

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DE SAÚDE
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DE BIOMEDICINA

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ESPESAMENTO ARTERIAL EM
AMOSTRA DE TECIDO HEPÁTICO DE ATRESIA BILIAR: CORRELAÇÕES
COM EXPRESSÃO DAS ANGIOPOIETINAS 1 E 2 E DO RECEPTOR TIE2

Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina

NAJARA MAURÍCIO REUS

Orientador: Dr. Jorge Luiz dos Santos

Porto Alegre, setembro de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DE SAÚDE
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DE BIOMEDICINA

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ESPESSAMENTO DE TÚNICA MÉDIA:
CORRELAÇÕES COM EXPRESSÃO DE ANGIOPOIETINAS 1 E 2 E
RECEPTOR TIE2

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Comissão de Graduação de Biomedicina como um dos requisitos para a obtenção do grau de Biomédico pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina.

Aluna: Najara Maurício Reus

Orientador: Dr. Jorge Luiz dos Santos

Porto Alegre, setembro de 2012.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e teve apoio financeiro do FIPE-HCPA e CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Dedico este trabalho àqueles que sempre acreditaram, me apoiaram e fortaleceram: minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que me permitiu chegar a este momento que, até então, é minha maior conquista profissional.

Agradeço à minha família, em especial a minha mãe que esteve presente em todos os momentos que eu mais precisei. Ao meu pai e meu irmão, que sempre deixaram transparecer o orgulho que sentiam por terem a filha/irmã estudando na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Gostaria de aproveitar este espaço para dizer que o orgulho que vocês, pai, mãe, “mano”, sentem de mim, não chega à metade do que sinto de vocês, meus guias!

Agradeço a todas as minhas amigas e amigos que estiveram ao meu lado e ajudaram a alegrar meus momentos de “folga” da faculdade.

Agradeço a todos que presenciaram esta trajetória e tiveram a paciência de tolerar a minha ausência em muitos momentos.

Agradeço ao meu namorado, que teve muita tranquilidade para me confortar sempre que precisei.

Além disso, gostaria de agradecer muito a cada integrante do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia por todas as instruções e ensinamentos que me passaram. Especialmente à Cleandra, Thaís, Renata Leke, pelas orientações, paciência e ajuda que me deram a cada dúvida que tive. Mas também à Thayssa, Laisa, Ranieli, Larisse, Laura, Gustavo, Mariana, Mariel, Darlan, Grazi, Sílvia, Rafael, Carolina, Ana Cláudia, Maria Inês, Dra. Norma, enfim, a cada integrante deste laboratório pelo companheirismo.

Meus agradecimentos especiais vão para o meu orientador, Dr. Jorge Luiz dos Santos, que me deu a oportunidade de participar deste projeto interessantíssimo e de grande importância, não só para mim, mas para toda a sociedade científica; à Dra.

Themis Reverbel da Silveira, grande “mente brilhante”, “chefe” do nosso grupo, que, com sua exigência e dedicação, consegue atingir índices de excelência em tudo o que faz; à Aline, mestranda do presente projeto, que também me ajudou muito e, juntamente com o Dr. Jorge, me ensinou muito sobre Atresia Biliar e tudo que esta patologia envolve; e ao Luiz Felipe Forgiarini, que me permitiu conhecer o projeto, o Dr. Jorge, a Aline e todas as pessoas que participaram da minha trajetória durante este período no LEHG.

ÍNDICE GERAL

Lista de abreviaturas.....	8
Resumo.....	9
1. Introdução Geral.....	11
1.1 Atresia Biliar.....	11
1.2 Diagnóstico.....	12
1.3 Tratamento e Prognóstico pós-portoenterostomia.....	12
1.4 Etiopatogenia.....	16
1.4.1 Hipótese Inflamatória.....	17
Vascularização Hepática.....	19
1.4.2 Hipótese Isquêmica.....	22
Hipóxia.....	22
VEGF A.....	24
Angiopietinas.....	25
Morfometria.....	26
1.5 Justificativa.....	28
1.6 Objetivos.....	29
2. Trabalho Experimental/Artigo Científico.....	30
Capa.....	31
Resumo.....	32
Introdução.....	33
Material e métodos.....	35
- Amostra.....	35
- Morfometria.....	35
- PCR.....	37
- Avaliação da idade de retirada da biópsia.....	38
- Análise estatística.....	38
Considerações éticas.....	39
Resultados.....	40

Discussão.....	41
Agradecimentos.....	43
Referências	44
3. Conclusões	46
4. Perspectivas.....	47
Referências Bibliográficas Adicionais	48
Anexos.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AB – Atresia Biliar

TxH – Transplante hepático

CIH – Colestase Intra-Hepática

ETM – Espessamento de Túnica Média

VEGF A – Fator de Crescimento Endotelial Vascular A

ANG1 – Angiopoietina 1

ANG2 – Angiopoietina 2

TIE2 – Receptor TIE 2

PCR – Reação da Cadeia da Polimerase

RT-PCRq – PCR quantitativo em tempo real

CK7 – Citoqueratina 7

PCK7 – Porcentagem de positividade de citoqueratina 7

FIB – Extensão de fibrose

PICRO – Picrossírius

HE – Hematoxilina e Eosina

GGT ou Gama-GT – Gamaglutamiltransferase/gamaglutamiltranspeptidase

FA – Fosfatase alcalina

BD – Bilirrubina direta

BI – Bilirrubina indireta

BT – Bilirrubina total

DHC – Doença hepática crônica

FN – Fígado nativo

SFN – Sobrevida do fígado nativo

RESUMO

Introdução- A Atresia biliar (AB) caracteriza-se por obstrução das vias biliares extra-hepáticas e por colangiopatia progressiva, que a despeito de tentativas cirúrgicas de restabelecimento do fluxo biliar, evolui com comprometimento intra-hepático, o qual culmina com o desenvolvimento de insuficiência crônica do fígado e cirrose. A etiopatogenia da AB permanece obscura. Nosso grupo investiga o papel de uma arteriopatia na doença. Em estudos anteriores observamos, por morfometria, a presença de espessamento de túnica média (ETM) arterial associado à rarefação biliar, e a expressão de VEGF A, marcador de hipóxia, em estruturas portais, incluindo túnica média arterial e ductos biliares. Este estudo teve por objetivo avaliar a expressão das angiopoietinas 1 e 2 (ANG1 e ANG2) e de seu receptor TIE2, envolvidos na maturação da parede arterial, em fígados de pacientes com AB, correlacionando-a com variáveis histológicas de gravidade, incluindo espessamento de parede dos ramos arteriais intra-hepáticos e comparando-os com uma amostra de fígados de pacientes com colestase intra-hepática.. **Métodos-** A expressão das angiopoietinas e seu receptor foi avaliada por RT-PCRq em amostras de fígado sob ultracongelamento, obtidas no momento da laparotomia exploradora realizada durante a portoenterostomia (22 pacientes com AB) ou biópsia hepática em cunha (9 pacientes com colestase intra-hepática). O gene normalizador foi o S18. O valor da ETM foi obtido pela razão “espessura de túnica média/diâmetro luminal”, calculada por análise morfométrica em 10 imagens/caso obtidas de lâminas coradas com HE, a partir de amostras hepáticas parafinizadas coletadas durante o mesmo procedimento. Outras variáveis morfométricas relacionadas à gravidade histológica (porcentagem de positividade de citoqueratina7 e extensão de fibrose) e clínica (idade por ocasião da laparotomia) foram também avaliadas. A morfometria foi realizada com os softwares Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics Inc. Rockville, MD/USA), e Adobe® Photoshop® CS3 Extended 10.0 (Adobe Systems Inc. San Jose, CA/USA). **Resultados-** Não houve diferenças nas expressões das moléculas em estudo entre pacientes com AB e CIH. Porém, exclusivamente na AB, houve correlação positiva moderada entre a expressão das angiopoietinas com o ETM (ANG1 r- 0,58; P- 0,013. ANG2 r- 0,52; P- 0,032). A expressão das angiopoietinas correlacionou-se negativamente com a de TIE2 (ANG1 r- 0,73; P< 0,001. ANG2 r- 0,54; P- 0,007). Não houve correlação das expressões dos marcadores angiogênicos com as demais variáveis de gravidade da doença. **Conclusões-** As angiopoietinas 1 e 2 relacionam-

se ao ETM que ocorre na AB, de maneira independente da gravidade histológica e clínica da doença, e há correlação inversa entre suas expressões e a de seu receptor.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 ATRESIA BILIAR

A Atresia Biliar (AB) é uma doença hepática infantil em que há a oclusão completa de parte ou da totalidade das vias biliares extra-hepáticas, associada a uma colangiopatia persistente e progressiva em ductos biliares intra-hepáticos^{1, 2}. A existência desta colangiopatia faz com que, apesar da desobstrução das vias biliares extra-hepáticas por meio de uma portoenterostomia, permaneça um processo lesivo biliar que leva a continuadas ativação e proliferação de fibroblastos, cirrose e à insuficiência hepática crônica, tornando a AB a causa mais frequente de transplante hepático (TxH) infantil. A AB é uma doença relativamente rara, exclusiva do período neonatal, que atinge cerca de 1:18000 até 1:5000 nascidos vivos^{3, 4}, sendo mais incidente em países asiáticos e no sexo feminino^{5, 6}.

Após a portoenterostomia, mesmo com um tratamento ideal, somente um terço dos pacientes sobrevive com seu próprio fígado (sobrevida do fígado nativo, SFN) até a idade adulta, e dois terços vêm a necessitar de transplante hepático durante a infância e a adolescência. Quando a portoenterostomia não tem sucesso em produzir um adequado fluxo biliar, a SFN costuma não ultrapassar dois anos de idade. Vários fatores afetam a SFN, sendo alguns deles intrínsecos ao paciente, tais como a presença de malformações extra-hepáticas associadas, enquanto outros dependem da qualidade do atendimento de saúde, o que inclui fatores como a idade do encaminhamento das crianças ao centro especializado para tratamento e a experiência do serviço médico-hospitalar no atendimento à AB⁷. No Reino Unido, Davenport *et al.* (2004) observaram que a centralização do atendimento em determinados locais com maior experiência no tratamento da doença interferiu positivamente nos níveis de SFN⁴. Diversos estudos apontam que quanto mais cedo a intervenção cirúrgica ocorre, maior a sobrevivência com o fígado nativo⁸. No Rio Grande do Sul, Kieling *et al.* (2008) observaram atraso no encaminhamento para a portoenterostomia e que os pacientes mais prejudicados são os originários do interior do Estado⁹. No Brasil, em um estudo multicêntrico, Carvalho *et al.* (2010) verificaram que, apesar de o diagnóstico estar mais precoce na última década, o encaminhamento às cirurgias de tratamento em centros especializados continua tardio, o que resulta em um pior prognóstico para os pacientes com AB em nosso país¹⁰.

1.2 DIAGNÓSTICO

A AB produz colestase no período neonatal. A colestase caracteriza-se por retenção no fígado dos compostos normalmente excretados pela bile, incluindo bilirrubinas de reação direta (BD), cujo aumento no soro é facilmente identificável por testes laboratoriais. Níveis séricos $BD \geq 2\text{mg/dL}$; ou $BD \geq 1\text{mg/dL}$ quando a BT (bilirrubina total) for $\leq 5\text{mg/dL}$; ou ainda, se a BT for $\geq 5\text{mg/dL}$, a presença de $BD \geq 20\%$ do total, sugerem colestase. Na colestase, em geral, há variados graus de hipocolia e até mesmo acolia. Na AB, por haver obstrução biliar completa, há acolia persistente, e, em função do refluxo da BD do sangue à urina, produz-se colúria. Hepatoesplenomegalia são frequentes, mesmo no início do quadro clínico. Em função da lesão biliar e do refluxo de compostos biliares para o sangue há, também, aumento significativo de gamaglutamiltransferase (GGT) e de fosfatase alcalina (FA) no soro.

O “padrão-ouro” para diagnóstico da AB continua sendo a biópsia hepática. Na biópsia, além dos achados inespecíficos característicos de colestase neonatal, observam-se: expansão portal, tampões de pigmento biliar na luz das estruturas biliares intra-hepáticas, reação ductular, além de fibrose precoce^{1, 11, 12}.

Até o presente momento, o tratamento da AB é cirúrgico. Morio Kasai (1959) descreveu a portoenterostomia hepática para os diversos tipos de atresias biliares¹³.

1.3 TRATAMENTO E PROGNÓSTICO PÓS-PORTOENTEROSTOMIA

O procedimento, que foi denominado cirurgia de Kasai em homenagem ao seu inventor, consiste em excisão cirúrgica das vias biliares atrésicas até o *porta hepatis* com anastomose deste a uma alça longa de jejuno em Y de Roux (figura 1)¹⁴.

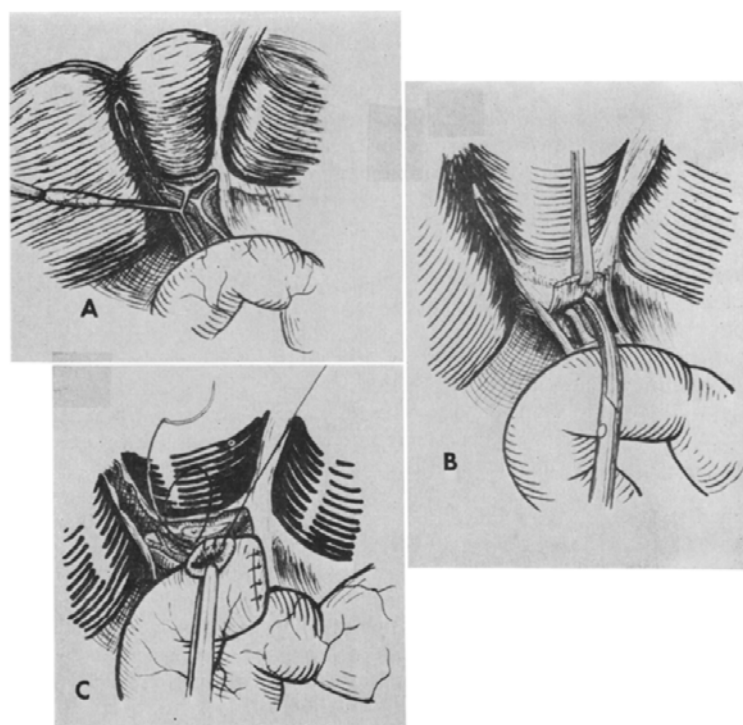


Figura 1: Passos da portoenterostomia hepática, segundo Kasai. Fonte: Kasai (1968).

O reestabelecimento do fluxo biliar após a portoenterostomia, avaliado pela normalização ou redução parcial dos níveis de bilirrubina sérica⁹, e a melhora dos sinais clínicos são indícios de sucesso na realização da cirurgia. A ausência de icterícia ou níveis de BT \leq 2mg/dL nos primeiros três a seis meses pós-portoenterostomia indicam maior SFN.

Entretanto, Ohi *et al.* observaram, em um estudo longitudinal, que muitos dos pacientes operados com sucesso pela portoenterostomia desenvolviam hipertensão portal e varizes esofágicas¹⁵.

A idade de realização do procedimento cirúrgico tem importantes implicações prognósticas. No nosso meio, Kieling *et al.*, em um estudo publicado em 2008, avaliou uma população de 112 casos de atresia biliar no qual notou que a idade em que os pacientes são operados é determinante para uma maior sobrevida com o fígado nativo e, também, que a idade que os pacientes do interior são encaminhados ao hospital é significativamente maior quando comparada a idade de encaminhamento dos pacientes da região metropolitana de Porto Alegre. A sobrevida do total de pacientes foi de 46,2% em dois anos e diminui progressivamente ao passar dos anos, chegando a 15,3% em 20 anos.

O diagnóstico precoce da colestase neonatal, que possibilita a diferenciação de causas intra e extra-hepáticas da doença, e a idade da portoenterostomia são itens fundamentais para prolongar a sobrevivência do fígado nativo, o que é de extrema importância para retardar a necessidade de um transplante hepático.

Mais de 80% dos pacientes com AB que apresentam fluxo biliar adequado sobrevivem mais de 10 anos com seu próprio fígado e com uma boa qualidade de vida.^{16, 17}

O prognóstico pós-cirúrgico da portoenterostomia, depende de uma série de fatores, alguns inerentes às características individuais do paciente, outros dependentes do atendimento de saúde recebido pelo enfermo (Quadro 1).

Quadro 1: Fatores associados ao prognóstico pós-portoenterostomia

Dependentes do atendimento de saúde	<ul style="list-style-type: none"> - Portoenterostomia tardia - Experiência do cirurgião - Capacitação técnica do centro de referência com AB (≥ 5 portoenterostomias/ano) - Época da cirurgia no centro de referência
Independentes do atendimento de saúde	<ul style="list-style-type: none"> - Tipo de atresia biliar - Presença de anormalidade extra-hepática associada - Hipertensão portal precoce - Histopatologia hepatobiliar Extensão da fibrose Cistos biliares extra-hepáticos pós-cirúrgicos Extensão da proliferação biliar Diâmetro dos remanescentes biliares no <i>porta hepatis</i> Padrão anatomopatológico dos remanescentes biliares no <i>porta hepatis</i> Esgotamento do processo inflamatório no <i>porta hepatis</i> Espessamento de túnica média arterial

Fonte: Santos, J. L. *et al.*, 2012.

A influência da idade na ocasião da portoenterostomia sobre o prognóstico pós-operatório tem sido repetidamente confirmada, sendo de até 60 dias de vida como idade ideal para realização do procedimento. A colestase presente na AB provoca a distorção da microanatomia hepática e perda funcional progressiva, através de um processo cicatricial.¹⁸

O encaminhamento precoce dos pacientes com colestase neonatal aos centros de referência em tratamento na AB continua um desafio, especialmente nos países em desenvolvimento¹⁹⁻²², como o Brasil^{9, 23}. Em um estudo publicado no Brasil, a

sobrevida do fígado nativo foi cerca de 33% em cinco anos e de 24% em dez anos, atingindo apenas 15,3% em 20 anos, sendo relacionada à idade por ocasião da portoenterostomia⁹. O encaminhamento tardio dessas crianças para o tratamento deve-se à ausência de suspeita pelos pais e serviços pediátricos não especializados, pois os bebês com AB no início do quadro, em geral, apresentam-se com peso adequado para sua idade, aspecto saudável e icterícia discreta. Profissionais inexperientes acabam tomando uma conduta expectante para avaliar uma icterícia supostamente fisiológica ou “causada pelo leite materno”, levando a consequências desastrosas na criança. Em alguns países, como o Reino Unido, houve uma melhora quanto a essa situação com o auxílio da Campanha do Alerta Amarelo, a qual orienta os médicos a solicitar dosagens de bilirrubinas, total e direta, de todo paciente que se mantiver icterício por 14 dias ou mais. Desse modo, caso detectado um quadro de colestase, o bebê deve ser encaminhado a um centro de referência especializado²⁴.

Grupos que conseguem um encaminhamento e cirurgias precoces, têm observado um melhor prognóstico dos pacientes com AB^{3, 25-29}. Em países desenvolvidos, a SFN num período de cinco anos supera 50% dos casos.

Outra estratégia eficaz para prevenir o agravamento da AB é a distribuição de um cartão com escala de cores das fezes aos pais e cuidadores. Em Taiwan dois grupos de estudo demonstraram a eficácia do método, observando a redução da idade por ocasião da portoenterostomia, o que resultou em melhores resultados pós-operatórios^{6, 30}. Recentemente no Brasil, foi incluída a Escala Cromática Fecal na Carteira do Bebê do Ministério da Saúde³¹.

Davenport et al. (2008) observaram que pacientes com malformações extra-hepáticas associadas e os com a forma cística da AB são os que apresentam pior prognóstico quando operados tardiamente^{32, 33}.

Além dos fatores prognósticos modificáveis, existem características singulares que expressam um fenótipo específico durante o processo lesivo, o que determina variações na gravidade e no prognóstico da doença para cada paciente. Entretanto, alguns desses fatores são, também, tempo-dependentes, o que os torna um tema bastante complexo na influência do prognóstico. O local da obstrução do fluxo biliar³⁴, a presença de anomalias extra-hepáticas associadas³⁵ e a presença de hipertensão portal precoce³⁶ são alguns exemplos de características particulares de cada paciente.

Algumas variáveis histopatológicas também têm sido utilizadas na tentativa de prever o prognóstico pós-portoenterostomia nos casos de AB.

1.4 ETIOPATOGENIA

A etiopatogenia da AB permanece obscura, entretanto, a AB parece corresponder mais a um fenótipo decorrente de diversas doenças do que a uma doença única³⁷. A hipótese de que a AB corresponda a um fenótipo é sugerida pela heterogeneidade clínica por ocasião da apresentação da doença, havendo diferença no período de tempo livre de sintomas em relação ao nascimento entre os pacientes que tem e os que não tem malformações congênicas extra-hepáticas associadas. Esta diferença gerou a ideia de que a forma associada com malformações, de apresentação precoce, correspondesse a uma lesão embrionária, enquanto a forma isolada, cujos sintomas podem iniciar nas primeiras semanas pós-natais, correspondesse a um evento adverso perinatal (Quadro 2).

Quadro 2: Alguns fatores associados à etiopatogenia da atresia biliar

Fatores Genéticos/cromossômicos	<ul style="list-style-type: none"> - Mutações e polimorfismos do gene CFC1 - Polimorfismos do gene ICAM - Polimorfismo do gene VEGF A - Relação com alterações cromossômicas
Fatores Ambientais	<ul style="list-style-type: none"> - Infecções <ul style="list-style-type: none"> - Citomegalovírus - Reovírus tipo 3 - Papilomavírus - Rotavírus - Micotoxinas/fitotoxinas
Outros	<ul style="list-style-type: none"> - Anomalias estruturais <ul style="list-style-type: none"> - BASM: relacionada ao diabetes materno gestacional - Anomalias da junção colédoco-pancreática - Anomalias arteriais hepáticas - Alterações imunogenéticas <ul style="list-style-type: none"> - Expansão oligoclonal de Linfócitos T - Atuação de células NK - Expressão aberrante de moléculas do MHC - Microquimerismo

Abreviaturas: VEGF- fator de crescimento vascular endotelial; ICAM- molécula de adesão intercelular; BASM- malformação esplênica da atresia biliar; NK- células natural killer; MHC- major histocompatibility complex/complexo de histocompatibilidade principal. Adaptado de: Santos *et al.* (2010).

Esta posição foi recentemente questionada com os achados de Harpavat et al. (2011), os quais demonstraram que em ambos os grupos de pacientes com AB há, nas primeiras 24 a 48 horas após nascimento, alterações nos níveis de bilirrubina direta/conjugada, indicando que há lesão biliar em andamento em todos os pacientes, independente da forma clínica³⁸

Cerca de 12 a 37% das AB congênitas associam-se com outras mal-formações em outros sistemas como cardiovascular e digestivo, ou seja, com mal-formações extra-hepáticas³⁹. Estudos recentes, tanto em modelos animais, quanto utilizando material humano, procuram a identificação de sítios genéticos que teriam influência no desenvolvimento da AB⁴⁰⁻⁴⁴. Uma das mais importantes áreas de estudo em relação à AB provém das análises dos mecanismos imunes envolvidos no modelo murino de AB⁴⁵.

1.4.1 HIPÓTESE INFLAMATÓRIA

Alguns autores acreditam na hipótese de que determinadas infecções virais, a exemplo de citomegalovirus (CMV), Epstein-Barr (ambos da família Herpeviridae), reovírus ou rotavírus (ambos da família Reoviridae) possam ser os fatores desencadeantes das reações inflamatórias causadoras da AB^{2, 8}.

Apesar de achados epidemiológicos relativos à presença de vírus em crianças com AB serem conflitantes, modelos de desenvolvimento de AB em animais utilizando a inoculação de vírus em camundongos recém-nascidos tem sido bem sucedidos para o estudo dos processos imunes provavelmente associados à doença⁸. Alguns autores^{46, 47}, observando a intensidade de infiltração de macrófagos, células NK, linfócitos T CD4+ e CD8+ no epitélio biliar, bem como a influência do interferon- γ (IFN- γ) no desencadeamento da obstrução luminal têm proposto a existência de uma resposta inflamatória na gênese da AB, provavelmente induzida por vírus, assim como a importância de um processo de autorreatividade secundária à lesão viral inicial. Este processo autorreativo perpetuaria o dano tecidual nas estruturas intrahepáticas, produzindo a colangiopatia que caracteriza a AB (figura 2).

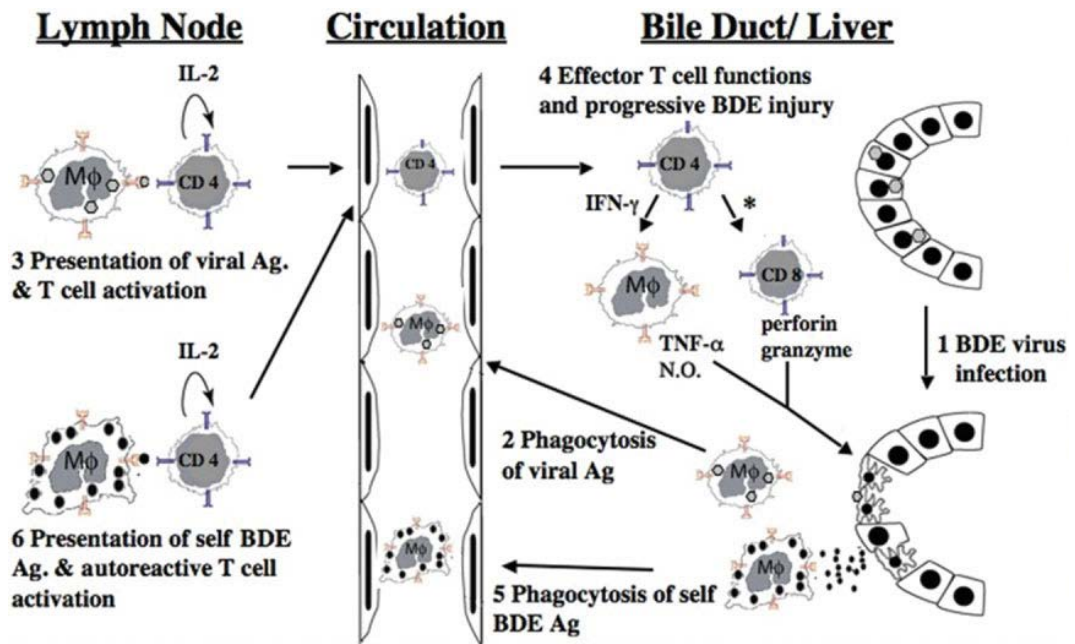


Figura 2: Modelo de autorreatividade induzida por vírus, mediada por linfócitos T, levando a dano epitelial de ductos biliares na AB. A infecção viral do epitélio biliar ductular (1) resulta em um dano inicial às células ductulares. Partículas virais fagocitadas por macrófagos ou células dendríticas (2) são apresentadas a células T virgens nos linfonodos locais, onde a ativação e proliferação (estimulada por interleucina-2) de linfócitos T CD4+ específicos para o vírus continuam (3). Esses linfócitos T CD4+ ativados retornam ao sítio de exposição original e ativam as funções das células T efetoras (4), incluindo estimulação de macrófagos induzida por interferon- γ e ativação de células T citotóxicas CD8+. Macrófagos liberam fator de necrose tumoral, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, enquanto linfócitos T CD8+ liberam granzima e perforina; juntos eles produzem dano no BDE através de vias necróticas e apoptóticas. Os antígenos do epitélio biliar, previamente sequestrados e alterados, são agora fagocitados por macrófagos ou células dendríticas e apresentados a células T autorreativas (5), provocando posterior ativação da cascata imunomediada por linfócitos T (6) e progressiva destruição desse epitélio. BDE – epitélio biliar ductular; Ag – antígeno; M ϕ - macrófago; CD4 – linfócito T CD4+; CD8 – linfócito T CD8+; IFN γ – interferon gama; TNF- α – fator de necrose tumoral alfa; NO – óxido nítrico. Fonte: Sokol *et al.* (2007).

Brindley *et al.* (2012) realizaram um estudo em que observaram um padrão de resposta imune voltado especificamente à CMV na maioria dos pacientes de AB estudados, embora a presença de proteínas e DNA virais não tenha sido encontrada. Os autores acreditam que um processo inflamatório deste tipo, em associação com deficiência de linfócitos T regulatórios, possa desencadear a perpetuação de uma reação autoimune localizada nas estruturas hepatobiliares desses pacientes⁴⁶.

Uma outra importante área que tem sido ainda pouco investigada em relação à AB, bem como a outras colangiopatias crônicas, são as alterações vasculares arteriais.

VASCULARIZAÇÃO HEPÁTICA

O aporte sanguíneo do fígado é bastante particular, por incluir irrigação sanguínea tanto pela veia porta, que traz sangue rico em nutrientes do intestino, e sangue arterial, rico em oxigênio. O sangue portal inclui 75% da irrigação hepática, e o arterial, os 25% restante. As células hepáticas, denominadas hepatócitos, são nutridas por uma mistura destes dois tipos de sangue que flui pelos canais vasculares denominados sinusóides, enquanto as estruturas biliares são nutridas exclusivamente pelo sangue arterial, por meio do plexo vascular peribiliar formado por ramos da artéria hepática. A artéria hepática divide-se em direita e esquerda, para suprir os lobos hepáticos correspondentes; entra no fígado, junto à veia porta, pelo *porta hepatis* e forma, no parênquima, uma ampla rede arterial com vasos de calibre que reduzem progressivamente, chegando até a margem dos lóbulos hepáticos (figura 3 e 4).

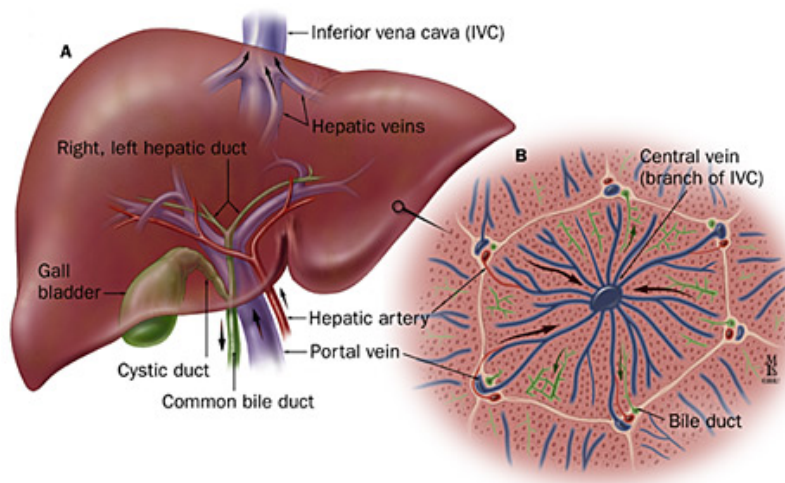


Figura 3: (A) Representação da anatomia normal de um fígado, com *porta hepatis* contendo um ducto biliar comum, uma veia porta e uma artéria hepática, uma vesícula biliar presente e o encontro das veias centrolobulares hepáticas em veia cava inferior. (B) Representação esquemática de um lóbulo hepático. Fonte: Johns Hopkins Medicine⁴⁸, disponível em: <http://www.hopkins-gi.org>

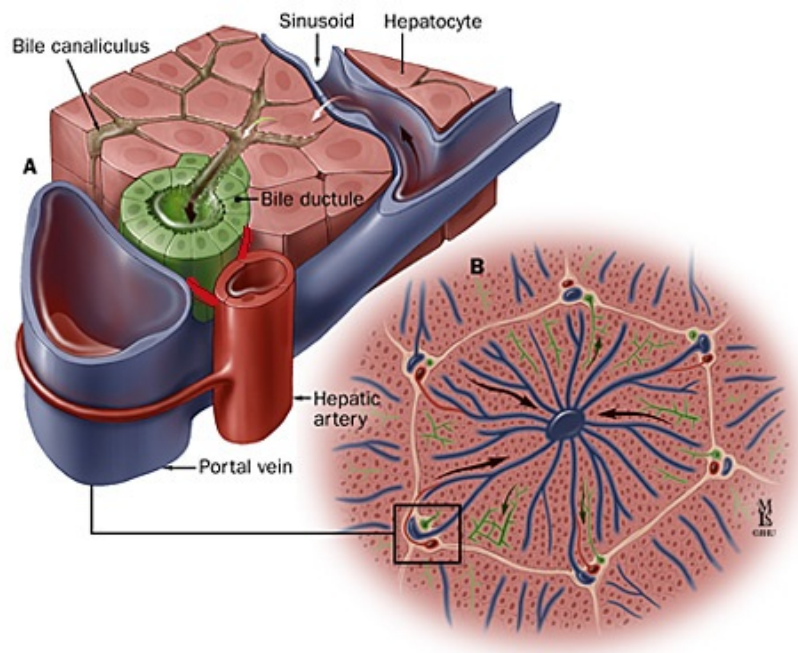


Figura 4: (A) Detalhe exibindo a arquitetura histológica de um (B) lóbulo hepático, composto por hepatócitos (hepatocyte), com um espaço porta que contém uma veia porta (*portal vein*) que se ramifica em sinusóides (*sinusoid*), uma artéria hepática (*hepatic artery*), que nutre um duto biliar (*bile ductule*), o qual capta a bile produzida pelos colangiócitos e transportada pelos canalículos biliares (*bile canaliculus*). Adaptado de: Johns Hopkins Medicine⁴⁸, disponível em <http://www.hopkins-gi.org>

O fluxo sanguíneo hepático se distribui a partir dos espaços porta, circulando por eixos vasculares que se originam a partir destas estruturas. Os vasos que deixam os eixos vasculares drenam nos sinusóides e estes deságuam nas veias centrolobulares^{39, 49}. Há um gradiente de oxigenação entre as regiões periportal e centrolobular. O eixo vascular, além de ramos arteriais e venosos, é constituído também de estruturas biliares e neurais.

As estruturas biliares, diferentemente dos hepatócitos que são nutridos por sangue arterial e venoso, recebem suprimento sanguíneo apenas dos ramos arteriais. Distúrbios arteriais são observados nas doenças crônicas do epitélio biliar denominados colangiopatias, sendo ainda necessário esclarecer a ordem causal entre os dois processos, ou seja, se a colangiopatia desencadeia a alteração vascular, ou vice-versa. Algumas desordens biliares, porém, são produzidas pelas alterações arteriais sendo, por isto, denominadas colangiopatias isquêmicas⁵⁰.

Nosso grupo tem estudado a hipótese de que, pelo menos alguns casos de AB sejam causados por uma alteração vascular arterial, constituindo, portanto, um tipo de colangiopatia isquêmica⁵¹.

Appleby (1959) já sugeria que a bile apenas determinaria a necrose de ductos biliares previamente isquêmicos⁵². Klippel (1972) especulou sobre a possibilidade de a AB estar vinculada às modificações circulatórias do fígado e das vias biliares que ocorrem após o nascimento. Segundo este autor, a necrose segmentar dos ductos biliares seria provocada, em indivíduos vulneráveis, pelo desvio da corrente sanguínea, através de ductos venosos permeáveis, seguida de uma diminuição significativa de sangue arterial da árvore biliar extra-hepática⁵³. Northover (1979) sugeriu que a estenose dos ductos biliares extra-hepáticos, pós-cirúrgica, fosse determinada pelo efeito fibrogênico da bile em tecido predisposto pela isquemia⁵⁴. Pode-se especular que evento similar ocorra na AB. Vários estudos investigaram um possível papel do sistema arterial no desenvolvimento da AB⁵⁵⁻⁵⁸. Hashimoto *et al.* (1983) produziram atresia de colédoco por meio de desvascularização desta estrutura em fetos de ovelha⁵⁹. Alterações histopatológicas têm sido observadas em ramos arteriais hepáticos de pacientes com AB. Ho *et al.* (1993) observaram a dilatação luminal e espessamento da parede vascular ao avaliarem alterações da artéria hepática em pacientes com essa patologia⁵⁵. Em diferentes estudos, Stowens (1963) e Brough & Bernstein (1969) descreveram a ocorrência de hiperplasia e hipertrofia em ramos da artéria hepática nos espaços-porta de pacientes com AB^{60, 61}. Neste último, no grupo de pior prognóstico foi encontrada fibrose portal intensa, espessamento da túnica média de ramos da artéria hepática e edema no endotélio da túnica íntima. Em um estudo por arteriografia, Uflacker & Pariente (2004) observaram, em fígados de pacientes com AB, artérias de contorno irregular, com oclusões periféricas e cercadas de tufos de pequenos ramos arteriais⁶².

Com base nas evidências de uma íntima relação entre o processo de angiogênese e o desenvolvimento da AB, nosso grupo de estudos vem, há alguns anos, procurando esclarecer mecanismos pelos quais essa relação ocorre.

Em 2005, através de um estudo morfométrico realizado por nosso grupo, foi possível observar um espessamento de túnica média (ETM) progressivo em pacientes AB entre o momento da portoenterostomia e o transplante hepático⁶³. Esse ETM progressivo pode ser explicado através de processos imunes de remodelamento vascular associados a uma disfunção endotelial^{8, 46, 64}. Tal arteriopatia pode

desarranjar todo o sistema hepático, pois veias, ductos, até mesmo aferências nervosas, são nutridas por ramos da artéria hepática. Esta pode, portanto, ser um elemento fundamental na patogênese da AB.

Dois estudos apresentaram um achado bastante útil para distinguir a AB de outras causas de colestases neonatal por hiperbilirrubinemia direta. Através de ultrassonografias, Humphrey & Stringer (2007) e Kim *et al.*(2007) observaram uma dilatação luminal da porção extra-hepática da artéria hepática em pacientes de AB. Ambos os autores citaram os estudos feitos pelo nosso grupo de pesquisas como uma possível explicação para a anomalia observada, pois acreditam que essa dilatação se deva às anormalidades dos ramos arteriais intra-hepáticos^{65, 66}.

1.4.2 HIPÓTESE ISQUÊMICA

A formação de novos vasos (angiogênese) é um mecanismo-chave na patogênese de doenças hepáticas crônicas (DHC), independente de sua etiologia. Visto que a maioria das DHC progride de um dano hepatocitário à inflamação, fibrose, cirrose e, em alguns casos, carcinoma hepatocelular, a neovascularização e o surgimento de uma arquitetura angiogênica anormal são relatadas durante este processo patogênico comum a várias dessas doenças. Basicamente, a formação de novos vasos começa com uma redução dos níveis de oxigênio tecidual, ou seja, em situações de hipóxia. Hipóxia promove o acúmulo de fatores induzidos por hipóxia, que estimula a expressão de fatores de crescimento angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF A).

HIPÓXIA

A redução nos níveis de oxigênio tecidual é um fator desencadeante para diversos mecanismos de reação do organismo humano. Sabendo que nossas células dependem do oxigênio fornecido através da corrente sanguínea para seu funcionamento, é razoável que, havendo um decréscimo dessa molécula, sejam ativados mecanismos para a formação de uma nova vasculatura, numa tentativa de suprir o volume de oxigênio necessário, aumentando o volume sanguíneo no local.

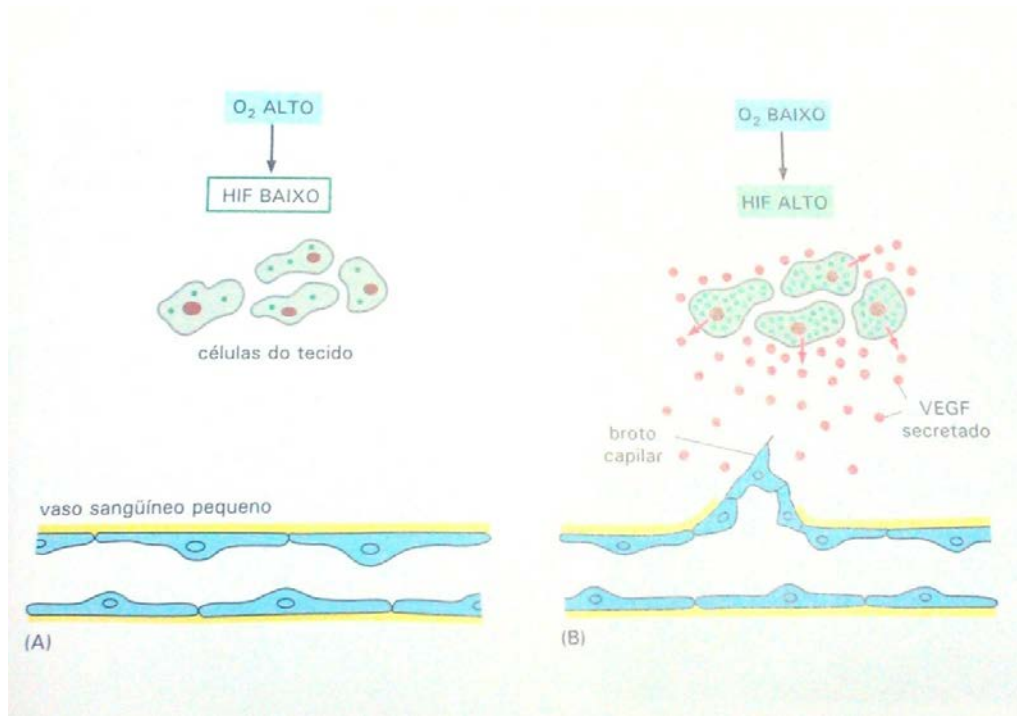


Figura 5: O mecanismo regulador de angiogênese conforme necessidade de oxigênio do tecido. HIF ALTO, significa a presença de HIF no núcleo celular, sinalizando a hipóxia; HIF BAIXO, significa HIF no citoplasma. O₂ – Oxigênio; HIF – Fator induzido por hipóxia; VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular. Fonte: Biologia Molecular da Célula, 4ª edição, Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Artmed editora, 2004.

Em situações hipoxêmicas, o endotélio provoca a liberação de HIF (fator induzido por hipóxia)⁶⁷. O HIF atua tanto sobre o próprio vaso que o secretou, quanto em células inflamatórias como células de Kupffer, mastócitos e células estreladas do fígado, estimulando a produção e liberação de outros fatores angiogênicos como angiopoietinas (ANG), fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento hepático, interleucinas (IL), óxido nítrico (NO), fator de crescimento derivado de plaqueta, fator de crescimento transformante, fator de crescimento tumoral (TNF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)⁶⁸ (figura 6).

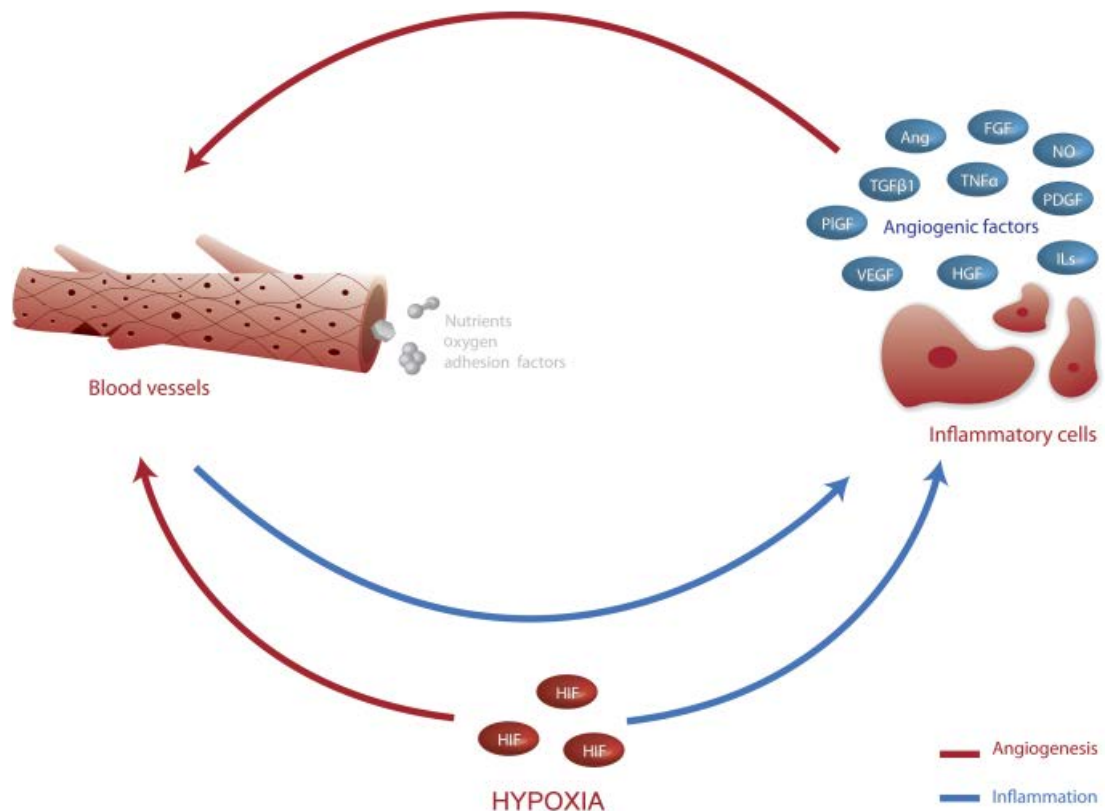


Figura 6: A relação entre hipóxia, inflamação e angiogênese. HIF estimula angiogênese. Estimula também células inflamatórias, as quais secretam outros fatores angiogênicos, que atuam sobre o vaso aumentando a resposta angiogênica. Os novos vasos fornecem oxigênio, nutrientes e fatores de adesão para as células inflamatórias, criando um círculo vicioso. ANG – angiopoietina, FGF – fator de crescimento de fibroblasto, HGF – fator de crescimento hepático, IL – interleucinas, NO – óxido nítrico, PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas, PIGF – fator de crescimento placentário, TGF – fator de crescimento transformante, TNF – fator de necrose tumoral, VEGF – fator de crescimento endotelial vascular. Fonte: Coulon, S. *et al.* (2010).

VEGF A

O VEGF A funciona tanto como um importante marcador de dano endotelial, quanto mediador de reparo. Em casos de lesão como isquemia, inflamação e infarto têm sua expressão aumentada. Os VEGFs são uma família de cinco homólogos na qual o que mais nos interessa, neste trabalho, é o VEGF-A. O VEGF-A é o principal fator envolvido na indução de angiogênese e vasculogênese através da ligação com seu receptor VEGFR-2, envolvido também no aumento da permeabilidade vascular pela via óxido nítrico-dependente, estimulando a produção endotelial de óxido nítrico por meio da ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS)⁶⁷⁻⁶⁹. Além disso, o VEGF-A promove a expressão de proteínas antiapoptóticas, através da ativação da via fosfatidilinositol-3-quinase, o que promove a sobrevivência de células endoteliais.

ANGIOPOIETINAS

Há, aproximadamente, 16 anos identificou-se um outro sistema de sinalização molecular envolvido com a formação vascular, neste caso com a maturação da parede vascular. Ao longo dos anos, observou-se que esse sistema incluía receptores tirosina-quinases, TIE1 e TIE2, e seus ligantes, as angiopoietinas 1, 2, 3 e 4 (ANG1, ANG2, ANG3 e ANG4)^{57, 70}. As ANG1 e 4 induzem a fosforilação de TIE2, promovendo a ativação do receptor, enquanto as ANG2 e 3 são inibidores competitivos de TIE2. Apesar de conhecidas as funções das quatro angiopoietinas, as mais estudadas são a ANG 1 e 2. TIE1, apesar de ser uma sequência quase homóloga a TIE2, não interage com as angiopoietinas, e mesmo que a presença de TIE1 em vias angiogênicas tenha sido observada, até o momento, não foi identificado nenhum ligante para este receptor^{57, 71, 72}.

Um estudo de 2010 deixou mais evidente esse papel do sistema ANG/TIE2 quando se observou o desenvolvimento vascular de ratos transgênicos que tiveram o gene TIE2 inativado. Esses animais morreram entre o nono e o décimo primeiro dia de desenvolvimento, pois, embora o coração e a rede vascular tenham sido formados, houve trabeculação e vascularização anormais do órgão, e os processos de maturação e estabilização dos capilares não foram bem realizados⁷³. De fato, a função do sistema angiopoietinas/TIE2 parece ser a maturação e estabilização dos vasos previamente formados por ação do VEGF A.

Angiopoietina-1 estimula a quimiotaxia de células endoteliais *in vitro*, mas não induz sua proliferação e, *in vivo*, estimula angiogênese⁷⁴. Supõe-se que a ligação de ANG1 e TIE2 nas células endoteliais estabilize o sistema vascular em maturação, pois se observou que em embriões de camundongos ANG1 *knockout* a rede vascular primária desenvolveu-se normalmente, mas não houve posterior remodelamento, pois esses camundongos exibiram retardo no desenvolvimento, deformações e morte, enquanto os animais controles desenvolveram-se normalmente. Uma análise ultraestrutural dos vasos evidenciou uma falha na adesão de células periendothelias durante o remodelamento vascular⁵⁷. Outro estudo demonstrou uma forte relação entre um aumento da espessura de vasos com o excesso de expressão de ANG1⁷⁵.

A ação da ANG2 na maturação de novos vasos depende da presença de VEGF. Na presença do VEGF, a ANG2 potencializa a ação da ANG1, enquanto que, na sua ausência, ANG2 bloqueia a atividade da ANG1 e promove regressão vascular^{74, 76}.

Em um estudo onde foi encontrada expressão de ANG2 em animais adultos submetidos a remodelamento vascular, como em tumores, surgiu a hipótese de que a ANG2 possa ser um sinal primário na estabilização vascular, promovendo um remodelamento vascular através da maturação da parede arterial^{77, 78}. Achados recentes sugerem uma ação de proteção vascular da ANG2 através do aumento da integridade de junções intercelulares endoteliais⁷⁹.

Há íntima relação entre fibrose e maturação vascular, e os mecanismos desta interação têm sido estudados.⁸⁰ Taura *et al.* (2008) sugerem que a expressão de ANG1 pelas células estreladas, desencadeadoras da fibrogênese hepática, tem papel fundamental nesse processo⁸¹.

A ação desses fatores sobre a vasculatura hepática pode produzir alterações histológicas, como o espessamento de túnica média arterial (ETM).

MORFOMETRIA

O método que nosso grupo tem utilizado para a avaliação histológica do ETM em pacientes de AB é a morfometria. Morfometria é um método de avaliação histológica que permite mensurar imagens microscópicas através de softwares de computação.

Aplicado na análise de diversas afecções, desde 1954 a morfometria tem apresentado grande valor para a avaliação histológica em patologias⁸².

A morfometria permite uma avaliação mais precisa de técnicas de análise histológica, uma vez que os cálculos estatísticos baseiam-se em dados trabalhados em computador, não somente na avaliação subjetiva.

Análises morfométricas realizadas em nosso Laboratório

Estudo do espessamento da túnica média dos ramos arteriais hepáticos

Utilizando métodos morfométricos, nosso grupo, em 2005, publicou dados que permitiram avaliar o ETM de artérias hepáticas em pacientes com AB. Nesse estudo, 1274 ramos de artérias hepáticas foram avaliados por morfometria em 47 pacientes de AB e 17 pacientes controles, observando uma maior espessura da túnica média nos pacientes de AB. Além disso, a progressão da espessura da túnica média foi acompanhada entre o momento da portoenterostomia e o TxH em 7 casos da doença em questão, demonstrando um aumento significativo do ETM durante esse período. Um achado instigante dessa análise foi o fato de arteríolas e artérias estarem mais

espessas em fígados de pacientes AB transplantados quando comparadas aos transplantados por outra afecção hepática⁶³. Observou-se, ainda, que o ETM progressivo pareceu relacionar-se com a regressão da árvore biliar interlobular.

Métodos morfométricos têm sido utilizados para estudar estruturas histológicas, incluindo a análise do diâmetro de ductos biliares, o espessamento de parede arterial, além da extensão de fibrose hepática e a reação ductular em pacientes de AB^{83, 84}.

Estudo da extensão da fibrose hepática

A extensão da fibrose hepática tem sido usada como variável histológica na tentativa de prever o prognóstico pós-portoenterostomia.

Na AB, a fibrose contribui para uma expansão portal e leva à formação de pontes entre os espaços-porta e também entre esses e as veias centrolobulares¹.

Desde 1968, o picrossírius tem sido utilizado como marcador histoquímico de colágeno tipo 2, presente na matriz extracelular de tecidos conjuntivos⁸⁵.

Embora existam estudos demonstrando não haver relação entre a quantidade de fibrose hepática e um pior prognóstico da AB^{86, 87}, estudos como o de Pape *et al.* (2009) demonstraram uma correlação entre valores menores de fibrose por número de espaços-porta e um valor preditivo para a sobrevida com o fígado nativo (SNF) até, pelo menos, os cinco anos de idade⁸⁸. Assim como este último grupo, Shteyer *et al.* (2006) sugeriu o uso de uma morfometria de fibrose, em conjunto com medidas de bilirrubina para auxiliar na decisão do uso de medicamentos em pacientes AB⁸⁹.

Em 2002, nosso grupo publicou dados que comprovaram uma menor área de fibrose nos pacientes AB em que a portoenterostomia ocorreu antes dos 60 dias de vida⁹⁰.

Estudo da extensão da reação ductular

Outra variável histológica que vem sendo associada ao prognóstico pós-portoenterostomia é a extensão da reação ductular, avaliada através da marcação de estruturas positivas para citoqueratina-7 (CK7).

Citoqueratinas compreendem um grande grupo de estruturas filamentosas intermediárias presentes no citoesqueleto intracitoplasmático de tecidos epiteliais. Todo epitélio humano pode ser classificado de acordo com a expressão de citoqueratinas específicas a um determinado tecido⁹¹. Osborn (1983) relatou a

expressão de CK7 em epitélio biliar⁹². Fisher *et al.*(1988) também observaram a presença de CK7 em ductos biliares⁹³.

A reação ductular é um fenômeno característico de diversas doenças hepáticas, incluindo a AB. Entretanto, biópsias realizadas antes de quatro semanas de vida podem ainda não apresentar a reação ductular, enquanto biópsias tardias, após a 16ª semana, podem apresentar rarefação de ductos interlobulares, como consequência da progressão da lesão biliar¹. Essa reação ductular pode ser observada e quantificada através da mensuração morfométrica da área de positividade imunohistoquímica de citoqueratina-7.

Em um estudo relativamente recente de nosso grupo, os dados obtidos demonstraram que uma reação ductular muito extensa no momento da portoenterostomia pode ser considerada fator preditivo de um prognóstico ruim no primeiro ano pós-cirúrgico nos pacientes de AB⁸⁶.

1.5 JUSTIFICATIVA

Em estudos anteriores, observamos um espessamento progressivo da túnica média arterial nos ramos da artéria hepática de pacientes AB, caracterizando uma arteriopatia aparentemente relacionada ao desaparecimento dos ductos biliares interlobulares⁹⁴. A caracterização dessa arteriopatia que envolve remodelamento arterial pode facilitar numa terapêutica complementar às atualmente empregadas, de modo a beneficiar o prognóstico da doença.

O sistema ANG/TIE2 é da maior importância no desenvolvimento normal das estruturas vasculares, e seu desequilíbrio está presente em distúrbios da embriologia vascular⁷⁷. A análise de sua expressão na AB pode reverter em valioso conhecimento sobre a anomalia arterial presente na doença.

Assim, visamos contribuir com o progresso da compreensão da AB através desse estudo que reúne informações e explora novas possibilidades no desenvolvimento da patologia. A etiopatogenia da AB permanece desconhecida e, com base em nossos achados anteriores, pareceu-nos adequado avaliar a expressão das angiopoietinas 1 e 2 e de seu receptor TIE2 nesta doença, comparando com outras hepatopatias neonatais, e relacionando suas expressões com variáveis clínicas e morfométricas, incluindo o espessamento de túnica média.

1.6 OBJETIVOS

Correlacionar a expressão das angiopoietinas 1 e 2 e de seu receptor TIE2 com o espessamento de túnica média em tecido hepático de pacientes com AB.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar, por meio de RT-PCRq (PCR quantitativo *real-time*), a expressão dos fatores angiogênicos ANG 1 e 2 e de seu receptor TIE2;
2. Analisar, através de métodos morfométricos, a intensidade das variáveis de gravidade histológica como extensão da reação ductular e extensão da fibrose;
3. Correlacionar a extensão das variáveis morfométricas às expressões do RT-PCRq.
4. Relacionar os dados dos itens anteriores à idade na qual os pacientes foram submetidos à biópsia hepática.
5. Comparar o resultado da expressão dos fatores angiogênicos ANG 1 e 2 e de seu receptor TIE2 observados em amostras de tecido hepático de pacientes com AB com aqueles observados em um grupo de fígados com colestase intra-hepática.

2. TRABALHO EXPERIMENTAL/ARTIGO CIENTÍFICO

Intenção de publicação ao periódico “*Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*”

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ESPESSAMENTO DE TÚNICA MÉDIA: CORRELAÇÕES COM EXPRESSÃO DE ANGIOPOIETINAS 1 E 2 E RECEPTOR TIE2

(*ANGIOPOIETINAS 1 E 2 CORRELACIONAM-SE AO ESPESSAMENTO DA PAREDE
ARTERIAL NA ATRESIA BILIAR*)

Najara Maurício Reus, Aline Friedrichs de Souza, Cleandra Gregório, Themis
Reverbel da Silveira, Jorge Luiz dos Santos.

- Não há conflitos de interesse sobre o este trabalho.
- O presente artigo será submetido somente a este periódico e os resultados contidos no manuscrito são todos originais.
- Artigo original na forma de manuscrito.
- Categoria: Hepatologia.
- As amostras utilizadas foram obtidas com o consentimento informado dos pais ou responsáveis pelos paciente e seu anonimato permanece preservado.

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ESPESSAMENTO DE TÚNICA MÉDIA:
CORRELAÇÕES COM EXPRESSÃO DE ANGIOPOIETINAS 1 E 2 E
RECEPTOR TIE2

Autores - Najara Maurício Reus¹, Aline Friedrichs de Souza², Cleandra Gregório³, Themis Reverbel da Silveira⁴, Jorge Luiz dos Santos⁵.

1. Aluna da Graduação em Biomedicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
 2. Médica Gastroenterologista Pediátrica; Aluna de Mestrado do PPGSCA - Pesquisadora responsável pelo projeto.
 3. Aluna da Graduação em Biomedicina na Universidade Federal de Ciências Básicas da Saúde;
 4. Professora do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia e do Programa de Pós-Graduação Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Médica. Doutora em Genética - Genética e Biologia Molecular.
 5. Médico do Serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Doutor em Medicina - Saúde da Criança e do Adolescente.
- *Orientador.**

Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Comissão de Graduação da Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Este estudo é Trabalho de Conclusão de Curso de Najara Maurício Reus, parte do Mestrado de Dra. Aline Friedrichs de Souza que será apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente.

Reimpressões: Jorge Luiz dos Santos, MD, PhD, Pós-Graduação do Departamento de Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, Bairro Rio Branco, CEP: 90035-091 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. (kapars@terra.com.br).

RESUMO

Na Atresia biliar (AB) uma colangiopatia progressiva de causa desconhecida permanece mesmo após desobstrução cirúrgica ao fluxo biliar através de portoenterostomia, levando à cirrose e insuficiência hepática crônica. Nós investigamos o papel de uma arteriopatia na doença. Previamente, observamos a presença de espessamento de túnica média arterial (ETM) associado à rarefação biliar e à expressão de VEGF-A, marcador de hipóxia, em estruturas portais. Este estudo teve por objetivo avaliar a expressão das angiopoietinas 1 e 2 (ANG1 e ANG2) e de seu receptor TIE2, envolvidos na maturação da parede arterial, em fígados de pacientes com AB, correlacionando-a com variáveis histológicas de gravidade da doença, incluindo o ETM. RT-PCRq foi realizado em amostras de fígado de pacientes com AB (n=22) e em casos de colestase intra-hepática (CIH, n=9) para avaliar a expressão das angiopoietinas e seu receptor. Gene normalizador: S18. O valor do ETM foi obtido pela razão “espessura de túnica média/diâmetro luminal”, calculada por análise morfométrica de 10 imagens/caso em lâminas de HE. Outras variáveis de gravidade histológica e clínicas foram também avaliadas. Não houve diferenças nas expressões das moléculas em estudo entre pacientes com AB e CIH. Porém, exclusivamente na AB, houve correlação positiva moderada entre a expressão das angiopoietinas com o ETM (ANG1 $r=0,58$; $P=0,013$, ANG2 $r=0,52$; $P=0,032$). A expressão das angiopoietinas correlacionou-se negativamente com a de Tie2 (ANG1 $r=0,73$; $P<0,001$, ANG2 $r=0,54$; $P=0,007$). Não houve correlação das expressões dos marcadores angiogênicos com as demais variáveis de gravidade da doença. Portanto, as angiopoietinas 1 e 2 relacionam-se ao ETM que ocorre na AB, de maneira independente da gravidade histológica e clínica da doença, e há correlação inversa entre suas expressões e de seu receptor.

Palavras-chave: Atresia Biliar, espessamento de túnica média, angiopoietinas, TIE2

INTRODUÇÃO

A Atresia Biliar (AB) é uma doença hepática infantil em que há a oclusão completa de parte ou da totalidade das vias biliares extra-hepáticas, associada a uma colangiopatia persistente e progressiva em ductos biliares intra-hepáticos^{1, 2}. A existência desta colangiopatia faz com que, apesar da desobstrução das vias biliares extra-hepáticas por meio de uma portoenterostomia, permaneça um processo lesivo biliar que leva a continuadas ativação e proliferação de fibroblastos, cirrose e à insuficiência hepática crônica, tornando a AB a causa mais frequente de transplante hepático (TxH) infantil.

A etiopatogenia da AB permanece obscura, mas especula-se que esse fenótipo seja o resultado da associação entre fatores predisponentes genéticos e ambientais^{37, 39}.

O padrão-ouro de diagnóstico ainda consiste em uma biópsia hepática. A AB é caracterizada, do ponto de vista histopatológico, pela presença de expansão portal, tampões de pigmento biliar na luz das estruturas biliares intra-hepáticas, reação ductular e fibrose precoce^{1, 11, 12} que, entretanto, são variáveis tempo-dependentes^{63, 94}.

Por havermos observado espessamento de túnica média arterial sugestivo de remodelamento vascular nestes pacientes, nossa hipótese é de que uma alteração vascular esteja envolvida na etiopatogenia da AB. Além disso, observamos, em um estudo recente, a expressão imunistoquímica do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF A), marcador de hipóxia, em estruturas portais (tanto biliares, quanto arteriais) e no porta hepatis de pacientes com AB, e que essa imunolocalização estava relacionada com o espessamento de túnica média nesses pacientes, sugerindo a existência de uma colangiopatia isquêmica na AB⁵¹, o que não é uma característica exclusiva dessa doença, mas que tem sido sugerida, através de estudos morfométricos realizados por nosso grupo de pesquisa^{51, 63}.

O sistema Angiopietinas 1 e 2 e seu receptor TIE2 (ANG/TIE2) é da maior importância no desenvolvimento normal das estruturas vasculares, e seu desequilíbrio está presente em distúrbios da embriologia vascular⁷⁷. Thurston (2003) demonstrou uma forte relação entre um aumento da espessura de vasos com o excesso de expressão de ANG1⁷⁵. Há, também, íntima relação entre fibrose e angiogênese, e os mecanismos desta interação têm sido estudados⁸⁰. A ação da

ANG2 na maturação de novos vasos depende da presença de VEGF. Na presença do VEGF, a ANG2 potencializa a ação de ANG1, enquanto que, na sua ausência, ANG2 bloqueia a atividade da ANG1 e promove regressão vascular^{74, 76}.

O objetivo desse estudo foi realizar uma análise morfométrica do ETM e correlacioná-la à expressão de ANG1, ANG2 e seu receptor TIE2 em fígados de pacientes com atresia biliar.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRA

A amostra estudada foi composta por dois grupos: AB – constituído de biópsias de fígados de pacientes com atresia biliar (n=23) e grupo controle – biópsias de pacientes com outras causas de colestase intra-hepática neonatal (de etiologia secundária a hepatite neonatal – n=5, deficiência de α -1-antitripsina – n=3, e colestase da NPT – n=1, totalizando um n=9).

Pacientes, de ambos os sexos, submetidos ao protocolo de investigação de colestase neonatal - do Setor de Gastroenterologia Pediátrica do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) - passaram por laparotomia exploratória a fim de diagnosticar AB e, nos casos em que esta doença foi identificada, foram, a seguir, submetidos a portoenterostomia. No momento dessa laparotomia, retirou-se uma biópsia em cunha do fígado desses pacientes. Esse material, foi armazenado: 1) parafinado, no Serviço de Patologia do HCPA e, 2) seguindo um protocolo específico de coleta e armazenamento (ANEXO I), mantido sob congelamento a -80°C , no Banco de Tecidos do LHEG.

MORFOMETRIA

- PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

De cada amostra de tecido obtidos, foram utilizados três secções de $5\mu\text{m}$ de espessura, para produção das lâminas histológicas de hematoxilina e eosina, imunohistoquímicas para marcação de CK7 e histoquímicas de Picrossírius, aplicadas nas respectivas avaliações morfométricas: mensuração de espessamento de parede arterial, análise da extensão da proliferação biliar e extensão de colágeno.

- CAPTURA DE IMAGENS

Todas as avaliações foram realizadas por meio de um sistema de análise computadorizada de imagens presente no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Essa estação inclui um fotomicroscópio (Olympus BX51) com captadores de posição, uma câmera digital Q Color5 (Olympus) com adaptador de câmera (Olympus BX60), um computador com monitor em cores, *mouse* e teclado. As aquisições das imagens foram feitas utilizando o software QCapture Pro® (QImaging Corporation. Austin,

TX/USA) e todas as aquisições seguiram os padrões do protocolo para aquisição de imagens no laboratório citado (ANEXO II). Para todas as avaliações, capturaram-se imagens de espaços-porta aleatórios por toda a extensão das lâminas histológicas e imunoistoquímicas; a voltagem da lâmpada foi mantida estável durante o processo de captura de imagens, permitindo a iluminação homogênea dos campos microscópicos; as imagens foram salvas em formato TIFF e armazenadas em dispositivo físico para posterior análise.

- AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DAS ESTRUTURAS VASCULARES ARTERIAIS PARA AVALIAÇÃO DE ESPESSAMENTO DE PAREDE ARTERIAL

Foram selecionadas, aleatoriamente, 10 imagens de cada lâmina corada com HE, seguindo os padrões do protocolo de aquisição. Apenas vasos arteriais em corte transversal (perpendiculares ao vaso) foram avaliados.

O processo de mensuração foi previamente desenvolvido e descrito pelo nosso grupo⁹⁰. Resumidamente, utilizando a ferramenta *Manual measurements* do software de imagens Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics Inc. Rockville, MD/USA) mediu-se o espessamento de túnica média arterial (ETM), que corresponde à média dos valores de 6 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 externa da túnica íntima, na direção do centro luminal. O valor do diâmetro luminal foi quantificado através da média dos valores da extensão de duas linhas traçadas entre pontos opostos da face interna da túnica íntima, uma delas na região de maior diâmetro e outra na de menor diâmetro (Figura 1 em ANEXO). A partir destas medidas foi calculada a relação RMED (*Relation of Medial Layer Thickness/External Diameter*, ou seja, Razão entre Espessura de Túnica Média e Diâmetro Luminal). (Figura 2 em ANEXO).

- ANÁLISE DA EXTENSÃO DA REAÇÃO DUCTULAR POR MÉTODO MORFOMÉTRICO: QUANTIFICAÇÃO DA PERCENTAGEM DE ESTRUTURAS CK7-POSITIVAS (PCK7)

O método foi, também, previamente desenvolvido e descrito por nosso grupo⁸⁶. Medidas morfométricas foram analisadas usando o programa de computador Adobe® Photoshop® CS3 Extended 10.0 (Adobe Systems Inc. San Jose, CA/USA)

em cada estrutura biliar de cada imagem salva. A área da imagem positiva para CK-7 foi medida em pixels, através da ferramenta “*Color Range*” para escolher a “*foreground color*” (a cor que se deseja selecionar) e a “*background color*” (cor de fundo), e, após isso, a ferramenta “*Grow*”, para ampliar o espectro da cor desejada, para que toda a área positiva para CK7 estivesse envolta/selecionada (Figura 3 em ANEXO). O PCK7 de cada caso inclui a média das medidas obtidas em 10 imagens, sendo analisada, em cada imagem, a razão da área de positividade em relação à área total medidas em pixels.

- QUANTIFICAÇÃO DA EXTENSÃO DA ÁREA DE FIBROSE

Foi realizada uma quantificação morfométrica, também através do programa de computador Adobe® Photoshop® CS3 Extended 10.0 (Adobe Systems Inc. San Jose, CA/USA), assim como descrito no item anterior. Essa análise é baseada em outras publicações^{89, 95} e, também, já foi descrita por nosso grupo⁵¹. Para cada paciente, foram analisadas imagens de tecido hepático marcado com picrossírius (coloração utilizada para marcar fibrose) nas quais foram aplicadas as ferramentas “*Color Range*” para selecionar a cor desejada (“*foreground color*”) sobre a cor de fundo (“*background color*”), utilizando, logo após, a ferramenta “*Grow*” para que toda a área positiva para picrossírius fosse selecionada. Para cada paciente foi calculada a média de pixels encontrados nas 10 imagens, sendo analisada em cada imagem a razão da área de positividade em relação à área total medida também em pixels (figura 4 em ANEXO). A razão encontrada nessa análise foi denominada de extensão da fibrose (FIB).

PCR

- PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA PCR

Amostras de tecido foram congeladas em nitrogênio líquido ou armazenadas em *RNA holder* (Bioagency. São Paulo, SP/BR) imediatamente após a biópsia e posteriormente armazenadas a -80°C para extração de RNA. A extração de RNA foi realizada utilizando kit Brazol® (LCG Biotecnologia. São Paulo, SP/BR) conforme instruções do fabricante. Após a extração, o RNA foi convertido em cDNA utilizando *primers* randômicos e enzima Transcriptase Reversa (Invitrogen®, Life Technologies do Brasil Ltda. São Paulo, SP/BR) e as amostras de cDNA armazenadas a -20°C para posterior análise.

- qRT-PCR

Para quantificação da expressão dos genes de interesse foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real com sinalização de SYBRGreen (Invitrogen®, Life Technologies do Brasil Ltda. São Paulo, SP/BR). De maneira simplificada, as amostras de cDNA de cada paciente foram amplificadas utilizando *primers* específicos e o intercalante de DNA fluorescente SYBRGreen. O valor de CT, isto é, o ciclo em que cada amostra ultrapassou o limiar de detecção foi indicativo da quantidade relativa de expressão gênica naquela amostra. Além disso, um gene de expressão constitutiva (S18 ribossômico) foi utilizado para normalizar os resultados.

As reações de PCR em tempo real realizaram-se em um aparelho ABI 7500 existente no Serviço de Genética Médica do HCPA, na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) e no Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG).

AVALIAÇÃO DA IDADE DA RETIRADA DA BIÓPSIA

Através da observação dos prontuários dos pacientes, anotamos as idades dos pacientes no momento da retirada da biópsia em cunha por ocasião da laparotomia exploratória que antecede, nos casos de AB, a portoenterostomia.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis quantitativas foram avaliadas por suas médias e desvios-padrão. As qualitativas por suas frequências e percentuais. Como os grupos são compostos de um número pequeno de pacientes e são pouco simétricos, foram utilizados testes não paramétricos para compará-los, no caso, o teste de Mann-Whitney foi aplicado. Além disso, para a verificar a correlação entre as variáveis analisadas, o coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado. Para essas correlações, um valor de $p < 0,05$ foi adotado como nível de significância. Os programas Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corp. Redmond, WA) e SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL) foram utilizados para processamento dos dados e análise estatística.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Devido à utilização de dados dos prontuários dos pacientes, os autores assinaram um Termo de Compromisso para Utilização de Dados. A utilização do material foi aprovada pela Comissão de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As coletas e armazenamento de material foram autorizada pelos pais ou responsáveis pela criança através da assinatura do Termo de Consentimento Informado, conforme protocolo estabelecido no LEHG (ANEXO III).

RESULTADOS

IDADE DAS BIÓPSIAS

Na avaliação das idades dos pacientes no momento da retirada da biópsia hepática por ocasião da portoenterostomia, observamos uma mediana semelhante para os dois grupos. (Tabela 1 em ANEXO)

EXPRESSÃO DAS ANG1, ANG2 E TIE2 POR RT-PCRq

A análise da expressão das angiopoietinas 1 e 2 e seu receptor TIE2 através do método de PCR quantitativo em tempo real não demonstrou diferença significativa entre os grupos AB e controle (Tabela 2 em ANEXO).

Exclusivamente no grupo da AB, observou-se relação inversa entre a expressão das angiopoietinas e do receptor Tie2.

RELAÇÃO RT-PCRq E VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS DE GRAVIDADE HISTOLÓGICA

Quando comparamos as expressões das angiopoietinas e seu receptor às variáveis morfométricas utilizadas para avaliação de gravidade histológica, a única a apresentar uma correlação significativa, foi a RMED ($r= 0,586$ e $p=0,013$ para ANG1, e $r= 0,522$ e $p=0,032$ para ANG2), sendo ambas correlações positivas de magnitude moderada (Tabela 3 em ANEXO). Não houve relação entre as expressões dos marcadores em estudo e as variáveis associadas à gravidade da doença hepática, ou seja, PCK7 e extensão de fibrose.

RELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS E IDADE DA BIÓPSIA

Ao correlacionarmos a idade da biópsia, em dias, e as variáveis morfométricas de gravidade histológica, houve correlação positiva foi com PCK7 ($r= 0,700$ e $p=0,002$), ou seja, a reação ductular presente na AB associou-se à idade por ocasião da portoenterostomia. Outra correlação positiva foi obtida entre PCK7 e a FIB ($r= 0,551$ e $p=0,022$) (Tabela 3 em ANEXO).

DISCUSSÃO

Como sugerido previamente, nós pudemos observar, neste estudo, a correlação existente entre as angiopoietinas e o espessamento de túnica média arterial presente na AB, começando a esclarecer o mecanismo do espessamento da parede arterial da doença em questão^{51, 56}. Diversos estudos histológicos descrevem hiperplasia e hipertrofia em ramos da artéria hepática nos espaços-porta de pacientes com AB^{52, 60, 61}. Ho *et al.* avaliaram as alterações da artéria hepática em pacientes com AB, observando, de forma subjetiva, a ocorrência de dilatação luminal e espessamento de parede vascular⁵⁵. Kobayashi *et al.* sugerem que níveis séricos de proteína-10 induzida por interferon (uma proteína associada à adesão de células endoteliais e angiogênese) possam estar associados à fibrose portal e que alterações hiperplásicas e hipertróficas arteriais sejam secundárias a essa expansão fibrogênica⁹⁶. Com base em estudos que apontam a ação das angiopoietinas 1 e 2 na maturação da parede arterial e na associação aos efeitos do VEGF, durante a angiogênese^{51, 57}, investigamos a ação da ANG1 e ANG2 e seu receptor TIE2 visando identificar a ação destas moléculas no ETM presente na AB. A partir de nossos resultados, identificamos que a expressão das angiopoietinas 1 e 2 associa-se à alteração vascular que observamos na AB. Entretanto, a associação observada por nosso estudo não evidenciou diferença dessa relação angiopoietinas/ETM entre AB e os pacientes com CIH.

A relação entre a lesão biliar e a fibrose progressiva em doenças colestáticas vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisa⁸⁵⁻⁸⁹. Na AB, a fibrose contribui para uma expansão portal e leva à formação de pontes entre os espaços-porta e também entre esses e as veias centrolobulares, o que contribui para uma progressão à cirrose. Nos ductos biliares extra-hepáticos, ocorre fibrose concêntrica e desaparecimento progressivo do epitélio biliar¹. Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa evidenciaram uma menor área de fibrose em pacientes de AB operados antes dos 60 dias de vida⁹⁰. Em uma pesquisa mais recente, nossos dados não demonstraram correlação entre o volume de fibrose e um melhor prognóstico pós-portoenterostomia, entretanto, foi observada uma forte relação com o aumento da reação ductular e a necessidade de transplante ou o óbito dos pacientes de AB⁸⁶. No presente estudo, não houve correlação entre a fibrose hepática e a idade por ocasião da biópsia. Contudo, foi observada uma correlação positiva entre a FIB e a PCK7. A relação observada nos resultados do presente estudo sugere uma íntima relação entre

a progressão da fibrose hepática e a reação ductular presentes na AB. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre a reação ductular e a idade por ocasião da portoenterostomia nos pacientes avaliados, reforçando o conceito de que essas alterações são dependentes do tempo e evidenciando a necessidade de um diagnóstico e tratamento precoces.

O fato de as expressões das angiopoietinas não terem se correlacionado com as variáveis de gravidade histológica gera a hipótese de que exista uma arteriopatia nos casos de AB independente da gravidade da doença.

Um resultado intrigante, em nosso estudo, foi a correlação negativa da expressão do receptor TIE2 quando comparada a dos seus ligantes, as angiopoietinas 1 e 2. Rubin *et al.* investigam sinalizações celulares que possam induzir a ubiquitinação de receptores tirosina quinase (como o TIE2) e sugerem que a amplitude e duração da sinalização nesses receptores tenham papel crítico na reação estudada⁹⁷. Wehrle *et al.*, em 2009, sugeriu que a ubiquitinação de TIE2 fosse dependente de uma molécula denominada c-Cbl e que essa interação fosse dependente da estimulação pelo seu ligante, a Angiopoietina-1⁹⁸. Entretanto, nosso resultado deve continuar sendo investigado em futuros estudos.

Em resumo, nosso estudo observou que as angiopoietinas 1 e 2 relacionam-se ao ETM que ocorre na AB, de maneira independente da gravidade histológica e clínica da doença, e que há uma correlação inversa entre suas expressões e de seu receptor.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Silva LF, CT; Carvalho, E. Hepatologia em Pediatria. 1ª ed. Barueri, SP: Manole; 2012.
2. Balistreri WF, Grand R, Hoofnagle JH, et al. Biliary atresia: current concepts and research directions. Summary of a symposium. *Hepatology* 1996;23(6):1682-92.
3. Santos JL, Carvalho E, Bezerra JA. Advances in biliary atresia: from patient care to research. *Braz J Med Biol Res* 2010;43(6):522-7.
4. Santos J. Presença de malformação de placa ductal e de alterações em artérias e arteríolas nos espaços-porta de pacientes com atresia biliar. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002.
5. Roquete ML. [Neonatal cholestasis]. *J Pediatr (Rio J)* 2000;76 Suppl 1:S187-97.
6. Mushtaq I, Logan S, Morris M, et al. Screening of newborn infants for cholestatic hepatobiliary disease with tandem mass spectrometry. *BMJ* 1999;319(7208):471-7.
7. dos Santos JL, da Silveira TR, da Silva VD, Cerski CT, Wagner MB. Medial thickening of hepatic artery branches in biliary atresia. A morphometric study. *J Pediatr Surg* 2005;40(4):637-42.
8. dos Santos JP, AA; Silveira, TR The ductal plate and the organization of the intrahepatic biliary system. *HCPA* 1998;18:302-310.
9. Edom PT, Meurer L, da Silveira TR, Matte U, dos Santos JL. Immunolocalization of VEGF A and its receptors, VEGFR1 and VEGFR2, in the liver from patients with biliary atresia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011;19(4):360-8.
10. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407(6801):242-248.
11. Thurston G. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003;314(1):61-8.
12. Saharinen P, Alitalo K. The yin, the yang, and the angiopoietin-1. *J Clin Invest* 2011;121(6):2157-9.
13. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2008;73(7):751-62.
14. Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, et al. Angiopoietin 2 displays a vascular endothelial growth factor dependent synergistic effect in hepatocellular carcinoma development in mice. *Gut* 2005;54(12):1768-75.
15. dos Santos JL, Cerski CT, da Silva VD, de Mello ES, Wagner MB, da Silveira TR. [Factors related to the post-portoenterostomy prognosis of biliary atresia]. *J Pediatr (Rio J)* 2002;78(4):341-6.
16. Santos JL, Kieling CO, Meurer L, et al. The extent of biliary proliferation in liver biopsies from patients with biliary atresia at portoenterostomy is associated with the postoperative prognosis. *J Pediatr Surg* 2009;44(4):695-701.
17. Lin XZ, Horng MH, Sun YN, Shiesh SC, Chow NH, Guo XZ. Computer morphometry for quantitative measurement of liver fibrosis: comparison with Knodell's score, colorimetry and conventional description reports. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13(1):75-80.

18. Shteyer E, Ramm GA, Xu C, White FV, Shepherd RW. Outcome after portoenterostomy in biliary atresia: pivotal role of degree of liver fibrosis and intensity of stellate cell activation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42(1):93-9.
19. Cameron GR, Hou CT. An experimental study of stricture of the common bile-duct in the guinea-pig. *J Pathol Bacteriol* 1962;83:265-74.
20. Appleby LH. Indwelling common duct tubes. *J Int Coll Surg* 1959;31(6):631-43.
21. Stowens D. Congenital Biliary Atresia. *Ann N Y Acad Sci* 1963;111:337-57.
22. Brough AJ, Bernstein J. Liver biopsy in the diagnosis of infantile obstructive jaundice. *Pediatrics* 1969;43(4):519-26.
23. Ho CW, Shioda K, Shirasaki K, Takahashi S, Tokimatsu S, Maeda K. The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the hepatobiliary system and the hepatic artery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;16(1):53-60.
24. Kobayashi H, Narumi S, Tamatani T, Lane GJ, Miyano T. Serum IFN-inducible protein-10: a new clinical prognostic predictor of hepatocyte death in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1999;34(2):308-11.
25. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87(7):1171-80.
26. Constantine VS, Mowry RW. Selective staining of human dermal collagen. II. The use of picosirius red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol* 1968;50(5):419-23.
27. Schweizer P, Schweizer M, Schellinger K, Kirschner HJ, Schittenhelm C. Prognosis of extrahepatic bile-duct atresia after hepatoportoenterostomy. *Pediatr Surg Int* 2000;16(5-6):351-5.
28. Pape L, Olsson K, Petersen C, von Wasilewski R, Melter M. Prognostic value of computerized quantification of liver fibrosis in children with biliary atresia. *Liver Transplantation* 2009;15(8):876-882.
29. Rubin C, Gur G, Yarden Y. Negative regulation of receptor tyrosine kinases: unexpected links to c-Cbl and receptor ubiquitylation. *Cell Res* 2005;15(1):66-71.
30. Wehrle C, Van Slyke P, Dumont DJ. Angiopoietin-1-induced ubiquitylation of Tie2 by c-Cbl is required for internalization and degradation. *Biochem J* 2009;423(3):375-80.

3. CONCLUSÕES

Através da realização desta pesquisa, foi possível confirmar a relação entre a as angiopoietinas 1 e 2 com o espessamento de túnica média arterial presente na atresia biliar. Observamos, também, que isso ocorre de maneira independente da gravidade histológica da doença, avaliada através dos métodos morfométricos de picrossírius e de PCK7, pois não houve correlação entre a expressão dos fatores angiogênicos com essas variáveis.

Foi possível observar uma correlação inversa entre a expressão das angiopoietinas e de seu receptor, TIE2.

Entretanto, não houve diferença estatística entre a expressão dos fatores angiogênicos entre os dois grupos estudados.

4. PERSPECTIVAS

Os resultados adquiridos, ao findar deste trabalho, levantaram questões a serem respondidas. Para obter tais respostas, é preciso a realização novas mensurações e da associação de outros fatores provavelmente associados à etiopatogenia da AB.

Portanto, como perspectivas iniciais da continuação do presente trabalho, encontram-se:

- Realizar qPCR de outros genes provavelmente envolvidos na patogênese da doença, como VEGF e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2, PDGF e HIF1;
- Avaliar os resultados obtidos através de cálculos estatísticos;
- Associar os dados previamente obtidos em trabalhos posteriores com os novos resultados de análise molecular, buscando encontrar correlações significativas entre as variáveis com os marcadores de gravidade histológica da doença;
- Correlacionar os resultados obtidos comparando os grupos estudados, buscando encontrar diferenças significativas entre os grupos controle (CIH) e atresia biliar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS

1. Silva LF, CT; Carvalho, E. Hepatologia em Pediatria. 1ª ed. Barueri, SP: Manole; 2012.
2. Balistreri WF, Grand R, Hoofnagle JH, et al. Biliary atresia: current concepts and research directions. Summary of a symposium. *Hepatology* 1996;23(6):1682-92.
3. McKiernan PJ, Baker AJ, Kelly DA. The frequency and outcome of biliary atresia in the UK and Ireland. *Lancet* 2000;355(9197):25-9.
4. Davenport M, De Ville de Goyet J, Stringer MD, et al. Seamless management of biliary atresia in England and Wales (1999-2002). *Lancet* 2004;363(9418):1354-7.
5. Nio M, Ohi R, Miyano T, Saeki M, Shiraki K, Tanaka K. Five- and 10-year survival rates after surgery for biliary atresia: a report from the Japanese Biliary Atresia Registry. *J Pediatr Surg* 2003;38(7):997-1000.
6. Chen SM, Chang MH, Du JC, et al. Screening for biliary atresia by infant stool color card in Taiwan. *Pediatrics* 2006;117(4):1147-54.
7. Weerasooriya VS, White FV, Shepherd RW. Hepatic fibrosis and survival in biliary atresia. *J Pediatr* 2004;144(1):123-5.
8. Sokol RJ, Shepherd RW, Superina R, Bezerra JA, Robuck P, Hoofnagle JH. Screening and outcomes in biliary atresia: summary of a National Institutes of Health workshop. *Hepatology* 2007;46(2):566-81.
9. Kieling CO, Santos JL, Vieira SM, et al. Biliary atresia: we still operate too late. *J Pediatr (Rio J)* 2008;84(5):436-41.
10. Carvalho E, Santos JL, Silveira TR, et al. Biliary atresia: the Brazilian experience. *J Pediatr (Rio J)* 2010;86(6):473-9.
11. Roquete ML. [Neonatal cholestasis]. *J Pediatr (Rio J)* 2000;76 Suppl 1:S187-97.
12. Mushtaq I, Logan S, Morris M, et al. Screening of newborn infants for cholestatic hepatobiliary disease with tandem mass spectrometry. *BMJ* 1999;319(7208):471-7.
13. Kasai MS, S A new operation for "non-correctable" biliary atresia, hepatoportoenterostomy. *Shujutsu* 1959; 13:733-9 A new operation for "non-correctable" biliary atresia, hepatoportoenterostomy. *Shujutsu* 1959;13:733-9
14. Kasai M, Kimura S, Asakura Y, Suzuki H, Taira Y, Ohashi E. Surgical treatment of biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1968;3(6):665-675.
15. Ohi R, Mochizuki I, Komatsu K, Kasai M. Portal hypertension after successful hepatic portoenterostomy in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1986;21(3):271-4.
16. Kuroda T, Saeki M, Morikawa N, Fuchimoto Y. Biliary atresia and pregnancy: puberty may be an important point for predicting the outcome. *J Pediatr Surg* 2005;40(12):1852-5.
17. Howard ER, MacLean G, Nio M, Donaldson N, Singer J, Ohi R. Survival patterns in biliary atresia and comparison of quality of life of long-term survivors in Japan and England. *J Pediatr Surg* 2001;36(6):892-7.
18. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, et al. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg* 2008;95(5):646-56.
19. Sookpotarom P, Vejchapipat P, Chittmitrapap S, Chongsrisawat V, Chandrakamol B, Poovorawan Y. Short-term results of Kasai operation for biliary atresia: experience from one institution. *Asian J Surg* 2006;29(3):188-92.
20. Lee WS, Chai PF, Lim KS, Lim LH, Looi LM, Ramanujam TM. Outcome of biliary atresia in Malaysia: a single-centre study. *J Paediatr Child Health* 2009;45(5):279-85.
21. Sanghai SR, Shah I, Bhatnagar S, Murthy A. Incidence and prognostic factors associated with biliary atresia in western India. *Ann Hepatol* 2009;8(2):120-2.
22. Mshelbwala PM, Sabiu L, Lukong CS, Ameh EA. Management of biliary atresia in Nigeria: the ongoing challenge. *Ann Trop Paediatr* 2007;27(1):69-73.

23. dos Santos JL, da Silveira TR, Almeida H, Carvalho PA, Cerski CT. [Neonatal cholestasis: the delay in referring patients for differential diagnosis]. *J Pediatr (Rio J)* 1997;73(1):32-6.
24. Mowat AP, Davidson LL, Dick MC. Earlier identification of biliary atresia and hepatobiliary disease: selective screening in the third week of life. *Arch Dis Child* 1995;72(1):90-2.
25. Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, Le Pommelet C, Golmard JL, Auvert B. Epidemiology of biliary atresia in France: a national study 1986-96. *J Hepatol* 1999;31(6):1006-13.
26. Wildhaber BE, Coran AG, Drongowski RA, et al. The Kasai portoenterostomy for biliary atresia: A review of a 27-year experience with 81 patients. *J Pediatr Surg* 2003;38(10):1480-5.
27. Wildhaber BE, Majno P, Mayr J, et al. Biliary atresia: Swiss national study, 1994-2004. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;46(3):299-307.
28. Shneider BL, Brown MB, Haber B, et al. A multicenter study of the outcome of biliary atresia in the United States, 1997 to 2000. *J Pediatr* 2006;148(4):467-474.
29. Hung PY, Chen CC, Chen WJ, et al. Long-term prognosis of patients with biliary atresia: a 25 year summary. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42(2):190-5.
30. Hsiao CH, Chang MH, Chen HL, et al. Universal screening for biliary atresia using an infant stool color card in Taiwan. *Hepatology* 2008;47(4):1233-40.
31. Bezerra JA. Biliary atresia in Brazil: where we are and where we are going. *J Pediatr (Rio J)* 2010;86(6):445-7.
32. Davenport M, Caponcelli E, Livesey E, Hadzic N, Howard E. Surgical outcome in biliary atresia: etiology affects the influence of age at surgery. *Ann Surg* 2008;247(4):694-8.
33. Caponcelli E, Knisely AS, Davenport M. Cystic biliary atresia: an etiologic and prognostic subgroup. *J Pediatr Surg* 2008;43(9):1619-24.
34. Shinkai M, Ohhama Y, Take H, et al. Long-term outcome of children with biliary atresia who were not transplanted after the Kasai operation: >20-year experience at a children's hospital. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;48(4):443-50.
35. Tanano H, Hasegawa T, Kawahara H, Sasaki T, Okada A. Biliary atresia associated with congenital structural anomalies. *J Pediatr Surg* 1999;34(11):1687-90.
36. Duche M, Fabre M, Kretzschmar B, Serinet MO, Gauthier F, Chardot C. Prognostic value of portal pressure at the time of Kasai operation in patients with biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43(5):640-5.
37. Santos JL, Carvalho E, Bezerra JA. Advances in biliary atresia: from patient care to research. *Braz J Med Biol Res* 2010;43(6):522-7.
38. Harpavat S, Finegold MJ, Karpen SJ. Patients with biliary atresia have elevated direct/conjugated bilirubin levels shortly after birth. *Pediatrics* 2011;128(6):e1428-33.
39. Santos J. Presença de malformação de placa ductal e de alterações em artérias e arteríolas nos espaços-porta de pacientes com atresia biliar. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002.
40. Yamashita R, Takegawa Y, Sakumoto M, et al. Defective development of the gall bladder and cystic duct in Lgr4- hypomorphic mice. *Dev Dyn* 2009;238(4):993-1000.
41. Leyva-Vega M, Gerfen J, Thiel BD, et al. Genomic alterations in biliary atresia suggest region of potential disease susceptibility in 2q37.3. *Am J Med Genet A* 2010;152A(4):886-95.
42. Lee HC, Chang TY, Yeung CY, et al. Association of polymorphisms in the Interleukin-18 gene with susceptibility to biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;52(5):607-11.
43. Arikan C, Berdeli A, Kilic M, Tumgor G, Yagci RV, Aydogdu S. Polymorphisms of the ICAM-1 gene are associated with biliary atresia. *Dig Dis Sci* 2008;53(7):2000-4.

44. Arikan C, Berdeli A, Ozgenc F, Tumgor G, Yagci RV, Aydogdu S. Positive association of macrophage migration inhibitory factor gene-173G/C polymorphism with biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42(1):77-82.
45. Coots A, Donnelly B, Mohanty SK, McNeal M, Sestak K, Tiao G. Rotavirus infection of human cholangiocytes parallels the murine model of biliary atresia. *J Surg Res* 2012;177(2):275-81.
46. Brindley SM, Lanham AM, Karrer FM, Tucker RM, Fontenot AP, Mack CL. Cytomegalovirus-specific T-cell reactivity in biliary atresia at the time of diagnosis is associated with deficits in regulatory T cells. *Hepatology* 2012;55(4):1130-8.
47. Bezerra JA. Biliary atresia--translational research on key molecular processes regulating biliary injury and obstruction. *Chang Gung Med J* 2006;29(3):222-30.
48. Johns Hopkins Medicine, Gastroenterology & Hepatology. Available at: <http://www.hopkins-gi.org> Accessed July, 12 2012.
49. Cotran RS KV, Collins T. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6 ed. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Company; 1999.
50. Deltenre P, Valla DC. Ischemic cholangiopathy. *J Hepatol* 2006;44(4):806-17.
51. Edom PT, Meurer L, da Silveira TR, Matte U, dos Santos JL. Immunolocalization of VEGF A and its receptors, VEGFR1 and VEGFR2, in the liver from patients with biliary atresia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011;19(4):360-8.
52. Appleby LH. Indwelling common duct tubes. *J Int Coll Surg* 1959;31(6):631-43.
53. Klippel CH. A new theory of biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1972;7(6):651-4.
54. Northover JM, Terblanche J. A new look at the arterial supply of the bile duct in man and its surgical implications. *Br J Surg* 1979;66(6):379-84.
55. Ho CW, Shioda K, Shirasaki K, Takahashi S, Tokimatsu S, Maeda K. The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the hepatobiliary system and the hepatic artery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;16(1):53-60.
56. Cameron GR, Hou CT. An experimental study of stricture of the common bile-duct in the guinea-pig. *J Pathol Bacteriol* 1962;83:265-74.
57. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87(7):1171-80.
58. Morgan WW, Jr., Rosenkrantz JC, Hill RB, Jr. Hepatic arterial interruption in the fetus--an attempt to simulate biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1966;1(4):342-6.
59. Hashimoto TY, J.; Mahour, G. et al. . Recent topics of experimental production of biliary atresia and an experimental model using devascularization of the extra-hepatic bile duct in fetal sheep. In: Kasai M, ed. *Biliary Atresia and its Related Disorders - Proceedings of an International Symposium, Sendai, Japan*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1983:38-45.
60. Stowens D. Congenital Biliary Atresia. *Ann N Y Acad Sci* 1963;111:337-57.
61. Brough AJ, Bernstein J. Liver biopsy in the diagnosis of infantile obstructive jaundice. *Pediatrics* 1969;43(4):519-26.
62. Uflacker R, Pariente DM. Angiographic findings in biliary atresia. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2004;27(5):486-90.
63. dos Santos JL, da Silveira TR, da Silva VD, Cerski CT, Wagner MB. Medial thickening of hepatic artery branches in biliary atresia. A morphometric study. *J Pediatr Surg* 2005;40(4):637-42.
64. Kobayashi H, Li Z, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T. Role of immunologic costimulatory factors in the pathogenesis of biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 2003;38(6):892-896.
65. Humphrey TM, Stringer MD. Biliary atresia: US diagnosis. *Radiology* 2007;244(3):845-51.
66. Kim WS, Cheon JE, Youn BJ, et al. Hepatic arterial diameter measured with US: adjunct for US diagnosis of biliary atresia. *Radiology* 2007;245(2):549-55.

67. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed; 2004.
68. Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Van Steenkiste C, Colle I, Van Vlierberghe H. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int* 2011;31(2):146-62.
69. Eibel B, Rodrigues CG, Giusti, II, et al. Gene therapy for ischemic heart disease: review of clinical trials. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2011;26(4):635-46.
70. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87(7):1161-9.
71. Gjini E, Hekking LH, Kuchler A, et al. Zebrafish Tie-2 shares a redundant role with Tie-1 in heart development and regulates vessel integrity. *Dis Model Mech* 2011;4(1):57-66.
72. Seegar TC, Eller B, Tzvetkova-Robev D, et al. Tie1-Tie2 interactions mediate functional differences between angiopoietin ligands. *Mol Cell* 2010;37(5):643-55.
73. Malik NM, Jin P, Raatz Y, et al. Regulation of the angiopoietin-Tie ligand-receptor system with a novel splice variant of Tie1 reduces the severity of murine arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49(10):1828-39.
74. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2008;73(7):751-62.
75. Thurston G. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003;314(1):61-8.
76. Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, et al. Angiopoietin 2 displays a vascular endothelial growth factor dependent synergistic effect in hepatocellular carcinoma development in mice. *Gut* 2005;54(12):1768-75.
77. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407(6801):242-248.
78. Jeansson M, Gawlik A, Anderson G, et al. Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *J Clin Invest* 2011;121(6):2278-89.
79. Holopainen T, Saharinen P, D'Amico G, et al. Effects of angiopoietin-2-blocking antibody on endothelial cell-cell junctions and lung metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(6):461-75.
80. Saharinen P, Alitalo K. The yin, the yang, and the angiopoietin-1. *J Clin Invest* 2011;121(6):2157-9.
81. Taura K, De Minicis S, Seki E, et al. Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;135(5):1729-38.
82. Dubrulle P, Amoudru C, Claeys C, Grailles. [Morphometry in the examination of endocrine function in young apprentices]. *Echo Med Nord* 1954;25(12):545-59.
83. Yamaguti DC, Patricio FR. Morphometrical and immunohistochemical study of intrahepatic bile ducts in biliary atresia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23(9):759-65.
84. Ng CY, Kamisah Y, Faizah O, Jubri Z, Qodriyah HM, Jaarin K. Involvement of Inflammation and Adverse Vascular Remodelling in the Blood Pressure Raising Effect of Repeatedly Heated Palm Oil in Rats. *Int J Vasc Med* 2012;2012:404025.
85. Constantine VS, Mowry RW. Selective staining of human dermal collagen. II. The use of picosirius red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol* 1968;50(5):419-23.
86. Santos JL, Kieling CO, Meurer L, et al. The extent of biliary proliferation in liver biopsies from patients with biliary atresia at portoenterostomy is associated with the postoperative prognosis. *J Pediatr Surg* 2009;44(4):695-701.
87. Schweizer P, Schweizer M, Schellinger K, Kirschner HJ, Schittenhelm C. Prognosis of extrahepatic bile-duct atresia after hepatoportoenterostomy. *Pediatr Surg Int* 2000;16(5-6):351-5.

88. Pape L, Olsson K, Petersen C, von Wasilewski R, Melter M. Prognostic value of computerized quantification of liver fibrosis in children with biliary atresia. *Liver Transplantation* 2009;15(8):876-882.
89. Shteyer E, Ramm GA, Xu C, White FV, Shepherd RW. Outcome after portoenterostomy in biliary atresia: pivotal role of degree of liver fibrosis and intensity of stellate cell activation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42(1):93-9.
90. dos Santos JL, Cerski CT, da Silva VD, de Mello ES, Wagner MB, da Silveira TR. [Factors related to the post-portoenterostomy prognosis of biliary atresia]. *J Pediatr (Rio J)* 2002;78(4):341-6.
91. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31(1):11-24.
92. Osborn M. Intermediate filaments as histologic markers: an overview. *J Invest Dermatol* 1983;81(1 Suppl):104s-9s.
93. Fisher HP, Doppl W, Osborn M, Altmannsberger M. Evidence for a hepatocellular lineage in a combined hepatocellular-cholangiocarcinoma of transitional type. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1988;56(2):71-6.
94. dos Santos JP, AA; Silveira, TR The ductal plate and the organization of the intrahepatic biliary system. *HCPA* 1998;18:302-310.
95. Lin XZ, Horng MH, Sun YN, Shiesh SC, Chow NH, Guo XZ. Computer morphometry for quantitative measurement of liver fibrosis: comparison with Knodell's score, colorimetry and conventional description reports. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13(1):75-80.
96. Kobayashi H, Narumi S, Tamatani T, Lane GJ, Miyano T. Serum IFN-inducible protein-10: a new clinical prognostic predictor of hepatocyte death in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1999;34(2):308-11.
97. Rubin C, Gur G, Yarden Y. Negative regulation of receptor tyrosine kinases: unexpected links to c-Cbl and receptor ubiquitylation. *Cell Res* 2005;15(1):66-71.
98. Wehrle C, Van Slyke P, Dumont DJ. Angiopoietin-1-induced ubiquitylation of Tie2 by c-Cbl is required for internalization and degradation. *Biochem J* 2009;423(3):375-80.

ANEXOS

ANEXO I

NORMA PARA OBTENÇÃO/ARMAZENAMENTO DE TECIDO HEPATOBILIAR NO BANCO DE TECIDOS DO LABORATÓRIO EXPERIMENTAL DE HEPATOLOGIA E GASTROENTEROLOGIA - HCPA

Material necessário:

- Garrafa para depósito de nitrogênio líquido (garrafa térmica);
- Lápis ou caneta marcadora a prova d'água (*Nalgene Lab Marker*)
- Criotubos com tampa de rosca
- Etiquetas de papel retangular e circular;
- Parafilm M* (*Pechiney, Plastic Packaging, Menasha, WI, USA*)
- Conservantes de RNA: *RNAholder* (Bioagency, código RN-0100N) ou *RNAlater* (Ambion, código 7020 & 7021)
- Caixas para armazenamento de criotubos
- Congelador a -80° C.

Método:

1. obter recipiente para depósito de nitrogênio líquido;
2. adicionar nitrogênio líquido no recipiente, evitando vedar por completo a garrafa;
3. Identificar etiqueta retangular com os dados do paciente (nome, registro, data de nascimento, data do exame) usando lápis ou caneta marcadora a prova d'água e afixar ao criotubo. Anotar em etiqueta circular os dados do tecido (número da amostra, seguido de **F** para *fígado* e **PH** para *porta hepatitis*) e afixar na tampa de rosca;
4. durante o procedimento cirúrgico colher pelo menos 10 mg de tecido hepático e de vias biliares, condicionando-o no criotubo, o qual deve ser, então, vedado;
5. Cobrir o frasco com *parafilm M*, o qual deve ser firmemente aderido;
6. Colocar o criotubo identificado, vedado e coberto com *parafilm* no recipiente com nitrogênio líquido, levando o recipiente ao local de armazenamento;
7. No local de armazenamento, acondicionar o frasco em caixa específica, adequadamente identificada, e depositá-la no freezer a -80°C, temperatura que deverá ser mantida constante.

Observação: Na impossibilidade de colocar o tecido hepatobiliar imediatamente em freezer a -80°C pode-se adicionar, logo após a colocação no criotubo, o volume adequado de *RNAholder* (Bioagency, código RN-0100N) ou *RNAlater* (Ambion, código 7020 & 7021) e manter o material à temperatura ambiente por 24 horas, ou a 4°C por 1 mês até o armazenamento adequado.

ANEXO II

PROTOCOLO PARA AQUISIÇÃO DE IMAGENS NO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL

- Abrir o *QCapture Pro*®;
- Selecionar câmera;
- Clicar em *Setup*;
- *Configure*;
- *Acquire*: selecionar a resolução 2560x1920 e clicar em OK;
- Coloca em formato *Basic Dialog*;
- A luz do microscópio deve estar no nível 9 e o aumento em 200x (objetiva de 20x - verde);
- O filtro ND6 e ND25 devem estar selecionados;
- Clica em *Autoset* e *calculate* (para realizar equilíbrio da luz – só fazer na primeira imagem);
- Regular, com o ajuste micrométrico, até o melhor foco dado pelo programa;
- Clicar em *Snap*;
- Salvar a foto em formato TIFF e armazenar.

FIGURA 1

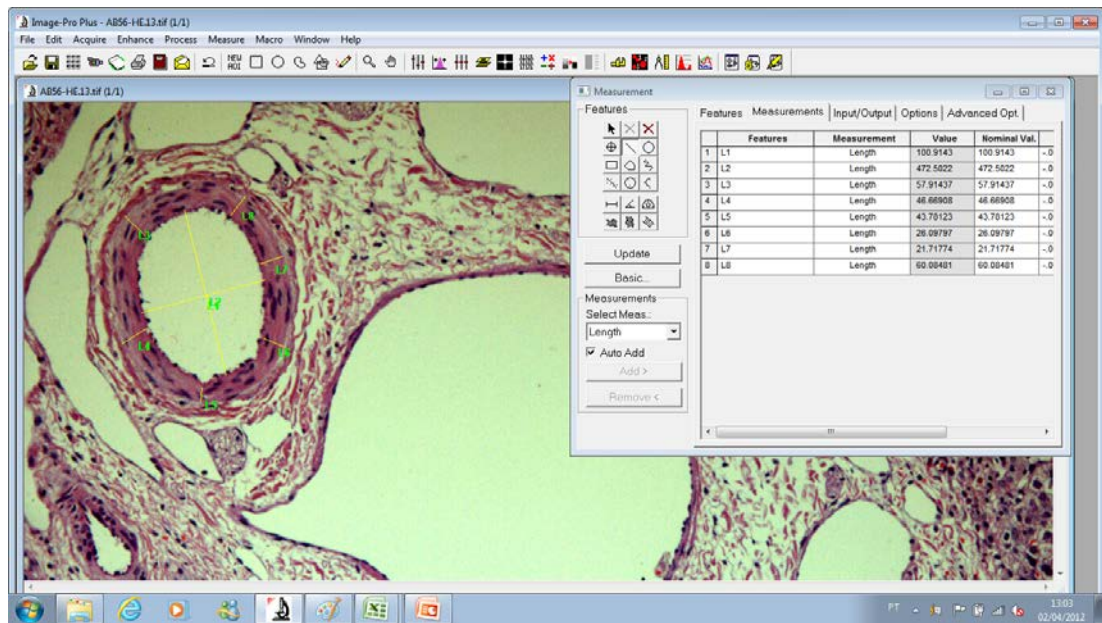


Figura 1: Medidas de espessamento de túnica média arterial (ETM) e diâmetro luminal (DL).

FIGURA 2

The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet titled 'Tabelas RMEB Abs - Relação Túnica Média pelo Diâmetro Luminal'. The table contains data for two patients, 9.1 and 9.2, with columns for 'Diâmetro Luminal', 'Espessura tún. Média', and 'RMED'. The RMEB (RMED) value for patient 9.2 is highlighted in red.

Paciente	Diâmetro Luminal	Espessura tún. Média	RMED
9.1	L1	1181556	3,215214
	L2	1118375	
	L3	3997565	
	L4	2538398	
	L5	1149966	
	Média	1149966	
9.2	L1	8720442	0,463217
	L2	7728767	
	L3	4694353	
	L4	3344267	
	L5	4275316	
	Média	8224605	
	Média RMEB		1,544034

Figura 2: Média dos valores de RMEB (Razão entre Espessura de Túnica Média e Diâmetro Luminal) para um paciente.

FIGURA 3

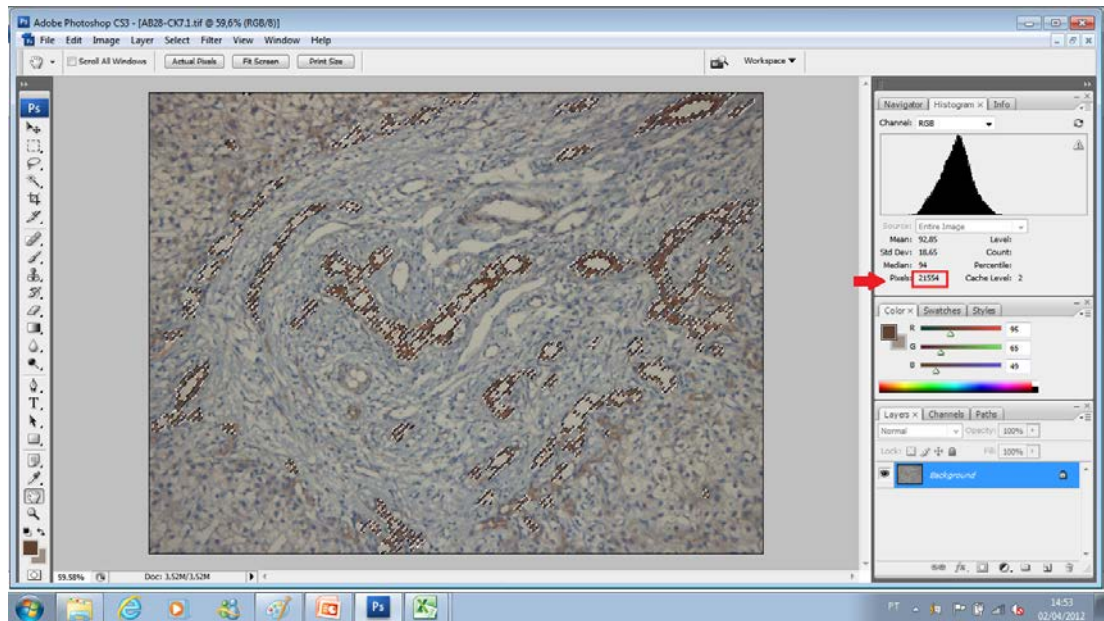


Figura 3: Medida, em pixels, da área de positividade para citoqueratina-7 (CK7). Uma imagem de dez para cada amostra.

FIGURA 4

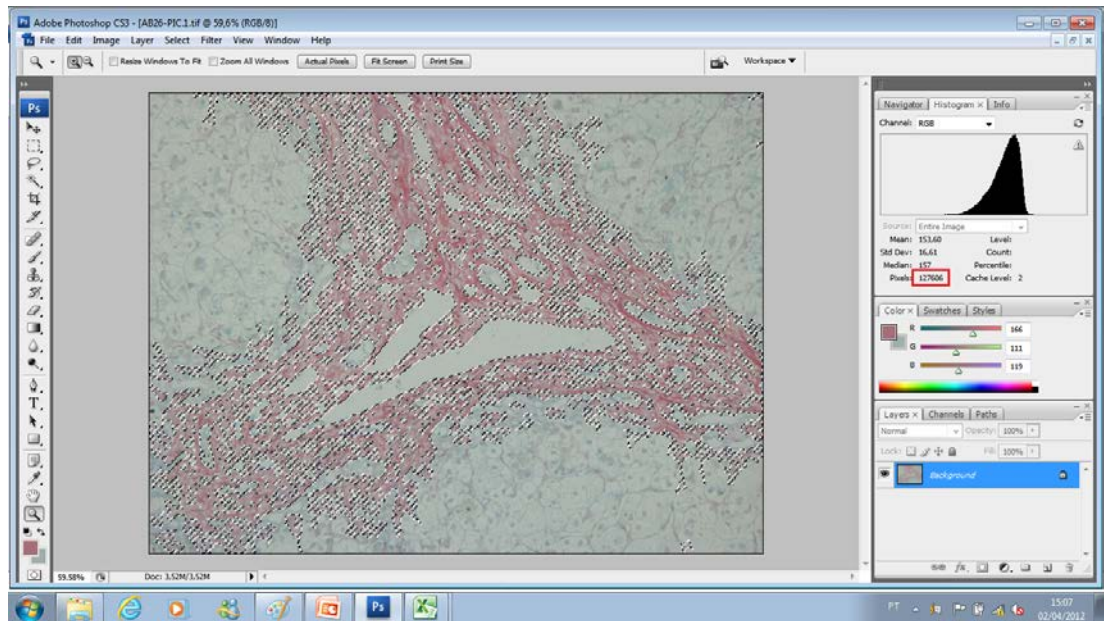


Figura 4: Medida, em pixels, da área de positividade para fibrose (picrosirius). Uma imagem de dez para cada amostra.

FIGURA 5

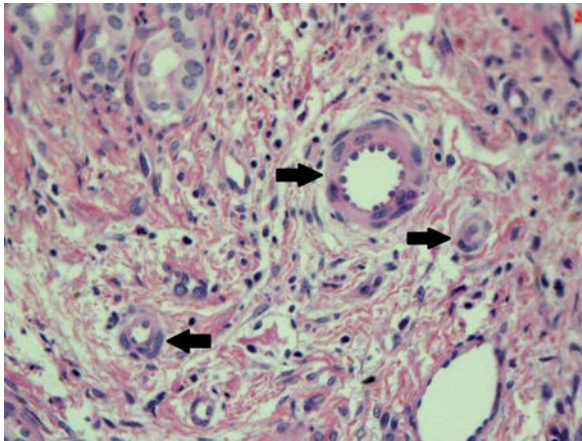


Figura 5: Artérias de um caso de atresia biliar avaliadas nas medidas morfométricas de RMED (razão espessura de túnica média/diâmetro luminal)

FIGURA 6

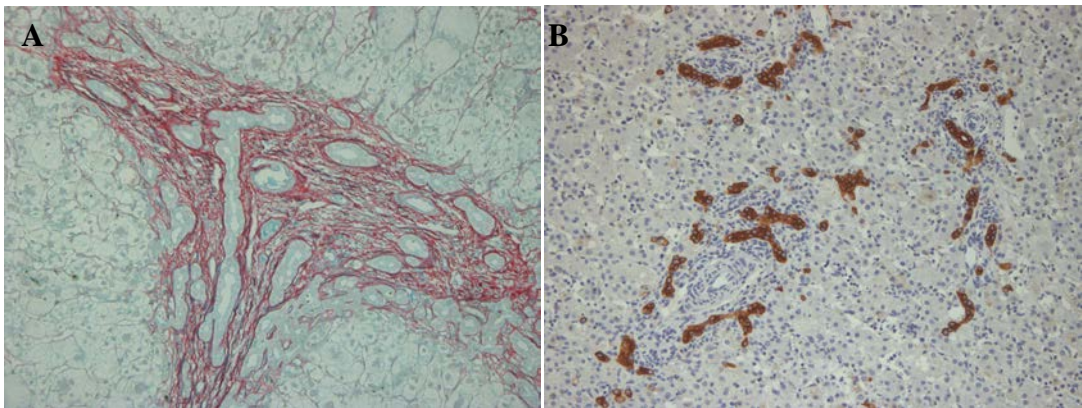


Figura 6: Exemplos de imagens das lâminas avaliadas para morfometria de (A) FIB (extensão da fibrose) e (B) PCK7 (percentual de positividade de citoqueratina-7).

ANEXO III

Termo de consentimento informado para armazenagem de material biológico

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

Material	sim	não
Soro		
Tecido hepático		
Tecido de porta hepatis		
Tecido de vias biliares		

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

1. Futuros estudos sobre a doença:

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

sim	não

2. Outras pesquisas que não envolvem a doença que você está investigando e serão realizadas sem identificação da amostra, sem nenhum benefício direto para você seu(s) familiar(es), mas com potencial benefício para o progresso médico e científico:

sim	não

3. Envio para outros centros para eventual realização de exames com potencial benefício direto para você ou seu(s) familiar(es) (amostra identificada):

sim	não

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

sim	não

O armazenamento da amostra não implica em qualquer custo adicional nem interferirá na realização normal do exame. O período de armazenamento é indeterminado, mas seu consentimento pode ser retirado a qualquer momento se você mudar de idéia e, neste caso, a amostra será descartada. Este documento não torna obrigatória a realização de nenhum dos procedimentos acima mencionados. Em nenhuma hipótese haverá quebra de sigilo quanto aos seus dados ou à liberação da amostra identificada para terceiros sem sua autorização.

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

Local: _____

Data: _____

Assinatura: _____

Endereço e telefone para contato: _____

TABELA 1

Tabela 1: Idade dos pacientes quando submetidos à laparotomia exploratória.

	Mediana	Mínima	Máxima	DP	p
AB (n24)	65	31	109	19	NS
C (n9)	67	34	147	33,88	NS

Teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p < 0,05$. AB – atresia biliar; C – controle/outros casos de colestase intra-hepática; NS – não significativo; DP – desvio padrão.

TABELA 2

Tabela 2: Expressão das angiopoietinas 1 e 2 e seu receptor TIE2 por RT-PCRq

		Perc25	Mediana	Perc75	p
ANG1	AB	15,02	92,93	4405,30	0,11
	C	10,01	15,67	1069,01	
ANG2	AB	17,82	136,00	1406,11	0,28
	C	10,05	15,73	1073,51	
TIE2	AB	304,43	3444,31	13307,94	0,75
	C	343,92	6882,98	17754,52	

Teste de Mann – Whitney. Nível de significância $p < 0,05$.

ANG1 – angiopoietina-1; ANG 2 – angiopoietina-2; TIE2 – receptor TIE2; AB – atresia biliar; CIH – colestase intra-hepática; Perc – Percentil.

TABELA 3

Tabela 3: Correlações entre as expressões de angiopoietina 1 e 2, seu receptor TIE2, as variáveis de gravidade histológica extensão da fibrose, positividade de citoqueratina-7, espessamento de túnica media arterial e a idade da biópsia hepática no grupo da atresia biliar. Em destaque, correlações positivas.

	ANG1	ANG2	TIE2	RMED	PCK7	FIB	IdBio
ANG1	1						
ANG2	r= 0,695 p= 0,0001	1					
TIE2	r= -0,733 p= 0,0001	r= -0,543 p= 0,007	1				
RMED	r= 0,586 p= 0,013	r= 0,522 p= 0,032	r= -0,461 p= 0,063	1			
PCK7	r= -0,15 p= 0,0955	r= 0,086 p= 0,743	r= 0,225 p= 0,202	r= 0,326 p= 0,202	1		
FIB	r= -0,64 p= 0,808	r= -0,074 p= 0,779	r= 0,137 p= 0,599	r= 0,387 p= 0,125	r= 0,551 p= 0,022	1	
IdBio	r= 0,224 p= 0,428	r= -0,18 p= 0,934	r= 0,054 p= 0,805	r= 0,031 p= 0,907	r= 0,700 p= 0,002	r= 0,330 p= 0,196	1

Estatística: Correlação de Spearman. Nível de significância $p < 0,05$.

ANG1 – angiopoietina-1; ANG2 – angiopoietina-2; TIE2 – receptor TIE2; RMED – razão entre espessura de túnica média e diâmetro luminal; PCK7 – porcentagem de positividade de citoqueratina-7; FIB – escore de extensão da fibrose; IdBio – idade da biópsia hepática.

r= coeficiente de correlação de Spearman; p= nível de significância.