



# **Implicações diagnósticas e prognósticas da positividade do HIF1-alfa nos colangiócitos de doentes com atresia biliar**

**Inês Mendes Leitão**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(Mestrado Integrado)

Orientador: Prof. Doutor Jorge Luiz dos Santos

**maio de 2022**



## **Dedicatória**

Para os meus pais, Sérgio e Natália, por serem o meu maior exemplo e a minha sorte grande. Obrigada por tudo.



## Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Luiz dos Santos, por todos os ensinamentos e conselhos, pela motivação para explorar o tema desta dissertação e por toda a disponibilidade para estar presente em todas as etapas da realização deste projeto.

À Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, por toda a formação, quer a nível pessoal quer a nível profissional, ao longo destes seis anos.

Aos meus pais e à minha irmã, por estarem sempre ao meu lado em todas as etapas da minha vida e por serem uma verdadeira família que me apoia incondicionalmente. Sem eles, não teria chegado até aqui.

Ao meu avô, António Mendes, por todas as lições que nos deixou.

A toda a minha família, que sempre esteve lá para mim.

Ao Filipe, à Silvana, à Joana e ao Nuno que, apesar da distância, sempre foram um porto de abrigo nesta caminhada.

À Catarina Sabbo, à Inês Lopes, à Catarina Oliveira, à Natacha Fatelo, à Bruna Sá, à Maria Antónia, à Sara Braga, à Ana Luísa, à Catarina Maia, à Rita Gonçalves e a todos os outros amigos que fizeram da Covilhã a minha segunda casa.

À Maria Luís, por toda a paciência e ajuda neste trabalho e por estar presente em todos os desafios e bons momentos.

À C'a Tuna Aos Saltos, pelas melhores experiências académicas destes seis anos, pelo espírito de união e por ser uma família que me faz tão feliz, que me enche de orgulho e que vou levar sempre comigo.



## Resumo

A atresia biliar é uma doença que se inicia exclusivamente no período neonatal e é a causa mais frequente de colestase neonatal. Consiste numa obstrução parcial ou total das vias biliares extra-hepáticas com posterior destruição progressiva dos ramos biliares intra-hepáticos, constituindo uma colangiopatia crónica. Verifica-se uma rápida progressão da fibrose, que se associa à necessidade de transplante hepático nestes doentes.

O tratamento é cirúrgico, em que numa primeira abordagem é realizada uma portoenterostomia de Kasai, procedimento que visa restabelecer a drenagem biliar para o intestino. Apesar de alguns doentes terem uma boa resposta à cirurgia de Kasai, a grande maioria acaba por desenvolver complicações como malnutrição e hipertensão portal, sendo o transplante hepático já a única opção terapêutica nesta fase.

A etiologia da atresia biliar não é completamente conhecida e a existência de variadas formas clínicas sugere uma multiplicidade de fatores causais. A atresia biliar associada à malformação esplénica (BASM), a forma cística, a forma associada à presença de IgM positiva para citomegalovírus no sangue e a forma isolada são as entidades clínicas descritas, sendo a atresia biliar isolada a mais frequente (70-80% dos casos). Anormalidades imunológicas, ambientais e genéticas foram reconhecidas como agentes envolvidos. Para além destes fatores, tem sido estudada uma associação entre atresia biliar e uma possível colangiopatia isquémica. Anormalidades vasculares e a variação na disponibilidade de oxigénio nas células podem causar uma disfunção da via metabólica antioxidante, levando a um aumento de espécies reativas de oxigénio, que foram também relatadas em doentes com atresia biliar e associadas à sua patogenia. Uma sobre expressão de fatores induzidos por hipoxia em doentes com atresia biliar isolada foi também reportada.

Com esta dissertação pretende-se fazer uma revisão narrativa de literatura atualizada, através de uma pesquisa por palavras-chave no motor de busca *PubMed*, com discussão focada no papel da hipoxia na fisiopatologia da atresia biliar e a importância que a positividade do fator induzido por hipoxia 1-alfa (HIF1- $\alpha$ ) poderá ter em questões de diagnóstico e prognóstico.

## Palavras-chave

Atresia biliar; Etiopatogenia; Histopatologia; Colangiopatia isquémica; HIF1-alfa





## **Abstract**

Biliary atresia is a disease that initiates exclusively in the neonatal period and it's the most frequent cause of neonatal cholestasis. It consists of a partial or total obstruction of the extrahepatic bile ducts, with subsequent progressive destruction of the intrahepatic bile branches, constituting a chronic cholangiopathy. There's a rapid progression of fibrosis that is associated with the need for liver transplantation in these patients.

Treatment is surgical. Initially, a Kasai portoenterostomy is performed, a procedure that aims to restore biliary drainage to the intestine. Although some patients have a good response to the Kasai surgery, almost all of them end up developing complications such as malnutrition and portal hypertension, and liver transplantation is the only therapeutic option at this stage.

The etiology of biliary atresia is not completely known and the existence of several clinical forms suggests a multiplicity of causes. Biliary atresia associated with splenic malformation (BASM), the cystic form, the form associated with the presence of positive IgM for cytomegalovirus in the blood, and the isolated form are clinical entities described, with isolated biliary atresia being the most frequent (70-80% of cases). Immunological, environmental and genetic abnormalities were characterized as agents involved. In addition to these factors, an association between biliary atresia and a possible ischemic cholangiopathy has been studied. Vascular abnormalities and variation in oxygen availability in cells can cause dysfunction of the antioxidant metabolic pathway, leading to an increase in reactive oxygen species, which have also been reported in patients with biliary atresia and associated with its pathogenesis. An overexpression of hypoxia-induced factors in patients with isolated biliary atresia has also been reported.

With this thesis we intend to make a narrative review of updated literature, through a search for keywords in the PubMed search engine, discussion focused on the role of hypoxia in the pathophysiology of biliary atresia and the importance that hypoxia-induced factor 1 – alpha positivity may have on diagnostic and prognostic issues.

## **Keywords**

Biliary atresia; Etiopathogenesis; Histopathology; Ischemic cholangiopathy; HIF1-alfa



# Índice

Dedicatória .....	iii
Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vii
Palavras-chave .....	vii
Abstract .....	ix
Keywords .....	ix
Lista de Figuras .....	xiii
Lista de Tabelas .....	xv
Lista de Acrónimos .....	xvii
1. Introdução .....	1
1.1. Colangiopatias .....	1
1.2. Colestase Neonatal .....	1
1.3. Atresia Biliar .....	5
2. Objetivos .....	9
3. Métodos .....	11
4. Desenvolvimento .....	13
4.1. Clínica e diagnóstico de Atresia Biliar .....	13
4.2. Etiopatogenia da Atresia Biliar .....	16
4.3. Alterações vasculares e hipoxia na atresia biliar .....	20
5. Conclusão e perspectivas futuras .....	25
6. Referências bibliográficas .....	27



## **Lista de Figuras**

Figura 1 - Locais potenciais de obstrução ao fluxo biliar. ....	2
Figura 2- Algoritmo de diagnóstico de atresia biliar.....	7
Figura 3- Padrão histológico obstrutivo.....	16
Figura 4 - Aglomerados vasculares subcapsulares na AB .....	22



## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 - Diagnóstico Diferencial de Colestase Neonatal. ....	3
----------------------------------------------------------------	---





## Lista de Acrónimos

<b>AB</b>	Atresia Biliar
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>ANGPT</b>	Angiopietina
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>BASM</b>	Atresia biliar com malformação esplénica
<b>BD</b>	Bilirrubina direta
<b>BT</b>	Bilirrubina total
<b>CMV</b>	Citomegalovírus
<b>FA</b>	Fosfatase Alcalina
<b>GGT</b>	Gamma glutamiltranspeptidase
<b>HIF1- <math>\alpha</math></b>	Fator induzido por hipoxia 1 – alfa
<b>IFN</b>	Interferão
<b>IL</b>	Interleucina
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>PE</b>	Portoenterostomia
<b>PVP</b>	Plexo vascular peribiliar
<b>RN</b>	Recém-nascido
<b>Th</b>	Célula T <i>helper</i>
<b>TxH</b>	Transplante Hepático
<b>VEGF A</b>	Fator de crescimento endotelial vascular A



# 1. Introdução

## 1.1. Colangiopatias

Colangiócitos são células epiteliais que delineiam os ductos biliares, atuam na modificação da composição e volume de bÍlis e sofrem interações por parte de estÍmulos endógenos e exógenos, participando tanto na lesão hepática, como na sua reparação. Uma lesão dos colangiócitos, seja ela por toxinas, drogas, microrganismos ou outros, leva à formação de um microambiente pró-inflamatório e, dependendo da suscetibilidade genética, epigenética ou de outros fatores, pode resultar numa resposta inflamatória crónica progressiva. Assim, a libertação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias vai influenciar a proliferação de colangiócitos e a sua apoptose ou senescência, o que pode levar a angiogénese local e ativação do sistema imune. Tudo isto contribui para uma reação ductular, acompanhada de infiltração leucocitária e ativação de células hepáticas progenitoras, colestase progressiva com fibrogénese que pode levar à cirrose. Por isto, as colangiopatias geralmente resultam em doença hepática terminal com necessidade de transplante hepático (TxH), fazendo com que estas patologias tenham um considerável impacto económico e significativas taxas de morbilidade e mortalidade. (1,2)

As colangiopatias podem ser classificadas como primárias, quando a afetação dos ductos biliares é o problema inicial da doença, ou secundárias, quando a degradação dos ductos biliares é consequência de um outro processo patológico. Dentro das colangiopatias existe um vasto leque de diagnósticos diferenciais, que incluem: colangite biliar primária, colangite esclerosante primária, fibrose quística com envolvimento hepático, atresia biliar (AB) e doença hepática poliquística (1,2)

## 1.2. Colestase Neonatal

A icterícia neonatal é uma condição relativamente comum, afetando cerca de 50% dos recém-nascidos (RN) de termo e 80% dos recém-nascidos pré-termo. Está frequentemente associada ao aleitamento materno, que se caracteriza por um aumento de bilirrubina indireta, sendo que a maioria dos casos tem resolução espontânea. Porém, em algumas situações, o período de icterícia é prolongado para além das duas primeiras semanas de vida e, nestas, para além de se considerar o aleitamento materno como possível causa, pode existir um aumento da bilirrubina de reação direta, suspeitando-se,

assim, da presença de uma colestase neonatal (CN), sendo imprescindível fazer este diagnóstico diferencial. (3)

A CN tem uma prevalência de cerca de 1 em cada 2500 bebés de termo e consiste numa redução do fluxo biliar, que resulta numa acumulação patológica de sais biliares nos ductos biliares e hepatócitos (Figura 1). (4)

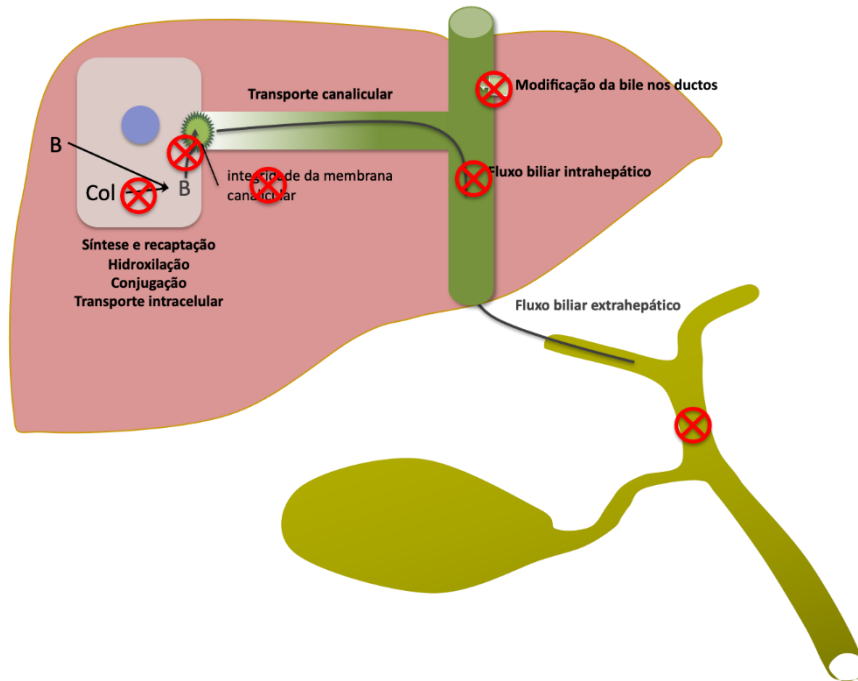


Figura 1 - Locais potenciais de obstrução ao fluxo biliar. Redução do fluxo biliar por alterações anatómicas ou funcionais, com acumulação de compostos biliares

Na abordagem de um doente com CN é extremamente relevante fazer a distinção entre causas obstrutivas e causas hepatocelulares, uma vez que a obstrução mecânica carece de intervenção cirúrgica. (5) Todos os RN com icterícia prolongada (mais de 14 dias) devem ser rapidamente submetidos a uma avaliação clínica e laboratorial, de forma a clarificar a etiologia da mesma e iniciar o tratamento adequado. (4) Do ponto de vista clínico, a colestase manifesta-se por icterícia, hipocolia/acolia fecal e colúria, sendo que a presença de hipocolia num doente com icterícia, mesmo que não prolongada, impõe a exclusão de colestase. A marcha diagnóstica inicia-se com a realização de uma história clínica minuciosa, incluindo a história da gravidez, de modo a averiguar a existência de infeções durante a gestação, como toxoplasmose, rubéola ou citomegalovírus (CMV), colestase intra-hepática materna durante a gravidez, história de asfixia neonatal ou emissão de mecónio atrasada. A história do RN, aliada ao exame objetivo, ajuda a reconhecer algumas causas de CN como fibrose quística, galactosemia ou hipotireoidismo. Laboratorialmente a colestase caracteriza-se por um aumento da bilirrubina direta. Outros marcadores analíticos como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamma glutamiltranspeptidase (GGT) podem sugerir presença de lesão e a respetiva gravidade. (4) Adicionalmente, a biópsia hepática percutânea é um

método diagnóstico de alta acurácia na avaliação de doentes com hiperbilirrubinemia persistente, que permite reconhecer os diversos grupos causais de colestase neonatal. (Tabela 1) O objetivo do método é a identificação de um padrão histopatológico obstrutivo, caracterizado por expansão do espaço porta por infiltrado inflamatório, edema e fibrose; presença de pontes fibrosas; reação ductular e, com alta especificidade, a presença de *plugs* em estruturas biliares, especialmente em ductos neoformados. Apesar disto, a presença de obstrução mecânica carece de confirmação por laparotomia exploratória associada a colangiografia trans-operatória, quer pela análise do *porta hepatis*, quer pela visualização direta da impermeabilidade do ducto biliar, permitindo, deste modo, a diferenciação entre obstrução extra-hepática e colestase intra-hepática, os dois grandes grupos de causas em que se divide a CN. (4,6)

Tabela 1 - Diagnóstico Diferencial de Colestase Neonatal. Adaptado de Santos et. al (7)

<b>CAUSAS INTRA-HEPÁTICAS</b>
<b>A. Hepatite neonatal idiopática</b> – mecanismo desconhecido
<p><b>B. Transtorno da embriogénese</b></p> <p><b>1. Síndrome de Alagille</b></p> <p><b>2. Malformação da Placa Ductal:</b> ARPKD, ADPLD, doença de Caroli, Síndrome de Joubert com fibrose hepática congénita (Síndrome COACH), Síndrome de Meckel, Displasia renal-hepático-pancreática 1 (gene NPHP3)</p>
<p><b>C. Transtorno da biossíntese e conjugação dos sais biliares</b></p> <p><b>1. Deficiência de 3-oxo-4-esteroide 5<math>\beta</math>-redutase</b></p> <p><b>2. Deficiência de 3<math>\beta</math>-hidroxi-5-C27-esteroide desidrogenase</b></p> <p><b>3. Deficiência de oxisterol 7<math>\alpha</math>-hidroxilase</b></p> <p><b>4. Deficiência de BACAT (Hipercolenémia familiar)</b></p> <p><b>5. Transtorno funcional da alfa-metilacil-CoA racemase (AMACR)</b> – Defeito congénito da síntese de ácido biliar tipo 4</p>
<p><b>D. Transtorno do transporte e secreção pela membrana</b></p> <p><b>1. Transtorno da secreção canicular</b></p> <p>a. Transporte de sais biliares – Deficiência de BSEP</p> <p>i. Persistente progressiva (PFIC2)</p>

ii. Recorrente benigna (BRIC2)

b. Transporte de fosfolípidos – Deficiência MDR3 (PFIC3)

c. Anormalidade da proteína de junção oclusiva 2 (PFIC4)

d. Transporte iónico – Fibrose Cística (CFTR)

### **2. Transtorno das junções oclusivas entre os hepatócitos e os canaliculos biliares**

a. Anormalidade da proteína de junção oclusiva 2 (PFIC4)

### **3. Transtornos complexos ou multiorgânicos**

a. Deficiência da FIC1 (distúrbio da translocação da fosfatidilserina)

i. Persistente progressiva (PFIC1)

ii. Recorrente benigna (BRIC1)

b. Colangite esclerosante neonatal com ictiose

c. Colangite esclerosante neonatal sem ictiose (gene DCDC2)

d. Disfunção artrogripose-renal-colestase (genes VPS33B, VIPAS39)

e. Xantomatose cerebrotendinosa (gene CYP27A1)

f. Disfunção da glicosilação congénita (ALG 3, ALG 8, GLS1, PMM2, MPI, COG1, COG7, ATP6AP1)

g. Disfunção Secundária do metabolismo dos sais biliares: Síndrome de Zellweger, distúrbios dos peroxissomos com envolvimento de mutação do gene PEX e doença de Refsum neonatal

h. Disfunção do ciclo de ureia: citrulinemia do tipo II (colestase por deficiência de citrina, gene SLC25A13)

i. *Outras*: hepatopatias mitocondriais (síndrome de depleção mitocondrial, genes dGK, POLG, MPV17) e défice do complexo III (gene BCS1L)

## **E. Distúrbio funcional dos recetores nucleares dos ácidos biliares**

1. PFIC 5 (gene NR1H4) – defeito funcional do FXR

## **F. Doenças hepáticas metabólicas**

1. Transtorno Glandular: hipotireoidismo, hipopituitarismo

2. Com envolvimento do trato biliar: doença de depósito da  $\alpha$ 1-antitripsina, fibrose cística

3. Sem envolvimento do trato biliar: Transtorno do metabolismo de hidratos de carbono (Galactosemia, Intolerância hereditária à frutose, Glicogenose IV, Síndrome de deficiência da glicoproteína dos hidratos de carbono), Transtorno do metabolismo dos aminoácidos (Tirosinemia), Transtorno do metabolismo dos lípidos (Síndrome de Wolman, Niemann-Pick, Gaucher tipo 2 e doença de Farber)

## **G. Infecções Congénitas**

1. Parasítica: Toxoplasmose

2. Viral: Rubéola, Citomegalovírus, herpes simples, Vírus hepatotrópicos (A, B e C), HIV, Parvovírus 19, Varicela, Paramixovírus, Sepse entérica viral (echo-, coxsackie e adenovírus)

3. Bacteriana: Sífilis, Sepsis bacteriana, Infecção do trato urinário, Listeriose, Tuberculose

<b>H. Transtornos Imunes</b> 1. Lúpus eritematoso neonatal 2. Hepatite neonatal com anemia hemolítica autoimune 3. Hemocromatose neonatal
<b>I. Associado à nutrição parentérica total</b>
<b>J. Miscelânea</b> 1. Histiocitose X 2. Hepatite fibrosante com leucemia transitória (trissomia 21) 3. Choque e hipoperfusão 4. Asfixia neonatal 5. Associada a obstrução intestinal
<b>CAUSAS EXTRA-HEPÁTICAS</b>
<b>1. Atresia Biliar</b> <b>2. Cisto do Colédoco</b> <b>3. Perfuração Espontânea do Ducto Biliar Comum</b> <b>4. Barro Biliar</b> <b>5. Colelitíase</b>

### **1.3. Atresia Biliar**

A AB é uma doença que se inicia exclusivamente no período neonatal e que se marca pela obstrução da árvore biliar extra-hepática, por fibrose e por um processo inflamatório que envolve primariamente as estruturas portais do fígado do RN, incluindo a interface entre espaços portais e parênquima. A partir deste processo desencadeia-se uma expansão fibrosa rapidamente progressiva na forma de pontes fibrosas, levando a cirrose. (8,9)

A AB representa 50% de todos os casos de colestase neonatal. (10) No entanto, é uma doença rara com prevalência e incidência variáveis a nível mundial, apresentando uma menor prevalência nos países ocidentais e uma maior nos países do Pacífico. Estima-se uma incidência de 0,5 a 8 /10.000 nascimentos nos países do Ocidente, de 1,1/10.000

no Japão e de 1,5/10.000 no Taiwan. A incidência máxima foi estimada na Polinésia Francesa, de 3 casos em cada 10.000 nascimentos vivos. (11)

O diagnóstico diferencial (Figura 2) entre a AB e outras causas não cirúrgicas de CN é difícil porque não existe um único método diagnóstico de AB e porque a clínica, os exames laboratoriais e a imagiologia muitas vezes são sobreponíveis a outras patologias. [4] Os sintomas ocorrem após o nascimento e incluem icterícia, hepatomegalia (pode estar ausente no início do quadro, surgindo com o desenvolvimento progressivo da hipertensão portal), fezes acólicas e colúria. (11) A colestase pode acontecer desde cedo, mas o facto de existir uma sobreposição temporal com a icterícia fisiológica do recém-nascido torna o diagnóstico precoce um desafio. (9) Assim, no momento da portoenterostomia (PE), é próprio existirem já diferentes níveis de fibrose, que geralmente progride após a restauração da drenagem de conteúdo biliar, mesmo após a resolução da icterícia. (12) A PE de Kasai constitui, então, a primeira linha de tratamento (11,13–16) e o prognóstico está dependente da restauração da drenagem atempada, sendo que um dos mais importantes fatores para um prognóstico favorável é o diagnóstico precoce. (13) Ainda assim, mesmo quando a PE é realizada com restauração bem sucedida da drenagem, a progressão da doença intra-hepática acaba por resultar em complicações como hipertensão portal e cirrose avançada, por um processo contínuo de colangiopatia fibrosante, sendo que a sobrevivência destes doentes acaba por ficar dependente de TxH. Assim, a AB é a principal indicação para TxH em idade pediátrica. (11,14,17) Quando não tratada, a história natural da atresia biliar é a morte da criança até ao segundo ano de vida. (13)



## ALGORITMO DE INVESTIGAÇÃO DA ATRESIA BILIAR

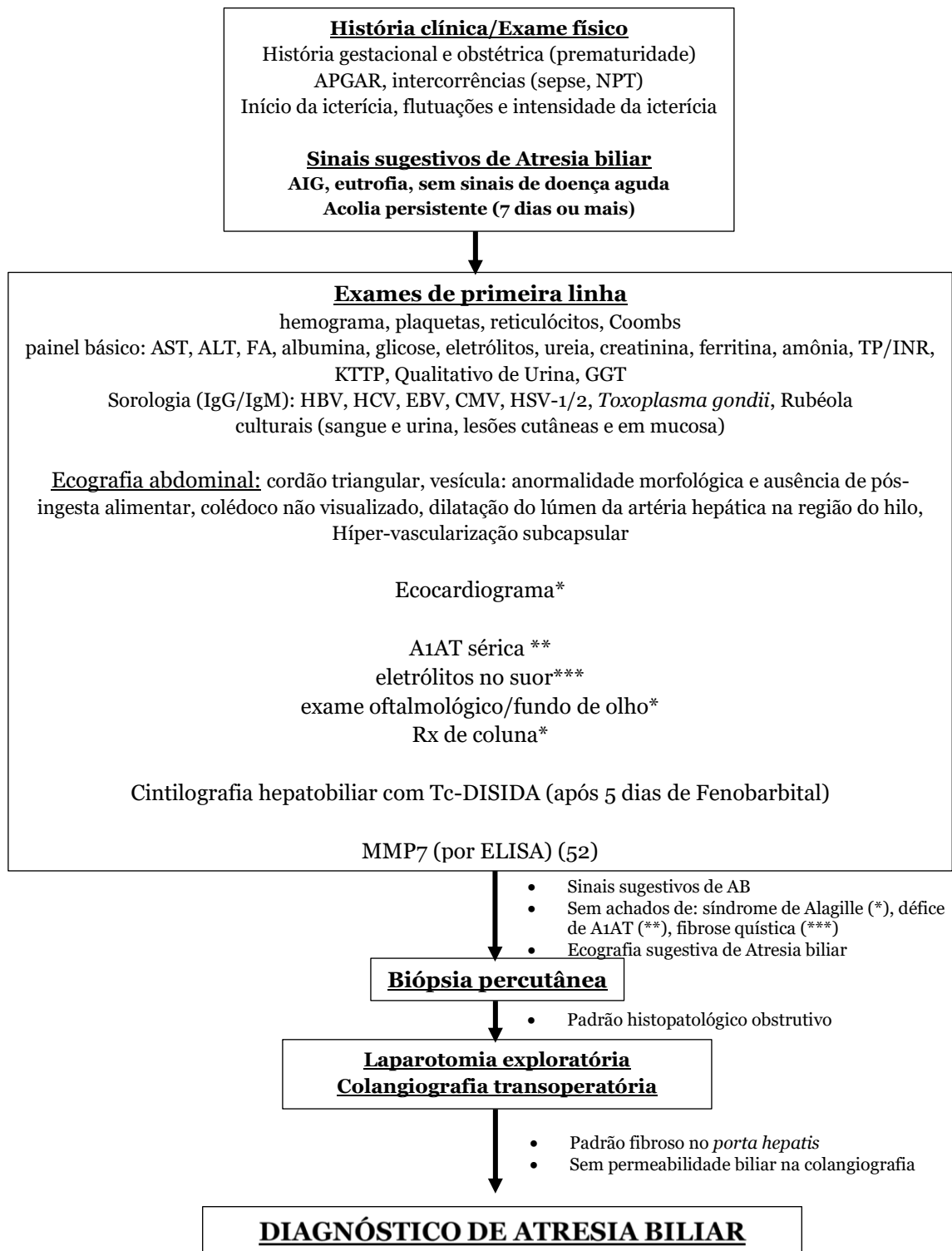


Figura 2- Algoritmo de diagnóstico de atresia biliar. AIG – Adequado para a idade gestacional; NPT - Nutrição Parentérica; TP/INR - tempo de protrombina e derivado índice internacional normalizado; TTPa – tempo de trombolastina parcial ativado; HBV – vírus da hepatite B; HCV – vírus da hepatite C; EBV – vírus Epstein-Barr; HSV-1/2 – vírus herpes simples 1 e 2; A1AT – alfa-1 anti-tripsin; Tc-DISIDA - Ácido diisopropilo iminodiacético marcado com tecnécio 99m; MMP7 - metaloproteinase-7 da matriz



## **2. Objetivos**

O objetivo desta dissertação é a realização de uma revisão bibliográfica narrativa extensa e atualizada acerca da AB, focando aspetos de diagnóstico, etiopatogenia e prognóstico, com discussão focada no papel das alterações vasculares e hipoxia na fisiopatologia da doença e na importância que a positividade do fator induzido por hipoxia 1 – alfa (HIF1- $\alpha$ ) poderá ter em questões de diagnóstico e prognóstico da doença. Pretende-se que esta revisão bibliográfica possa servir de atualização do estado da arte e suporte para investigações futuras, no âmbito da hipoxia associada a casos de AB.



### 3. Métodos

Foi realizada uma pesquisa através do motor de busca *PubMed*, que ocorreu entre maio e setembro de 2021, tendo sido atualizada em março e abril de 2022. Realizou-se uma revisão de literatura narrativa.

A pesquisa foi efetuada através da seguinte sequência de palavras-chave:

1. “Biliary atresia” AND (etiology OR etiopathogenesis OR etiopathogeny OR pathophysiology)

AND

(clinical AND (variant OR type OR form OR phenotype)) OR BASM OR “biliary atresia splenic malformation” OR cystic OR isolated OR “intestinal malrotation” OR polysplenia OR asplenia OR syndromic OR Gene OR Genetic OR susceptibility OR environment\* OR “environmental risk factor” OR “chronic cholangiopathy” OR virus OR toxin OR biliatresone OR “oxidative stress” OR “REDOX status” OR GSR OR OR “hepatic artery” OR “medial layer thickening” OR “hypoxia ischemia” OR hypoxia-ischemia OR (subcapsular AND (telangiectasis OR telangiectasias)) OR “peribiliary vascular plexus” OR “ischemic cholangiopathy”

2. “Biliary atresia” AND (“ischemic cholangiopathy” OR “hypoxia-ischemia” OR “subcapsular vascularization” OR “hepatic artery” OR “hepatic artery medial layer” OR hypoxia OR “subcapsular telangiectasias”)

Foram incluídos na pesquisa artigos escritos em inglês. Foi dada prioridade aos artigos mais recentes e atualizados, não descurando outros mais antigos que evidenciassem conteúdo considerado pertinente e adequado ao tema. Consultaram-se, igualmente, livros e revistas da área em estudo, recomendados pelo respectivo orientador desta tese.



## **4. Desenvolvimento**

### **4.1. Clínica e diagnóstico de Atresia Biliar**

Na clínica, a AB é tradicionalmente categorizada em duas formas, a forma perinatal ou adquirida (80% dos casos) e a forma embrionária. (18) A forma mais representativa de AB embrionária é a atresia biliar com malformação esplénica (BASM), representando cerca de 10% dos casos de AB. A BASM é caracterizada por defeitos na determinação de lateralidade e apresenta-se com poliesplenia ou asplenia, tendo esta pior prognóstico do que a atresia biliar isolada. (19) Outra variante clínica, cujo desenvolvimento tem origem intrauterina, é a forma cística de AB, sendo possível identificar um quisto na ecografia obstétrica por volta das 18-20 semanas (20), o que evidencia que esta forma de AB começa a desenvolver-se antes do nascimento. A forma cística de AB é reconhecida como tendo melhor prognóstico, uma vez que há uma melhor drenagem após a PE, provavelmente porque a identificação do quisto permite a realização do diagnóstico diferencial mais cedo. (19) Foi também descrito um subgrupo clínico de AB associada ao CMV. Estes doentes apresentam uma resposta inflamatória exacerbada, relatando-se, assim, uma relação entre esta forma clínica e um pior prognóstico pós PE e uma maior taxa de mortalidade. (19) A forma adquirida é conhecida como atresia biliar isolada e é a entidade mais comumente encontrada. (20) Recentemente verificou-se que, mesmo na forma isolada, há níveis elevados de bilirrubina direta ou conjugada nas primeiras 48h de vida, com colestase estabelecida ao nascimento, o que sugere que a forma isolada de AB também se inicia no período intrauterino e que o doseamento sérico de bilirrubina direta ou conjugada pode ser útil como um teste de triagem para a presença de atresia biliar. (20)

A avaliação de crianças com suspeita de AB é difícil, dado que, atualmente, não existe um único meio complementar de diagnóstico pré-operatório que permita, com certeza, identificar os casos de AB. (7) Tendo em conta a grande sobreposição de padrões clínicos, bioquímicos, imagiológicos e histológicos torna-se difícil distinguir a AB de outras causas de CN (22), sendo que, para fazer o diagnóstico de AB, é necessário confirmar a obstrução mecânica extra-hepática, através da colangiografia trans-operatória, e excluir algumas doenças de causa intra-hepática, que podem simular esta obstrução tanto na biópsia percutânea, quanto na colangiografia. De entre estas doenças de causa intra-hepática, o grande desafio diagnóstico é a síndrome de Alagille sem as características fenotípicas evidentes pois, neste caso, além de biópsia percutânea com padrão obstrutivo, pode haver hipoplasia do ducto biliar extra-hepático simulando obstrução mecânica completa. (5,9) Porém, o diagnóstico atempado e eficiente de AB é

importante, visto que a idade e o grau de fibrose aquando submetidos à PE tem um impacto muito significativo no prognóstico destes doentes. (8) O diagnóstico geralmente é sugerido por várias investigações, iniciando-se pela história clínica detalhada e pelo exame físico do RN, seguidos de uma avaliação laboratorial, imagiológica, histológica e de exploração cirúrgica associada a colangiografia trans-operatória. Cartões com uma escala cromática de cores de fezes são usados em diversos países e demonstraram diminuir o número de avaliações tardias de bebés sintomáticos, diminuindo a idade com que são submetidos à PE de Kasai. Também foram estudados, como potenciais identificadores precoces de RN assintomáticos, rastreios utilizando valores de bilirrubina direta, não tendo, porém, sido implementados em larga escala. (8)

Ao exame objetivo, o recém-nascido apresenta-se com icterícia persistente, acolia e colúria. (13) Cerca de 20% dos doentes com AB apresentam-se com outras malformações congénitas, incluindo a forma BASM, ou malformações relacionadas a doenças genético-cromossômicas, ou ainda doentes com anomalias extra-hepáticas, porém sem alterações na determinação de lateralidade. (13)

A abordagem inicial em doentes com suspeitas de AB inclui, por ser uma técnica rápida, não invasiva e disponível, uma ecografia abdominal. (3,23) Foram descritos diversos parâmetros ecográficos como indicadores de AB que, quando observados por operadores experientes, revelaram elevada especificidade e sensibilidade diagnóstica, nomeadamente, irregularidades na forma e na parede da vesícula biliar, principalmente após ingesta-alimentar. (24,25) *Kendrik et al* descreveram uma tríade fantasma da vesícula biliar que consiste na reunião de parâmetros que, em conjunto, são altamente sugestivos de AB. Integram este agregado de parâmetros uma vesícula biliar atrésica (<1,9cm), a ausência de revestimento ecogénico liso e completo, um revestimento fino, uma parede indistinta ou um contorno nodoso, irregular ou lobular. (26) Um outro achado fundamental e reconhecido como um indicador de AB na ecografia hepática é o sinal do cordão triangular, que constitui um tecido ecogénico fibroso triangular, anterior à veia porta, perto do *porta hepatis* e que representa o ducto biliar fibrosado. Este sinal, apesar de apresentar elevada especificidade para atresia biliar, tem reduzida sensibilidade, uma vez que a inflamação do hilo hepático faz com que o cordão possa não ser visualizado (7,8,13,15,19,20). Os achados ecográficos do *porta hepatis*, como o sinal do cordão triangular, os quistos biliares e um ducto biliar comum não visualizado, são úteis na suspeita de AB. (27) Um outro parâmetro que mostrou fornecer informação adicional, quando combinado com os restantes achados, é a dilatação do lúmen da artéria hepática. (7,15,20) A ecografia com Doppler também demonstrou interesse discriminatório no diagnóstico de AB, tendo em conta que permite visualizar um aumento da vascularização subcapsular. (22,28,29)



Apesar da ecografia ser um exame não invasivo extremamente informativo que tem vindo a ser muito aplicado no diagnóstico de AB, é um método extremamente dependente do utilizador, com baixa concordância entre observadores e, por isto, continua a ser necessária a realização de uma biópsia percutânea, sendo este o exame de maior interesse na etapa pré-operatória. (7,15)

Histologicamente, a AB é caracterizada por uma colangite fibro-esclerosante e progressiva e por uma obstrução dos ductos extra-hepáticos. (30) A biópsia em fases mais precoces da doença revela um estado fibrótico com padrão biliar obstrutivo, caracterizado por uma infiltração inflamatória dos tratos portais, uma expansão portal relacionada a fibrose e edema, hiperplasia de ductos e ductulos biliares (denominada reação ductular, um dos *hallmarks* do diagnóstico histológico) e tampões (*plugs*) biliares em estruturas biliares neoformadas. Além disto, devido à fibrose, é comum formarem-se pontes fibrosas a unir espaços portais adjacentes. (13,31,32) (Figura 3)

Apesar de o conjunto de exames supracitados em correlação com a clínica serem altamente preditivos de AB o diagnóstico definitivo é apenas conseguido através da colangiografia intraoperatória, sendo este o exame *gold standard*. (31)

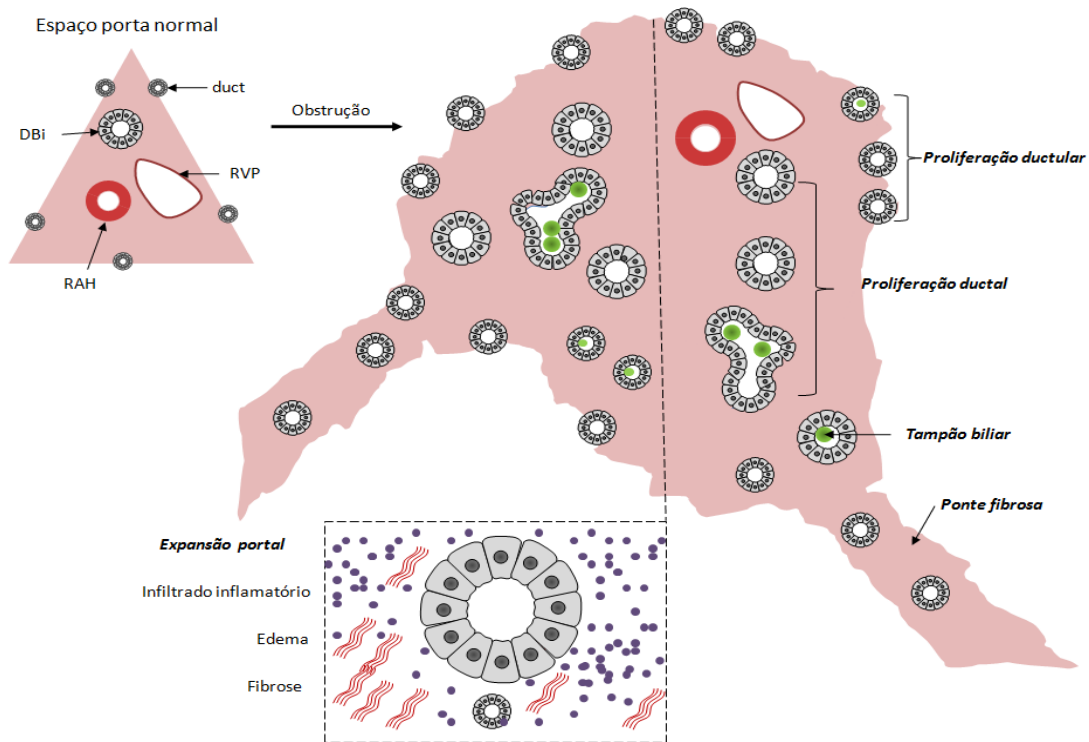


Figura 3- Padrão histológico obstrutivo

## 4.2. Etiopatogenia da Atresia Biliar

É certo que a AB é uma patologia acompanhada por inflamação marcada, contudo, como a maioria dos doentes são diagnosticados numa fase já de ductos atréticos e fibrose hepática avançada, mantém-se a questão: a inflamação é sempre um fenómeno primário/etiológico ou poderá ser secundário a outros processos patogénicos? (18) Apesar de muitos estudos terem tentado avaliar achados morfológicos e imunológicos aquando da PE, nenhum foi ainda capaz de explicar o evento inicial que desencadeia a patologia. (18)

A etiopatogenia da AB é ainda desconhecida e, visto que esta é uma colangiopatia de apresentação com diferentes fenótipos, acredita-se que, mais do que o produto de uma única etiologia, a AB seja a expressão comum de diferentes causas e complexos mecanismos, que culminam nos achados típicos clinicamente reconhecidos, sendo que todos eles englobam lesão e obstrução das vias biliares extra-hepáticas, com progressão para cirrose hepática. A perturbação que leva ao desenvolvimento da doença pode ocorrer no período embrionário, decorrente de fatores genéticos, alterações cromossómicas, fatores ambientais como teratógenos, ou pode ser um processo em que a lesão afeta, após organogénese completa, estruturas hepatobiliares previamente sem alterações. Mecanismos potencialmente patogénicos na AB incluem predisposição genética, diabetes gestacional, envolvimento do sistema imune e fatores ambientais,

como toxinas e vírus. O facto da AB ser uma patologia exclusivamente de neonatos sugere que o feto e o RN são particularmente suscetíveis a lesão e a reparação desregulada, após um insulto à árvore biliar. (8,9,19,33,34)

Os fatores de predisposição genética são uma das áreas exploradas na tentativa de esclarecer a patogenia da AB. A pertinência destes estudos prende-se com a associação da AB a malformações congénitas, a anomalias cromossómicas e a polimorfismos genéticos em populações específicas, sugerindo que a hereditariedade da atresia biliar é possível, apesar de não ser mendeliana. (34)

Estudos realizados em camundongos demonstraram que a inativação ou superexpressão dos genes *Invs*, *Hes1*, *Hnf6*, *Hnf1b*, *Foxf1*, *Foxa1* ou *Foxa2*, *Sox17*, *Lgr4* e *Pdx1* pode interromper a embriogénese normal do sistema biliar extra-hepático, causando malformações da vesícula e dos ductos biliares extra-hepáticos. (35,36) No entanto, as mutações genéticas ligadas à atresia biliar em humanos não foram evidenciadas. A título de exemplo temos as mutações no *Invs*, que apesar de detetadas em camundongos, não foram identificadas em RN com anomalias de lateralidade e atresia biliar. Especificamente na forma BASM foi observada uma relação entre a ocorrência desta anomalia da determinação de lateralidade e variantes do gene *PK1DL1* associadas a alterações dos cílios dos colangiócitos. (37) Estudos promissores associaram mutações polimórficas no gene *CFC1* à patogenia da AB, contudo também não foram validadas em grandes coortes. Outros estudos que pesquisam variantes de sequências génicas como fatores de suscetibilidade para atresia biliar, como as descrições de polimorfismos de nucleotídeo único em *JAG1*, *CD14*, *MIF*, *ITGB2*, *ADIPOQ* e *VEGF*, estão a tornar-se investigações de grande interesse. Também a expressão hepática diferencial de polimorfismos de nucleotídeo único em *ADD3* em fígados doentes sugere um fator de suscetibilidade ou modificador de doença. (36)

Embora o trato biliar extra-hepático forme um único trato anatómico, um estudo mostrou que segmentos anatomicamente diferentes podem ter bases moleculares únicas. Uma proteína envolvida na formação de órgãos endodérmicos, *Sox 17*, controla a diferenciação do fígado e ductos biliares a partir de marcadores pancreáticos, no broto hepático embrionário. Assim, a *Sox 17* é necessária para induzir uma diferenciação ductal em células endodérmicas e a divisão das linhagens biliares e pancreáticas, sendo o processo regulado pela *Hes1*, uma proteína pertencente ao sinal Notch que pode atuar num mecanismo de retroalimentação com a *Sox 17*. A embriogénese da vesícula biliar e do ducto cístico mostrou-se dependente da expressão do gene *Lgr4*. Em camundongos com uma mutação *Lgr4* não se demonstraram alterações dos ductos hepáticos e biliares comuns, porém comprovou-se ausência total da vesícula biliar e do ducto cístico. Mutações em fatores intervenientes de circuitos moleculares que gerem a embriogénese

de segmentos do sistema biliar podem, possivelmente, constituir um fator genético na patogénese da AB. (35)

Avanços recentes nas técnicas de sequenciamento genético não revelaram um perfil único de transformação genética. É possível que vários insultos, incluindo modificações genéticas (hereditárias ou somáticas) e epigenéticas, devido a alterações genéticas ou perturbações ambientais, possam atuar na orquestração desta doença complexa. (34)

A influência do sistema imunológico na lesão dos ductos biliares destaca-se em muitas das investigações realizadas no âmbito da AB, sendo que se presume que desempenha um papel fulcral na etiologia da doença. O sistema imune adquirido, e o inato também, responde a infeções ou insultos produzindo rapidamente respostas inflamatórias inespecíficas, com a libertação de fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-8, IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . (1,33,38) Os colangiócitos, mais do que apenas uma barreira física que drena a bÍlis para o duodeno, são células imunocompetentes envolvidas na homeostase tecidual, capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através de recetores de reconhecimento de padrões (PRRs) e aptos a iniciar uma resposta inflamatória. (19)

O fenótipo típico que encontramos na AB tem sido reproduzido e investigado, com sucesso, em vários modelos animais, como cordeiro, vitelo, peixe-zebra e camundongo. Sendo que no cordeiro, vitelo e peixe-zebra as formas de AB experimentais são induzidas por toxinas, enquanto que nos modelos roedores estas são obtidas por infeção viral. (19)

O papel dos vírus na agressão das vias biliares é um dos mecanismos mais estudados como suspeitos desencadeadores de AB. Várias evidências sustentam que uma infeção viral perinatal pode desencadear um episódio agudo, mediado por autoimunidade, no epitélio dos ductos biliares, onde células humorais desempenham funções importantes no mecanismo da lesão. Apesar de alguma controvérsia e de ainda não ter sido isolado um vírus que causasse diretamente AB, foram demonstradas respostas imunes caracteristicamente virais nos hepatócitos, nos ductos biliares e no epitélio. O reovírus, rotavírus, CMV, adenovírus, enterovírus e o vírus Epstein-Barr foram todos mencionados como possíveis agentes causais no desenvolvimento de AB, destacando-se o papel do CMV como presumível causa, tendo em conta que foi identificada uma fração de doentes com AB com positividade da IgM sérica para o CMV. (11,19,20,30,34) Após uma infeção viral, colangiócitos, macrófagos e células dendríticas desencadeiam uma resposta antiviral autócrina e parácrina, através do interferão do tipo I (IFN-1), nas células infetadas e nas vizinhas, para evitar a propagação do vírus. Em células infetadas, o IFN-1 vai promover a apoptose e no tecido adjacente, os IFNs desencadeiam a produção de proteínas antivirais (Mx), que fornecem proteção contra a infeção viral nessas células. A produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por colangiócitos, macrófagos

e células dendríticas cria um microambiente favorável para o recrutamento e ativação das células inflamatórias e para um ataque tecidual específico. A IL-8, produzida principalmente por macrófagos e, apesar de em menor escala, por colangiócitos, recruta e molda a ação de neutrófilos, basófilos, monócitos e células T. A IL-15, secretada principalmente por células dendríticas, atrai e regula a atividade de células inflamatórias efetoras, como as células *natural killer* (NK), para atingir os colangiócitos através de contacto ou de citocinas relacionadas ao IFN- $\gamma$  e/ou a agentes citotóxicos. À medida que a inflamação progride, os macrófagos e as células dendríticas interagem principalmente com células T CD4+, de forma a promover a sua ativação, expansão oligoclonal e diferenciação num fenótipo especializado e dependente do microambiente de citocinas predominante no momento. Na maioria dos doentes com AB, esse microambiente é pró-inflamatório, caracterizado pela produção de IFN- $\gamma$  e pela ativação de células efetoras (macrófagos, células T CD8+ e células B) para perpetuar o dano tecidual. Ao contrário do que se sabe em relação às células T, a informação sobre a implicação da imunidade humoral na patogenia da AB é escassa. Os linfócitos B parecem desempenhar um papel como células apresentadoras de antígenos para ativação de células. Assim, a depleção de células B, em AB experimental, foi associada a um prejuízo da ativação de células T efetoras e, conseqüentemente, da proteção contra lesão biliar. Após a obstrução, independentemente da restauração do fluxo biliar, a lesão biliar imunomediada persiste e o predomínio inicial de *T helper* (Th) 1 muda para Th2, com a emergência simultânea de Th17, que leva à produção de quimiocinas por parte dos colangiócitos e conseqüente atração de macrófagos inflamatórios, promovendo, mais uma vez, a destruição das células epiteliais dos ductos biliares. (19)

A autoimunidade humoral-específica de ductos biliares foi demonstrada na AB experimental, todavia o papel dos linfócitos B permanece por esclarecer na AB humana e serão necessárias mais investigações para fornecer informação adicional sobre a implicação da imunidade humoral na AB. (19)

Outra hipótese de mecanismo pelo qual ocorre a lesão hepática crónica na AB é o papel de macrófagos hepáticos e invasivos como células intermediárias, cujas citocinas inflamatórias perpetuam a lesão celular e a síntese de colagénio. O recrutamento destes macrófagos é dependente de moléculas quimiotáticas e de adesão celular. A proteína 10 induzida por interferão, expressa em monócitos, fibroblastos e células endoteliais, desencadeia uma sobre expressão de moléculas de resposta imune. *Kobayashi et al.* demonstraram que a proteína 10 induzida por interferão é um marcador de disfunção hepática e fibrose progressiva em doentes com AB pós-operatório e que a hipertrofia dos ramos da artéria hepática pode também estar associada a esta proteína, destacando o papel da autoimunidade perpetuada como fator fisiopatológico importante na AB. (39)

Uma toxina biliar isoflavonóide, chamada biliatresona, foi isolada em plantas na Austrália, após vários surtos de doenças semelhantes a AB terem ocorrido em grande escala (em 1964, 1988, e 2007) em RN de ovelhas que, durante a gestação, ingeriam estas plantas e bebiam a água de lagos que também as continham. Esta toxina biliar atua em modelos *in vitro*, em explantes de ductos biliares extra-hepáticos de camundongo e peixe-zebra larval, indicando que a toxina causa uma lesão seletiva da árvore biliar extra-hepática. Esta parece danificar os colangiócitos através da depleção de glutatião, e, corroborando esta suspeita, mostrou-se que a restauração das reservas de glutatião com N-acetil-L-cisteína atenuou a sua toxicidade em colangiócitos de camundongo e peixe-zebra. (8,19) Embora a biliatresona não seja ingerida por humanos, o que torna extremamente improvável que seja causa de AB nestes, esta não deixa de ser útil como modelo para estudo de possíveis insultos tóxicos aos ductos biliares dos neonatos, incluindo as vias de lesão e reparação. É possível que existam toxinas ambientais semelhantes, que levem à doença em humanos e, por isso, a compreensão dos mecanismos pelos quais a biliatresona se acumula e atua nos ductos biliares pode ser relevante para a compreensão de outras potenciais toxinas, o que faz desta toxina a base da teoria que implica hepatotoxinas como agentes etiológicos de AB. (8,19)

### **4.3. Alterações vasculares e hipoxia na atresia biliar**

A artéria hepática e seus ramos estão intimamente relacionados com as estruturas biliares extra e intra-hepáticas, sendo seu desenvolvimento embriológico associado ao do epitélio biliar que induz a formação de novos vasos. A árvore biliar intra-hepática, bem como os ductos biliares extra-hepáticos, são irrigados pelo plexo vascular peribiliar (PVP) derivado da artéria hepática. Em humanos, as estruturas biliares são irrigadas exclusivamente pelo sangue derivado da artéria hepática. Sabe-se que o PVP é anormal em distúrbios como a colangite esclerosante e que há algumas associações com a colangite isquêmica. No entanto, em entidades como a AB, o papel de um distúrbio arterial e de hipoxia ainda não foi adequadamente esclarecido. Alguns conjecturam que um processo isquêmico afetando o ducto biliar extra-hepático, à semelhança do que ocorre na atresia intestinal, possa causar a obstrução biliar. (13,20) A hipertrofia da camada medial dos ramos da artéria hepática tem vindo a ser associada à patogenia da AB. Santos *et al.* demonstraram que na maioria dos casos de AB a camada média arterial, aquando da PE, era mais espessa do que a dos RN sem doença hepática e que esse espessamento aumentou no intervalo entre a PE e o TxH, associando-se ao desaparecimento progressivo dos ductos biliares interlobulares nos espaços portais. (40,41) Uma hipótese colocada foi que estas alterações seriam causadas por uma

angiogénese desregulada e, para estudar essa mesma conjectura, foram analisadas biópsias hepáticas, recolhidas durante a laparotomia exploratória de doentes com AB, e de doentes de um grupo de controlo com colestase intra-hepática que necessitaram ser encaminhados para laparotomia, devido ao seu quadro clínico ser indistinguível de AB. Nos casos de AB, após o reconhecimento da obstrução ao fluxo biliar extra-hepático através da colangiografia, colheu-se também o *porta hepatis*. Este material histológico, que inclui fígado e *porta hepatis* nos doentes com AB e fígado nos doentes com colestase intra-hepática, foi analisado por imunohistoquímica para descrever o padrão de imunolocalização do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF A) e dos seus recetores. Sendo um importante fator angiogénico induzido por hipoxia, o VEGF A atua na divisão e na sobrevivência das células endoteliais, aumentando a permeabilidade vascular, promovendo a vasodilatação e estimulando a expressão de proteases, para degradação da matriz extracelular. Concluiu-se que especificamente nos doentes com AB, no momento da PE, o VEGFA era expresso preferencialmente nas estruturas biliares nos tratos porta e no *porta hepatis* e nas paredes arteriais. A positividade do VEGFA nestas estruturas correlacionou-se com a extensão da proliferação biliar. Estes achados sugerem a existência de uma colangiopatia isquémica, embora a via do VEGFA possa relacionar-se com outros processos incluindo inflamação e fibrogénese. (41) Também o padrão de expressão hepática de angiopoietina (ANGPT) 1 e 2 foi alvo de estudo, tendo-se observado sobre-expressão génica destas angiopoietinas e seus receptores, correlacionada com o espessamento da artéria hepática. As angiopoietinas associam-se à aglomeração dos pericitos, que dão origem à túnica média, em torno do endotélio, durante o desenvolvimento dos vasos. (14)

Na AB há evidências arteriográficas de ramos periféricos distróficos da artéria hepática periférica, com irregularidades no contorno e com imagens sugestivas de oclusão. São comuns os “tufos” vasculares angiográficos, que rodeiam os segmentos periféricos dos segmentos vasculares ocluídos. A ecografia e a tomografia computadorizada mostram um aumento do lúmen arterial hepático no *porta hepatis*, que é indicativo de AB precocemente por aquando do diagnóstico e é sugestivo de bloqueio ao fluxo sanguíneo de entrada, localizado nos vasos intra-hepáticos. Laparoscopicamente é possível identificar o característico sinal de telangiectasia subcapsular em aranha, que parece ser valioso no diagnóstico de AB. (Figura 4) (14,28)

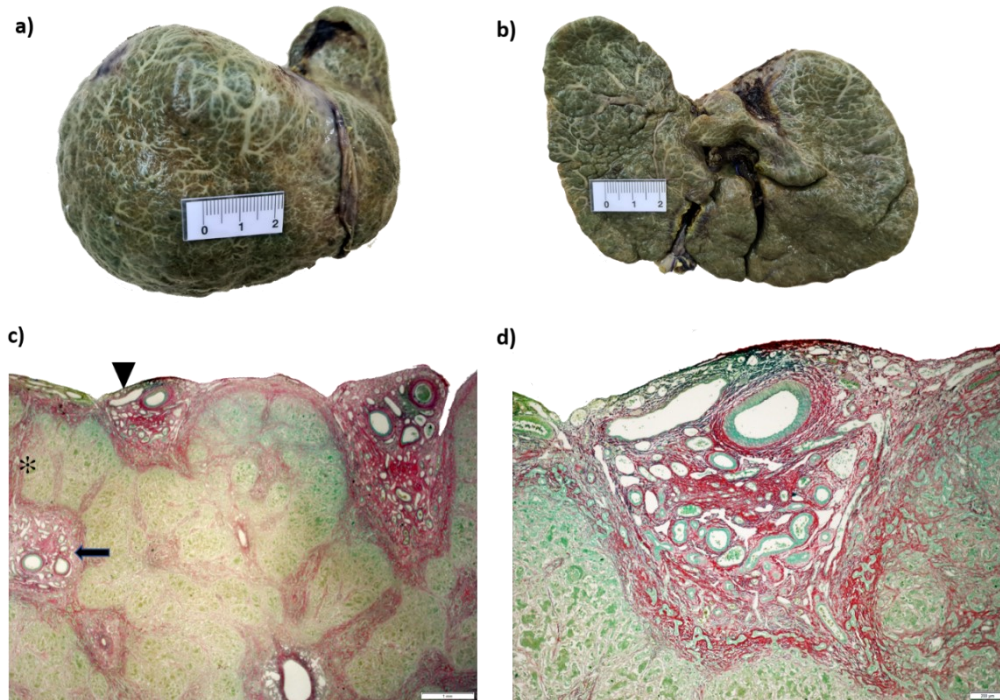


Figura 4 - Aglomerados vasculares subcapsulares na AB

Sob condições de hipoxia, a subunidade alfa da proteína HIF torna-se estável, transloca-se para o núcleo, heterodimeriza-se com a unidade beta e regula a expressão dos genes responsáveis pela adaptação celular à hipoxia (42). A atuação do HIF-1  $\alpha$  sobre os vasos arteriais é principal fator desencadeador da angiogénese (43) ao estimular a secreção do VEGFA, entre outras vias moleculares. Estados cirróticos levam a uma alteração da vascularização hepática normal, provocando um estado de hipoxia que sustenta a produção de VEGF A, e que conduz, por conseguinte, a uma angiogénese desregulada. Além disso, o VEGFA também induz reação ductular e fibrinogénese, perpetuando assim o processo de cirrose. (14)

*Fratta et al*, ao estudarem o perfil de expressão génica na variante isolada de AB, observaram uma maior expressão de HIF1-alfa e HIF2-alfa nestes doentes, quando comparados com doentes com colestase intra-hepática. Verificaram também uma subexpressão do recetor 2 do VEGFA, alvo essencial da angiogénese induzida por VEGFA nos RN com AB. Os doentes com maior expressão de HIF foram, essencialmente, os mesmos que revelaram uma menor expressão de VEGFA e VEGFR2, sugerindo hipoxia e isquemia. Sugeriram também que a expressão marcadamente aumentada do HIF na AB pode ser correlacionada com o grau de gravidade de doença. Perante os achados, propõem a existência de um distúrbio que afeta o PVP, associado a um fator ambiental como, por exemplo, um vírus ou toxinas, e que pode estar associado ao desequilíbrio do



eixo HIF-VEGF-VEGFR em resposta à hipoxia, que posteriormente leva à lesão das estruturas biliares. (44)

*Quelhas et al*, investigaram e demonstraram evidência acerca do papel, como mecanismo patogénico em doentes com AB isolada, de uma colangiopatia isquémica envolvendo o PVP e associada a uma desregulação do estado *redox*. Para testar esta hipótese, compararam 20 doentes com AB isolada com um grupo controlo, com colestase intra-hepática aquando da laparotomia exploratória. Para tal, foi realizada uma análise imunohistoquímica em amostras de hepatócitos e *porta hepatis*, através de coloração, em cortes em parafina, com anticorpo anti-HIF1- $\alpha$ , que permitiu a avaliação da positividade nuclear HIF, que caracteriza a ativação desta via molecular. Com isto, constataram ativação da via do HIF-1  $\alpha$  em colangiócitos e endotélio de vasos arteriulares num subgrupo de doentes com AB, exclusivamente. A ativação da via do HIF-1  $\alpha$  no epitélio biliar nos doentes com AB envolveu os ductos biliares interlobulares, a reação ductular marginal onde se localiza o nicho de células progenitoras, assim como os remanescentes biliares do *porta hepatis* e o endotélio dos ramos do PVP. Estes achados reforçam a possibilidade de que, num subgrupo de pacientes com AB, um distúrbio do PVP desencadeia ativação da via do HIF-1  $\alpha$  no epitélio biliar, implicando efeitos de reação ductular e fibrogénese. O envolvimento do HIF-1  $\alpha$  implica não só uma resposta angiogénica regenerativa, mas também os efeitos deletérios citados. O HIF-1  $\alpha$  controla a secreção de mediadores fibróticos no desenvolvimento da fibrose hepática, incluindo o próprio VEGF (43,45). A ativação do HIF-1  $\alpha$  no compartimento das células progenitoras hepáticas (46) pode ter importantes repercussões da fisiopatologia hepatobiliar ao causar desregulação dos mecanismos ativadores das células estaminais e assim levar a *stress* oxidativo, inflamação, reação ductular e fibrose progressivos. (47–49) A hipótese, a ser ainda comprovada, é que este grupo específico de doentes representa uma forma clínica adicional de AB em que a causa do processo atrésico se relaciona com a anormalidade vascular arterial. (50)



## 5. Conclusão e perspectivas futuras

A AB é uma causa preponderante de CN e é uma doença que, apesar da sua baixa incidência, apresenta um impacto significativo na mortalidade e morbidade dos RN afetados. É uma patologia complexa e de diagnóstico difícil, que tem vindo a ser estudada com o objetivo de conhecer a sua etiopatogenia e de procurar possíveis fatores que facilitem o diagnóstico precoce e, acima de tudo, favoreçam o seu prognóstico, com prolongamento da sobrevida do fígado nativo do RN. Diversos estudos têm vindo a ser realizados com o objetivo de decifrar a fisiopatologia da AB e atualmente acredita-se que as formas clínicas reconhecidas não são resultado de um único processo patológico, mas sim da sinergia de vários. Recentemente, foram descritos achados sugestivos de colangiopatia isquémica na AB, incluindo o espessamento dos ramos da artéria hepática (40), imuno-localização biliar do VEGFA e seus receptores (41), sobre-expressão de angiopoietinas (14) e um padrão molecular compatível com hipoxia-isquemia no fígado destes doentes (50). Além disto, foi confirmada a ativação da via do HIF-1  $\alpha$  no epitélio biliar de um subgrupo de doentes com AB, reforçando a hipótese do envolvimento da vasculatura arterial na fisiopatologia da doença. Reatam dúvidas. Sabemos que é possível a marcação com HIF1- $\alpha$  em doentes com AB isolada, mas será que isto se verifica noutras formas de AB? A hipoxia está presente em todos os doentes com AB isolada ou será este um novo subtipo ainda por descrever? Será a hipoxia um evento inicial da fisiopatologia ou um evento secundário a outro desencadeante?

O HIF1- $\alpha$ , para além de estar a ser reconhecido como um marcador importante no diagnóstico, poderá também ser implicado no prognóstico destes doentes. Visto que a sua ativação no compartimento de células progenitoras se associa a um agravamento da colestase e fibrogénese, terão os doentes com positividade para HIF1- $\alpha$  pior *outcome* após PE? Que relação terá este marcador com a sobrevida do fígado nativo do RN?

Os mecanismos e as implicações fisiopatológicas de uma anormalidade vascular arterial na AB requerem ainda um estudo amplo e exaustivo, de modo a definir, de uma forma mais concreta e pormenorizada, o papel de uma colangiopatia isquémica na etiopatogenia de AB. (14) No entanto, apesar de todas as limitações, os biomarcadores disponíveis para detetar e qualificar a patologia da AB podem proporcionar uma melhor gestão do doente, incorporando objetividade nos algoritmos de diagnóstico e tratamento, que são particularmente valiosos ao permitirem a realização mais tardia do TxH. (51)

O trabalho de investigação e de caracterização da fisiopatologia da doença, com pesquisa de novos potenciais alvos terapêuticos, pode ter um impacto significativo na esperança e

na qualidade de vida destes doentes. No que diz respeito à hipótese de uma colangiopatia isquémica como um dos princípios etiológicas de AB, é prioritária a realização de estudos de larga escala, de modo a corroborar esta teoria. É também crucial a concretização de estudos longitudinais, que visem avaliar as implicações prognósticas da positividade do marcador de hipoxia nestes doentes, bem como a associação desta com outros fatores causais de lesão estudados na AB.

## 6. Referências bibliográficas

1. Lazaridis KN, Larusso NF. The cholangiopathies. Vol. 90, Mayo Clinic Proceedings. Elsevier Ltd; 2015. p. 791–800. doi:10.1016/j.mayocp.2015.03.017
2. Tam PKH, Yiu RS, Lendahl U, Andersson ER. Cholangiopathies – Towards a molecular understanding. Vol. 35, EBioMedicine. Elsevier B.V.; 2018. p. 381–93.
3. Sandberg JK, Sun Y, Ju Z, Liu S, Jiang J, Koci M, et al. Ultrasound shear wave elastography: does it add value to gray-scale ultrasound imaging in differentiating biliary atresia from other causes of neonatal jaundice? *Pediatric Radiology* [Internet]. 2021;51:1654–66. doi:10.1007/s00247-021-05024-9
4. Catzola A, Vajro P. Management options for cholestatic liver disease in children. Vol. 11, Expert Review of Gastroenterology and Hepatology. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 1019–30.
5. Mu SL, Kim MJ, Lee MJ, Choon SY, Seok JH, Oh JT, et al. Biliary Atresia: Color Doppler US findings in neonates and infants. *Radiology*. 2009 Jul;252(1):282–9.
6. Biliary atresia. In: *Pediatric Hepatology* ed. Barueri, SP : Manole, 2012, p. 263-295. Keywords: biliary atresia, neonatal cholestasis Printed, ISBN: 9788520432945, Home page: www.manoleeducacao.com.br
7. Santos JL, Carvalho E, Silveira TR. Atresia Biliar. In: Rodrigues Silva L, Targa Ferreira C, de Carvalho E (eds.) *Manual de Residência em Gastroenterologia Pediátrica*. 1ª Edição. Barueri (SP):Manole. 2018. pp. 527-50. ISBN 9788520458525
8. Wehrman A, Waisbourd-Zinman O, Wells RG. Recent advances in understanding biliary atresia. *F1000Res*. 2019;8:F1000 Faculty Rev-218. Published 2019 Feb 25. doi:10.12688/f1000research.16732.1
9. Bezerra JA, Wells RG, Mack CL, et al. Biliary Atresia: Clinical and Research Challenges for the Twenty-First Century. *Hepatology*. 2018;68(3):1163-1173. doi:10.1002/hep.29905
10. Jensen KK, Oh KY, Patel N, Narasimhan ER, Ku AS, Sohaey R. Fetal Hepatomegaly: Causes and Associations. *Radiographics*. 2020;40(2):589-604. doi:10.1148/rg.2020190114
11. Nizery L, Chardot C, Sissaoui S, et al. Biliary atresia: Clinical advances and perspectives. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2016;40(3):281-287. doi:10.1016/j.clinre.2015.11.010

12. Masuya R, Muraji T, Ohtani H, et al. Morphometric demonstration of portal vein stenosis and hepatic arterial medial hypertrophy in patients with biliary atresia. *Pediatric Surgery International*. 2019;35(5):529-537. doi:10.1007/s00383-019-04459-4
13. Keplinger KM, Bloomston M. Anatomy and embryology of the biliary tract. *The Surgical clinics of North America*. 2014;94(2):203-217. doi:10.1016/j.suc.2014.01.001
14. de Souza AF, Meurer L, da Silveira TR, et al. Angiopoietin 1 and angiopoietin 2 are associated with medial thickening of hepatic arterial branches in biliary atresia. *Pediatric Research*. 2014;75(1-1):22-28. doi:10.1038/pr.2013.177
15. Hussein A, Wyatt J, Guthrie A, Stringer MD. Kasai portoenterostomy--new insights from hepatic morphology. *J Pediatr Surg*. 2005;40(2):322-326. doi:10.1016/j.jpedsurg.2004.10.018
16. Jeon TY, Yoo SY, Kim JH, Eo H, Lee SK. Serial ultrasound findings associated with early liver transplantation after Kasai portoenterostomy in biliary atresia. *Clinical Radiology*. 2013;68(6):588-594. doi:10.1016/j.crad.2012.12.004
17. Ho CW, Shioda K, Shirasaki K, Takahashi S, Tokimatsu S, Maeda K. The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the hepatobiliary system and the hepatic artery. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1993;16(1):53-60. doi:10.1097/00005176-199301000-00011
18. Chung-Davidson YW, Yeh CY, Li W. The Sea Lamprey as an Etiological Model for Biliary Atresia. *BioMed research international*. 2015;2015:832943. doi:10.1155/2015/832943
19. Ortiz-Perez A, Donnelly B, Temple H, Tiao G, Bansal R, Mohanty SK. Innate Immunity and Pathogenesis of Biliary Atresia. *Frontiers in immunology*. 2020;11:329. Published 2020 Feb 25. doi:10.3389/fimmu.2020.00329
20. Davenport M. Biliary atresia: From Australia to the zebrafish. *J Pediatr Surg*. 2016;51(2):200-205. doi:10.1016/j.jpedsurg.2015.10.058
21. Napolitano M, Franchi-Abella S, Damasio MB, et al. Practical approach to imaging diagnosis of biliary atresia, Part 1: prenatal ultrasound and magnetic resonance imaging, and postnatal ultrasound *Pediatric Radiology*. 2021;51(2):314-331. doi:10.1007/s00247-020-04840-9
22. El-Guindi MA, Sira MM, Konsowa HA, El-Abd OL, Salem TA. Value of hepatic subcapsular flow by color Doppler ultrasonography in the diagnosis of biliary atresia. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2013;28(5):867-872. doi:10.1111/jgh.12151

23. Choochuen P, Kritsaneepaiboon S, Charoonratana V, Sangkhathat S. Is "gallbladder length-to-width ratio" useful in diagnosing biliary atresia? *Journal of pediatric surgery*. 2019;54(9):1946-1952. doi:10.1016/j.jpedsurg.2019.01.008
24. Humphrey TM, Stringer MD. Biliary atresia: US diagnosis. *Radiology*. 2007 Sep;244(3):845-51.
25. Zhou LY, Wang W, Shan QY, et al. Optimizing the US Diagnosis of Biliary Atresia with a Modified Triangular Cord Thickness and Gallbladder Classification. *Radiology*. 2015;277(1):181-191. doi:10.1148/radiol.2015142309
26. Tan Kendrick AP, Phua KB, Ooi BC, Tan CE. Biliary atresia: making the diagnosis by the gallbladder ghost triad. *Pediatric Radiology*. 2003;33(5):311-315. doi:10.1007/s00247-003-0867-z
27. 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):549-555. doi:10.1148/radiol.2452061093
28. Zhou Y, Jiang M, Tang ST, et al. Laparoscopic finding of a hepatic subcapsular spider-like telangiectasis sign in biliary atresia. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(39):7119-7128. doi:10.3748/wjg.v23.i39.7119
29. Zhou LY, Guan BY, Li L, et al. Objective differential characteristics of cystic biliary atresia and choledochal cysts in neonates and young infants: sonographic findings. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. 2012;31(6):833-841. doi:10.7863/jum.2012.31.6.833
30. Harada K. Sclerosing and obstructive cholangiopathy in biliary atresia: mechanisms and association with biliary innate immunity. Vol. 33, *Pediatric Surgery International*. Springer Verlag; 2017. p. 1243-8.
31. Abbey P, Kandasamy D, Naranje P. Neonatal Jaundice. *Indian journal of pediatrics*. 2019;86(9):830-841. doi:10.1007/s12098-019-02856-0
32. Mittal D, Bhatnagar V, Agarwala S, et al. Pre-operative Hepatic Artery Resistive Index is a Non-invasive Predictive Indicator of Prognosis in Biliary Atresia. *Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons*. 2017;22(4):237-241. doi:10.4103/jiaps.JIAPS\_103\_17
33. Lakshminarayanan B, Davenport M. Biliary atresia: A comprehensive review. *Journal of autoimmunity*. 2016;73:1-9. doi:10.1016/j.jaut.2016.06.005
34. Girard M, Panasyuk G. Genetics in biliary atresia. *Current opinion in gastroenterology*. 2019;35(2):73-81. doi:10.1097/MOG.0000000000000509

35. Santos JL, Carvalho E, Bezerra JA. Advances in biliary atresia: From patient care to research. Vol. 43, Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2010. p. 522–7.
36. Asai A, Miethke A, Bezerra JA. Pathogenesis of biliary atresia: Defining biology to understand clinical phenotypes. Vol. 12, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. Nature Publishing Group; 2015. p. 342–52.
37. Berauer JP, Mezina AI, Okou DT, et al. Identification of Polycystic Kidney Disease 1 Like 1 Gene Variants in Children With Biliary Atresia Splenic Malformation Syndrome. *Hepatology*. 2019;70(3):899-910. doi:10.1002/hep.30515
38. Mack CL, Feldman AG, Sokol RJ. Clues to the etiology of bile duct injury in biliary atresia. *Seminars in liver disease*. 2012;32(4):307-316. doi:10.1055/s-0032-1329899
39. Kobayashi H, Narumi S, Tamatani T, Lane GJ, Miyano T. Serum IFN-inducible protein-10: a new clinical prognostic predictor of hepatocyte death in biliary atresia. *Journal of pediatric surgery*. 1999;34(2):308-311. doi:10.1016/s0022-3468(99)90197-5
40. 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. *Journal of pediatric surgery*. 2005;40(4):637-642. doi:10.1016/j.jpedsurg.2004.12.002
41. Turnes Edom Patrícia, Meurer L, Reverbel da Silveira T, Matte U, Luiz dos Santos J. Immunolocalization of VEGF A and Its Receptors, VEGFR1 and VEGFR2, in the Liver From Patients With Biliary Atresia. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology (Print)*., v.19, p.360 - 368, 2011. doi: 10.1097/PAI.ob013e3182028a8e
42. Cash TP, Pan Y, Simon MC. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(9):1219-1225. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.001
43. Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1270-1282. doi:10.1053/j.gastro.2005.12.034
44. Fratta LX, Hoss GR, Longo L, et al. Hypoxic-ischemic gene expression profile in the isolated variant of biliary atresia. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences*. 2015;22(12):846-854. doi:10.1002/jhbp.297
45. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 *Molecular and cellular biology*. 1996;16(9):4604-4613. doi:10.1128/MCB.16.9.4604



46. Overi D, Carpino G, Cardinale V, et al. Contribution of Resident Stem Cells to Liver and Biliary Tree Regeneration in Human Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(10):2917. Published 2018 Sep 25. doi:10.3390/ijms19102917
47. Williams MJ, Clouston AD, Forbes SJ. Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology*. 2014;146(2):349-356. doi:10.1053/j.gastro.2013.11.034
48. Mazumdar J, O'Brien WT, Johnson RS, et al. O<sub>2</sub> regulates stem cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nature cell biology*. 2010;12(10):1007-1013. doi:10.1038/ncb2102
49. Bellanti F, Pannone G, Tartaglia N, Serviddio G. Redox Control of the Immune Response in the Hepatic Progenitor Cell Niche. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020;8:295. Published 2020 May 6. doi:10.3389/fcell.2020.00295
50. Patricia Quelhas, Michele Breton, Rui Oliveira, Maria Augusta Cipriano, Pranavkumar Shivakumar, Jorge Bezerra, Sandra Vieira, Carlos Kieling, Ignacio Verde , Jorge Luiz dos Santos . Ischemic cholangiopathy in biliary atresia: immunohistochemical and molecular evidence. EASL Congress. *Journal of Hepatology* 2021; 75(2)-S294–S803. S441. The Liver International Congress. (PO-2761).
51. Udomsinprasert W, Poovorawan Y, Chongsrisawat V, Vejchapipat P, Jittikoon J, Honsawek S. Leukocyte mitochondrial DNA copy number as a potential biomarker indicating poor outcome in biliary atresia and its association with oxidative DNA damage and telomere length. *Mitochondrion*. 2019;47:1-9. doi:10.1016/j.mito.2019.04.006
52. Lertudomphonwanit C, Mourya R, Fei L, et al. Large-scale proteomics identifies MMP-7 as a sentinel of epithelial injury and of biliary atresia. *Science translational medicine*. 2017;9(417):eaan8462. doi:10.1126/scitranslmed.aan8462

