seis devem ser listado e 'et al.' Adicionado para os subsequentes. Serão aceitas no máximo 30 referências para artigos originais, 60 para artigos de revisão e 15 para relatos de casos.

Exemplos:

- **Periódicos:** Sobrenome do(s) Autor(es) e Iniciais. Título do Artigo. Abreviaturas do Periódico, ano, volume: página inicial - página final. Ex: Prolla JC, Dietz J, da Costa LA. Geographical differences in esophageal neoplasm mortality in Rio Grande do Sul. Rev Assoc Med Bras. 1993;39(4):217-20

- **Teses:** Sobrenome do Autor e Iniciais. Título da Tese. Cidade, ano, página

(Tese de Mestrado ou Doutorado - Nome da Faculdade). Ex: Barros SGS. Detecção de lesões precursoras em indivíduos sob risco para o carcinoma epidermóide do esôfago. Tese de doutorado (1992). Porto Alegre, UFRGS.

- **Livros:** Sobrenome do(s) Autor(es) e Iniciais. Título do Livro, no da edição. Cidade: Editora; ano. Ex: Corrêa da Silva, LC. Condutas em Pneumologia. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2001.

- **Capítulos de Livros:** Sobrenome do(s) Autor(es) do capítulo e Iniciais. Nome do capítulo. In: Sobrenome do(s) Autor(es) do Livro e Iniciais. Título do Livro. Número da edição. Cidade: Editora; ano, página inicial - página final. Ex: Silveira TR, Krebs S, Vieira SMG. Fibrose Cística. In Gayotto LC e Strauss EO. Hepatologia, 1ª ed. São Paulo: Ed. Rocca; 2000, 353-364.- Material eletrônico: para artigos na íntegra retirados da internet, seguir as regras prévias, acrescentando no final "disponível em: endereço do site".
Abreviaturas e Unidades: a revista reconhece o Sistema Internacional (SI) de unidades. As abreviaturas devem ser usadas apenas para palavras muito freqüentes no texto.

Tabelas e Gráficos: cada tabela deve ser apresentada com números arábicos, por ordem de aparecimento no texto, em página separada com um título sucinto, porém explicativo, não sublinhando ou desenhando linhas dentro das tabelas. Quando houver tabelas com grande número de dados, preferir os gráficos (em preto e branco). Se houver abreviaturas, providenciar um texto explicativo na borda inferior da tabela ou gráfico.

Ilustrações: enviar as imagens e legendas conforme instruções de envio do Sistema de Gestão de Publicações (SGP) no site www.revistadaamrigs.org.br. Até um total de 8 figuras será publicado sem custos para os autores; fotos coloridas serão publicadas dependendo de decisão do editor e seu custo será por conta do autor. As imagens deverão ser enviadas em 300dpi, preferencialmente em formato TIF sem compactação. As tabelas deverão ser colocadas no final do artigo e coladas juntamente com o conteúdo no respectivo passo. Os gráficos deverão ser convertidos em formato de imagem, jpg, gif, tif ou png.
Se forem usadas fotografias de pessoas, os sujeitos não devem ser identificáveis ou suas fotografias devem estar acompanhadas por consentimento

escrito para publicação (ver a seção de Proteção dos Direitos de Privacidade dos Pacientes). Se uma figura já foi publicada, agradecer à fonte original e enviar a autorização escrita do detentor dos direitos autorais para reproduzir o material. A autorização é requerida, seja do autor ou da companhia editora, com exceção de documentos de domínio público. Legenda das ilustrações: Quando símbolos, setas, números ou letras forem usados para identificar as partes de uma ilustração, identificar e explicar cada uma claramente na legenda. Explicar a escala interna e identificar o método de coloração utilizado nas fotografias.

Declaração de conflitos de interesse: Além da declaração no Sistema de Gestão de Publicações, os autores devem informar no final do artigo a existência ou não de conflitos de interesses.

GUIA PARA AUTORES

- Título em português e inglês; nome e titulação dos autores; instituição; endereço para correspondência; apresentação em congresso; fonte de financiamento;
- Resumo estruturado em tópicos e palavras-chave em português e inglês;
- Texto em português;
- Agradecimentos;
- Referências bibliográficas;
- Tabelas e gráficos;
- Ilustrações (fotos e desenhos);
- Legendas das ilustrações.
- Declaração por escrito de todos os autores que o material não foi publicado em outros locais, permissão por escrito para reproduzir fotos/figuras/gráficos/tabelas ou qualquer material já publicado ou declaração por escrito do paciente em casos de fotografias que permitam a sua identificação.
- Declaração por escrito sobre a "Transferência dos Direitos Autorais" e sobre a "Declaração de Conflitos de Interesse".
- Autorização da Comissão de Ética da Instituição de origem para estudos em humanos ou animais (pode estar incorporado no capítulo Material e Métodos, com o número de protocolo de aprovação).

Essas normas foram retiradas do site www.revistadaamrigs.org.br acessado em 15/06/10.

Termo de consentimento informado para armazenagem de material biológico

Você / seu filho coletará a(s) seguinte(s) amostra(s) para investigação / diagnóstico no Serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (assinale o tipo de amostra coletada):

Material

Tecido hepático

Outro tecido (especificar)

Outro material (especificar)

sim	não

Você concorda que esta amostra seja armazenada neste serviço para os seguintes fins:

1. Futuros estudos sobre a doença:

Caso sua resposta seja sim, a amostra permanece identificada e você será avisado sobre qualquer informação obtida.

sim	não

2. Outras pesquisas que não envolvem a doença que você está investigando e são realizadas sem identificação da amostra, sem nenhum benefício direto para você ou seus familiares, mas com potencial benefício para o progresso médico e científico:

sim	não

3. Envio para outros centros para eventual realização de exames com potencial benefício direto para você ou seus familiares (amostra identificada):

sim	não

4. Envio para outros centros de pesquisa em que não há benefício direto para você ou seus familiares (amostra enviada sem identificação):

sim	não

O armazenamento da amostra não implica em qualquer custo adicional nem interferirá na realização normal do exame.

O período de armazenamento é indeterminado, mas seu consentimento pode ser retirado a qualquer momento se você mudar de idéia e, neste caso, a amostra será descartada. Este documento não torna obrigatória a realização de

nenhum dos procedimentos acima mencionados. Em nenhuma hipótese haverá quebra de sigilo quanto aos seus dados ou à liberação da amostra identificada para terceiros sem sua autorização.

Declaro que li e compreendi as informações acima e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas por:_____.

Local:_____.

Data:_____.

Assinatura:_____.

Endereço e telefone para contato:_____.