

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

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS FATORES ANGIOGÊNICOS
VEGF A E SEUS RECEPTORES E FGFB EM TECIDO HEPÁTICO
DE PACIENTES COM ATRESIA BILIAR**

Patrícia Turnes Edom

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil

2009

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

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS FATORES ANGIOGÊNICOS
VEGF A E SEUS RECEPTORES E FGFB EM TECIDO HEPÁTICO
DE PACIENTES COM ATRESIA BILIAR**

Patrícia Turnes Edom

Orientadora: Dra. Themis Reverbel da Silveira

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2009

E24a Edom, Patrícia Turnes

Avaliação da expressão dos fatores angiogênicos VEGF A e seus receptores e FGFB em tecido hepático de pacientes com atresia biliar / Patrícia Turnes Edom; orient. Themis Reverbel da Silveira. – 2009. 109 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Atresia biliar 2. Fator A de crescimento do endotélio vascular 3. Fatores de crescimento de fibroblastos 4. Hipóxia 5. Receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular I. Silveira, Themis Reverbel da II. Título.

NLM: WI 750

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Dra. Themis Reverbel...

Exemplo pessoal e profissional que, com sua jovialidade, vitalidade, genialidade, beleza e criatividade, inunda de entusiasmo e de sabedoria as pessoas que com ela convivem e os lugares por onde passa. Ela tem aquele brilho nos olhos que denuncia a inquietação de novas idéias, contagiando-nos e fazendo com que acreditemos que tudo é possível. Agradeço pelo carinho, pela paciência, pelos ensinamentos e pelo privilégio do convívio. A senhora será sempre uma inspiração em minha vida. Obrigada.

Ao Dr Jorge Santos...

Meu co-orientador que me guiou pelo mundo da pesquisa, trazendo interrogação ao meu pensamento e a insatisfação ao que me era oferecido, me estimulando a ir atrás do que talvez nem eu mesmo soubesse o que era, mas, com a sua ajuda, ia, aos poucos, tendo sentido. Agradeço pela paciência, pela dedicação e por ajudar-me a realizar este sonho.

Aos meus pais Eliane e José...

Por me fazerem sentir especial e acreditar que todos os meus maiores desejos se tornarão realidade. Obrigada pelos ensinamentos, pelo exemplo, apoio e carinho que sempre dedicaram a mim.

AGRADECIMENTOS

Este estudo, por envolver as áreas de patologia e análise de imagens, só se tornou realidade pelo concurso competente de diversas pessoas. Desse modo, agradeço:

- à **Dra. Luise Meurer, patologista** colaboradora incansável na produção e na análise do material histológico;
 - à **Flávia Giusti**, técnica em histologia, pela dedicação e pelo capricho na realização da técnica imunoistoquímica e pelo carinho, amizade e incentivo a mim dedicados;
 - à **Zeli Pacheco**, técnica responsável pela blocoteca, pois sua colaboração e disposição foram essenciais para a realização deste estudo;
 - ao **Dr. Carlos Thadeu Cerski**, patologista, pelas sugestões relativas ao material a ser utilizado;
 - ao **Dr. Vinícius Duval da Silva**, pela orientação no método de análise de imagens;
 - à **Rafael Maurer e Álvaro Laureano** pela ajuda, carinho e amizade dispensadas a mim neste período;
 - à **Lovaine Rodrigues**, mestre em nutrição, pelo estímulo à realização deste objetivo;
 - ao **Dr. Matias Bressel** que, durante meses, realizou conosco a avaliação estatística dos dados.
 - ao **Dr. Carlos Kieling**, gastroenterologista pediátrico, pela ajuda na aquisição de informações que contribuíram para a realização deste estudo;
 - às **bolsistas Patricia De Leon e Ariela Cardoso** pela colaboração em diferentes etapas de elaboração deste trabalho;
 - à **Moema Goulart e Jamile Ladeira**, secretárias do Departamento de Pesquisa e Pós-Graduação em Gastroenterologia, pelo carinho e pela disposição que sempre me dedicaram;
 - à **Dra. Angela Wise**, bioquímica, exemplo de competência, que participou de minha formação acadêmica e possibilitou meu primeiro contato com a pesquisa experimental, sendo minha incentivadora até hoje;
-

-
- à **Dra. Eneida Kopinski**, pela paciência, pelo carinho e pelo apoio;
 - às **Dras. E grandes amigas Ana Luiza Ziemer e Rejane Fialho** pelo apoio, conselhos, carinho, incentivo e paciência;.
 - à **Lu, Cine e Fê, minhas irmãs**, pelo apoio e valorização de todas as minhas conquistas;

Agradeço, finalmente, às **pessoas que trabalham nos serviços de Patologia e Citologia e no Centro de Pesquisas do HCPA** pela recepção amigável, experiência e aprendizado que me proporcionaram durante o período em que frequentei estas áreas do hospital.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 1.1 Microanatomia hepática..... | 19 |
| 1.1.1 Anatomia vascular hepática..... | 20 |
| 1.1.2 Subunidade vascular hepática..... | 22 |
| 1.1.3 Ductus biliares e vascularização..... | 25 |
| 1.2 Fibrogênese..... | 28 |
| 1.3 Atresia biliar..... | 29 |
| 1.3.1 Fatores etiológicos..... | 31 |
| 1.3.2 Anomalias Congênicas Extra-Hepáticas Associadas..... | 34 |
| 1.3.3 Alterações vasculares na AB..... | 35 |
| 1.3.4 Fatores de crescimento angiogênicos na atresia biliar..... | 37 |
| 1.3.4.1 VEGF A..... | 38 |
| 1.3.4.1.1 Expressão imunoistoquímica do VEGF nas estruturas hepáticas... | 39 |
| 1.3.4.2. Receptor 1 do VEGF (VEGFR1)..... | 41 |
| 1.3.4.3. Receptor 2 do VEGF..... | 42 |
| 1.3.4.4. FGFb..... | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 45 |
| 3 OBJETIVOS DO ESTUDO | 46 |
| 3.1 Objetivo principal | 46 |
| 3.2 Objetivos específicos | 46 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 47 |
| 4.1 Delineamento do estudo | 47 |
| 4.2 Critérios de inclusão | 47 |
| 4.3 Critérios de exclusão | 48 |
| 4.4 Amostra | 48 |
| 4.5 Variáveis do estudo..... | 50 |
| 4.6 Definição das variáveis do estudo | 51 |
| 4.7 Análise histológica..... | 52 |
| 4.8 Análise morfométrica..... | 53 |
| 4.8.1 Captura de imagens | 53 |
| 4.8.1.1 Características da captura de imagens..... | 53 |
| 4.8.2 Quantificação da densidade de colágeno..... | 54 |
| 4.8.3 Quantificação da porcentagem de positividade da CK7 (PCK 7)..... | 55 |
| 4.8.4 Mensuração das variáveis espessura da túnica média arterial e diâmetro luminal | 55 |
| 4.9 Preparação Histológica e Imunoistoquímica..... | 56 |
| 4.10 Cálculo do tamanho da amostra..... | 58 |
| 4.11 Análise estatística | 59 |
| 4.12 Considerações éticas | 59 |
| 5 RESULTADOS | 61 |
| 6 DISCUSSÃO | 71 |
| 6.1 Considerações gerais | 71 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 6.2 | Hipóxia e expressão de VEGF A e seus receptores e FGFb | 75 |
| 6.3 | Hipóxia e estruturas portais | 77 |
| 6.4 | Colangiócitos e fibrogênese..... | 80 |
| 7 | CONCLUSÕES | 86 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 88 |
| ANEXO | | |
| | Anexo I - Protocolo imunistoquímico..... | 109 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Representação esquemática do lóbulo hepático | 20 |
| Figura 2 - Representação da microcirculação hepática..... | 22 |
| Figura 3 - Representação esquemática do fluxo sanguíneo na microcirculação hepática | 23 |
| Figura 4 – Representação esquemática da tríade porta..... | 27 |
| Figura 5 - Características imunohistoquímicas do VEGF A nas estruturas hepatobiliares dos pacientes em estudo | |
| 1a, 1b | 64 |
| 1c, 1d | 65 |
| 1e, 1f-1 | 66 |
| 1f-2, 1g..... | 67 |
| Figura 6 – Proliferação ductular-PCK7 em fígado de pacientes com AB | 79 |
| Figura 7 – Diminuição da expressão de VEGFA e VEGFR2 por oclusão de artéria hepática e ducto biliar..... | 82 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Fatores etiológicos propostos para atresia biliar..... | 32 |
| Quadro 2 - Atuação do VEGF na angiogênese patológica | 72 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Malformações extra-hepáticas associadas à atresia biliar nos pacientes em estudo | 49 |
| Tabela 2 - Marcadores imunoistoquímicos empregados no presente estudo | 56 |
| Tabela 3 - Positividade da expressão dos marcadores imunoistoquímicos nas estruturas hepatobiliares de acordo com o grupos em estudo | 62 |
| Tabela 4 - Relação das variáveis PCK7, densidade de colágeno e idade dos pacientes por ocasião da laparotomia exploradora com a expressão dos marcadores imunoistoquímicos nas estruturas hepatobiliares | 68 |
| Tabela 5 - Associação da positividade de expressão imunoistoquímica do VEGF em estruturas hepatobiliares com as variáveis Grupo e PCK7 | 69 |
| Tabela 6 - Relação da razão espessura de túnica média/diâmetro luminal com a positividade do VEGF nas estruturas hepatobiliares | 70 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| µm | Micrômetro |
| AA | Artéria acompanhante |
| AAP | Anastomose artério-portal |
| AB | Atresia biliar |
| AC | Artéria comunicante |
| ADPKD | Autosomal dominant polycystic kidney disease |
| AH | Artéria hepática |
| AHI | Artéria hepática isolada |
| ANG | Angiopoetina |
| ANOVA | Analysis of variance |
| AST | Arteriosinus twigs |
| AT-1 | Receptor 1 da angiotensina |
| BASM | Biliary atresia splenic malformation syndrome |
| CA | Califórnia |
| CC14 | Chemokine (C-C motif) ligand 4 |
| CFC1 | Cryptic family 1 |
| CH | Ramo que nutre a cápsula hepática |
| CIA | Comunicação interatrial |
| CIH | Colestase intra-hepática |
| CIV | Comunicação interventricular |
| CMEH | Com malformação extra-hepática |
| CML | Células musculares lisas |
| CN | Outras causas de colestase neonatal |

| | |
|--------------|--|
| DAB | Diaminobenzidina |
| DAKO | Marca de reagentes e equipamentos para imunohistoquímica. |
| DAPM | Deoxyadenosine monophosphate |
| DB | Ducto biliar |
| DEN | Diethylnitrosamine |
| DP | Desvio padrão |
| EA | Esfíncter aferente |
| EBV | Epstein Barr vírus |
| EE | Esfíncter eferente |
| EGF | Epidermal growth factor |
| EPS | Espaço perissinusoidal |
| ETM | Epitélio de transição mesenquimal |
| EV | Endotélio venoso |
| FGFb ou FGF2 | Fator de crescimento de fibroblastos básico |
| FLK1 | Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase) |
| FLT1 | Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor) |
| HCC | Hepatocarcinoma |
| HCPA | Hospital de Clínicas de Porto Alegre |
| HEP | Hepatócitos |
| HES | Hairy and enhancer of split 1 |
| HHF35 | Anticorpo monoclonal específico antiactina muscular |
| HIF-1 | Hypoxia inducible factor 1 |
| HLA | Human leukocyte antigen |
| HNF | Hepatocyte nuclear factor |
| HP | Hipertensão porta |

| | |
|----------|--|
| ICAM | Intercellular adhesion molecule |
| IC | Intervalo de confiança |
| IEP | Ramo que nutre o interstício do espaço-porta |
| IGF | Insulin-like growth factor |
| IHC | Imunoistoquímica |
| IIQ | Intervalo interquartil |
| IL | Interleucina |
| JAG | Proteína associada à Síndrome de Alagille |
| LAH | Ligadura de artéria hepática |
| LDB | Ligadura de ducto biliar |
| LEHG | Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia |
| MCP-1 | Monocyte chemoattractant protein-1 |
| MEC | Matrix extracelular |
| MEH | Malformação extra-hepática |
| MPD | Malformação de placa ductal |
| N | Tamanho da amostra |
| NADPH | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase |
| NFKAPPAB | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells |
| NO | Óxido nítrico |
| Notch | Receptor de protein transmembrana |
| OR | Odds ratio |
| PA | Parede arterial |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCK7 | Positividade de citoqueratina 7 |
| PDGF | Platelet-derived growth factor |

| | |
|-------------|---|
| PD | Placa ductal |
| PE | Portoenterostomia |
| PI3-KINASE | Phosphoinositide 3-kinase |
| PLGF | Placental growth factor |
| PVP | Plexo vascular peribiliar |
| RA | Rota arterial do PVP |
| REMD | Relação espessura de túnica média/diâmetro luminal |
| RJ | Rio de janeiro |
| RNAm | Ácido ribonucleico mensageiro |
| ROS | Reactive oxygen species |
| RS | Rio Grande do Sul |
| RV | Rota venular do PVP |
| r-VEGF A | Fator de crescimento do endotélio vascular recombinante |
| S/A | Sociedade anônima |
| SFLT1 | Soluble fms-like tyrosine kinase-1 |
| SIN | Sinusoides |
| SIS | Sinusóide intersinusoidal com esfíncteres |
| SMEH | Sem malformação extra-hepática |
| SPSS | Statistical Package for the Social Sciences |
| TEM | Transição epitéliomesenquimatosa |
| TGF β | Fator de crescimento tumoral β |
| TIE domains | Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains |
| TIF | Tag image format |
| TxH | Transplante hepático |
| USA | Estados Unidos da América |

| | |
|----------------|--|
| VC | Veia centrolobular |
| VEGF ou VEGF A | Vascular endothelial growth factor |
| VEGFR1 | Receptor 1 do fator de crescimento do endotélio vascular |
| VEGFR2 | Receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular |
| VP | Veia porta |
| VV | Ramos dos <i>vasa vasorum</i> para veia porta e veia centrolobular |

RESUMO

A atresia biliar (AB) é uma colangiopatia de etiologia indeterminada que leva à necessidade de transplante hepático, mesmo com a realização da Portoenterostomia em tempo hábil. O espessamento da camada média da artéria hepática sugere o envolvimento de um distúrbio angiogênico. Este estudo objetivou avaliar a expressão imunoistoquímica do VEGF A e seus receptores nas estruturas hepatobiliares de pacientes com AB.

Nós avaliamos, por método semiquantitativo, a positividade do VEGF A, VEGFR1 e VEGFR2 em biópsia de fígados obtidas por ocasião da Portoenterostomia de crianças com AB (n=52), com (n=14) e sem (n=38) malformação extra-hepáticas. Serviram como controles, pacientes com colestase intra-hepática (CI) (n=7). A positividade do VEGFA foi também avaliada em explantes (n=33) e *porta hepatitis* (n=16) de pacientes com AB. Avaliamos morfometricamente as variáveis positividade de CK7 (PCK7) em biópsia de pacientes com AB e a relação espessura da camada média arterial/ diâmetro luminal (REMD) em ramos da artéria hepática de pacientes com AB e de pacientes com CI. Nós encontramos que a positividade do VEGF A foi maior em pacientes com AB por ocasião da Portoenterostomia (p=0, 006) que nos outros grupos, enquanto que nos explantes, a positividade de VEGF A foi maior no parênquima (P<0.001). A positividade do VEGFR2 em ducto biliares e hepatócitos foi menor em pacientes com AB que nos casos de CI (P=0.023 e P=0.011, respectivamente). Maior positividade de CK7 ocorreu em pacientes com artérias e estruturas biliares positivas para VEGF A (P<0.001 e P=0.040, respectivamente). Nos pacientes com AB por ocasião da Portoenterostomia a positividade do VEGF A em estruturas biliares, artérias e hepatócitos correlacionou-se com PCK7 (P=0.031, P=0.031 e P=0.032, respectivamente). O VEGF A foi expresso no *porta hepatitis* de pacientes com AB em artérias e em ductos biliares, principalmente nos pacientes sem malformações extra-hepáticas (P=0.013). A positividade do VEGF A associou-se com a maior REMD (P=0.016 e P=0.044, respectivamente). Nossos achados sugerem que a colangiopatia isquêmica, agravada pela proliferação biliar, ocorre na AB por ocasião da Portoenterostomia, começando no *porta hepatitis*. O espessamento da camada média arterial está associada à expressão do VEGF A.

PALAVRAS CHAVES: Atresia biliar; *porta hepatitis*; imunoistoquímica; VEGF A; VEGFR-2; hipóxia; camada media arterial; proliferação biliar; colangiopatia isquêmica

ABSTRACT

In Biliary atresia (BA) a cholangiopathy of elusive etiology leads to the need of liver transplantation regardless of timely performance of Portoenterostomy; hepatic arterial medial thickening suggests involvement of a disturbed angiogenesis. This study aimed to evaluate the immunohistochemical expression of VEGF A and its receptors in hepatobiliary structures in BA. We semiquantitatively analyzed the positivity rate of VEGF A, VEGF-R1 and -R2 in liver biopsies obtained at Portoenterostomy from infants with BA (n=52), with (n=14) and without (n=38) extrahepatic malformations. Controls were infants with intrahepatic cholestasis (IC, n=7). VEGF A positivity was also evaluated in explants (n=33) and at *porta hepatis* (n=16) from patients with BA. We morphometrically assessed the variables percentage of CK-7 positivity (PCK7) in biopsies from patients with BA, and the ratio medial layer thickness/luminal diameter (RMED) in hepatic arterial branches from infants with BA and IC. We found that arterial VEGF A positivity was higher in patients with BA at the time of Portoenterostomy (P=0.006) than in other groups, while explants' parenchyma presented the highest VEGF A positivity (P<0.001). Biliary and hepatocytic VEGFR2 positivity was lower in BA than IC (P=0.023 and P=0.011, respectively). Higher PCK7 occurred in arterial and biliary VEGF A-positive patients (P<0.001 and P=0.040, respectively). Biliary, arterial and hepatocytic VEGF A positivity in BA at Portoenterostomy was correlated with PCK7 (P=0.031, P=0.031 and P=0.032, respectively). VEGF A was expressed at *porta hepatis* from BA patients in arteries, and, in bile ducts mainly in patients without extrahepatic malformations (P=0.013). Biliary and arterial VEGF A positivity was associated with higher RMED (P=0.016 and P=0.044, respectively). Our findings suggest that an ischemic cholangiopathy, aggravated by biliary proliferation, exists in BA at the time of Portoenterostomy, beginning at *porta hepatis*. Medial layer thickening is associated with VEGF A expression.

KEY WORDS: Biliary atresia; liver; *porta hepatis*; immunohistochemistry; VEGF A; VEGFR-2; hypoxia; medial layer thickening; biliary proliferation; ischemic cholangiopathy.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Microanatomia hepática

A compreensão dos processos patológicos hepáticos exige conhecimentos sobre os aspectos histológicos e funcionais do fígado. A análise histológica hepática, ao utilizar microscopia ótica, possibilita uma avaliação bidimensional da microestrutura deste órgão. O “lóbulo hepático”, durante muito tempo considerado como unidade estrutural básica, foi primeiramente descrito J. J. Wepfer em porcos no ano de 1664. O “lóbulo hepático” pode ser classificado em: 1) “lóbulo da veia central”, de forma hexagonal e com tratos portais em seus ângulos, ou 2) “lóbulo da veia porta”, hexágono no qual a área periportal constitui o centro axial do lóbulo, enquanto as veias centrolobulares circundantes constituem os pontos limitantes (Kuntz E, Kuntz H, 2006). Em 1954, Rappaport desenvolveu uma abordagem tridimensional da microanatomia hepática, propondo o conceito de “ácino hepático”, o qual consiste em uma massa parenquimatosa, irregular em forma e tamanho, arranjada em torno de um eixo formado por ramos de arteríola hepática terminal, vênula porta, ducto biliar, vasos linfáticos e nervos que se ramificam juntos a partir de espaço-porta. Atualmente, porém, o conceito acinar de Rappaport tem sido posto em discussão, propondo-se ser mais adequada a divisão do tecido hepático em termos de subunidades microvasculares hepáticas (McCUSKEY, 1994), definindo-se a importância da vasculatura na fisiologia e na fisiopatologia hepática que será ressaltada adiante.

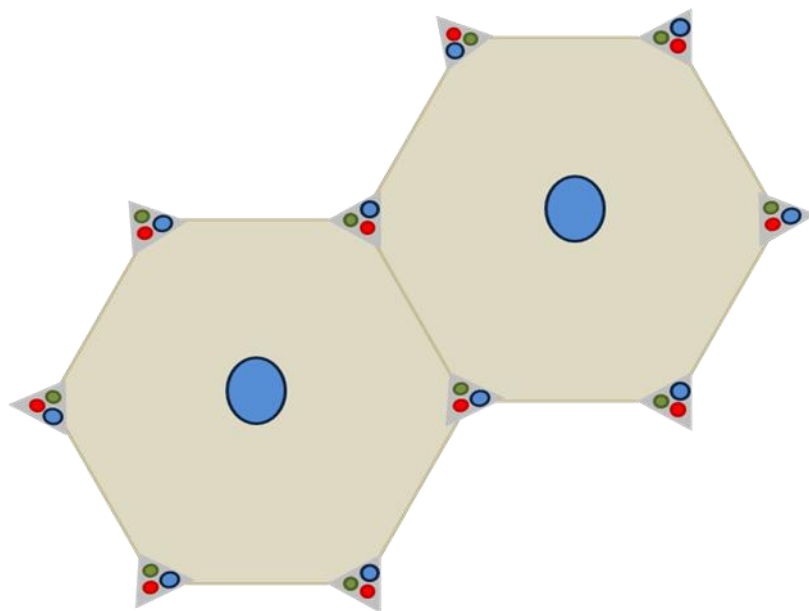


Figura-1 - Representação esquemática do lóbulo hepático

1.1.1. Anatomia vascular hepática

Os fatores reguladores do fluxo sanguíneo através das subunidades microvasculares hepáticas e sua relação com a estrutura e a função do fígado ainda não estão totalmente esclarecidos. A distribuição hepática das terminações arteriais tem sido lentamente desvendada, demonstrando a complexidade da microvasculatura hepática, cujo desarranjo deve integrar a fisiopatologia de diversas hepatopatias. TAKASAKI e HANO (2001) observaram que a artéria hepática se divide em dois ramos: o ramo axial e, derivado dele, o peribiliar. Esses dois sistemas interconectam-se por raras anastomoses. Segundo os autores, o primeiro ramo contribui com sangue arterial para a nutrição do parênquima hepático, e o segundo forma as camadas do plexo vascular peribiliar (PVP) em torno dos ductos biliares. São os ramos arteriais axiais que acompanham os ramos da veia porta e os ductos biliares intra-hepáticos, estruturando o ácino. Grupos de hepatócitos reúnem-se em torno da tríade porta. A entrada do fluxo

sanguíneo ocorre invariavelmente na região periportal e a saída, na periferia acinar, produzindo gradientes de oxigênio e de substâncias absorvidas ou excretadas em diferentes regiões do ácino.

Cerca de 20% a 33% do fluxo sanguíneo que aporta ao fígado provém da artéria hepática. Ela costuma surgir do segundo ramo da artéria celíaca ou brotar como dois ou três ramos das artérias mesentérica superior, gastroduodenal, gástrica, ou mesmo da aorta. Ramos da artéria gastroduodenal irrigam os ductos biliares extra-hepáticos e anastomosam-se com a artéria hepática no *porta hepatis* (CHO e LUNDERQUIST, 1983). A artéria hepática cruza anteriormente à veia porta em 91% dos indivíduos e localiza-se à esquerda e posteriormente ao ducto biliar em 64% dos casos. Divide-se em artérias hepáticas direita e esquerda para suprir os lobos hepáticos correspondentes. Junto à veia porta, penetra no fígado na região do *porta hepatis* e, incluída pela bainha de Glisson, forma no parênquima uma extensa arborização de vasos com calibre progressivamente decrescente e termina na margem dos lóbulos hepáticos.

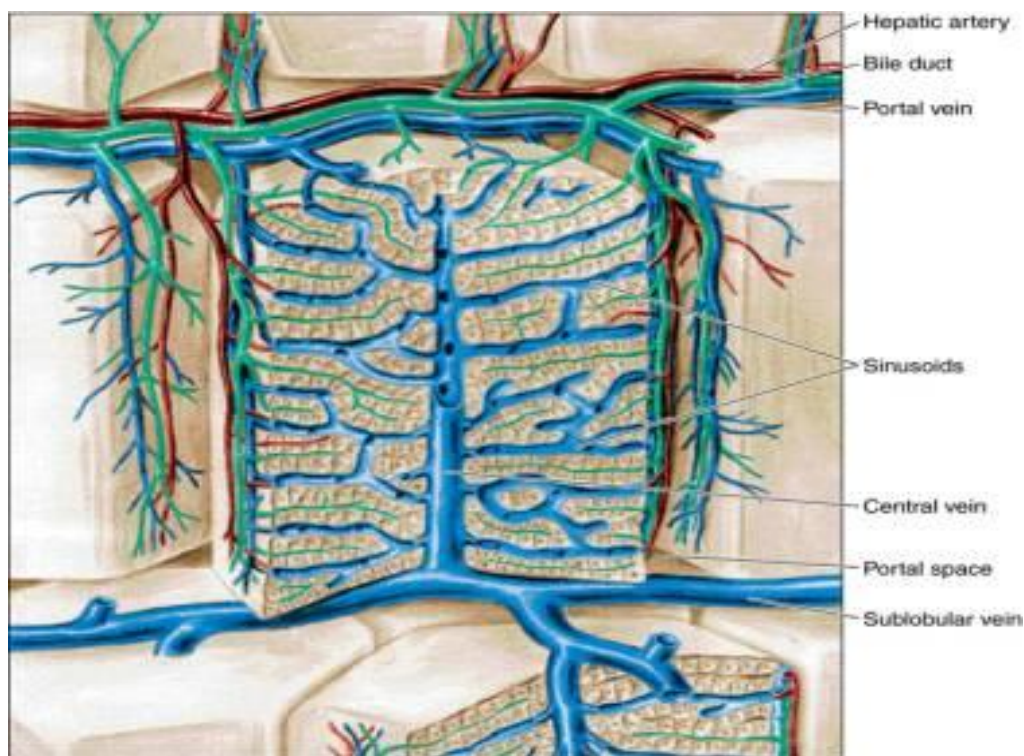


Figura- 2 - Representação da microcirculação hepática
(Fonte: www.mc.vanderbilt.edu/histology/labmanual2002)

1.1.2 Subunidades microvasculares hepáticas

As considerações formuladas nesta seção basearam-se, fundamentalmente, nos textos de revisão de LAUTT e GREENWAY, 1987; McCUSKEY, 1994; WANLESS, 1998; EKATAKSIN e KANEDA, 1999; EKATAKSIN, 2000; TAKASAKI e HANO, 2001, não se deixando, porém, de recorrer a outros autores.

De acordo com McCUSKEY (1994), as subunidades microvasculares hepáticas consistem em todos os vasos intra-hepáticos com diâmetro interno inferior a 300 μm , incluindo vênulas porta, arteríolas hepáticas, sinusóides, vênulas centrais e linfáticos. A figura 1 apresenta esquematicamente as subunidades microvasculares hepáticas.

denominadas esfínteres aferentes. O sangue arterial penetra nos sinusoides através de ramos das arteríolas hepáticas chamados de brotos dos seios arteriais (*arteriosinus twigs*), os quais desembocam próximo às entradas das vênulas porta. Conexões diretas entre vênulas e arteríolas (anastomoses arterioportais) ocorrem ocasionalmente. Todas essas estruturas apresentam contrações independentes e os sinusoides recebem uma mistura variável de sangue portal e arterial. Há evidências de que a fração de sangue distribuída aos sinusoides pela artéria hepática difere entre o hilo e a periferia dos lobos hepáticos. O sangue deixa os sinusoides após passar pelos esfínteres eferentes compostos de células pavimentosas sinusoidais, penetrando nas vênulas centrais terminais hepáticas. As células pavimentosas sinusoidais também servem como esfínteres na rede sinusoidal, regulando a distribuição do fluxo sanguíneo em pequenos segmentos de sinusoides. De acordo com o conceito de subunidades microvasculares hepáticas, cada lóbulo clássico consiste de vários lóbulos primários de forma cônica, tendo sua superfície convexa na periferia deste lóbulo, sendo esta suprida por ramos terminais das vênulas e arteríolas portais, e seu ápice localizado no centro do lóbulo clássico, onde se encontra a veia centrolobular. Os lóbulos primários das subunidades microvasculares hepáticas consistem de um grupo de sinusoides supridos por um único ramo da vênula porta e outro da arteríola hepática, oriundos do espaço-porta adjacente. A microcirculação hepática organiza-se em unidades nas quais a pressão e o fluxo estão primariamente sob controle arteriolar. Os sinusoides contribuem para a regulação da microcirculação pela contração das células de Kuppfer e das suas células endoteliais.

O plexo vascular peribiliar (PVP) é uma rede vascular densa, incluída nas subunidades microvasculares hepáticas, derivada dos ramos arteriais peribiliares, composto por artérias acompanhantes que cursam paralelamente aos ductos, das quais se ramificam as artérias comunicantes, vasos que se comunicam intimamente com os

ductos (YAMAMOTO *et al.*, 1985; TAKEMURA *et al.*, 1991). O PVP drena, pela “rota venular”, em sub-ramos das vênulas porta circunjacentes ao ducto biliar. Pelo menos dois padrões de alterações do PVP ocorrem em hepatopatias: o proliferativo e o vaso-pênico. A proliferação do PVP se verifica na hipertensão porta (HP) (TERADA *et al.*, 1989; RONCALLI *et al.*, 1999). Nessa situação parece ocorrer regurgitação de sangue portal para o PVP, pelas raízes internas, levando à proliferação do plexo e à dilatação dos vasos, e aumento da frequência de anastomoses entre PVP e ramos das vênulas porta, ou sinusoides, as quais servem como rotas colaterais para o fluxo sanguíneo (HARATAKE *et al.*, 1991 I). Na cirrose biliar primária, por outro lado, observa-se diminuição do número de vasos da PVP com o avanço da doença, assim como nos casos de colangite esclerosante em qualquer estágio de evolução (WASHINGTON *et al.*, 1997) e nas situações de rejeição ao enxerto hepático (TAKEMURA *et al.*, 1991).

A ligadura da artéria hepática em indivíduo sem hepatopatia não é fatal, especialmente quando ocorre por oclusão gradual. O fígado passa a desenvolver suprimento arterial colateral (CHO e LUNDERQUIST, 1983; EKATAKSIN, 2000) com sangue oriundo das artérias adjacentes ao tronco celíaco e à artéria mesentérica superior e, dessa forma, sobrevive. O controle de fluxo sanguíneo hepático ocorre pela ação da artéria hepática já que o fígado não é capaz de controlar diretamente o fluxo venoso portal (LAUTT e GREENWAY, 1987).

1.1.3 Ductos biliares e vascularização

Em contraste com os hepatócitos, o epitélio biliar é nutrido especificamente pela rede de arteríolas e capilares do PVP, o qual é fundamental para manter a integridade e função do epitélio biliar (KONO & NAKANUMA, 1992). Esse suprimento vascular é

responsável pelo envolvimento dos ductos biliares interlobulares em casos de lesão isquêmica por obstrução dos ramos da artéria hepática com menos de 200 mm de diâmetro, caracterizando a “colangiopatia isquêmica” (BATTIS, 1998). Devido ao fato dos colangiócitos possuírem receptores para diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, o PVP possibilita extensa comunicação dos colangiócitos com as células hepáticas. Várias substâncias reabsorvidas pelo epitélio biliar podem ser encaminhadas da bile aos hepatócitos pelo PVP, havendo comunicação direta entre hepatócitos e colangiócitos. O PVP tem ainda relação anatômica com outras estruturas vasculares, especialmente com ramos vasculares arteriais hepáticos (STRAZZABOSCO & FABRIS, 2008). Os ductos biliares intra-hepáticos e os ramos arteriais têm uma relação estreita e preferencial, que não ocorre em relação aos ramos venosos. Há, inclusive, paralelismo numérico entre ramos arteriais e ductos biliares interlobulares nos espaços-porta (CRAWFORD *et al.*, 1998). Essa associação já está presente no desenvolvimento embrionário, quando os ramos arteriais hepáticos formam-se na vizinhança da placa ductal, estrutura biliar primitiva (LIBBRECHT *et al.*, 2002). O padrão de ramificação de ambas as estruturas é coordenado e, em modelo animal de proliferação biliar, a neovascularização arterial segue a expansão da árvore biliar (MASYUK *et al.*, 2003). Em algumas hepatopatias, dúctulos e PVP proliferam concomitantemente (DESMET *et al.*, 1995). Em modelos animais, a inativação dos fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento do epitélio dos ductos intra-hepáticos, como HNF6 e HNF1b (CLOTMAN *et al.*, 2002), desencadeiam anomalias dos ramos da artéria hepática que acompanham os ductos (CLOTMAN *et al.*, 2003). Uma associação estreita de estruturas biliares e arteriais anômalas foi descrita em colangiopatias relacionadas à malformação da placa ductal, resultando num padrão artério-biliar dismórfico, em “ramos de salgueiro” (DESMET, 1992). Sinais originados em ductos biliares parecem dirigir a

vasculogênese arterial durante o desenvolvimento e nas colangiopatias. Observou-se que nas colangiopatias císticas relacionadas à malformação de placa ductal, como doença renal policística dominante autossômica e doença de Caroli, o epitélio cístico biliar retém um fenótipo imaturo caracterizado por sobreexpressão de fatores angiogênicos, incluindo o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), levando à vascularização aberrante pericística para induzir suprimento vascular dos cistos (FABRIS *et al.*, 2006a). No embrião, a secreção do VEGF pelos ductos biliares em desenvolvimento, atuando por via parácrina sobre células endoteliais e seus precursores, promove a vasculogênese arterial e do PVP (FABRIS *et al.*, 2006b).

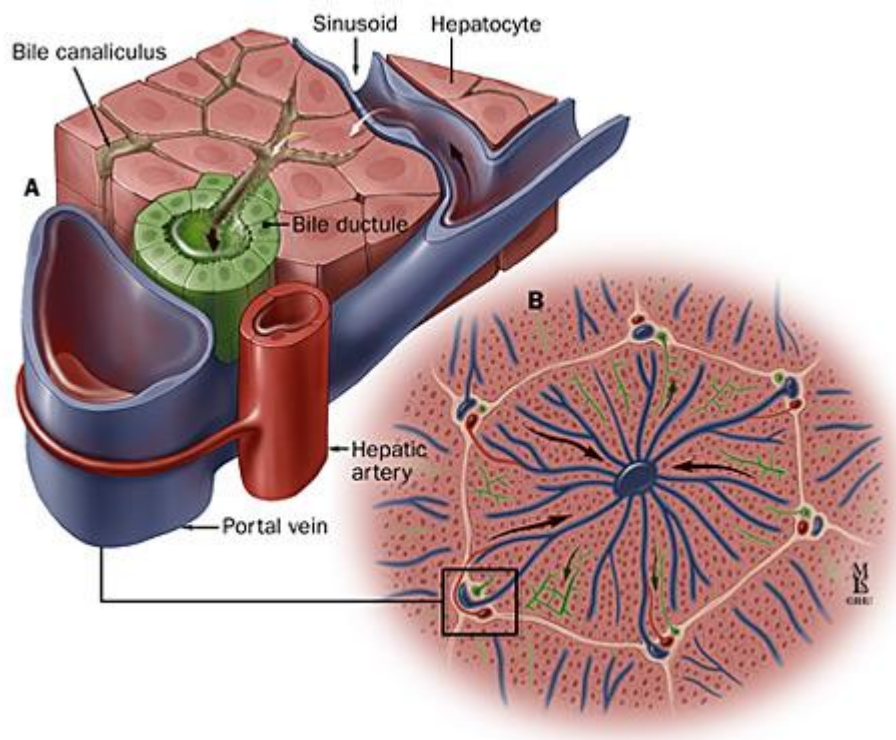


Figura 4 - Representação esquemática da tríade porta

(Fonte: www.hopkins-gi.org)

1.2 Fibrogênese

A produção de matriz extracelular no fígado fibrótico relaciona-se a células de tipo miofibroblástico que, num “modelo clássico”, têm sido identificadas como as células estreladas ativadas, residentes no parênquima, especificamente sob o endotélio sinusoidal (FRIEDMAN, 2000). A lesão crônica por álcool, por exemplo, caracteriza-se inicialmente por processo inflamatório e fibrogênico pericentral, progredindo posteriormente para uma cirrose panlobular. Na atresia biliar (AB) há um processo de colangite crônica, envolvendo inicialmente os espaços-porta, mas com evolução gradativa, comprometendo também o parênquima hepático. Ao mesmo tempo em que se observam achados típicos de uma obstrução mecânica biliar, tais como proliferação ductal e ductular, e presença de tampões biliares em ductos neoformados, outros como proliferação gigantocelular são comuns (SANTOS *et al.*, 1998). O processo lesional progressivo no espaço porta envolve de forma crescente os eixos dos ácinos de Rappaport, onde a proliferação biliar se desenvolve e a fibrose se deposita sob a forma de pontes porta-porta. A lesão parenquimatosa relacionada ao processo colestático contribui com a formação de pontes porta-centro. O “modelo clássico”, prevendo a necessidade de migração das células estreladas desde o espaço de Disse para o espaço-porta na vigência de colangiopatia, tem sido discutido. Friedman, criador do “modelo clássico” de fibrogênese, reconhece como possível o envolvimento de outros grupos celulares distintos das células estreladas nesse processo, tais como fibroblastos portais, células derivadas da medula óssea e fibroblastos derivados de epitélio por meio de transição epitélio-mesenquimatosa (FRIEDMAN *et al.*, 2007). CASSIMAN *et al.*, em 2003, descreveu a aceitação da hipótese de que na fibrogênese do tipo biliar, células peribiliares distintas das células estreladas é que sofrem conversão em miofibroblastos e

contribuem para a formação inicial deste tipo de fibrose. Recentemente, a transição epitélio-mesenquimatosa (TEM) tem sido implicada como mecanismo chave na patogênese da fibrose hepática. Dados histológicos revelam que a TEM ocorre em fígados fibróticos humanos, particularmente em doenças associadas com elevada proliferação ductular, como a atresia biliar e a cirrose biliar primária (GLASER *et al.*, 2009). Os colangiócitos parecem responder à lesão biliar com TEM, levando à produção de matriz extracelular (MEC). Eles, quando estimulados, produzem a integrina específica dos epitélios ductais ($\alpha\beta6$), a qual induz fibrogênese, por ativação do TGF β , independentemente de um processo inflamatório. Esse tipo de processo fibrogênico é distinto da fibrogênese centrolobular induzida por CCl₄, na qual esta integrina não se altera. A terapêutica de processo fibrogênico biliar seria, portanto, distinto daquela de um processo de fibrogênese centrolobular (WANG *et al.*, 2007).

1.3 Atresia biliar

A atresia biliar (AB) é uma doença exclusiva da infância e consiste na obliteração completa de parte ou da totalidade das vias biliares extra-hepáticas e engloba a maioria dos casos de colestase neonatal (CN) (BALISTRERI, 1996). Ela se caracteriza por uma colangiopatia dos ductos biliares intra-hepáticos com destruição progressiva dessas estruturas, desenvolvendo-se, com o tempo, um padrão de “rarefação dos ductos biliares intra-hepáticos” (HUSSEIN *et al.*, 2005) e cirrose. O diagnóstico da AB é embasado em manifestações clínicas características e exames complementares. Após o nascimento, a tríade clínica que caracteriza a AB constitui-se de 1) icterícia, às custas de hiperbilirrubinemia conjugada, que se prolonga além da segunda semana de vida; 2) acolia/ colúria; e 3) hepatomegalia. Os sinais tardios incluem esplenomegalia, que

sugere hipertensão porta, ascite e hemorragias, evoluindo para cirrose e morte quando não tratada. Utilizam-se, para o diagnóstico, exames de imagem, como a ultrassonografia, a cintilografia e a colangiografia transoperatória e biópsia (CHARDOT, 2006), a qual permite a realização de Portoenterostomia caso não se evidencie fluxo nas vias biliares. Durante o procedimento cirúrgico uma biópsia em cunha também é realizada. Os achados histológicos que sugerem AB são os tampões biliares, a proliferação ductular e fibrose acompanhada ou não de edema portal.

Do ponto de vista clínico, ocorrem duas formas de AB: a congênita e a adquirida. A primeira caracteriza-se pela presença concomitante de anomalias congênitas extra-hepáticas e início precoce da icterícia; na segunda não há associação com anomalias extra-hepáticas e o início da icterícia é mais tardio (BALISTRERI *et al.*, 1996). Por outro lado, do ponto de vista histopatológico, segundo Desmet, *et al.*, (1999) há duas formas de AB: a “clássica” e a “precoce grave”. O primeiro grupo apresenta histopatologia compatível com colestase de causa obstrutiva mecânica (SANTOS *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2004). No segundo, a “precoce grave”, ocorre “malformação de placa ductal” (MPD), provavelmente relacionada a um bloqueio no desenvolvimento embriológico das estruturas biliares, de modo similar ao que ocorre nas doenças policísticas hepáticas (DESMET *et al.* 1998).

Em relação à associação com malformações extra-hepáticas (MEH), a AB classifica-se em AB síndrômica, que corresponde a 10% dos casos de AB e associam-se várias anomalias congênitas como polisplenia, asplenia, defeitos cardíacos ou intra-abdominais; e AB não síndrômica, que corresponde a 80% dos casos e na qual não existe associação com MEH (CHARDOT , 2006).

A frequência da AB varia de 1:8000 a 1:15000 nascidos vivos, havendo pequena predominância no sexo feminino (1,4:1) (CAUDURO, 2003). Sua incidência

varia de acordo com as regiões geográficas, desde 5:100000 na Holanda (CHARDOT; 2001) a 32:100000 na Polinésia Francesa, e 23 a 35:100000, em Taiwan (KOBAYASHI H, STRINGERB M. 2003; CHARDOT *et al.*, 2001; HUNG *et al.*, 2006).

Em 1890, Thonson reuniu uma série de cinquenta casos de AB e descreveu, cuidadosamente, por tabelas e diagramas, as características dessa doença que se manifestava nas primeiras semanas de vida com obstrução do fluxo biliar e era fatal. Já em 1916, Holmes afirmou que a AB não era uma doença rara da infância e que merecia maior atenção, propondo um tratamento cirúrgico para alguns casos de AB (HOLMES, 1916). Em 1959, o professor Morio Kasai, desenvolveu a Portoenterostomia (PE), técnica cirúrgica usada até hoje, que permite o reestabelecimento do fluxo biliar nos casos de AB classificados até então como “não corrigíveis” e, deste modo, a permanência do paciente com seu fígado nativo. Porém, apesar da desobstrução eficaz das vias biliares extra-hepáticas por meio da PE, a destruição progressiva das vias biliares intra-hepáticas se mantém, fazendo da AB a principal causa de transplante hepático em crianças. Portanto, apesar dos aprimoramentos técnicos na realização da PE, o conhecimento da etiopatogenia da AB torna-se indispensável, visando o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para essa desordem, com conseqüente melhoria do prognóstico.

1.3.1 Fatores etiológicos

A patogenia da AB permanece obscura, mas ela parece representar uma resposta estereotipada dos tecidos hepatobiliares a distintos processos mórbidos (PERLMUTTER *et al.*, 2002). Em 1916, HOLMES já propunha que a AB poderia se dever-se a múltiplos fatores, agravando-se no período pós-natal por mecanismo

desconhecido. Mantém-se ainda hoje a idéia de que AB decorre de múltiplos fatores, propondo-se que a constituição imunogenética do hospedeiro atua como moduladora do dano hepatobiliar a fatores exógenos de etiologia a ser determinada (SILVEIRA *et al.*, 1991.; SILVEIRA *et al.*, 1993 IRIE *et al.*, 2009). O distúrbio causal poderia ocorrer no período embrionário, a partir de alterações genéticas ou cromossômicas, ou poderia tratar-se de um processo disruptivo, no qual o insulto atuaria sobre as estruturas hepatobiliares após a organogênese estar completa (SILVEIRA, 1988). O processo, desse modo, poderia incidir em diferentes momentos do desenvolvimento. Lee *et al.* (2009) desceveram associação do polimorfismo VEGF +936 C/T e, em particular, o alelo C com AB, possivelmente conferindo suscetibilidade com a doença .

O quadro 1 descreve fatores que têm sido propostos para a etiologia da AB.

| Quadro 1 - Fatores etiológicos propostos para atresia biliar |
|---|
| A - Fatores genéticos |
| <ul style="list-style-type: none">• Alterações gênicas<ul style="list-style-type: none">○ Mutação CFC1 (heterozigoto associado com BASM) (Davitt-Spraul <i>et al.</i>, 2008)○ Polimorfismo do ICAM G241R (Arikan <i>et al.</i>, 2008)○ Mutação NFkappaB/c (Gyorffy <i>et al.</i>, 2008)○ Mutação <i>missense</i> do JAG1 (associação com AB de pior prognóstico)<ul style="list-style-type: none">▪ Persistência anormal da expressão da proteína HES1 em estruturas biliares da via de sinalização Notch (Rakheja <i>et al.</i>, 2006)• Anormalidades cromossômicas numéricas<ul style="list-style-type: none">○ Trissomia do 17-18 (Alpert <i>et al.</i>, 1969)○ Trissomia do 18 (Buffa <i>et al.</i>, 1972; Ikeda <i>et al.</i>, 1999)○ Trissomia do 21 (Pameijer <i>et al.</i>, 2000)○ Cromossoma 10q: trissomia proximal (Lam <i>et al.</i>, 2000), trissomia parcial proximal (Lysy <i>et al.</i>, 2007), monossomia (Tsukuda <i>et al.</i> 1996; Maruyama <i>et al.</i>, 2001), Síndrome de Turner |
| B - Fatores ambientais |
| <ul style="list-style-type: none">• Drogas usadas durante a gravidez<ul style="list-style-type: none">○ Anfetamina (Levin <i>et al.</i>, 1971)○ Álcool (Newman <i>et al.</i>, 1979; Dunigan & Werlin, 1981) |

- **Infecções maternas**
 - listeriose (Becroft, 1972),
 - citomegalovirose (Fischler *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2002)

- **Infecções neonatais**
 - reovírus tipo 3 (Steele *et al.*, 1995; Tyler *et al.*, 1998)
 - adenovírus
 - rubéola (Aguirre *et al.*, 1989)
 - citomegalovírus (Oliveira *et al.*, 2002)
 - vírus não A e não B da hepatite,
 - papilomavírus (Drut *et al.*, 1998)
 - rotavírus (Riepenhoff-Talty *et al.*, 1996)
 - Erytrovírus (parvovírus) B19 (Abe *et al.*, 2007)
 - EBV (Fjaer *et al.*, 2005; Mahjoub *et al.*, 2008)

- **Tóxicos na agricultura**

- **Fitotoxinas, micotoxinas** (Harper *et al.*, 1990)

- **Toxina industrial**
 - 4,4' metileno-dianilina (Bourdelat *et al.*, 1983)

C - Causas primárias não bem determinadas

- **Anomalias estruturais**
 - BASM (Maksem, 1980)
 - Anormalidades da junção coledocopancreática (Misra & Dwivedi, 1990)
 - Malformação da placa ductal (Desmet, 1992)

- **Anormalidades metabólicas**
 - Ácidos biliares (Jenner & Howard, 1975; Siviero *et al.*, 2008), L-prolina (Vacanti & Folkman, 1979)

- **Anormalidades imunológicas**
 - Autoimunidade sorológica materna (Burch *et al.*, 2003)

- **Alterações imunogenéticas**
 - Presença de HLA-B12 e de certos haplótipos (Silveira *et al.*, 1992; Donaldson *et al.*, 2002)
 - Microquimerismo (Hayashida *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2007; Muraji *et al.*, 2008).

- **Diabete materno** (associação com BASM: Davenport *et al.*, 2006)
 - Diabete gestacional (Fischler *et al.*, 2001)

- **Idade materna** (Fischler *et al.*, 2001)

BASM- biliary atresia splenic malformation
(Fonte: modificado de Silveira *et al.*, 1988, 1992)

1.3.2 Anomalias Congênitas Extra-Hepáticas Associadas

Uma investigação mais detalhada dos casos com anomalias congênitas extra-hepática associadas à AB (AEH) aponta para a existência de diferentes grupos, um deles associado à anomalia da seqüência de lateralidade, que inclui a síndrome malformativa esplênica da AB, anteriormente restrita à síndrome polisplênica. Outro grupo, mais numeroso, inclui pacientes com anomalias não relacionada à síndrome malformativa esplênica da AB, ao qual CARMÍ *et al.*, (1993) denominaram grupo não-sindrômico. A síndrome polisplênica compõe-se, além de polisplenia, de anomalias posicionais e cardiovasculares (RODIN *et al.*, 1972; ABRAMSON *et al.*, 1987; ICARDO e SANCHEZ DE VEJA, 1991). CHANDRA, em 1974, descrevendo os achados de autópsia em dez crianças com polisplenia, cinco das quais tinham AB e anomalias congênitas extra-hepáticas associadas, incluiu a AB na síndrome polisplênica. DIMMICK (1975) observou síndrome polisplênica em 17% de uma amostra de AB. Desde então, diversos estudos têm reforçado essa associação (NAKADA *et al.*, 1997; TANANO *et al.*, 1999; OHI, 2000). Na Espanha, VAZQUEZ *et al.*, em 1995, encontraram AEH em cerca 13% de seus casos. Em 2006, DAVENPORT *et al.* observaram síndrome malformativa esplênica em 56 de 548 (10,2%) crianças com AB. CHANDRA (1974) postulou que a associação entre AB e síndrome polisplênica não seria casual devido à frequente coincidência dessas duas raras desordens e pelo fato de a formação do primórdio esplênico e dos ductos biliares extra-hepáticos coincidir, no desenvolvimento embriônico, com a septação do tronco arterioso e com o desenvolvimento dos coxins endocárdicos, da árvore pulmonar, do septo cardíaco e da árvore brônquica. Ele sugeriu a existência de uma causa comum, por exemplo, um insulto ambiental, que atuaria em torno da quinta

semana gestacional. Posteriormente, a asplenia foi encontrada em casos de AB (MAKSEM, 1980; SILVEIRA *et al.*, 1991; DAVENPORT *et al.*, 1993), passando-se a denominar a associação de AB com anomalias esplênicas com a expressão síndrome malformativa esplênica da AB, mais ampla. Polisplenia e asplenia, quando associadas à AB, são manifestações de um defeito morfogenético primário de determinação de simetria ou lateralização. Contudo, nem sempre anomalia esplênica é identificada na “síndrome malformativa esplênica da AB”, e o termo mais abrangente para a descrição dessa associação talvez seja “anomalia da seqüência de lateralidade associada à AB” (SANTOS, 2002) Finalmente, CARMI *et al.* (1993) relacionam um terceiro grupo de anomalias congênitas extra-hepáticas associadas à AB: casos que apresentam má rotação intestinal isolada, acompanhada ou não de veia porta pré-duodenal.

1.3.3 Alterações vasculares na AB

Em 1963, Stowens descreveu hiperplasia e hipertrofia em ramos da artéria hepática em áreas portais de pacientes com AB. A hipertrofia dos ramos da artéria hepática também foi descrita por Brough & Bernstein em 1969. HO *et al.* (1992) observaram hipertrofia da parede das pequenas artérias e arteríolas em pacientes com AB, considerando essa alteração com evento primário na patogênese da doença. SANTOS *et al.* (2005) detectaram, por método morfométrico, a existência de espessamento da túnica média dos ramos arteriais hepáticos nos pacientes com AB por ocasião da Portoenterostomia, aparentemente relacionada com o desenvolvimento da rarefação dos ductos biliares interlobulares. Os autores buscaram também identificar a progressão dessas alterações em vasos arteriais desde a Portoenterostomia até o transplante hepático (TxH), observando nos explantes dos pacientes com AB a presença

de arteríolas com túnica média extremamente espessada, algumas com oclusão luminal, sugerindo espessamento progressivo. Uflacker e Pariente (2004) utilizaram angiografia em artéria hepática de 46 pacientes com AB por ocasião da Portoenterostomia e observaram em 40 deles alterações morfológicas, com as artérias apresentando contorno irregular, com oclusão periférica cercadas por tufo de minúsculos ramos arteriais, achados superponíveis aos de Santos *et al.* (2005). HUMPHREY *et al.* e KIM *et al.*, ambos em 2007, documentaram aumento significativo do diâmetro da artéria hepática comum em pacientes com AB, quando comparados aos controles em estudos ultrassonográficos, sugerindo que os vasos arteriais intra-hepáticos estejam comprometidos pelo espessamento de túnica média. Uma arteriopatia desse tipo poderia desorganizar a totalidade do sistema hepatobiliar, pois veias, ductos e nervos são nutridos pelos ramos da artéria hepática. Poderia, portanto, constituir elemento-chave, ainda não considerado, na patogênese da colangiopatia progressiva da AB. Esse espessamento progressivo da túnica média arterial poderia ser explicado pelo modelo de remodelagem vascular, o qual tem sido estudado em relação à hipertensão pulmonar. A remodelagem vascular pode ser causada, entre outros fatores, por distúrbios hemodinâmicos, mediadores inflamatórios (CARMELIET *et al.*, 2000), lesão endotelial direta (SMITH *et al.*, 1998), hipoxemia e vasoconstrição crônicas, além de desordens genéticas (CARMELIET *et al.*, 1999).

1.3.4 Fatores de crescimento angiogênicos na atresia biliar

A hipótese da presença de uma arteriopatía relacionada à atresia biliar estimulou o grupo do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG) do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) a avaliar o tecido hepático de pacientes com a doença quanto à expressão de genes relacionados à arteriopatía. Dessa forma, o grupo procurou identificar genes relacionados à angiogênese que pudessem ter sua expressão alterada, de modo específico, na AB. Foi identificada uma lista resumida de 38 moléculas envolvidas com o desenvolvimento vascular, incluindo os seguintes tópicos: 1) vasculogênese; 2) angiogênese, moléculas inibidoras e estimuladoras; 3) miogênese vascular e arteriogênese; 4) especificação artéria/veia; 5) estímulo da hipóxia à angiogênese; 6) moléculas envolvidas em brotamento vascular e na degradação da matriz extracelular; 7) integrinas e 8) quimiocinas envolvidas na angiogênese; relação da angiogênese com: 9) coagulação, 10) inflamação, 11) “*shear stress*” e 12) neurogênese. O grupo do LEHG com a colaboração de *Cincinnati Children’s Hospital Medical Center* (Ohio, Estados Unidos) analisou, empregando o método de *Microarray*, a expressão do transcriptoma dessa série de 38 fatores de crescimento e outras moléculas em pacientes com AB, incluindo as formas perinatal e embrionária, comparando-a com a de pacientes com colestase neonatal de causa intra-hepática, visando a identificar quais desses fatores poderiam relacionar-se às alterações arteriais nos casos de AB. Observou-se sobre-expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF A) e fator de crescimento de fibroblastos básico (FGFb) na AB em comparação com outras causas de colestase.

1.3.4.1 VEGF A

A sinalização pelo VEGF A representa a etapa condicionante da angiogênese fisiológica. O VEGF A promove o crescimento endotelial em artérias, em veias e em linfáticos e responsabiliza-se pela manutenção da sobrevivência dos endoteliócitos, prevenindo sua apoptose; aumenta a permeabilidade vascular, indispensável para a angiogênese; causa vasodilatação *in vitro* dependente de *NO* derivado do endotélio; estimula o recrutamento de células inflamatórias e a expressão de proteases implicadas na degradação da matriz extracelular durante a angiogênese (FERRARA *et al.*, 2003). 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 (GEIGER *et al.*, 2000; TAMMELA *et al.*, 2003; XIA *et al.*, 2003).

O VEGF A está também envolvido com vasculatura linfática, podendo desencadear sua hipertrofia ao estimular o recrutamento de células inflamatórias, secretoras fatores linfangiogênicos (FERRARA *et al.*, 2003). O VEGF A é o principal fator angiogênico induzido por hipóxia, sendo, nesse caso, o HIF-1 o mediador das respostas hipoxêmicas (TSUZUKI *et al.*, 2000). Além da hipóxia, hipoglicemia e acidose sobrerregulam a expressão do VEGF A. Por outro lado, IL-1 α e IL-6 induzem VEGF em alguns tecidos como fibroblastos sinoviais. Outros fatores que sobrerregulam a produção de VEGF A incluem EGF, TGF- α , TGF- β , keratinocyte growth factor, IGF e FGF (FERRARA, *et al.*, 2003).

A expressão do VEGF A e de seus receptores, em diversos órgãos, não se restringe ao endotélio vascular, sendo também observada em osteoblastos, miotubos de regeneração e células-fonte hematopoiéticas (GAUDIO *et al.*, 2006). O VEGF A

também age sobre as CML sendo induzido, nesta situação, por agonistas como a angiotensina II, trombina, PDGF, serotonina, e, com menor intensidade pelo FGFb (RICHARD *et al.*, 2000).

1.3.4.1.1 Expressão imunoistoquímica do VEGF nas estruturas hepáticas

Em fígados normais, a expressão imunoistoquímica do VEGF é observada difusamente no parênquima, especialmente nos hepatócitos centrolobulares. Os vasos arteriais não expressam VEGF A (FABRIS *et al.*, 2006; GAUDIO *et al.*, 2006). Depois da 25^a semana gestacional poucos hepatócitos apresentam expressão do VEGF A e, após o nascimento, ela se torna ausente (GOUYSSE *et al.*, 2002). O epitélio biliar prematuro sobre-expressa intensamente VEGF A e VEGFR2, por IHC. Nas doenças associadas à má formação de placa ductal, o epitélio biliar imaturo sobre-expressa intensamente VEGF A e VEGFR2, como também angiopoetina 1 (Ang1) e seus receptor Tie2. O VEGF A e Ang1 mostraram efeito proliferativo: 1) autócrino, sobre colangiócitos, e, 2) parácrino, sobre a vasculatura portal, assim promovendo o crescimento de estruturas císticas e seu suprimento vascular.

As hepatopatias crônicas se caracterizam pela presença de fibrose e de inflamação. Durante o processo fibrogênico, o excesso de MEC acumulado oferece resistência ao fluxo biliar e ao transporte de oxigênio, produzindo hipóxia tecidual. A estimulação dos fatores hipóxia/induzidos produz sobre-regulação dos fatores angiogênicos. As células estreladas ativadas, por sua vez, produzem VEGF (ANKOMA-SEY *et al.*, 2000). Mediadores pró-inflamatórios e outros estímulos não hipoxêmicos podem produzir uma resposta angiogênica por meio da indução do HIF-1 nas células musculares lisas e, conseqüentemente, da produção de VEGF A (RICHARD

et al., 2000). Além disso, os eicosanoides pró-inflamatórios podem também relacionar-se à angiogênese nas hepatopatias crônicas. Por outro lado, durante a inflamação, a permeabilidade vascular aumenta, e monócitos, macrófagos, plaquetas, mastócitos e outros leucócitos, todos capazes de produzir citocinas e fatores de crescimento angiogênicos, são recrutados pela atração das quimiocinas. Independentemente dos mecanismos estimuladores, a produção de VEGF A, assim como a da angiotensina II, é fator importante no desenvolvimento da fibrogênese (Yoshiji *et al.*, 2006).

Gaudio *et al.* (2006) identificaram que o VEGF A era sobre-expressado em ductos biliares ao realizar modelo animal de ligadura do ducto biliar. Rosmoduc *et al.* (1999), por meio desse modelo, detectaram neovascularização, aumento da imunorreatividade hepatocitária de VEGF A e da expressão de FGFb. Já Beaussier *et al.* (2005), em estudo de isquemia biliar em ratos, observaram, após dois dias de privação de sangue arterial completa, a presença de imunorreatividade do VEGF A nas células epiteliais biliares e arteríolas hepáticas. Os autores conseguiram relacionar a ocorrência de hipóxia com a produção de VEGF A pelos colangiócitos.

Através de modelo experimental de cirrose em ratos tratados com DEN, Corpechot *et al.* (2002) observaram aumento da expressão hepatocitária do VEGF A na presença de fibrose, com distribuição heterogênea. Também se observou que, na cirrose biliar primária, existe uma expressão intensa de VEGF A nas células endoteliais sinusoidais, particularmente na periferia dos espaços-porta afetados (MEDINA *et al.*, 2005).

No hepatocarcinoma, a expressão do VEGF A por IHC é intensa em hepatócitos tumorais, em células endoteliais e epiteliais biliares (MISE *et al.*, 1996), principalmente nas menos diferenciadas (UEMATSU *et al.*, 2005), e até células hepáticas não afetadas expressam mais intensamente VEGF que aquelas de pacientes sem hepatocarcinoma (El-ASSAL *et al.*, 1998).

Em casos de rejeição hepática crônica, observa-se expressão aumentada de VEGF A em ductos e dútulos biliares, ocorrendo um aumento do número de microvasos e dútulos, paralelo à expressão ductular do VEGF A (GOUW *et al.*, 2006).

1.3.4.2 Receptor 1 do VEGF (VEGFR1)

As considerações formuladas nesta seção basearam-se, fundamentalmente, no texto de Ferrara *et al.* (2004), não se deixando, porém, de recorrer a outros autores.

Há ainda debates a respeito das funções do VEGFR1, também denominado Flt-1, talvez devido ao fato de que suas atividades sejam diferentes, dependendo do estágio de desenvolvimento e tipo celular. Fabris *et al.* (2006) verificaram que as células das paredes vasculares eram negativas para VEGF, mas positivas para VEGFR-1. Além do VEGF A, o VEGFR-1 liga-se também ao VEGF B e ao Placental growth factor (PlGF). Há uma forma solúvel de VEGFR1 (sFlt-1) com atividade inibidora ao VEGF A. Park *et al.* (1994) propôs que o VEGFR1 não apresenta sinal mitogênico para o VEGF A, mas sim um sinal negativo indireto pelo qual, ao associar-se ao VEGF A, torna esse fator menos disponível para ligação ao VEGFR2. Além dessa ação indireta, o VEGFR1 inibe diretamente a proliferação endotelial induzida pela ligação do VEGF A com o VEGFR2, por bloqueio da via dependente de PI3-kinase (GILLE *et al.*, 2000; ZENG *et al.*, 2001). Porém, o VEGFR1 é capaz de induzir resposta mitogênica positiva: o PlGF regula uma interação inter- intramolecular entre os receptores do VEGF A, resultando em amplificação da resposta angiogênica do VEGFR2 a esse fator de crescimento (AUTIERO *et al.*, 2003). Por outro lado, o VEGFR1 é indispensável à ação quimiotática do VEGF A sobre monócitos (HIRATSUKA *et al.*, 1998; BARLEON *et al.*, 1996), o que é importante na atividade do VEGFR1 em situações de angiogênese

em certos tumores, na artrite reumatóide e na aterosclerose (SHIBUYA *et al.*, 2006). No fígado, a ativação do VEGFR-1 pelo VEGF A, em certas circunstâncias, resulta em liberação de HGF, IL-6 e outras moléculas hepatotróficas por células endoteliais sinusoidais (LE COUTER *et al.*, 2003). Além disso, agonistas do VEGFR1 apresentam efeito protetor sobre hepatócitos expostos ao CCl₄. Desse modo, a função primordial da sinalização pelo VEGFR1 no endotélio parece não ser a regulação da angiogênese, mas, sim a liberação de fatores necessários ao desenvolvimento e à sobrevivência de determinados tecidos, tais como o pâncreas e o fígado embrionários. Fabris *et al.* (2006a) observaram, nas doenças policísticas hepáticas, sobre-expressão do VEGFR1 no epitélio imaturo, além da sobre-expressão do VEGF A e do VEGFR2; em fígados fetais os colangiócitos expressaram forte imunorreatividade para VEGF A em diferentes estágios do desenvolvimento apesar de sua negatividade para vasos. Ao contrário, a expressão do VEGFR1 foi presente em colangiócitos e vasos, principalmente arteriais, diminuindo progressivamente a intensidade de sua expressão conforme evolução do processo de maturação dessas estruturas.

1.3.4.3 Receptor 2 do VEGF

A participação do VEGFR2 (KDR, humano; Flk-1 ratos) na angiogênese e na hematopoiese é demonstrada pela falência do desenvolvimento e da organização de vasos sanguíneos em ratos homozigotos para deleção do Flk-1, resultando em morte intra-útero precoce (SHALABY *et al.*, 1995). O VEGFR2 é considerado o principal mediador dos efeitos mitogênico, angiogênico, de aumento de permeabilidade e de proteção das células endoteliais contra apoptose produzidos pelo VEGF A. O VEGFR2 se expressa, portanto, em células endoteliais. O papel biológico do VEGFR2 em células não endoteliais não está bem esclarecido (MATSUMOTO e CLAEISSON-WELSH,

2001). Contudo, já foi demonstrado que a expressão do VEGFR2 no epitélio biliar associa-se à proliferação dos colangiócitos por estimulação do VEGF A, de modo semelhante à proliferação das células endoteliais, e o bloqueio de sua expressão leva à apoptose de colangiócitos, associando-se à rarefação biliar (GAUDIO, 2006b).

1.3.4.4 FGFb

O FGF2, ou FGF básico é parte da família dos FGFs, a qual participa da regulação do desenvolvimento embriônico dos vertebrados, desde etapas iniciais, como o crescimento do blastocisto e a indução do mesoderma primário. Mais tardiamente, os FGFs regulam a diferenciação e o desenvolvimento de vários tecidos e órgãos. Os FGFs têm ação crucial na reparação hepática.

O FGFb é mitogênico para o endotélio, sendo fator pró-angiogênico. É um potente indutor da proliferação e da migração das células musculares lisas da túnica média arterial, crítico para o “*upgrading*” de capilares, ou seja, a produção de arteríolas a partir de capilares. Enquanto o VEGF induz a proliferação de capilares, o FGFb induz o crescimento de arteríolas (LE NOBLE, *et al.*, 2005). O FGFb junto ao PDGF β participa da “arteriogênese adaptativa”, na qual, após oclusão de uma artéria supridora, as arteríolas colaterais crescem e tornam-se artérias. O FGFb e o PDGF β , secretados por endoteliócitos ativados, são responsáveis pela estimulação da musculatura da túnica média e do crescimento arterial (CONWAY *et al.*, 2001).

O FGFb RNAm é sobre-expressado em função de aumentos do *shear stress* (MALEK *et al.*, 1993), o qual afeta a remodelagem vascular e o desenvolvimento de circulação colateral tanto em situação fisiológica como em condições mórbidas. Durante o desenvolvimento embrionário, a cobertura dos vasos por células musculares lisas

relaciona-se à geração de pressão capilar adequada proximal à aorta (CARMELIET, 2000; CONWAY *et al.*, 2001). O *shear stress* é a força propulsora da arteriogênese, e o desenvolvimento das estruturas tubulares vasculares é otimizado em relação à quantidade de fluxo a ser transportado (LE NOBLE *et al.*, 2005). É importante observar que o *shear stress* modula a expressão dos genes de fatores de crescimento angiogênico, como o FGF2.

2 JUSTIFICATIVA

A colangiopatía intra-hepática da AB é progressiva, desenvolvendo-se com o tempo um padrão de “rarefação dos ductos biliares “intra-hepáticos (HUSSEIN *et al.*, 2005) e cirrose. Nosso grupo já documentou, como outros autores (UFLACKER *et al.*, 1993, DESMET *et al.*, 1995), a presença de arteriopatia na AB e identificou sobre-expressão de fatores de crescimento angiogênicos VEGF e FGFb nos pacientes com AB. Decidimos, portanto, avaliar a expressão dos fatores de crescimento angiogênicos VEGF A e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2, e FGFb nas estruturas hepatobiliares dos pacientes com AB.

3 OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1 Objetivo principal

Avaliar a expressão imunoistoquímica dos fatores de crescimento VEGF A e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2, e FGFb em estruturas hepatobiliares de pacientes com AB.

3.2 Objetivos específicos

1. Relacionar a expressão imunoistoquímica do VEGF A em estruturas hepatobiliares de pacientes com AB, com outras causas de colestase neonatal e com explantes;
 2. Avaliar a característica de expressão do VEGF A em *porta hepatis* de pacientes com AB;
 3. Relacionar as características de expressão imunoistoquímica dos marcadores VEGFR1, VEGFR2 e FGFb em tecido hepático de pacientes com AB e com outras causas de colestase neonatal;
 4. Analisar a relação da expressão imunoistoquímica dos marcadores nas estruturas hepatobiliares hepáticas com variáveis relacionadas ao prognóstico da AB, PCK7, densidade de colágeno e idade no procedimento cirúrgico;
 5. Analisar a relação entre espessamento de túnica média e expressão imunoistoquímica do VEGF A nas estruturas hepatobiliares.
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

O delineamento do estudo foi de corte transversal, constando de uma avaliação retrospectiva e de outra prospectiva do material de biópsia hepática em cunha, fixado com formalina, incluído em parafina e obtido durante os procedimentos cirúrgicos no HCPA, segundo o protocolo histológico (Anexo I). No estudo retrospectivo, incluíram-se pacientes que já haviam sido submetidos ao procedimento cirúrgico ao início da pesquisa. No estudo prospectivo foram avaliadas amostras de tecido com as mesmas características, segundo o mesmo protocolo, de pacientes selecionados segundo os mesmos parâmetros e que foram prospectivamente atendidos a partir do início do estudo.

4.2 Critérios de inclusão

- a. Pacientes com AB com tecido hepático incluído em parafina, por ocasião da PE no período de 1986 e 2007, disponível no serviço de Patologia do HCPA;
 - b. Pacientes com causas não atresícas de colestase neonatal, com tecido hepático incluído em parafina obtido durante procedimento cirúrgico, no período de 1986 a 2007, disponível no serviço de Patologia do HCPA;
 - c. Pacientes com AB com material de *porta hepatitis* obtido por ocasião da PE no período de 1986 a 2007, incluído em parafina, disponível no serviço de Patologia do HCPA;
-

- d. Pacientes com AB que possuem material de explante, obtido por ocasião do TxH no HCPA no período de 1986 a 2007, incluído em parafina disponível no serviço de Patologia do HCPA.

4.3 Critérios de exclusão

- a. Pacientes com insuficiência hepática fulminante
- b. Pacientes com cirrose criptogênica;
- c. Pacientes que não preencheram os critérios acima.

4.4 AMOSTRA

A amostra incluiu 52 pacientes com AB e 7 controles com outras causas de colestase neonatal (CN), incluindo dois casos de deficiência α 1 antitripsina, quatro de hepatite neonatal idiopática, 1 de hipopituitarismo. O material de biópsia desses foi fixado e processado no Serviço de Patologia do HCPA. O grupo AB foi composto de 26 meninos e 26 meninas e o grupo CN, de 3 meninos e 4 meninas. A idade dos pacientes com AB por ocasião da laparotomia exploradora variou entre 25 e 251 dias de vida no grupo AB (Média = 79,92 dias; DP \pm 35,39) e entre 47 e 100 dias de vida no grupo CN (Média = 66,29 dias; DP \pm 20,20) com P= 0, 325. Para a análise de um dos marcadores imunoistoquímicos (VEGF em tecido hepático) foi também avaliado o material de explante de 33 pacientes com AB submetidos a transplante hepático no HCPA entre 1995 e 2007, incluindo 17 meninos e 16 meninas, dos quais, oito pacientes são comuns ao grupo que sofreu PE. A idade à época do transplante variou entre 242 e

7803 dias de vida (Média= 1570 dias; DP±2051,75). Em 16 pacientes do grupo de AB, foi possível obter, durante o procedimento cirúrgico, amostra histológica do *porta hepatis*, sendo utilizado esse material para a marcação imunoistoquímica com VEGF e posterior análise histológica. Esse estudo analisou amostras de tecido hepático obtido por ocasião do procedimento cirúrgico de 59 pacientes atendidos no Setor de Gastroenterologia Pediátrica do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) entre janeiro de 1986 a dezembro de 2007. O procedimento cirúrgico inicial ao que foram submetidos esses pacientes constou de laparotomia exploradora acompanhada de biópsia hepática em cunha. Por ocasião desse procedimento, realizou-se uma colangiografia transoperatória para confirmação do diagnóstico de AB e, na vigência de obstrução biliar completa, PE.

Quatorze dos pacientes com AB apresentavam anomalias extra-hepáticas associadas, incluindo, segundo a classificação de Carmi *et al.* (1993), pacientes com anomalia de lateralidade incompleta e outras com anomalias do tipo “não-sindrômico”. A tabela a seguir descreve as MEH associadas encontradas nos pacientes com AB.

Tabela 1- Malformações extra-hepáticas associadas à atresia biliar nos pacientes em estudo

| Número de pacientes | Anomalias extra-hepáticas associadas |
|---|--|
| Grupo de anomalia de lateralidade incompleta | |
| 1 | estenose mitral, CIV, arco aórtico à esquerda, anomalia de extremidades, veia porta pré-duodenal, fígado mediano |
| 1 | <i>Situs inversus</i> |
| 1 | Má rotação intestinal,estenose pulmonar |
| 1 | Cardiopatia complexa |
| 1 | <i>Situs inversus</i> abdominal |
| 1 | Dextrocardia, múltiplas atresias de esôfago |
| Grupo “não-sindrômico” | |
| 1 | Estenose de ramos da pulmonar |
| 1 | Rim único |
| 1 | Fístula artério-venosa pulmonar, ectasia do sistema coletor renal |
| 1 | Duplicação renal, ectasia de pelve renal |
| 1 | CIV |
| 3 | CIA |

Abreviatura: CIV- comunicação interventricular; CIA:comunicação interatrial.

Todos os pacientes foram acompanhados desde a internação hospitalar até sua alta pela mesma equipe, sendo, posteriormente, atendidos no ambulatório de gastropediatria do HCPA.

Quanto à pesquisa de anomalias congênitas extra-hepáticas, nos pacientes em estudo retrospectivo, foram coletadas informações nos prontuários, já que essa pesquisa faz parte do protocolo realizado na investigação diagnóstica da colestase neonatal. Avaliaram-se dados do exame físico e radiológicos, incluindo radiografia de tórax, ecografia abdominal e de sistemas específicos, além da descrição de achados clínicos, cirúrgicos e de autópsia quando possível. No estudo prospectivo houve a pesquisa de anomalias congênitas extra-hepáticas em cada paciente investigado, segundo o mesmo protocolo. Foram levadas em consideração apenas anormalidades congênitas maiores, ou seja, aquelas que afetam a viabilidade ou a fertilidade de seus portadores (SILVEIRA, 1988).

4.5 Variáveis em estudo

4.5.1 Intensidade da expressão imunoistoquímica dos marcadores em estruturas

hepatobiliares;

4.5.2 Idade por ocasião da laparotomia exploradora;

4.5.3 Densidade de colágeno;

4.5.4 Positividade de citoqueratina 7 (PCK7);

4.5.5 Razão espessura de túnica média arterial/diâmetro luminal arterial;

4.6 Definição das variáveis em estudo

4.6.1 Intensidade da expressão imunoistoquímica dos marcadores em estruturas hepatobiliares: obtida por avaliação histológica, de acordo com protocolo preestabelecido (Anexo I), seguindo escore semiquantitativo descrito por Wu *et al.* (2004).

4.6.2 Idade por ocasião da laparotomia exploradora – calculada em dias de vida.

4.6.3 Densidade superficial de colágeno – conceituada como a média dos valores da porcentagem de colágeno, quantificados por método morfométrico, presentes em dez imagens obtidas do material histológico corado com picrossírius, segundo Chevallier *et al.* (1994). Expressa a extensão da fibrose tecidual.

4.6.4 Positividade de citoqueratina 7 (PCK7)- conceituada como a média dos valores da positividade de CK7, quantificados por método morfométrico, presentes em dez imagens obtidas do material histológico marcado por imunoistoquímica com anticorpo anti-CK7, segundo Santos *et al.* (2009). Expressa a extensão da proliferação biliar.

4.6.5 Razão espessura de túnica média arterial/diâmetro luminal arterial (REMD)- obtida por método proposto por Santos *et al.* (2005), a partir da mensuração morfométrica das variáveis

4.6.6 Espessura de túnica média arterial e diâmetro luminal arterial em artérias e arteríolas marcadas com anticorpo anti-actina humana (HHF-35). Considerou-se:

4.6.6.1 Espessura da túnica média arterial- média dos valores de quatro medidas de espessura obtidas a partir de uma linha traçada entre um ponto da face externa da parede da túnica média a outro da face interna na direção do centro;

4.6.6.2 Diâmetro luminal arterial - média dos valores de duas medidas obtidas a partir de duas linhas traçadas ligando dois pontos opostos da face interna do vaso, incluindo o maior e o menor diâmetro.

A REMD possibilita a avaliação do espessamento de túnica média arterial.

4.7 Análise histológica

Constou da avaliação semiquantitativa da intensidade de expressão dos marcadores imunoistoquímicos realizada por dois expertos em histopatologia hepática e o autor do presente estudo, “cegos” quanto ao diagnóstico, utilizando o protocolo histológico apresentado no anexo II. O protocolo baseou-se no estudo de Wu *et al* .(2004), conceituando: 0- ausência de marcação; 1- marcação de cor amarela fraca; 2- marcação de cor amarelo escura; 3- marcação cor marrom com distribuição granular. O limiar de positividade empregado foi o escore dois.

4.8 Análise morfométrica

As seguintes avaliações foram realizadas: 1) quantificação da densidade superficial de colágeno; 2) quantificação da porcentagem de positividade da CK7 (PCK7); 3) mensuração das variáveis espessura da túnica média arterial e diâmetro luminal.

4.8.1 Captura de Imagens

Para as três atividades, dez imagens foram captadas em áreas de positividade de cada lâmina histológica corada com picorrossírius ou marcada com CK7 e HHF-35 e gravadas no formato TIFF (*tag image format*), para posterior mensuração. A captura foi realizada utilizando o programa *Image Pro Express*. O aumento das imagens no microscópio para a avaliação de vasos foi de 400x, e para a avaliação de densidade superficial de colágeno e PCK7, de 200x. A voltagem da lâmpada foi mantida estável durante o processo de captura de imagens, permitindo a iluminação homogênea dos campos microscópicos.

4.8.1.1 Características de captura

A captura das imagens foi feita com câmera *Olympus Q color 5* acoplada a microscópio *Olympus BX 51* (Hamburg, Germany) utilizando um computador Intel Pentium 4 com programa *Image Pro Express 5.1* (*Media Cybernetics-Bethesda, USA*). Após microscópio estar ligado por 30 minutos, centralizou-se a imagem, fechou-se o diafragma, e o foco foi corrigido. A roséola foi centralizada, o diafragma foi aberto ao

máximo, e o foco foi rebaixado totalmente. A resolução da ferramenta *Acquire* foi localizada em 1280x960 *pixels* (*Full Frame, Bin 2*) e com a ferramenta *General Bit Depth* em 36 *bit color*. Usou-se a ferramenta *White Balance* para a correção de fundo.

4.8.2 Quantificação da densidade de colágeno

A quantificação da densidade de colágeno foi realizada segundo a técnica utilizada por CHEVALLIER *et al.*, (1994), a partir do material histológico corado com picrossírius. O método provê a quantificação automática da área de fibrose presente em um campo de superfície (MASSEROLI *et al.*, 2000). A densidade superficial de colágeno foi realizada automaticamente em um sistema de análise computadorizada de imagens. Essa estação incluiu um fotomicroscópio (*Olympus BX 51*) com captadores de posição, uma câmera *Olympus Q color 5*, um computador Intel Pentium 4, com monitor em cores e *mouse*. A análise de imagem foi feita com o programa *Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0* (*Adobe Systems Inc*, San Jose, CA). A densidade superficial de colágeno foi medida com magnificação de 20x, em imagens captadas de áreas de positividade para picrossírius, excluindo áreas que apresentam elevada extensão de fibrose em fígados normais, como regiões pericapsular e em torno de grandes vasos. A expressão da porcentagem de área de colágeno correspondeu à razão entre superfície de colágeno e campo de superfície analisado em cada imagem. O avaliador histológico estava “cego” em relação aos dados clínicos.

4.8.3 Quantificação da porcentagem de positividade da CK7 (PCK7)

A quantificação da porcentagem da positividade da CK7 foi acessada de acordo com técnica desenvolvida por Santos *et al.* (2009), utilizando o programa *Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0* (*Adobe Systems Inc*, San Jose, CA). Cada imagem exibida no monitor foi ajustada no mesmo nível de limiar, e a área de estruturas CK7-positivas foi medida em pixels usando o instrumento “*magic wand*”. O número total de pixels, por imagem se manteve constante em todos os campos. O PCK7 foi calculado pela razão “área CK7-positiva/número total de pixels por imagem”. Para cada paciente a média de PCK7 das imagens avaliadas foi calculada e registrada. O avaliador histológico estava “cego” em relação aos dados clínicos.

4.8.4 Mensuração das variáveis espessura da túnica média arterial e diâmetro luminal

Os vasos arteriais foram identificados pela parede da túnica média marcada pelo anticorpo antiactina humano-específica, HHF-35 (*DAKO Corporation-Carpinteria*, CA). A mensuração morfométrica foi realizada pelo programa *Photoshop CS3 Extended 10.0* (*Adobe Systems Inc*, San Jose, CA), em cada vaso arterial de cada imagem previamente captada, utilizando a ferramenta “*length*”. Os valores obtidos em cada medida foram registrados, calculando-se, a seguir, as médias de cada vaso. O avaliador histológico estava “cego” em relação aos dados clínicos.

4.9 Preparação Histológica e Imunoistoquímica

De cada amostra de tecido obtido por ocasião da laparotomia exploradora foram utilizados oito secções de cinco μm de espessura para:

1. Coloração com hematoxilina e eosina e picrossírius;
2. marcação com os anticorpos primários reativos contra as moléculas descritas na tabela abaixo, que inclui também as diluições empregadas.

Tabela 2 - Marcadores imunoistoquímicos empregados no presente estudo.

| Marcadores | Fabricantes | Concentrações |
|------------|--|---------------|
| HHF-35 | DAKO Corporation, Carpinteria, USA | 1/100 |
| CK7 | DAKO A/S, Glostrup, Denmark | 1/100 |
| VEGF | Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA | 1/400 |
| FGFb | R&D Systems, Minneapolis, USA | 1/10 |
| VEGFR1 | Epitomics, Burlingame, USA | 1/100 |
| VEGFR2 | Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, USA | 1/200 |

Abreviaturas: HHF-35-anticorpo antiactina humano-específico, clone 35; CK7- anticorpo anti-citoqueratina 7; VEGF-fator de crescimento do endotélio vascular; FGFb-fator de crescimento de fibroblastos básico; VEGFR1 -receptor 1 do fator de crescimento do endotélio vascular; VEGFR2-receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular.

A técnica imunoistoquímica foi realizada no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas do HCPA, constando:

I. Desparafinização:

- a. Primeira desparafinização (a quente) - cortes em lâminas de cola em estufa a 60°C por 12 horas.
- b. Segunda desparafinização (a frio) - com a seguinte ordem: xilol, 10 minutos; álcool, 5 minutos; lavagem com água destilada; PBS (*phosphate buffered saline*) por 10 minutos (pH=7,2).

II. Recuperação Antigênica

- a. Colocação das lâminas em solução a 0,002% de ácido cítrico equilibrada em pH=6,0 com hidróxido de sódio aquecidos em banho-maria por 21 minutos em microondas sem ferver.
- b. Resfriamento gradual aproximadamente por 10 minutos.

Lavagem em água destilada por duas vezes e em tampão PBS (*phosphate buffered saline*) por 5 minutos.

III. Bloqueio da Peroxidase Endógena

- a. Colocação das lâminas em peróxido de hidrogênio a 5% em água destilada em três vezes de dez minutos. Lavagem duas por vezes em água destilada e em tampão PBS por 5 minutos.

IV. Bloqueio das Reações Inespecíficas

- a. Feito com leite em pó desnatado bovino Glória (Parmalat Brasil S/A Indústria de Alimentos, Itaperuna, RJ) diluído em PBS por 20 minutos.

V. Anticorpo Primário

- a. Foi colocado diluído em tampão PBS por 90 a 120 minutos. Lavagem por três vezes com tampão PBS por 5 minutos.
-

VI. Anticorpo Secundário

- a. Aplicou-se o *Biotinylated Link Universal* (Kit LSAB-Dako, Carpinteria, Califórnia) por 30 minutos. Seguiram-se três lavagens em tampão PBS por 5 minutos.
- b. *Streptavidin*-HRP (Dako, Carpinteria, Califórnia) por 30 minutos. Lavagem por três vezes em tampão PBS por 5 minutos.
- c. Aplicação de Diaminobenzidina (DAB-Dako, Carpinteria, Califórnia) diluído conforme fabricante. Lavagem com água destilada.

Deixou-se o material por 2 segundos em hematoxilina de HARRIS.

Lavagem por três vezes em água corrente.

Passou-se uma vez por água amoniacal (1,0 %).

Montaram-se as lâminas.

4.10 Definição do tamanho da amostra

Para a avaliação das questões de pesquisa do presente estudo, baseamo-nos em uma amostra de conveniência. Foi arrolados material anatomo-patológico de tecido hepático e de vias biliares obtidos de pacientes com AB e controles não atrésicos por ocasião da laparotomia exploradora no período de janeiro de 1986 a dezembro de 2007 e disponível no departamento de Patologia do HCPA, respeitando os critérios de inclusão e exclusão já definidos.

4.11 Análise estatística

Inicialmente, todos os dados foram descritos como média e desvio padrão nas variáveis quantitativas, e frequências e percentual nas variáveis qualitativas. A avaliação das diferenças entre variáveis quantitativas foi realizada a partir do teste *t de Student* e, nas situações que envolveram três ou mais grupos, utilizou-se a análise de variância de um critério de classificação (*ANOVA one-way*). Nas situações de assimetria, foram utilizados os testes não paramétricos *U de Mann-Whitney* e *ANOVA de Kruskal-Wallis*. A localização de diferenças a partir da *ANOVA de Kruskal-Wallis* foi realizada pelo procedimento de comparações múltiplas proposto por *Dunn*. Nos casos de variáveis qualitativas, foi utilizado o teste Qui-quadrado e, quando necessário, o teste exato de *Fisher*. Na avaliação de associações entre variáveis ordinais e contínuas empregou-se o coeficiente de correlação não paramétrico de *Spearman*.

O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$, sendo considerados de significância limítrofe os testes estatísticos que atingiram valores de $0,05 < P < 0,1$.

Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas Excel versão 2007 e SPSS versão 15.0.

4.12 Considerações éticas

Este estudo utilizou material histopatológico obtido durante a investigação de pacientes com colestase neonatal rotineiramente realizada no Setor de Gastroenterologia Pediátrica do serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Não resultou em aumento da permanência hospitalar dos pacientes, não teve implicações terapêuticas,

não produziu aumento de desconforto aos pacientes, nem os colocou em risco de maior morbimortalidade. Portanto, não foi necessária a solicitação aos pais ou aos responsáveis de um termo de consentimento informado. Contudo, como foram utilizados os prontuários dos pacientes, o autor preencheu o Termo de Compromisso para Utilização de Dados.

5 RESULTADOS

Embora tenhamos tentado discriminar a intensidade da expressão imunistoquímica dos marcadores em vasos arteriais nas diferentes estruturas vasculares positivas, ou seja, túnica média arterial e endotélio, esta diferenciação não foi possível, pois a coloração se mostrou homogênea nessas estruturas.

Como mostramos a seguir, a tabela 3 apresenta a positividade de expressão dos marcadores imunistoquímicos VEGF, em fígado e *porta hepatis*, FGFb, VEGFR1 e VEGFR2 em fígado, de acordo com os grupos de pacientes.

Tabela 3 - Positividade da expressão dos marcadores imunoistoquímicos nas estruturas hepatobiliares de acordo com os grupos em estudo.

| marcadores | Grupos | | | | P |
|----------------|--------------------|---------------------|-----------|--------------------|--------|
| | Com MEH | AB Sem MEH | Explantes | CN | |
| VEGF | (N=14) | (N=38) | (N=33) | (N=7) | |
| DB | 4(28,6%) | 18(47,4%) | 8(24,2%) | 1(14,3%) | 0,137 |
| PA | 7(50,0%) | 28(73,7%) | 12(36,4%) | 2(28,6%) | 0,006 |
| Hep | 5(35,7%) | 19(50,0%) | 30(90,9%) | 2(28,6%) | <0,001 |
| VEGFR1 | (N=14) | (N=35) | - | (N=7) | |
| DB | 5 (35,7%) | 4 (11,4%) | - | 1 (14,3%) | 0,138 |
| PA | 2(14,3%) | 0 (0,0%) | - | 1(14,3%) | 0,048 |
| Hep | 5 (35,7%) | 13(37,1%) | - | 3(42,9%) | 1,000 |
| VEGFR2 | (N=13) | (N=34) | - | (N=7) | |
| DB | 5(38,5%) | 21(61,8%) | - | 7(100,0%) | 0,023 |
| PA | (N=13) 3(23,1%) | (N=33) 13(39,4%) | - | (N=6) 5(83,3%) | 0,051 |
| Hep | (N=13) 4(30,8%) | (N=34) 19(55,9%) | - | (N=7) 7(100,0%) | 0,011 |
| FGFb | (N=13) | (N=33) | - | (N=7) | |
| PA | 7(53,8%) | 27(81,8%) | - | 6(85,7%) | 0,130 |
| EV | (N=12) 2(16,7%) | (N=33) 5(15,2%) | - | (N=7) 3(42,9%) | 0,290 |
| VEGF PH | (N=5) | (N=11) | - | - | |
| DB | 1(20,0%) | 10(90,9%) | - | - | 0,013 |
| PA | (N=5) 3(60,0%) | (N=9) 8(88,9%) | - | - | 0,505 |

Abbreviations: AB- atresia biliar; Meh- malformação extra-hepática; CN- outras causas de colestase neonatal; VEGF- fator de crescimento do endotélio vascular; FGFb- fator de crescimento de fibroblasto básico; VEGFR1- receptor 1 do fator de crescimento do endotélio vascular; VEGFR2-receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular;DB- ducto biliar;PA-parede arterial ; Hep-hepatócitos; EV-endotélio venoso; PH-*porta hepatis*. Estatística-teste exato de Fisher.

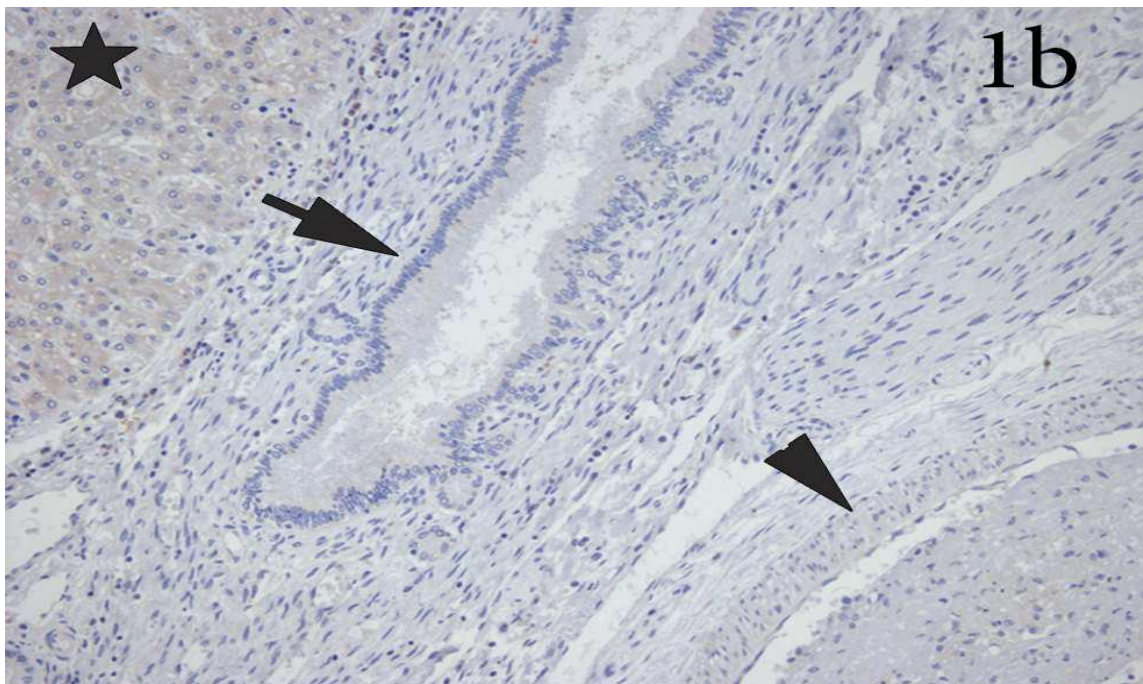
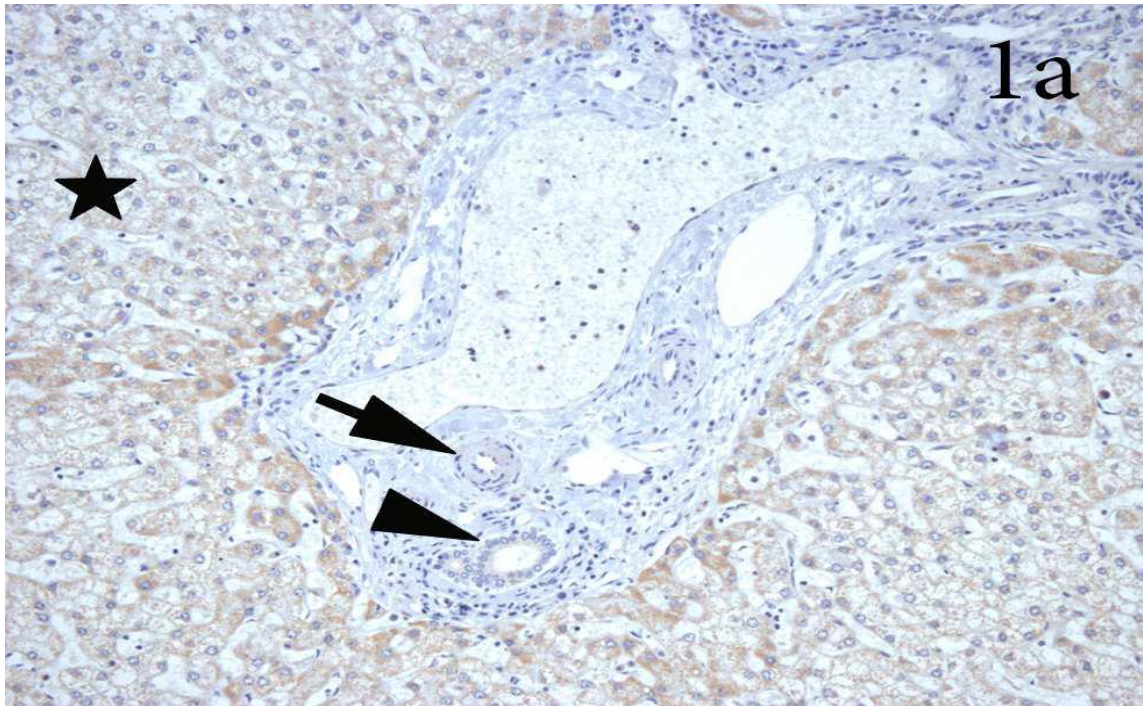
Como observado na tabela 3, evidencia-se diferença entre os grupos quanto à positividade de expressão do VEGF em fígado em duas estruturas: parede arterial (P=0,006) e hepatócitos (<0,001). A positividade de expressão do VEGF foi maior em parede arterial na AB, especialmente no grupo sem MEH em relação à CN e explantes. Por outro lado, a positividade de expressão do VEGF em hepatócitos foi maior no grupo de explantes.

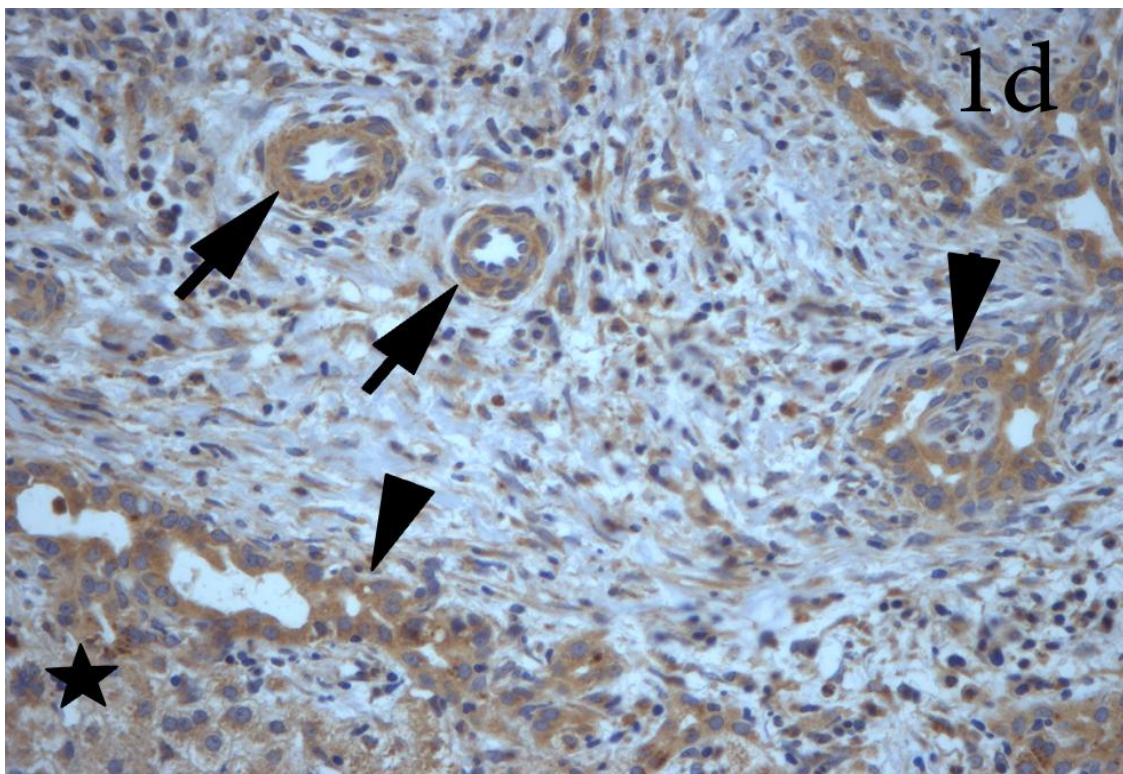
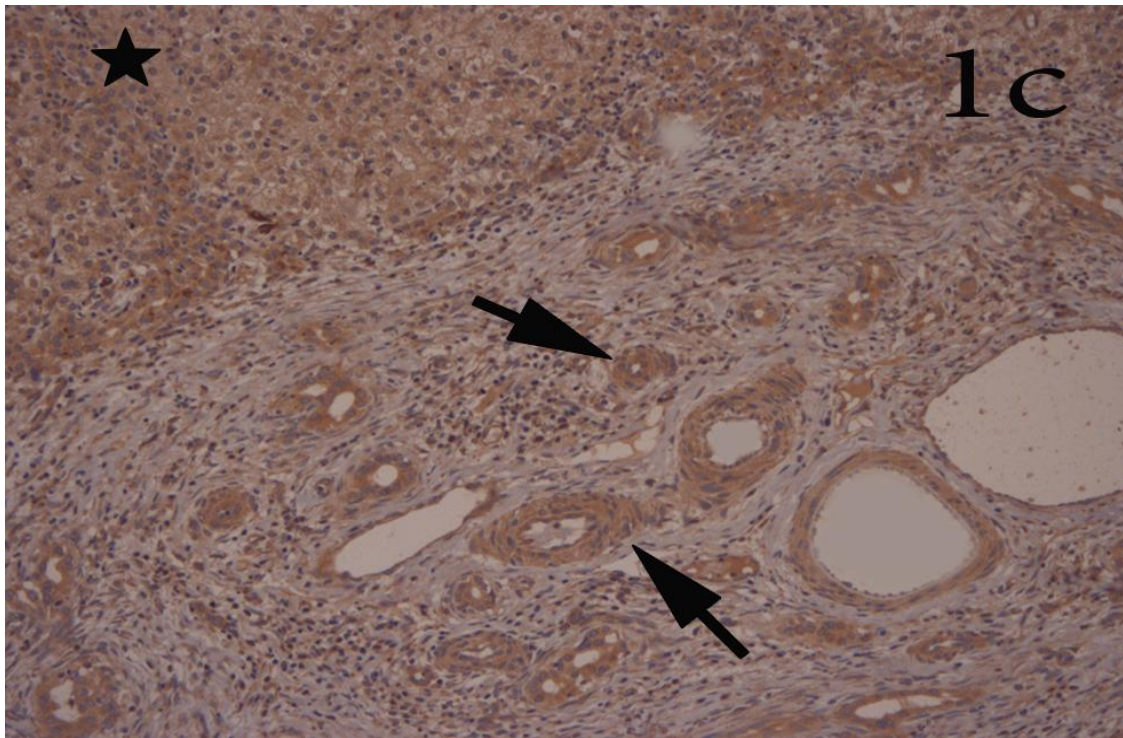
Em relação ao VEGFR1, houve diferença quanto à positividade nos distintos grupos em parede arterial ($P=0,048$), sendo menor no grupo de AB SMEH do que nos pacientes AB CMEH e CN. Foram poucos os pacientes que apresentaram positividade em parede arterial (14,3% dos grupos AB CMEH e CN). Nenhum dos 38 pacientes com AB SMEH apresentou positividade nesta estrutura. O maior índice de positividade do VEGFR1 ocorreu em hepatócitos.

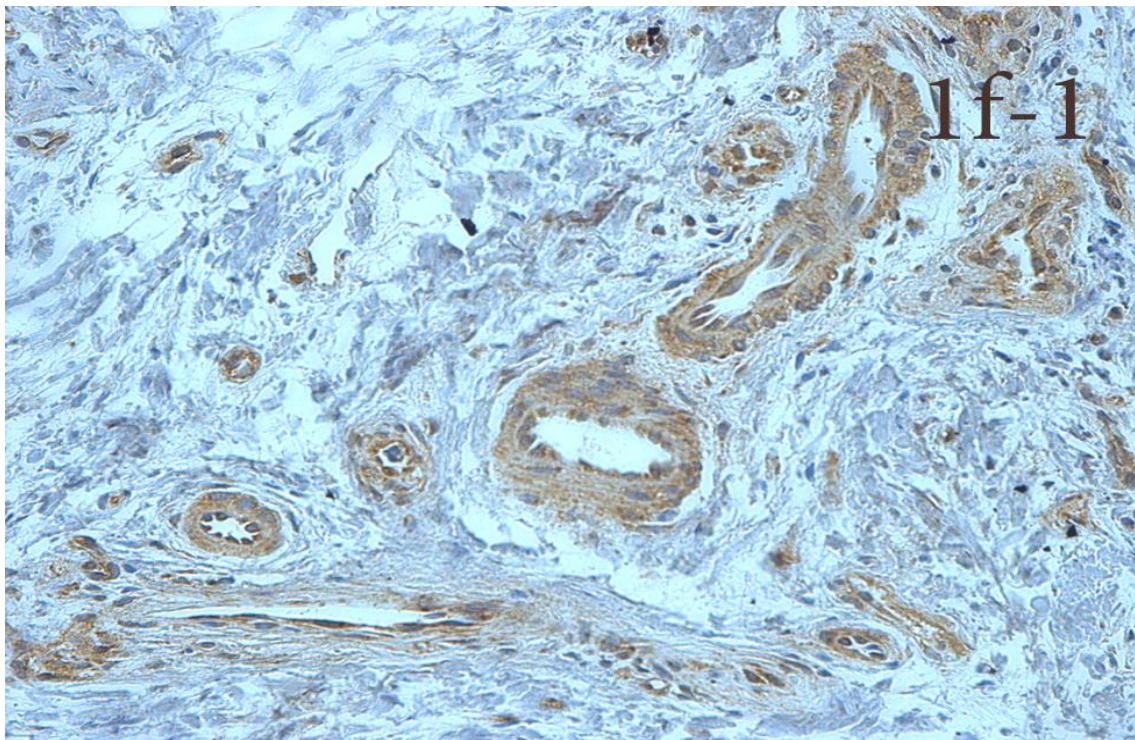
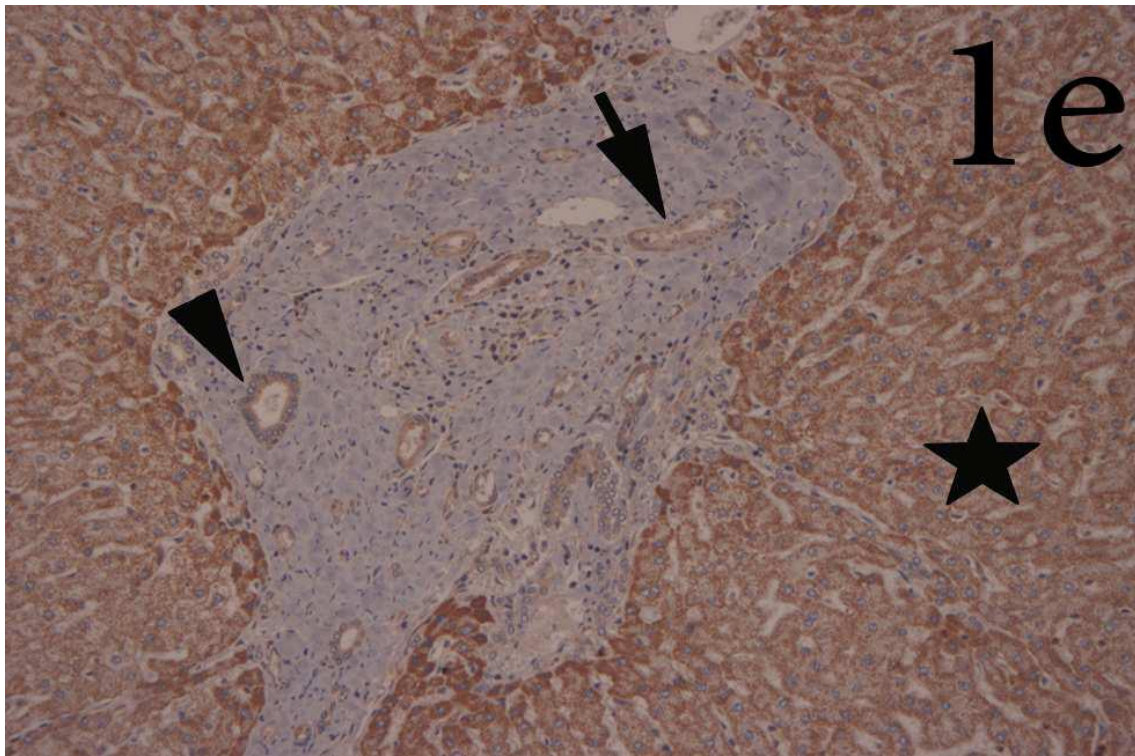
O receptor 2 do VEGF A apresentou diferente índice positividade entre os grupos tanto em ductos biliares ($P=0,023$) como em hepatócitos ($P=0,011$), sendo sua maior expressão nos pacientes com CIH que nos pacientes com AB. Todos os pacientes com CIH tiveram expressão positiva do VEGFR2 em ductos biliares e hepatócitos, enquanto nos grupos de AB, houve índices menores e variados de positividade. Isto também pareceu ocorrer em parede arterial, porém, sem significância estatística ($P=0,051$).

O FGFb expressou-se em parede arterial e endotélio venoso apenas, sendo maior os seus índices de expressão na parede arterial. Em relação a essas estruturas, não houve diferença entre os grupos quanto à positividade de expressão.

Nos casos em que a expressão do VEGF A foi positiva em *porta hepatis*, observou-se intensa expressão do marcador. Nessa estrutura, observou-se diferença no índice de positividade do VEGF A em ductos biliares entre os grupos de AB, sendo maior nos pacientes SMEH.







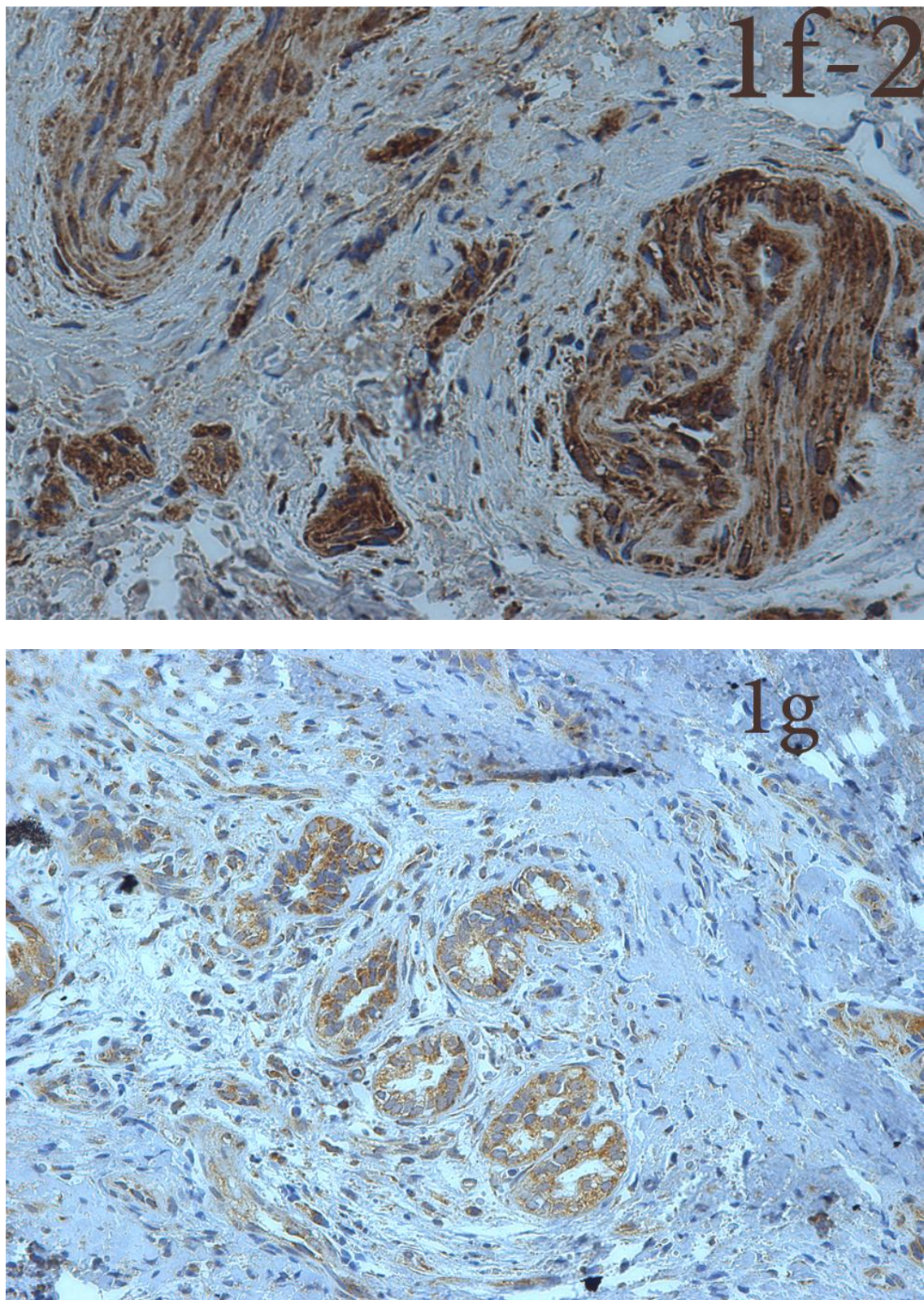


Figura 5 – Características imunoistoquímicas do VEGF Anas estruturas hepatobiliares dos pacientes em estudo. Símbolos: setas- ramo da artéria hepática; cabeça de seta-ducto biliar; estrela-hepatócitos. 1^a- Espaço porta de necropsia de paciente sem doença hepática(200x); 1b-porta hepatis de paciente sem doença hepática (200x); 1c- Fígado de paciente com atresia biliar por ocasião da Portoenterostomia (200x); 1d- detalhe do fígado de paciente com atresia biliar por ocasião da Portoenterostomia(400x); 1e- explante de paciente com atresia biliar (200x); 1f-1 e 1f-2artérias em porta hepatis de paciente com atresia biliar (200x); 1g-ductos biliares em porta hepatisde paciente co atresia biliar (200x).

A tabela 4 relaciona as variáveis relacionadas ao prognóstico da AB (PCK7, densidade de colágeno e idade no procedimento cirúrgico) com a positividade de expressão dos marcadores imunohistoquímicos nas estruturas hepatobiliares.

Tabela 4 - Relação das variáveis PCK7, densidade de colágeno e idade no procedimento cirúrgico com a característica de expressão dos marcadores imunohistoquímicos nas estruturas hepatobiliares

| Variáveis | Positiva | Negativa | P |
|------------------------------|-------------|-------------|--------|
| VEGF PA | | | |
| PCK7 | 7,63±4,23 | 3,33±3,04 | <0,001 |
| Densidade de colágeno | 25,41±10,39 | 23,93±9,05 | 0,584 |
| Idade no procedimento | 82,95±38,40 | 70,50±24,13 | 0,177 |
| VEGFR1DB | | | |
| PCK7 | 8,27±4,55 | 5,23±4,10 | 0,040 |
| Densidade de colágeno | 28,59±10,60 | 24,33±9,80 | 0,244 |
| Idade no procedimento | 99,50±59,99 | 73,20±24,92 | 0,204 |
| VEGFR1 PA | | | |
| PCK7 | 8,39±6,33 | 5,59±4,19 | 0,275 |
| Densidade de colágeno | 18,66±7,72 | 25,40±9,99 | 0,258 |
| Idade no procedimento | 86,33±13,05 | 77,42±35,48 | 0,669 |
| VEGFR2 PA | | | |
| PCK7 | 5,18±4,64 | 6,52±4,09 | 0,253 |
| Densidade de colágeno | 23,05±10,27 | 27,02±9,84 | 0,170 |
| Idade no procedimento | 77,90±44,99 | 79,00±27,78 | 0,914 |
| VEGFR2 DB | | | |
| PCK7 | 5,08±4,48 | 7,37±3,75 | 0,056 |
| Densidade de colágeno | 23,43±10,53 | 28,09±8,66 | 0,101 |
| Idade no procedimento | 81,61±39,69 | 74,62±25,56 | 0,477 |

Abreviaturas: PCK7- porcentagem de citoqueratina 7; VEGF- fator de crescimento do endotélio vascular; VEGFR1- receptor 1 do fator de crescimento do endotélio; PA- parede arterial; DB- ducto biliar; VEGFR2- receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular. Método estatístico: Teste T.

Em relação ao VEGF em parede arterial houve diferença entre os grupos com marcação imunohistoquímica positiva e negativa em relação ao PCK7 (P<0, 001), o

qual foi maior no grupo com expressão positiva do VEGF. O mesmo foi observado em relação ao VEGFR1 em ductos biliares ($P=0,040$). O PCK7 não foi diferente entre os grupos positivo e negativo nas outras estruturas hepatobiliares.

A densidade de colágeno e a idade por ocasião do procedimento cirúrgico não foram diferentes entre os grupos positivo e negativo em nenhuma das estruturas avaliadas.

A tabela 5 apresenta a associação da positividade de expressão imunoistoquímica do VEGF em estruturas hepatobiliares com as variáveis Grupo e PCK7.

Tabela 5 - Associação da positividade de expressão imunoistoquímica do VEGF em estruturas hepatobiliares com as variáveis grupo e PCK7

| Variáveis | OR | IC 95% | P |
|-----------------|-------|----------------|-------|
| VEGF DB | | | |
| Grupo | 2,089 | (0,517;8,437) | 0,301 |
| PCK7 | 1,187 | (1,016;1,387) | 0,031 |
| VEGF PA | | | |
| Grupo | 2,946 | (0,712;12,187) | 0,136 |
| PCK7 | 1,257 | (1,021;1,547) | 0,031 |
| VEGF hep | | | |
| Grupo | 1,452 | (0,380;5,555) | 0,586 |
| PCK7 | 1,184 | (1,014;1,382) | 0,032 |

Abreviaturas: OR- *odds ratio*; IC- intervalo de confiança; VEGF- fator de crescimento do endotélio vascular; PCK7- porcentagem de positividade de citoqueratina 7; DB- ducto biliar; PA- parede arterial; hep- hepatócitos. Método estatístico: Regressão logística.

Em análise multivariada por regressão logística, conforme tabela 5, observou-se que foi o PCK7 e não o grupo de pacientes com AB que determinou a positividade expressão do VEGF tanto em parede arterial ($P=0,031$), ducto biliar ($P=0,031$) quanto em hepatócitos ($P=0,032$).

A tabela 6 relaciona a REMD com a positividade do VEGF nas estruturas hepatobiliares.

Tabela 6 - Relação da razão espessura de túnica média/diâmetro luminal com a positividade do VEGF nas estruturas hepatobiliares

| Variável | Razão espessura de túnica média / diâmetro luminal Mediana (IIQ 0,25; 0,75) | P |
|-----------------------------|---|-------|
| VEGF Ducto biliar | | |
| Positivo | 0,70 (0,56;1,10) | 0,016 |
| Negativo | 0,60 (0,50;0,70) | |
| VEGF Parede arterial | | |
| Positivo | 0,70 (0,57; 0,87) | 0,044 |
| Negativo | 0,50 (0,46; 0,71) | |
| VEGF hepatócitos | | |
| Positivo | 0,70 (0,60; 0,84) | 0,076 |
| Negativo | 0,70 (0,48; 0,72) | |

Abreviaturas: VEGF- fator de crescimento do endotélio vascular; IIQ- intervalo interquartil.
Teste estatístico: Mann-Whitney.

Na tabela acima, observamos que houve diferença nos valores da REMD entre os grupos de expressão do VEGF positiva e negativa nas estruturas ducto biliar (P=0,016) e parede arterial (P=0,044), sendo mais espessas as paredes arteriais nos casos com positividade para o VEGF.

6 DISCUSSÃO

Ao avaliarmos nossos achados, os seguintes questionamentos nos inquietaram:

- *Será a hipóxia a principal causa do aumento de expressão do VEGF em nossos pacientes?*
- *Qual a causa da provável presença de hipóxia em artérias e ductos portais?*
- *Quais os possíveis mecanismos pelos quais os colangiócitos induzem a fibrose na AB?*

Assim, tentaremos respondê-los, mas não antes de fazer algumas considerações.

6.1 Considerações gerais

A possibilidade de ser a hipóxia um elemento importante no determinismo da etiopatogenia da AB estimulou a investigação da expressão do principal fator angiogênico envolvido na hipóxia e de seus receptores.

O VEGF A é um fator de crescimento angiogênico que age mantendo a sobrevivência das células endoteliais, aumentando a permeabilidade vascular, causando dilatação vascular e estimulando a expressão de proteases associadas à degradação da matrix extracelular (FERRARA *et al.*, 2003). Em fígados normais, a expressão leve de VEGF A é observada difusamente no parênquima e não ocorre expressão intensa em ductos biliares, nem em vasos (FABRIS *et al.*, 2006). A expressão é maior nos hepatócitos circundantes das veias centrolobulares (GAUDIO *et al.*, 2006). Alguns autores descreveram uma expressão citoplasmática nas células de Kupffer, além de uma expressão leve na membrana do epitélio de ductos e dúctulos biliares (GOUW, 2006).

Durante o desenvolvimento embriológico, o VEGF A estimula a migração de brotos capilares que originam o leito vascular. Segundo Fabris *et al.* (2006), as células epiteliais dos ductos biliares no feto, e não a parede arterial, é que expressam VEGF A por IHC. Além da angiogênese fisiológica, o VEGF A também participa da angiogênese patológica em várias situações, sendo algumas citadas abaixo:

Quadro 2 - Atuação do VEGF na angiogênese patológica

| | |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| Cicatrização de feridas | Tammela <i>et al.</i> (2003) |
| Crescimento tumoral | Schoenleber <i>et al.</i> (2009) |
| Artrite reumatoide | Akavani <i>et al.</i> (2009) |
| Retinopatia isquêmica | Zhao S <i>et al.</i> (2009) |
| Psoríase | Xia <i>et al.</i> (2003) |
| Aterosclerose | Tammela <i>et al.</i> (2003) |
| Arteriopatia pulmonar plexigênica | Geiger <i>et al.</i> (2000) |

Abreviatura: VEGF- Fator de crescimento do endotélio vascular.

No desenvolvimento intrauterino, de cinco a 15 semanas, a expressão imunohistoquímica do VEGFA é detectada difusamente em todos os hepatócitos, com um padrão granular citoplasmático. Entre 15 e 25 semanas, a expressão do VEGF A nos hepatócitos diminui progressivamente, exceto em torno da placa ductal, num processo que se inicia na região central do primórdio hepático, espraiando-se para a periferia. Tal expressão se reduz progressivamente, não sendo mais detectável por imunohistoquímica após as 40 semanas gestacionais (GOUYSSE *et al.*, 2002).

Enquanto um incremento até certos níveis da concentração de VEGF A conduz à angiogênese de vasos normais, aumentos expressivos na sua concentração resultam na formação de vasos anormais, frágeis, morfologicamente irregulares, como os vasos

tumorais e com lumens aumentados (MAC GABHANN *et al.*, 2006; OZAWA *et al.*, 2004; BANFI *et al.*, 2005).

De acordo com Tsuzuki *et al.*(2000), VEGF A é o principal fator angiogênico induzido por hipóxia e expressa-se em muitos tecidos corporais (GAUDIO *et al.*, 2006). Além da hipóxia, a atividade do VEGF A é também induzida por hipoglicemia, acidose e fatores de crescimento como, EGF, TGF- α , TGF- β , fator de crescimento queratinocítico, IGF e FGF (FERRARA *et al.*, 2003). Nas doenças hepáticas crônicas, a expressão do VEGF A em células epiteliais por IHC ocorre em diferentes sítios. Em modelos animais de cirrose por CCL4 e por ligadura de ducto biliar comum, há um aumento progressivo de vasos sanguíneos limitados por septos fibrosos que está associado ao aumento progressivo da expressão de VEGF A em hepatócitos por IHC, ultrapassando pelas áreas pericentral e periportal (VANHEULE *et al.*, 2008). GAUDIO *et al.* (2006) observaram que também os ductos biliares sobre-expressavam VEGF A por IHC em modelos animais de ligadura de ductos biliares. Rosmorduc *et al.* (1999) observaram correlação entre a reação ductular neste modelo animal e o progressivo aumento da angiogênese e, de acordo com esses autores, a sobre-expressão do VEGF A ocorreu em hepatócitos e foi secundária à hipóxia associada ao processo colestático obstrutivo. A expressão do VEGFb ocorreu mais tardiamente. Na cirrose biliar primária, por outro lado, existe uma intensa expressão de VEGF A por IHC, nas células endoteliais sinusoidais, principalmente na periferia dos espaços-porta afetados (MEDINA, *et al.*, 2005). Nos pacientes HCC a expressão do VEGF A é intensa nos hepatócitos tumorais, nas células endoteliais vasculares e nos colangiócitos (MISE *et al.*, 1996). Parece haver relação entre o aumento da percentagem de hepatócitos positivos com o maior grau de diferenciação tumoral e o endotélio dos vasos intratumorais parece mais fortemente positivo nos HCC moderadamente e pouco

diferenciados (UEMATSU *et al.*, 2005). Mesmo os hepatócitos não tumorais de pacientes com HCC expressam VEGF A mais intensamente que hepatócitos de pacientes sem HCC (EL-ASSAL *et al.*, 1998).

Fabris, *et al.* (2006a) estudaram a expressão imunoistoquímica hepática do VEGF, angiopoietinas 1 e 2 e de seus receptores (VEGFR-1 e 2, Tie2) nas doenças policística autossômica dominante (ADPKD), de Caroli e em fígados normais e de fetos. Os autores observaram que, consistente com a existência de um fenótipo imaturo no epitélio cístico biliar, a expressão dos VEGF A, VEGFRs, Ang1 e Tie-2 apresentou-se fortemente sobrerregulada nos colangiócitos das doenças policísticas hepáticas. O VEGF A e a Ang1 apresentaram efeitos proliferativos: 1) autócrino sobre o crescimento dos colangiócitos e 2) parácrino sobre a vasculatura portal, assim promovendo o crescimento dos cistos e de seu suprimento vascular. No caso da ADPKD, portanto, o defeito no gene que produz essa doença, levando à manutenção de epitélio biliar imaturo primitivo, induz a um distúrbio na expressão de VEGF, além de Ang-1 localizada especificamente no fígado.

Em pacientes com rejeição crônica pós-TxH, existe um aumento da intensidade de expressão do VEGF A por IHC em ductos biliares, associada com o aumento do número de microvasos e dúctulos (GOUW *et al.*, 2006).

Em estudo de isquemia biliar em ratos, Beussier *et al.* (2005) observaram, após dois dias de privação de sangue arterial completa, presença de expressão IHC do VEGF A tanto em parede vascular arterial como em ductos biliares evidenciando isquemia. Os autores, então, conseguiram relacionar a ocorrência de hipóxia com a produção de VEGF pelos colangiócitos e parede arterial. Nossos achados são similares ao que ocorre em modelo animal após completa deprivação do fluxo arterial em ductos biliares extra-hepáticos desenvolvido por Beussier *et al.* (2005). Nós avaliamos a expressão do

VEGF A na AB em dois momentos distintos: na PE e no TxH. Como pode ser visto na tabela 4, na PE, a sobre-expressão do VEGF A localizou-se principalmente nos espaços-porta e de maneira especial na parede arterial. Por outro lado, por ocasião do TxH, a expressão do VEGF A na AB apresentou um padrão característico de cirrose, isto é, predominantemente intralobular. Os achados, por ocasião da Portoenterostomia, assemelham-se, portanto, ao modelo de deprivação sanguínea total às estruturas portais desenvolvido por Beaussier *et al.*(2005).

6.2 Hipóxia e expressão de VEGF A e seus receptores e FGFb

Será a hipóxia a principal causa do aumento de expressão do VEGF A em nossos pacientes?

Por a hipóxia mostrar-se como o principal mecanismo sobrerregulador de VEGF A e seus receptores 1 e 2 *in vivo*, Gerber *et al.* (1997) estudaram, *in vitro*, sob condições de hipóxia a expressão do VEGFR1 e VEGFR2. Eles observaram uma sobre-expressão do VEGFR1 e nenhuma ou pouca expressão do VEGFR2. Os autores, então, identificaram os elementos regulatórios envolvidos na resposta dos receptores do VEGF A à hipóxia. Eles isolaram a região promotora do gene do VEGFR1 e do VEGFR2 de ratos e testaram em conjunção com o gene relator da luciferase. A hipóxia levou a uma intensa ativação por transcrição do promotor do VEGFR1, enquanto a transcrição do promotor do VEGFR2 praticamente não ocorreu. Uma análise de deleção promotora demonstrou uma região específica do promotor do VEGFR1 que parece ser necessária para a ativação da transcrição requerida em resposta à hipóxia. Gaudio *et al.*(2006) descreveram que uma importante diminuição do fluxo sanguíneo da artéria hepática em ratos com LDB induz, a redução na expressão do VEGFR2, em ductos biliares. Já o

VEGFR1 não foi expresso em colangiócitos tanto em ratos normais como também nos que sofreram LDB. Assim, a hipóxia seria determinante na diminuição da expressão do VEGFR2, reforçando nossa hipótese de ser o mecanismo hipóxico/ isquêmico o principal fator causal na AB. Nós também não encontramos expressão IHC de VEGFR1 em tecido hepático dos pacientes com AB e com CIH, mas observamos que o VEGFR2 teve sua maior expressão nos pacientes com CIH em relação ao pacientes com AB. Possivelmente, isso tenha ocorrido por não ser a hipóxia, apesar de existir, o principal agente causador da hepatopatia nos pacientes com CIH.

Rosmorduc, *et al.* (1999), utilizando modelo experimental de ligadura de ducto biliar, relacionou a hipóxia com a expressão do VEGF A em hepatócitos. Para a caracterização da hipóxia em tecido hepático, os autores utilizaram o pimonidazole, composto que é reduzido, ativado e ligado covalentemente por macromoléculas em células sob baixas concentrações de oxigênio. Houve, após a terceira semana de LDB, um padrão de expressão de pimonidazole similar à do VEGF A em hepatócitos. O FGFb teve sua expressão detectada mais tardiamente e sem respeitar o padrão de expressão do VEGF A e do pimonidazole. Portanto, os autores sugeriram a hipóxia como fator responsável pela expressão do VEGF A em hepatócitos em modelos de LDB, o que não se aplicaria ao FGFb.

Corpechot *et al.* (2000) relacionaram a extensão da expressão do VEGF A em explantes de fígados cirróticos à hipóxia, a qual pode ter sua origem de mecanismos diversos. Como esses autores, nós também identificamos uma intensa expressão de VEGF A em hepatócitos do material de explante de nossos pacientes. Honsawek *et al.* (2008) sugeriram a associação do FGFb sérico com a patogênese do processo inflamatório em pacientes com AB pós-Portoenterostomia, perpetuando a hipertensão porta nesses pacientes. Em nossos resultados, a expressão do FGFb foi observada

principalmente em PA, sem haver, contudo, sobre-expressão de FGFb nos pacientes com AB, em comparação com CIH.

Brogi *et al.*, em 1994, descreveram que tanto o VEGF como o FGFb, eram sobre-expressados em células musculares lisas quando o aumento do VEGF A era indiretamente causado por citocinas; quando era causado por hipóxia, somente o VEGF A era sobre-expressado.

Estes achados sugerem que a hipóxia possa ser o principal evento causador da expressão do VEGF A observada na parede arterial do tecido hepático de nossos pacientes, por ocasião da Portoenterostomia.

6.3 Hipóxia e estruturas portais

Qual a causa da provável presença de hipóxia em artérias e ductos portais?

Segundo Ankoma-Sey *et al.*, (2000), durante a fibrogênese, o excesso de MEC oferece resistência ao fluxo biliar e ao transporte de oxigênio, induzindo à hipóxia tecidual e levando à sobre-expressão do VEGF A o qual, por sua vez, também induz fibrogênese (YOSHIJI *et al.*, 2006). Como na AB existe uma intensa expansão portal, devido à presença edema e fibrose, como também infiltração inflamatória e proliferação ductal/ductular (SANTOS *et al.*, 1998), talvez essas alterações promovam distorção mecânica na estrutura arterial determinando hipóxia/isquemia.

Nossos achados mostram que a extensa proliferação biliar foi um fator determinante para a positividade do VEGF A nas estruturas portais na Portoenterostomia. É sabido que a proliferação biliar induz à sobre-expressão do VEGF A na tentativa de desenvolver novos vasos arteriais organizados para nutrir os neocolangiócitos e garantir sua sobrevivência celular e a diminuição da apoptose

(GAUDIO *et al.*, 2006). Por outro lado, o VEGF A produzido por colangiócitos, por mecanismo autócrino, estimula a proliferação biliar (GAUDIO *et al.*, 2006). De acordo com Gaudio *et al.* (2006), o VEGF A tem função importante, também por mecanismo parácrino, na proliferação de colangiócitos e o bloqueio de sua ação induz apoptose nessas células. Ainda é possível que haja compressão mecânica dos vasos arteriais causada pela expansão das estruturas biliares. Concordamos com Johnstone *et al.* (1976) e Alpini *et al.*, (1989) em que a proliferação biliar possa ser incapaz de restaurar o fluxo biliar, persistindo a colestase com intensa neocolangiogênese. Mantém-se, deste modo, o insulto agressivo. De fato, sabe-se que a proliferação biliar pode ter efeito deletério ao estimular a fibrogênese (KINNMAN *et al.*, 2002; KINNMAN *et al.*, 2003). Corroborando esse fato, nosso grupo recentemente avaliou, por método morfométrico, a percentagem de positividade de CK7 (marcador imunoistoquímico de estruturas biliares) em fígados de pacientes com AB por ocasião da Portoenterostomia e observou que a proliferação biliar foi o fator independente determinante de mau prognóstico pós-operatório. Neste estudo, a positividade do CK7 foi observada em ductulos periportais e periseptais, bem como em células distribuídas no parênquima hepático, com variável grau de severidade entre os diferentes casos. A positividade de CK7 teve como ponto de corte para o efeito máximo de sobrevida com fígado nativo no primeiro ano de vida o valor de 10.8%. Sobreviveram com seu fígado nativo até o fim do primeiro ano de vida 87,9%±5,7% dos pacientes com PCK7 menor que 10.8% (p<0,001) (SANTOS *et al.*, 2009). Observando a figura abaixo, podemos identificar a intensa proliferação ductular em fígado de pacientes com AB, a qual foi associada por Santos *et al.* (2009), a um pior prognóstico no primeiro ano de vida.

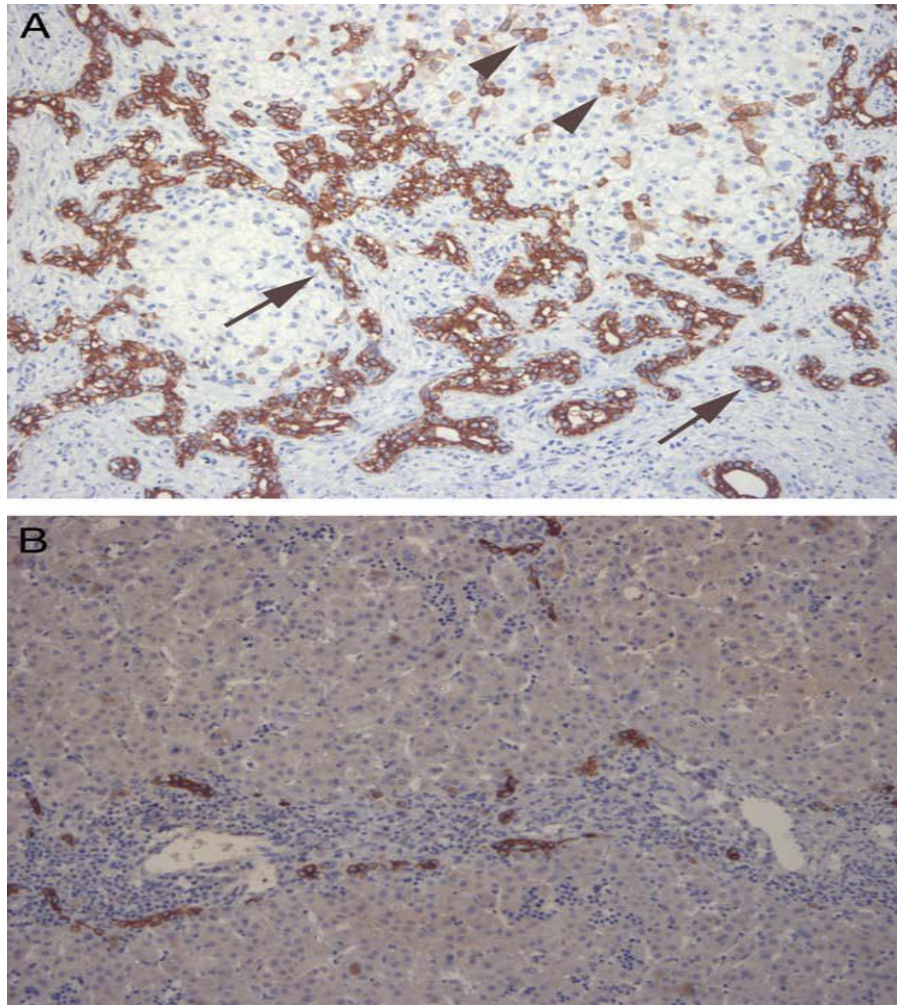


Figura 6 - Proliferação ductular-PCK7 em fígado de pacientes com AB. A, fígado com alta PCK7(15%). Reação ductular periportal/periseptal (setas) e células distribuídas pelo parênquima hepático (cabeças de seta). B, fígado com pouca positividade de CK7(1.23%).
(Fonte: Santos *et al.*, 2009)

6.4 Colangiócitos e fibrogênese

Quais são os possíveis mecanismos pelos quais os colangiócitos induzem a fibrose na AB?

Os colangiócitos podem estimular a fibrogênese portal por diferentes mecanismos: 1) estimulação da fibrogênese celular portal através da liberação de fatores pró-mitogênicos, pró-fibrogênicos, quimiotáticos e antiapoptóticos (BEAUSSIER *et al.*, 2007; KINNMAN *et al.*, 2003); 2) ativação de miofibroblastos portais (KRUGLOV *et al.*, 2006), ou 3) diretamente, agindo na acumulação de MEC (MURAWAKI *et al.*, 1997). Mas evidências recentes apresentam ainda outro mecanismo: em doenças hepáticas crônicas em humanos, as células que formam ductos biliares de pequeno e médio tamanho e a reação ductular sofrem transição epitélio-mesenquimatosa, resultando em formação de fibroblastos invasivos. O processo é provavelmente guiado por TGF β local, secretado por células T (RYGIEL *et al.*, 2008), e regulado por *Sonic-hedgehog* (OMENETTI *et al.*, 2008).

Na tabela 5, pode ser observada a relação estatisticamente significativa entre PCK7 e VEGF A na PA ($p < 0,001$) e, na tabela 6, demonstra-se que a expressão do VEGF A se associa à positividade do CK7. Por outro lado, o distúrbio que sobrerregula o VEGF A em parede de artérias portais sugere isquemia, e a anormalidade biliar presente na AB parece originar-se de um processo por uma única via. Como pode ser visto na tabela 3, analisamos a expressão do VEGF A no *porta hepatis* de 16 pacientes, e observamos a presença de artérias distorcidas, com camada muscular irregular e/ou espessada, achado esse descrito previamente por outros autores (GAUTIER *et al.*, 1981). Houve intensa expressão do VEGF A, reconhecido importante marcador angiogênico de hipóxia, nas artérias e nos ductos biliares remanescentes. Esses achados demonstram

que o processo hipóxico/isquêmico, o qual está afetando também as estruturas do espaço porta, principalmente a parede arterial, está ainda presente ajusante, agindo no sítio da obstrução dos ductos biliares extra-hepáticos. Interessantemente, no *porta hepatitis*, nós observamos uma diferença no índice de positividade do VEGF A entre os grupos de AB com e sem MEH, sendo maior no segundo grupo. Esses achados de diferentes padrões de hipóxia do epitélio biliar no *porta hepatitis* nas formas clínicas podem sugerir que o insulto causal atue em diferentes momentos da doença. Talvez a hipóxia não seja o principal fator envolvido no determinismo da forma embriônica de AB.

Em relação aos receptores do VEGF A, nós observamos, como apresentado em nossos resultados, que a expressão reduzida do VEGFR2 em pacientes com AB, tanto em DB como em hepatócitos, sendo sua maior expressão identificada nos pacientes com CIH que nos pacientes com AB. Não encontramos, na literatura, até o momento, outro estudo que tenha avaliado a expressão dos receptores de VEGF A nos pacientes com AB para comparar com os nossos resultados. Mas sabemos que o VEGFR2 pode expressar-se em fígados de pacientes normais e com hepatopatias (FERRARA, 2004). Talvez, por isso, não nos tenha surpreendido a característica de expressão do VEGFR2 em nossos achados.

Em estudos experimentais, Gaudio *et al.* (GAUDIO *et al.*, 2006; GAUDIO *et al.*, 2006a; GAUDIO *et al.*, 2006b) observaram fatos extremamente interessantes: 1) ratos que sofreram apenas ligação de ducto biliar (LDB) apresentaram proliferação de plexo peribiliar e sobre-expressão de VEGF A e VEGFR2 em ductos biliares; 2) ratos que sofreram ligação da artéria hepática (LAH) associada com LDB não apresentaram proliferação do PVP como os ratos que sofreram apenas LDB; 3) o tratamento com VEGF A recombinante (r-VEGF A) preveniu a ausência de proliferação do PVP, em

ratos com LAH; 4) a LAH diminuiu o número de colangiócitos positivos para VEGF A e VEGFR2; e o uso de r-VEGF A reestabeleceu a expressão de VEGF-A e VEGFR2 nos ratos com LAH e com LDB. Esses autores apontam que uma drástica redução do fluxo sanguíneo da artéria hepática em ratos com LDB induz, além da redução da proliferação do PVP, a redução tanto do VEGF A como do seu receptor VEGFR2, em ductos biliares. Essa redução levará, eventualmente, à apoptose das células do epitélio biliar e ao desaparecimento biliar.

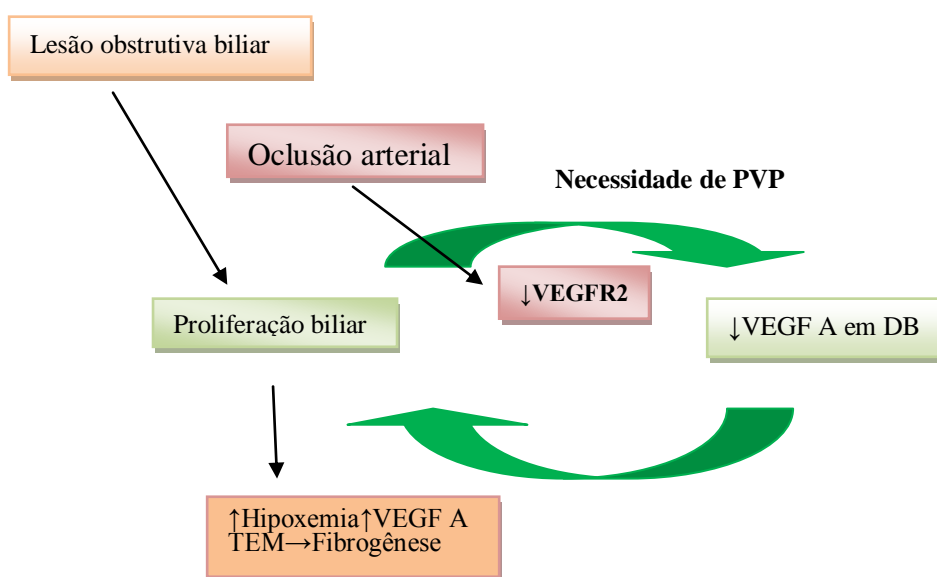


Figura 7 - Diminuição da expressão de VEGFA e VEGFR2 por oclusão de artéria hepática e ducto biliar.

Nossos achados mostram que o VEGFR2 está diminuído em ductos biliares de pacientes com AB, sugerindo a possibilidade de que, nessa desordem, exista um quadro de bloqueio da artéria hepática associado à obstrução mecânica dos ductos biliares. Como anteriormente referido no estudo experimental de Gaudio, a obstrução mecânica da via biliar associada à LAH promoveu a diminuição do VEGF A. Nossos pacientes com AB não apresentaram padrão similar de expressão do VEGF A em DB. Mas também não houve aumento do VEGF A como poderia ser esperado nos quadros de obstrução biliar isolada. Tais constatações, porém, não excluem a possibilidade de haver regulação reduzida de VEGF A e VEGFR2 em ductos biliares. Talvez não tenhamos

observado essa redução por ser ela tempo-dependente e por nós estarmos observando apenas uma etapa do desaparecimento os ductos biliares na AB.

Nós postulamos que a artéria hepática possa estar influenciando, via mecanismo parácrino, a positividade do VEGFR2 nas estruturas biliares, levando à proliferação biliar. Isto ocorreria por via similar àquela dos ductos biliares quando estimulam a produção de VEGF A na parede arterial.

As alterações histopatológicas dos ramos intra-hepáticos da artéria hepática têm sido observadas em pacientes com AB. Stowens (1963); Brough & Bernstein (1969); Ho *et al.* (1993); Kobayashi *et al.* (2003); Uflacker & Pariente (2004) e outros autores sugeriram que essa anomalia da artéria hepática pode representar o evento inicial desta doença. Em nossos resultados, observamos a relação entre a expressão do VEGF A nas estruturas hepatobiliares, principalmente em DB, e o espessamento da camada média dos ramos da artéria hepática. Em 2005, nosso grupo detectou por método morfométrico: 1) a existência de espessamento da camada média dos ramos da artéria hepática em pacientes com AB por ocasião da Portoenterostomia, sugestivo de remodelamento vascular; 2) a progressão do remodelamento vascular no período entre a Portoenterostomia e o TxH, e; 3) uma presumível relação entre o espessamento da camada média arterial e a rarefação dos ductos biliares. No período entre a Portoenterostomia e o TxH, o remodelamento vascular pareceu estender-se dos maiores ramos arteriais centrais para os menores ramos periféricos. Desse modo, uma arteriopatia poderia induzir o desarranjo de todo o sistema hepatobiliar, incluindo ductos biliares, veias e nervos, bem como as próprias paredes arteriais, todos nutridos por sangue arterial. Dados do presente estudo apresentados anteriormente, sugerem que a produção de VEGF A em ductos biliares e em parede arterial está associada ao espessamento da camada média arterial em pacientes com AB. Geiger *et al.* (2000)

demonstraram que o VEGF A está implicado na atividade angioproliferativa das formas graves de arteriopatia plexogênica pulmonar, caracterizada por intensa hiperplasia da camada média arterial, visto que a expressão do VEGF A foi mais frequente e intensa na túnica média e no endotélio de pacientes com esse nível de hipertensão pulmonar em comparação com as formas mais leves da doença. Nas artérias, além da expressão endotelial, o VEGF A se expressou nas células musculares lisas, onde pode ser sintetizado.

Yang *et al.* (2004) demonstraram importante papel do VEGF A na indução da migração das CML, fenômeno importante na angiogênese e na remodelagem microvascular patológica, observada em condições, como malformações arteriovenosas cerebrais, arteriosclerose, além da hipertensão pulmonar (YAO, *et al.*, 2007). Richard, *et al.* (2000) observaram que a expressão do VEGF A nas células musculares lisas vasculares apresenta características únicas, sendo induzida por agonistas como angiotensina II, trombina, PDGF, serotonina e, em menor intensidade, o FGF2.

Em relação à proliferação de CML, o VEGF A atua indiretamente, aumentando o efeito mitogênico de outros fatores. O VEGF A aumenta a resposta mitogênica do FGFb em células musculares lisas *in vivo* via expressão de fms-like tyrosine kinase-1 (COUPER *et al.*, 1997), agindo sobre o influxo de cálcio para as CML (CHANDRA *et al.*, 2005). Parente *et al.*, (2004) demonstraram que, na presença de hipóxia, o VEGF A e o MCP-1, juntos, são responsáveis pela proliferação de CML vasculares. É interessante destacar que o MCP-1 atua também na regulação de transformação epitélio mesenquimal dos ductos biliares em miofibroblastos (KRULOV *et al.*, 2006).

Nosso trabalho apresenta limitações para a sua interpretação. O fato de inexistir publicação prévia sobre a expressão de VEGF A e seus receptores em casos de AB dificulta a análise dos resultados. No entanto, nossos resultados mostram-se relevantes,

considerando que a existência de hipóxia parece estar diretamente envolvida no processo atrésico.

7 CONCLUSÕES

Este estudo permitiu-nos chegar às seguintes conclusões:

1. Foi possível avaliar a expressão imunoistoquímica dos fatores de crescimento VEGF A e de seus receptores VEGFR1 e VEGFR2, como também a expressão do FGFb, em estruturas hepatobiliares de pacientes com AB.
 2. Houve relação estatisticamente significativa na expressão do VEGF A entre pacientes com AB por ocasião da PE e TxH e aqueles com outras causas de CIH. O VEGF A em fígado de pacientes por ocasião da Portoenterostomia foi especialmente expressado em estruturas portais, principalmente na PA, enquanto no fígado de pacientes por ocasião do TxH, foi mais expressado no parênquima.
 3. O VEGF A foi fortemente expressado no *porta hepatitis* dos pacientes com AB, tanto nos ductos biliares remanescentes como na PA, as quais se encontram espessadas e irregulares. O índice de positividade do VEGF A foi maior nos pacientes com AB sem MEH;
 4. Poucos pacientes expressaram VEGFR1 em PA e o maior índice de positividade do VEGFR1 ocorreu em hepatócitos dos pacientes com AB sem MEH;
 5. O VEGFR2 foi menos expressado em ductos biliares de pacientes com AB que em pacientes com CIH, o que também ocorreu em hepatócitos;
 6. Não existiu diferença no índice de positividade do FGFb nas estruturas portais entre os grupos. Observamos que a positividade do VEGF A foi de forma independente, correlacionada com a extensão de proliferação biliar avaliada por PCK7, mas não com idade por ocasião da PE ou extensão de colágeno;
 7. Finalmente, a positividade do VEGF A em ductos biliares e parede arterial foi associada com o espessamento da camada média arterial.
-

Nossos achados sugerem que um processo isquêmico, associado ao comprometimento ductal/ductular, contribui de forma determinante para a evolução da lesão hepática na AB e teria sua origem em *porta hepatis* com comprometimento das paredes arteriais.

8 REFERÊNCIAS

Abe K, Kiuchi T, Tanaka K, Edamoto Y, Aiba N, Sata T. Characterization of erythrovirus B19 genomes isolated in liver tissues from patients with fulminant hepatitis and biliary atresia who underwent liver transplantation. *International Journal Medical Sciences* 2007; Apr 5; 4(2):105-9.

Abramson S, Berdon W, Altman R, Amodio J, Levy J. Biliary atresia and noncardiac polysplenic syndrome: US and surgical considerations. *Radiology* 1987; 163: 377– 379.

Alpert LI, Strauss L, Hirschhorn K. Neonatal hepatitis and biliary atresia associated with trisomy 17-18 syndrome. *New England of Journal Medicine* 1969; Jan 2; 280 (1):16-20.

Alpini G, Lenzi R, Zhai W-R, Slott PA, Liu MH, Sarkozi L, et al. Bile secretory function of intrahepatic biliary epithelium in the rat. *American Journal of Physiology* 1989; Jul; 257 (1pt1) :G124– G133.

Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z. Hypoxic Stimulation of Vascular Endothelial Growth Factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000; jan 31 (1) :141-148.

Arikan C, Berdeli A, Kilic M, Tumgor G, Yagci RV, Aydogdu S. Polymorphisms of the ICAM-1 gene are associated with biliary atresia. *Digestive Disease and Sciences* 2008; Jul; 53 (7):2000-2004.

Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P 2003 Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature Medicine* 2003 jul;9 (7) :936–943.

Balistreri W, Grand R, Hoofnagle J, Suchy F, Ryckman F, Perlmutter D, et al. Biliary atresia: current concepts and research directions – summary of a symposium. *Hepatology* 1996; Jun 23 (6): 1682–1692.

Banfi A, von Degenfeld G, Blau HM. Critical role of microenvironmental factors in angiogenesis. *Current Atherosclerosis Report* 2005; May 7 (3): 227–234.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; Apr 15; 87 (8): 3336–3343.

Batts KP. Ischemic cholangitis. *Mayo Clinic Proceedings* 1998; Apr; 73 (4):380–385.

Beaussier M, Wendum D, Fouassier L, Rey C, Barbu V, Lasnier E, Lienhart A, Scoazec JY, Rosmorduc O, Housset C. Adaptive bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia. *Journal of Hepatology* 2005;Feb; 42 (2): 257–265.

Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, Dumont S, Rey C, Lienhart A, Housset C. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injury. *Laboratory Investigation* 2007; Mar 87 (3): 292-303.

Becroft DM. Biliary atresia associated with prenatal infection by *Listeria monocytogenes*. *Archives of disease in Childhood* 1972; Aug; 47(254):656-60.

Bourdelat D, Moulinoux JP, Chambon Y, Babut JM. Infrahepatic bile duct proliferation in the gestating rat treated with 4, 4'-diaminodiphenylmethane (4,4DDPM). *Bulletin de L'Association des Anatatomistes (Nancy)* 1983; Dec; 67(199):375-382.

Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and FGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994;Aug; 90(2):649-652.

Brough A, Bernstein J. Liver biopsy in the diagnosis of infantile obstructive jaundice. *Pediatrics* 1969; Apr 43 (4): 519–526.

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.

Burch JM, Sokol RJ, Narkewicz MR, Reichlin M, Frank MB, MacKenzie T, Lee LA. Autoantibodies in mothers of children with neonatal liver disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2003; Sep; 37(3):262-267.

Carmeliet P, Ng Y, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I et al. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF₁₆₄ and VEGF₁₈₈. *Nature Medicine* 1999; May;5 (5): 495–502.

Carmeliet P, Jain R. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; Sep; 407 (6801): 249–257.

Carmi R, Magee C, Neill C, Karrer F. Extrahepatic biliary atresia and associated anomalies: etiologic heterogeneity suggested by distinctive patterns of associations. *American Journal of Medical Genetics* 1993; Mar45 (6): 683–693.

Cassiman Kinnman N, Francoz C, Barbu V, Wendum D, Rey C, Hultcrantz R, Poupon R, Housset C. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Laboratory Investigation* 2003; Feb; 83 (2):163–173.

Cauduro S. Atresia biliar extra-hepática: métodos diagnósticos. *Jornal de Pediatria* 2003, vol 9 Nº 2.

Chandra R. Biliary atresia and other structural anomalies in the congenital polysplenia syndrome. *The Journal of Pediatrics* 1974; Nov; 85 (5): 649–655.

Chandra A, Angle N. Vascular endothelial growth factor stimulates a novel calcium-signaling pathway in vascular smooth muscle cells *Surgery* 2005; Oct; 138 (4):780-7.

Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, Le Pommelet C, Golmard J, Reding R, et al. Is the Kasai operation still indicated in children of more than 3 months diagnosed with biliary atresia? *The Journal of Pediatrics* 2001; Feb 138 (2): 224–228.

Chardot C. Biliary Atresia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006; Jul 26;1:28.

Chevallier M, Guerret S, Chossegras P, Gerard F, Grimaud J. A Histological semiquantitative scoring for evaluation of hepatic fibrosis in liver needle biopsy specimens: comparison with morphometric studies. *Hepatology* 1994; Aug; 20 (2): 349–355.

Cho K, Lunderquist A. The peribiliary vascular plexus: the microvascular architecture of the bile duct in the rabbit and in clinical cases. *Radiology* 1983; May; 147 (2): 357–364.

Clotman F, Lannoy VJ, Reber M, Cereghini S, Cassiman D, Jacquemin P, Roskams T, Rousseau GG, Lemaigre FP. The oncut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. *Development* 2002; Apr; 129 (8):1819–1828.

Clotman F, Libbrecht L, Gresh L, Yaniv M, Roskams T, Rousseau GG, Lemaigre FP. Hepatic artery malformations associated with a primary defect in intrahepatic bile duct development. *Journal of Hepatology* 2003; Nov; 39 (5): 686–692.

Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-Induced VEGF and Collagen I Expressions Are Associated With Angiogenesis and Fibrogenesis in Experimental Cirrhosis. *Hepatology* 2002; May; 35 (5):1010-1021.

Couper LL, Bryant SR, Eldrup-Jorgensen J, Bredenberg CE, Lindner V. Vascular endothelial growth factor increases the mitogenic response to fibroblast growth factor-2

in vascular smooth muscle cells in vivo via expression of fms-like tyrosine kinase-1. *Circulation Research* 1997; Dec; 81(6):932-939.

Crawford A, Lin X, Crawford J. The normal adult human liver biopsy: a quantitative reference standard. *Hepatology* 1998; Aug 28 (2): 323–331.

Davenport M, Savage M, Mowat A, Howard E. Biliary atresia splenic malformation syndrome: an etiologic and prognostic subgroup. *Surgery* 1993; Jun; 113 (6): 662–668.

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. *Journal of Pediatric* 2006; Sep; 149 (3):393-400.

Davit-Spraul A, Baussan C, Hermeziu B, Bernard O, Jacquemin E. CFC1 gene involvement in biliary atresia with polysplenia syndrome. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2008; Jan; 46 (1):111-112.

Desmet V. Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: variations on the theme “Ductal Plate Malformation”. *Hepatology* 1992; Oct; 16 (4): 1069–1083.

Desmet V, Roskams T, Van Eyken P. Ductular reaction in the liver. *Pathology-Research and Practice* 1995; Jul; 191 (6):513–524.

Desmet VJ. Ludwig symposium on biliary disorders—part I. Pathogenesis of ductal plate abnormalities. *Mayo Clinic Proceedings* 1998; Jan; 73 (1):80-89.

Desmet V, Van Eyken P, Roskams T. Embriology of the liver and intrahepatic biliary tract, an overview of malformations of the bile duct. In: Bircher J, Banhamon J, McIntyre N, Rizzetto M, Rodés J, editors. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. Oxford: Oxford University Press. 2nd ed. 1999. p.51– 61.

Dimmick J. Extrahepatic biliary atresia and the polysplenia syndrome. *The Journal of Pediatrics* 1975; Apr; 86 (4): 644–645.

Donaldson PT, Clare M, Constantini PK, Hadzic N, Mieli-Vergani G, Howard E, Kelley D. HLA and cytokine gene polymorphisms in biliary atresia. *Liver* 2002; Jun; 22(3):213-219.

Drut R, Drut RM, Gómez MA, Cueto Rúa E, Lojo MM. Presence of human papillomavirus in extrahepatic biliary atresia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1998; Nov; 27(5):530-5.

Dunigan TH, Werlin SL. Extrahepatic biliary atresia and renal anomalies in fetal alcohol syndrome. *American Journal of Disease of Children*; 1981 Nov; 135 (11):1067-1068.

Ekataksin W, Kaneda K. Liver microvascular architecture: an insight into the pathophysiology of portal hypertension. *Seminars in Liver Disease*, 1999; 19 (4): 359–382.

Ekataksin W. The isolated artery: an intrahepatic arterial pathway that can bypass the lobular parenchyma in mammalian livers. *Hepatology* 2000; Feb; 31(2): 269–279.

E.Kuntz, H. D Kuntz. In: *Hepatology: Principles and Practice*. 2nd Ed. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2006.

El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, Nabika T, Nagasue N. 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; Jun; 27 (6):1554-1562.

Fabris L, Cadamuro M, Fiorotto R, Roskams T, Spirli C, Melero S, Sonzogni A, Joplin RE, Okolicsanyi L, Strazzabosco M.. Effects of angiogenic factor overexpression by human and rodent cholangiocytes in polycystic liver diseases. *Hepatology* 2006a; May 43 (5): 1001–1012.

Fabris L, Cadamuro M, Libbrecht L, Spirlì C, Fiorotto R, Okolicsanyi L, Strazzabosco M, Roskams T. Role of angiogenic growth factors in the cross-talk between epithelial and vascular cells during human liver development. *Hepatology* 2006b; 44:391A

Ferrara N, Gerber H, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 2003; Jun; 9 (6): 669-676.

Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews* 2004; Aug; 25 (4):581–611.

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 Jul; 27 (1): 57-64.

Fischler B, Papadogiannakis N, Nemeth A. Aetiological factors in neonatal cholestasis. *Acta Paediatrica.* 2001 Jan; 90 (1):88-92.

Fjaer RB, Bruu AL, Nordbø SA. Extrahepatic bile duct atresia and viral involvement. *Pediatric Transplantation* 2005; Feb; 9(1):68-73.

Friedman S. 2000. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 275, No. 4, Issue of January 28, pp. 2247–2250.

Friedman S. Hepatic fibrosis. In: Schiff E, Sorrell M, Maddrey W (Eds.). *Schiff's Diseases of the Liver.* 10th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2007; pp.395-418.

Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Franchitto A, Onori P, Ueno Y, Marziani M, Fava G, Venter J, Reichenbach R, Summers R, Alpini G. Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct

ligated rats. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2006; 291:G307-G317.

Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Ueno Y, Meininger C, Franchitto A, Onori P, Marzioni M, Taffetani S, Fava G, Stoica G, Venter J, Reichenbach R, De Morrow S, Summers R, Alpini G. Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology* 2006a; Apr; 130 (4):1270- 1282.

Gaudio E, Franchitto A, Pannarale L, Carpino G, Alpini G, Francis H, Glaser S, Álvaro D, Onori P. Cholangiocytes and blood supply. *World Journal of Gastroenterology* 2006b; Jun; 14; 12(22): 3546-3552.

Gautier M, Eliot N. Extrahepatic biliary atresia. Morphological study of 98 biliary remnants. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 1981; Aug 105 (8):397-402.

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; Jun; 191(2):202-207.

Gille H, Kowalski J, Yu L, Chen H, Pisabarro MT, Davis-Smyth T, Ferrara N. A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits VEGF-dependent PI 3 kinase activation and endothelial cell migration. *EMBO Journal* 2000; Aug; 19 (15): 4064–4073.

Glaser S, Gaudio E, Miller, Alvaro D, Alpini G. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. Author manuscript 2009; available in PMC April 30.

Gouysse G, Couvelard A, Frachon S, Bouvier R, Nejari M, Dauge M-C, Feldmann G, Hénin D, Scoazec J-Y. Relationship between vascular development and vascular differentiation during liver organogenesis in humans. *Journal of Hepatology* 2002; Dec; 37 (6): 730–740.

Gouw ASH, Van den Heuvel MC, Boot M, Slooff MJH, Poppema S, de Jong KP. Dynamics of the vascular profile of the finer branches of the biliary tree in normal and diseased human livers. *Journal of Hepatology* 2006; Sep; 45 (6): 393-400.

Guerra Aguirre E, Jara Vega P, Arroba Basanta ML, Díaz Fernández MC, Larrauri Martínez J, Vázquez González C. Viral infection and obstructive cholangiography in children. *Anales Españoles de Pediatría* 1989; Feb; 30 (2):91-94.

Gyorffy A, Baranyai Z, Cseh A, Munkácsy G, Jakab F, Tulassay Z, Gyorffy B. Promoter analysis suggests the implication of NFkappaB/C-Rel transcription factors in biliary atresia. *Hepatogastroenterology*. 2008 Jul-Aug; 55(85):1189-1192.

Haratake J, Hisaoka M, Yamamoto O, Horie A. Morphological changes of hepatic microcirculation in experimental rat cirrhosis: a scanning electron microscopic study. *Hepatology* 1991 I; May; 13(15): 952– 956.

Harper P, Plant JW, Unger DB. Congenital biliary atresia and jaundice in lambs and calves. *Australian Veterinary Journal* 1990; Jan; 67 (1):18-22.

Hayashida M, Nishimoto Y, Matsuura T, Takahashi Y, Kohashi K, Souzaki R, Taguchi. The evidence of maternal microchimerism in biliary atresia using fluorescent in situ hybridization. *Journal of Pediatric Surgery* 2007; Dec; 42 (12):2097-2101.

Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 1998; Aug 4; 95 (16):9349– 9354.

Ho C, Shioda K, Shirasaki K, Takahashi S, Tokimatsu S, Maeda K. The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the hepatobiliary system and the hepatic artery. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1993; Jan; 16 (1) 53– 60.

Holmes J. Congenital obliteration of the bile ducts: diagnosis and suggestions for treatment. *American journal of diseases of children* 1916; 11(6) 405-431. *Radiology* 2007; 244:845-851.

Honsawek S, Chongsrisawat V, Vejchapipat P, Thawornsuk, Poovorawan Y. High levels of serum basic fibroblast growth factor in children with biliary atresia. *Hepato-Gastroenterology* 2008; Jul-Aug; 55 (85): 1184-1188.

Humphrey T, Stringer M. Biliary atresia: US diagnosis. *Radiology* 2007; Sep 244 (3): 845-851.

Hung PY, Chen CC, Chen WJ, et al. Long-term prognosis of patients with biliary atresia: a 25 year summary. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2006; Feb; 42 (2):190-195.

Hussein A, Wyatt J, Guthrie A, Stringer M. Kasay portoenterostomy- new insights from hepatic morphology. *Journal of Pediatric Surgery* 2005; Feb; 40 (2):322-326.

Icardo J, Sanchez de Veja M. Spectrum of heart malformations in mice with situs solitus, situs inversus, and associated visceral heterotaxy. *Circulation* 1991; Dec; 84 (6): 2547-2558.

Irie N, Murai T, Hosaka N, Takada Y, Sakamoto S, Tanaka K. Maternal HLA class I compatibility in patients with biliary atresia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2009; Oct; 49 (4):488- 492.

Jenner RE, Howard ER. Unsaturated monohydroxy bile acids as a cause of idiopathic obstructive cholangiopathy. *Lancet* 1975; Nov 29; 2(7944):1073-1075.

Johnstone J, Lee E. A quantitative assessment of the structural changes in the rat's liver following obstruction of the common bile duct. *British Journal of Experimental Pathology* 1976; Feb; 57 (1):85-94.

Kim W, Cheon J, Youn B, Kim YW, kim I, Yeon K, Seo J, park k. Hepatic arterial diameter measured with US : Adjunct for US diagnosis of biliary atresia. *Radiology* 2007; Nov; 245(2): 249-255.

Kinnman N, Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Frontiers in Bioscience* 2002; Feb 1; 7:496–503.

Kinnman N, Francoz C, Barbu V, Wendum D, Rey C, Hultcrantz R, Poupon R, Housset C. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Laboratory Investigation* 2003; Feb; 83 (2):163–173.

Kobayashi H, Stringer M. Biliary atresia. *Seminars in Neonatology* 2003; Oct; 8 (5), 383–391.

Kobayashi H, Tamatani T, Tamura T, Kusafuka J, Yamataka A, Lane GJ, Kawasaki S, Ishizaki Y, Mizuta K, Kawarasaki H, Gittes GK. Maternal microchimerism in biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 2007; Jun; 42(6):987-91.

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; Marc 15 (3): 411– 418.

Kruglov EA, Nathanson RA, Nguyen T, Dranoff JA. Secretion of MCP-1/CCL2 by bile duct epithelia induces myofibroblastic transdifferentiation of portal fibroblasts. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2006; Abr; 290 (4):G765–G771.

Kuntz E, Kuntz H. In: *Hepatology: Principles and Practice*. 2nd Ed. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Germany 2006.

Lam F, Chan W, Lam S, chu W, kwong N. Proximal 10q trisomy: a new case with anal atresia. *Journal of Medical Genetics* 2000; Sep; 37(9): 24.

Lautt W, Greenway C. Conceptual review of the the hepatic vascular bed. *Hepatology* 1987; Oct; 7 (5): 952–963.

LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003; Feb; 299 (5608):890–893.

Lee HC, Chang TY, Yeung CY, Jiang CB, Chen WF, Chan HW, Liu HF, Lin M, Lee YJ. Variation in the Vascular Endothelial Growth Factor Gene is Associated With Biliary Atresia. *Journal of Clinical gastroenterology* 2009, Aug 25.

Levin JN. Amphetamine ingestion with biliary atresia. *Journal of Pediatric* 1971; Jul; 79 (1):130-131.

Libbrecht L, Cassiman D, Desmet V, Roskams T. The correlation between portal myofibroblasts and development of intrahepatic bile ducts and arterial branches in human liver. *Liver* 2002; Jun 22 (3):252–258.

Li M, Crawford J. The pathology of cholestasis. *Seminars in Liver Disease* 2004; Feb; 24 (1): 21-42.

Mac Gabhann F, Ji JW, Popel AS. Computational model of vascular endothelial growth factor spatial distribution in muscle and pro-angiogenic cell therapy. *PLoS Computational Biology* 2006; Sep; 2 (9); 127:1107-1120.

Mahjoub F, Shahsiah R, Ardalan FA, Iravanloo G, Sani MN, Zarei A, Monajemzadeh M, Farahmand F, Mamishi S. Detection of Epstein Barr Virus by Chromogenic In Situ Hybridization in cases of extra-hepatic biliary atresia. *Diagnostic Pathology* 2008; Apr 28; 3:19.

Maksem J. Polysplenia syndrome and splenic hypoplasia associated with extrahepatic biliary atresia. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 1980; Apr; 104 (4): 212–214.

Maruyama K, Koizumi T, Ikeda H. Partial monosomy 10q with partial trisomy 11q due to paternal balanced translocation. *Journal of Paediatric and Child Health* 2001; Apr; 37(2):198-200.

Masyuk TV, Ritman EL, LaRusso NF. Hepatic artery and portal vein remodeling in rat liver: vascular response to selective cholangiocyte proliferation. *American Journal of Pathol* 2003;Apr; 162 (4):1175–1182.

Masseroli M, Caballero T, O'valle F, Del Moral R, Pérez-Milena A, Del Moral R. Automatic quantification of a new image analysis method comparison with semi-quantitative indexes of fibrosis. *Journal of Hepatology* 2000; Marc; 32 (3): 453–464.

McCuskey R. The hepatic microvascular system. In: Arias I, Boyer J, Fausto N, Jakoby W, Schachter D, Shafritz D, editors. *The Liver Biology and Pathobiology*. 3rd ed. New York: Raven Press Ltd.; 1994. p.1089 – 1106.

Medina J, Arroyo AG, Sanchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in Chronic Inflammatory Liver Disease. *Hepatology* 2004; May; 39 (5):1185–1195.

Medina J, Sanz-Cameno P, García-Buey L, Martín-Vílchez S, López-Cabrera M, Moreno-Otero R. Evidence of angiogenesis in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical descriptive study. *Journal of Hepatology* 2005; Jan; 42 (1): 124–131

Mise M, Arii S, Higashitani H, Furutani M, Niwano M, Harada T, Ishigami SI, Toda Y, Nakayama H, Fukumoto M, Fujita J, Imamura M. Clinical Significance of Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Gene Expression in Liver Tumor . *Hepatology* 1996; Marc; 23 (3):455 - 464.

Misra SP, Dwivedi M. Pancreaticobiliary ductal union. *Gut* 1990; Oct; 31(10):1144-1149.

Muraji T, Hosaka N, Irie N, Yoshida M, Imai Y, Tanaka K, Takada Y, Sakamoto S, Haga H, Ikehara S. Maternal microchimerism in underlying pathogenesis of biliary atresia: quantification and phenotypes of maternal cells in the liver. *Pediatrics* 2008; Marc; 121 (3):517-521.

Murawaki Y, Ikuta Y, Idobe Y, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the liver patient with chronic liver disease. *Journal of Hepatology* 1997; Jun; 26 (6):1213-1219.

Nakada K, Kawaguchi F, Wakisaka M, Nakada M, Enami T, Yamate N. Digestive tract disorders associated with asplenia/polysplenia syndrome. *Journal of Pediatric Surgery* 1997; Jan; 32 (1): 91 – 94.

Newman SL, Flannery DB, Caplan DB. Simultaneous occurrence of extrahepatic biliary atresia and fetal alcohol syndrome. *American Journal of Disease of Children* 1979; Jan; 133(1):101.

Ohi R. Biliary atresia. A surgical perspective. *Clinics In Liver Disease* 2000; Nov; 4 (4): 779–804.

Oliveira NL, Kanawaty FR, Costa SC, Hessel G. Infection by cytomegalovirus in patients with neonatal cholestasis. *Arquivos em Gastroenterologia* 2002; Apr-Jun; 39(2):132-136.

Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Witek RP, Alpini G, Venter J, Vandongen HM, Syn WK, Baroni GS, Benedetti A, Schuppan D, Diehl AM. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *Journal of Clinical Investigation* 2008; Oct118 (10):3331-3342.

Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, et al. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 2004; Feb; 113 (4):516–527.

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. *Journal of Pediatric Surgery* 2000; May; 35(5):745-747.

Parenti A, Bellik L, Brogelli L, Filippi S, Ledda S. Endogenous VEGF-A is responsible for mitogenic effects of MCP-1 on vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Heart Circulatory Physiology* 2004; May; 286 (5): H1978–H1984.

Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *Journal of Biological Chemistry* 1994; Oct; 269 (41):25646–25654.

Perlmutter D, Shepherd R. Extrahepatic biliary atresia: a disease or a phenotype? *Hepatology* 2002; Jun; 35 (6): 1297-1304.

Rakheja D, Maitra A, Kapur P, Weinberg AG. Extrahepatic biliary atresia demonstrates abnormal persistence of HES1 protein in neonatal biliary epithelium: an immunohistochemical study. *Pediatric and Developmental Pathology* 2006; Mar-Apr; 9(2):98-102.

Rauschenfels S, Krassmann M, Al-Masri AN, Verhagen W, Leonhardt J, Kuebler JF, Petersen C. Incidence of hepatotropic viruses in biliary atresia. *European Journal of Pediatrics* 2009; Apr; 168(4):469-476.

Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; Sep 1; 275 (35):26765–26771.

Riepenhoff-Talty M, Gouvea V, Evans MJ, Svensson L, Hoffenberg E, Sokol RJ, Uhnou I, Greenberg SJ, Schäkel K, Zhaori G, Fitzgerald J, Chong S, el-Yousef M, Nemeth A, Brown M, Piccoli D, Hyams J, Ruffin D, Rossi T. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *The Journal of Infectious Diseases* 1996; Jul; 174(1):8-15.

Rodin A, Sloane J, Nghiem Q. Polysplenia and severe congenital heart disease and Howell-Jolly bodies. *American Journal of Clinical Pathology* 1972; Aug; 58 (2): 127–134.

Roncalli M, Roz E, Coggi G, Di Rocco M, Bossi P, Minola E, et al. The vascular profile of regenerative and dysplastic nodules of the cirrhotic liver: implications for diagnosis and classification. *Hepatology* 1999; Nov; 30 (5): 1174–1178.

Rosmorduc O, Wendum D, Corpechot C, et al.,1999. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *American Journal of Pathology* 1999; Oct; 155 (4):1065-1073.

Rygiel KA, Robertson H, Marshall HL, Pekalski M, Zhao L, Booth TA, Jones DE, Burt AD, Kirby JA. Epithelial–mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. *Laboratory Investigation* 2008; Feb; 88: (2)112–123.

Santos J. Presença de malformação de placa ductal e de alterações em artérias e arteríolas nos espaços-porta de pacientes com atresia biliar.[Tese de doutorado]. Porto Alegre: Departamento de Pediatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002.

Santos J, Almeida H, Cerski C, Silveira T. Histopathological diagnosis of intra- and extrahepatic neonatal cholestasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1998; Jul; 31 (7): 911–919.

Santos J, Silveira T, Silva D, Cerski T, Wagner B. Medial thickening of hepatic artery branches in biliary atresia, a morphometric study. *Journal of Pediatric Surgery* 2005; Apr; 40(4):637-642.

Santos J, Kieling C, Meurer L, Vieira S, Ferreira C, Lorentz A, Silveira T. The extent of biliary proliferation in liver biopsies from patients with the postoperative prognosis. *Journal of Pediatric Surgery* 2009; Apr; 44 (4): 695-701.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; Jul; 376 (6535):62– 66.

Shibuya M. Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 39, No. 5, Sep 2006; pp. 469-478.

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

Silveira T, Salzano F, Howard E, Mowat A. Congenital structural abnormalities in biliary atresia: evidence for etiopathogenic heterogeneity and therapeutic implications. *Acta Paediatrica Scandinavica* 1991; Dec; 80 (12): 1192–1199.

Silveira T, Salzano F, Donalson P, Mieli-Vergani G, Howard E, Mowat A. Association between HLA and extrahepatic biliary atresia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1993; Feb; 16 (2): 114–117.

Silveira T, Salzano F, Howard E, Mowat A. The relative importance of familial, reproductive and environmental factors in biliary atresia: etiological implications and effect on patient survival. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1992; 25 (7): 673–681.

Siviero I, Ferrante SM, Meio IB, Madi K, Chagas VL. Hepatobiliary effects of cholic and lithocholic acids: experimental study in hamsters. *Pediatric Surgery International*. 2008; Mar; 24(3):325-331.

Smith F, Arias J, Elmquist T, Mazzara J. Microvascular cytomegalovirus endothelialitis of the lung: a possible cause of secondary pulmonary hypertension in a patient with AIDS. *Chest* 1998; Jul; 114 (1):337–340.

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; Mar; 21(3):697-702.

Stowens D. Congenital biliary atresia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1963; Dec 30;111: 337–351.

Strazzabosco M & Fabris L. Functional anatomy of normal bile ducts. *The Anatomical Record* 2008; Jun; 291 (6): 653-660.

Takasaki S, Hano H. Three-dimensional observations of the human hepatic artery (arterial system in the liver). *Journal of Hepatology* 2001; Marc 34 (3): 455–466.

Takemura M, Oguma S, Mori S, Ishii M, Starzl T, Demetris A, et al. Peribiliary vascular diseases in rejected livers; computed-aided three dimensional reconstruction and morphometry. *Transplantation Proceedings* 1991; Feb;23 (1 pt 2): 1409–1412.

Tammela T, Enholm B, Alitalo K, et al. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Research* 2005; Feb 15; 65 (3):550– 563.

Tanano H, Hasegawa T, Kawahara H, Sasaki T, Okada A. Biliary atresia associated with congenital structural anomalies. *Journal of Pediatric Surgery* 1999; Nov; 34 (11):1687–1690.

Terada T, Ishida F, Nakanuma Y. Vascular plexus around intrahepatic bile ducts in normal livers and portal hypertension. *Journal of Hepatology* 1989; Marc; 8 (2): 139–149.

Tsukuda T, Nagata I, Sawada H, Murakami J, Hanaki K, Urashima H, Kaneda T, Shimizu N, Kaibara N, Kodama N, Ohzeki T, Shiraki K. Partial monosomy 10q and partial trisomy 9q anal atresia due to maternal translocation: t(9;10)(q32;q26). *Clinical Genetics* 1996; Oct; 50(4):220-222.

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; Nov 15; 60 (22): 6248-6252.

Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus SM, Le M, Karrer FM, Narkewicz MR, Tyson RW, Murphy JR, Low R, Brown WR. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology* 1998; Jun; 27(6):1475-1482.

Uematsu S, Toshihiro Higashi T, Nouse K, Kariyama K, Nakamura SI, Suzuki M, Nakatsukasa H, Kobayashi Y, Hanafusa T, Tsuji, Shiratori Y. Altered expression of vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor-2 and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2005; Apr; 20 (4): 583–588.

Uflacker R, Pariente D. Angiographic findings in biliary atresia *Cardiovascular and Interventional. Radiology* 2004; sep- Oct; 27 (5):486–490.

Vacanti JP, Folkman J. Bile duct enlargement by infusion of L-proline: potential significance in biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1979; Dec; 14(6):814-818.

Vanheule E, Geerts AM, Van Huysse J, Schelfhout D, Praet M, Van Vlierberghe, De Vos M, Colle I. An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in

cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. *International Journal of Experimental Pathology* 2008; Dec; 89 (6):419–432.

Vazquez J, López Gutierrez J, Gámez M, López-Santamaria M, Murcia J, Larrauri J, et al. Biliary atresia and the polysplenia syndrome: its impact on final outcome. *Journal of Pediatric Surgery* 1995; Marc; 30 (3): 485–487.

Wang B, Dolinski BM, Kikuchi N, Leone DR, Peters MG, Weinreb PH, Violette SM, Bissell M. Role of integrin in acute biliary fibrosis. *Hepatology* 2007; Nov; 46 (5):1404-1412.

Washington K, Clavien P, Killenberg P. Peribiliary vascular plexus in primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis. *Human Pathology* 1997; Jun; 28 (7): 791–795.

Wu A, Gu J, Li Z, Ji J, Xu G. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 2004; Aug 15; 10(16):2323-2326.

Xia YP, Li B, Hylton D, Detmar M, Yancopoulos GD, Rudge JS. Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to inflammatory condition resembling human psoriasis. *Blood* 2003; Jul 1; 102 (1):161-168.

Yamamoto K, Sherman I, Phillips M, Fisher M. Three-dimensional observations of the hepatic arterial terminations in rat, hamster and human liver by scanning electron microscopy of microvascular casts. *Hepatology* 1985; May-Jun; 5 (3): 452–456.

Yang GY, Yao JS, Huey M, Hashimoto T, Young WL. Participation of PI3K and ERK1/2 pathways are required for human brain vascular smooth muscle cell migration. *Neurochemistry International* 2004; May; 44 (6):441–446.

Yao JS, Shen F, Young W, Guo-Yuan Yang GY. Comparison of doxycycline and minocycline in the inhibition of VEGF-induced smooth muscle cell migration. *Neurochemistry International* 2007; Feb; 50 (3):524–530.

Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Ikenaka Y, Kitade M, Kaji K, Yoshii J, Yanase K, Yamazaki M, Asada K, Tsujimoto T, Akahane T, Uemuraa M, Fukui H. Angiotensin-II and vascular endothelial growth factor interaction plays an important role in rat liver fibrosis development. *Hepatology Research* 2006; Oct; 36 (2):124-129.

Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) peceptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; Jul 20; 276 (29): 26969–26979.

ANEXO

Anexo I - PROTOCOLO HISTOPATOLÓGICO

Nome: _____

Nº Caso

Registro

Grupo:

1. Atresia biliar com POE () sem POE ()
2. Outras causas de colestase neonatal

Idade: () dias () anos

MARCADOR IMUNOISTOQUÍMICO: _____

Expressão imunoistoquímica

Vasos arteriais:

Túnica média: intensidade 0() 1() 2() 3()

Endotélio: intensidade 0() 1() 2() 3()

OUTRAS ESTRUTURAS

Ductos biliares: intensidade 0() 1() 2() 3()

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

Endotélio venoso: intensidade 0() 1() 2() 3()

Intensidade de cor de marcação das estruturas (World J Gastroenterol 2004; 10(16):2323-2326):

- 0. não apresenta coloração;**
- 1. coloração amarelo claro;**
- 2. coloração amarelo escuro;**
- 3. coloração marrom com distribuição granular.**

São consideradas positivas as estruturas com intensidade 2 e 3.

