

# **Atualização do Protocolo de Investigação de Colestase Neonatal**

**Joana Maria Janela Jacinto**

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

Orientador: Prof. Doutor Jorge Luiz dos Santos

**novembro de 2022**



## Declaração de Integridade

Eu, **Joana Maria Janela Jacinto**, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição 39688 de Mestrado Integrado em Medicina, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 2/11/2022

Assinatura

Joana Maria Janela Jacinto



## Agradecimentos

Este estudo só se tornou possível devido ao trabalho incansável de diversas pessoas. Deste modo, agradeço ao **Professor Doutor Jorge Luiz dos Santos** pela constante disponibilidade ao longo deste percurso, pela acessibilidade para discutir ideias e esclarecer dúvidas. Agradeço, também, à **Covilhã**, à **Universidade da Beira Interior** e à **Faculdade de Ciências da Saúde** por tão bem me terem acolhido, e pelo contributo tanto na minha formação profissional como no meu desenvolvimento pessoal. Agradeço os meus **amigos** por tornarem a Covilhã um lugar mais especial. Agradeço aos **meus pais, à minha tia, aos meus avós e ao meu namorado**, o apoio incondicional que me deram ao longo deste meu percurso académico.



## **Resumo**

A colestase neonatal (CN) inicia-se nos primeiros três meses de vida englobando grupos de doenças extra-hepáticas e intra-hepáticas que muitas vezes apresentam altas taxas de morbimortalidade se não forem identificadas e tratadas rapidamente. Icterícia, fezes cor de argila ou acólicas e colúria no lactente indicam a necessidade urgente de investigar a CN e, a partir daí, obter o diagnóstico diferencial das causas extra e intra-hepáticas. Na elucidação do diagnóstico etiológico, deve-se ter como prioridade a identificação de situações que ameacem a vida e que tenham possibilidade de tratamento, como é o caso da atresia biliar, doenças infecciosas, doenças metabólicas, e endocrinopatias. O diagnóstico diferencial da CN é um processo trabalhoso que exige a identificação ou exclusão precisa de um amplo painel de doenças ou grupos de doenças, por meio do uso hábil e interpretação de métodos especializados. É imprescindível uma integração sábia das avaliações clínico-laboratorial, histopatológica, molecular e genética, empregando amplo conhecimento sobre cada doença avaliada, bem como as armadilhas de cada teste diagnóstico. Na presente monografia, revisamos as armadilhas envolvidas no diagnóstico correto da causa da colestase em uma criança afetada.

## **Palavras-chave**

Neonato; Colestase; Insuficiência Hepática; Guideline; Manifestação Clínica.



## **Abstract**

Neonatal cholestasis (NC) starts in the first three months of life, encompassing groups of extrahepatic and intrahepatic diseases that often present high rates of morbidity and mortality if they are not identified and treated quickly. Jaundice, clay-colored or colonic stools, and choluria in the infant indicate the urgent need to investigate NC and, from there, obtain the differential diagnosis of extra- and intrahepatic causes of NC. In the elucidation of the etiological diagnosis, priority should be given to identifying life-threatening situations that have the possibility of treatment, such as biliary atresia, infectious diseases, metabolic diseases, and endocrinopathies. Differential diagnosis of NC is a laborious process that requires the accurate identification or exclusion of a broad panel of diseases or disease groups, through the skillful use and interpretation of specialized methods. A wise integration of clinical-laboratory, histopathological, molecular and genetic evaluations is essential, employing extensive knowledge about each disease evaluated, as well as the pitfalls of each diagnostic test. In this monograph, we review the pitfalls involved in correctly diagnosing the cause of cholestasis in an affected child.

## **Keywords**

Neonate; Cholestasis; Liver Failure; Guideline; Clinical Manifestation.



# Índice

<b>Declaração de Integridade</b>	iii
<b>Agradecimentos</b>	v
<b>Resumo</b>	vii
<b>Abstract</b>	ix
<b>Lista de Figuras</b>	xiii
<b>Lista de Tabelas</b>	xv
<b>Lista de Acrónimos e Siglas</b>	xvii
<b>1. Introdução</b>	1
<b>2. Materiais e Métodos</b>	3
<b>3. Fisiologia da Síntese, Conjugação e Metabolismo dos Sais Biliares</b>	5
3.1 Síntese e Conjugação de Ácidos Biliares Primários nos Hepatócitos e Secreção Canalicular	6
3.2 Modificação da Bile Ductular e Derivação Cole-hepática	6
3.3 Bile nas Estruturas Extra-hepáticas e Circulação Entero-hepática	8
3.4 Mecanismos Moleculares (genes e proteínas) Envolvidos em Cada uma das Etapas Acima	9
<b>4. Colestase Neonatal</b>	11
4.1 Definição	11
4.2 Diagnóstico Diferencial	12
4.3 Avaliação da Icterícia	14
4.4 Propensão para a Colestase Neonatal	15
<b>5. Estamos Perante Atresia Biliar?</b>	17
5.1 Novas Abordagens para Identificação de AB	21
5.1.1 Marcadores Sanguíneos	21
5.1.2 Anomalias Vasculares Arteriais	22
5.1.3 Os Estudos Genéticos são Úteis para Diferenciar a AB de Causas Intra-hepáticas de AB?	23
5.2 Qual é o Distúrbio Colestático Neonatal Presente?	24
5.3 Investigação Clínico-laboratorial em Criança com Aparência de Doença Aguda	26
5.4 Abordagem Integrativa da Investigação Clínico-laboratorial, Molecular, Histopatológica e Genética para o Diagnóstico da CN	29

5.5 O Papel da Investigação Histopatológica na Diferenciação da CN Intra-hepática	36
5.5.1 Padrão Inflamatório	38
5.5.2 Padrão Ductopénico	39
5.5.3 Padrão de Esteatose	40
5.5.4 Padrão Obstrutivo	42
5.5.5 Padrão de Armazenamento	42
<b>6. Conclusão</b>	45
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	47
<b>Anexo I</b>	57
<b>Anexo II</b>	58

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Síntese de ácidos biliares, metabolismo e fluxo biliar, mostrando os genes associados às diferentes etapas fisiológicas .....	5
<b>Figura 2</b> – Algoritmo para investigação diferencial entre atresia biliar e doenças intra-hepáticas .....	19
<b>Figura 3</b> – Características histopatológicas dinâmicas no fígado de um paciente com atresia biliar .....	20
<b>Figura 4</b> – Glóbulos de alfa-1 antitripsina (A1AT) dentro de hepatócitos periportais em um paciente com doença hepática associada a A1AT .....	21
<b>Figura 5</b> – Aglomerados vasculares subcapsulares com características de telangiectasias no explante de paciente com atresia biliar .....	23
<b>Figura 6</b> – Comparação do comportamento clínico inicial das intoxicações metabólicas e outras hepatopatias neonatais graves – medidas preventivas .....	27
<b>Figura 7</b> – Algoritmo para diagnóstico diferencial de doenças colestáticas intra-hepáticas neonatais .....	35
<b>Figura 8</b> – Padrão inflamatório .....	38
<b>Figura 9</b> – Glóbulos de A1AT dentro dos hepatócitos periportais num doente com doença hepática associada a deficiência de A1AT .....	39
<b>Figura 10</b> – Padrão de esteatose misto .....	41
<b>Figura 11</b> – Esteatose macrovesicular .....	41
<b>Figura 12</b> – Esteatose microvesicular .....	42



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Diagnósticos diferenciais da colestase neonatal .....	13
<b>Tabela 2</b> – A primeira linha no diagnóstico diferencial entre Atresia Biliar e Causas de Colestase Neonatal Intrahepática .....	17
<b>Tabela 3</b> – Dados clínico-laboratoriais sugestivos de doenças diagnósticas específicas ou grupos de doenças .....	31
<b>Tabela 4</b> – Achados histopatológicos associados à colestase neonatal intra-hepática .	37
<b>Tabela 5</b> – Achados histopatológicos do fígado na apresentação de algumas doenças de armazenamento que causam CN .....	43



## Lista de Acrónimos e Siglas

ABC	ATP Binding Cassette (Subfamilies B, C, G)
CN	Colestase Neonatal
AE2	Anion exchange protein 2
ASBT	Apical Sodium Dependent Bile Acid Transporter
BSEP	Bile salt export pump
ATP8B1	ATPase Phospholipid Transporting 8B1
FIC1	Familial intrahepatic cholestasis 1-associated protein
BA	Bile Acid
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
ER	Retículo Endoplasmático
FGF19	Fibroblast growth factor 19
MDR	Multidrug-resistant protein
MRP	Multidrug resistance-associated protein
NTCP	Na <sup>+</sup> - taurocholate co-transporting polypeptide
OATP	Organic anion transporting peptide
OST $\alpha/\beta$	Organic solute transporter alpha and beta
SLC10A2	Solute Carrier Family 10 Member 2
SLC10A1	Solute Carrier Family 10 Member 1
CYP7A1	Cytochrome P450 Family 7 Subfamily A Member 1
PVP	Plexo Vascular Peribiliar
T/G	Taurine/Glicina
UDCA	Ácido Ursodesoxicólico
TUDCA	Ácido Tauroursodesoxicólico
FXR	Receptor Farnesoid-X
CYP27	Cytochrome P450 Family 27
CYP27A1	Cytochrome P450 Family 27 Subfamily A Member 1
SHP-1	Pequeno Heterodímero Parceiro-1
PXR	Receptor X Pregnano
CAR	Receptor de Androstano Constitutivo
VDR	Recetor da Vitamina D
A1AT	$\alpha$ 1-Antitripsina
TGPs	Traceless Genetic Programming
NGS	Next Generation Sequencing

WGS	Whole Genome Sequencing
CES	Sequenciamento de Exoma Clínico
WES	Whole Exome Sequencing
NEC	Enterocolite Necrotizante
MBP	Muito Baixo Peso
PNALD	Parenteral Nutrition Associated Liver Disease
NP	Nutrição Parentérica
UTIN	Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais
GGT	Gamaglutamiltranspeptidase
AB	Atrésia billiar
AGS	Síndrome de Alagille
PFIC3	Colestase Intra-hepática Familiar Progressiva do Tipo 3
PIG	Pequeno para Idade Gestacional
MMP-7	Metaloproteinase-7 da Matriz
IP	Inibidor de Protease
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
FAH	Fumarilacetoacetato Hidrolase
GALT	Galactose-1-fosfato uridil Transferase
GALD	Doença Hepática Aloimune Gestacional
CK	Células de Kupffer
INR	International normalized ratio
NBS	New Born Screening
DAG	Doença de Armazenamento de Glicogénio

## **1. Introdução**

Colestase descreve os estados patológicos que cursam com distúrbios do fluxo biliar, por alterações anatómicas ou funcionais deste sistema. Conseqüentemente, os pacientes colestáticos apresentam concentrações séricas elevadas de substâncias habitualmente excretadas na bÍlis, com repercussão clínica e laboratorial. Quando há predomÍnio da bilirrubina indireta nos recém-nascidos, é comum e, na maioria das vezes, fisiológica. Todavia, o aumento da bilirrubina direta traduz a presença de doença hepatocelular ou biliar e requer exploração clínica urgente. Trata-se de uma patologia com elevada morbidade e mortalidade e, assim, pode considerar-se a colestase neonatal uma urgência em gastroenterologia pediátrica. A etiologia da colestase neonatal inclui um grupo de entidades com apresentações clÍnicas sobrepostas. As causas mais comumente identificáveis são a atresia biliar 25-55%, a deficiência de  $\alpha$ 1-antitripsina (A1AT) 10-20% e a síndrome de Alagille 2-14%. A sua identificação precoce, o correto diagnóstico etiológico e a instituição de tratamento adequado exercem influência decisiva na qualidade de vida e sobrevivência dos pacientes. Em última análise, muitos pacientes acabam por ser submetidos a transplante hepático, sendo que esta patologia representa a sua principal indicação na população pediátrica.



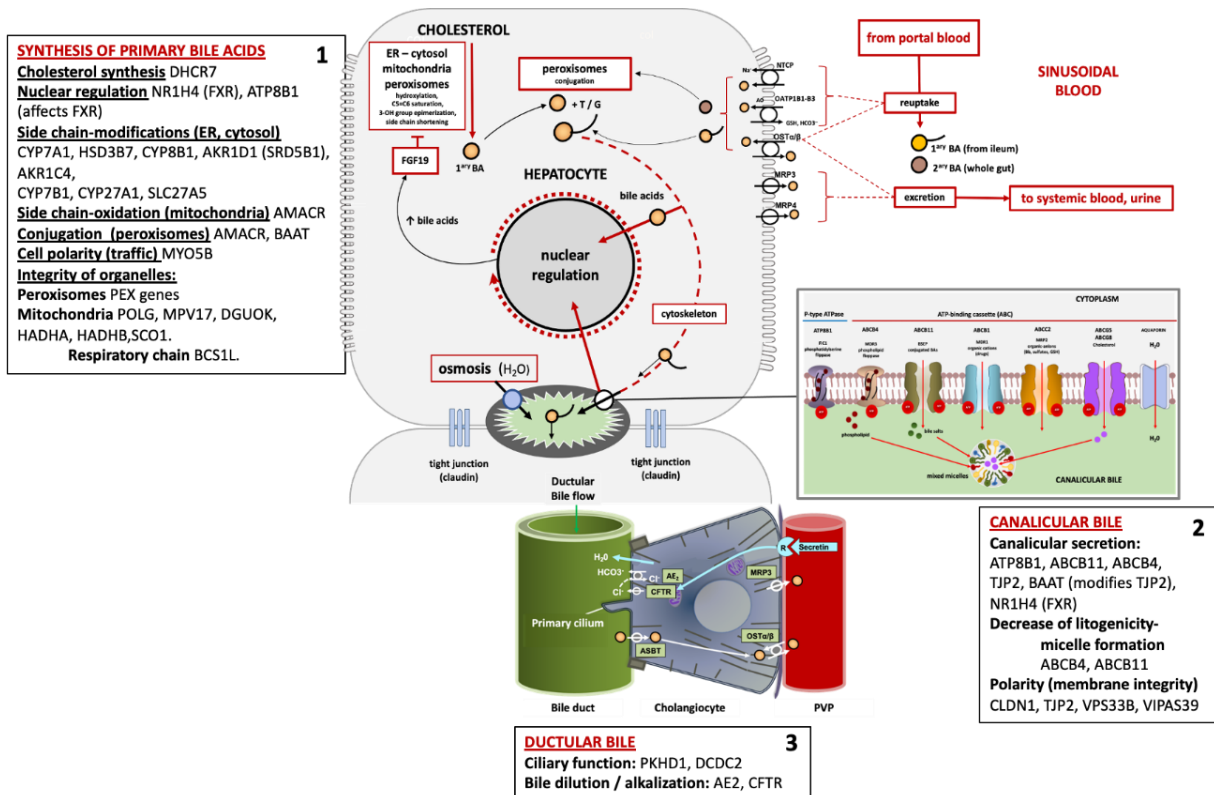
## **2. Materiais e Métodos**

Para efetuar esta pesquisa bibliográfica foi utilizada principalmente a base de dados da PubMed, incluindo especialmente as seguintes palavras-chave: ((Neonate OR Neonatal OR Infant OR infantile) AND (cholestasis OR liver failure)) AND Guideline OR protocol OR “clinical manifestation” OR ((Clinical OR laboratory OR clinical-laboratory OR image OR histopathol\* ) AND (diagnosis OR “differential diagnosis”)) OR portoenterostomy OR “Kasai” OR “intraoperative cholangiography” OR “accuracy” OR “next generation sequencing” OR prognostics OR “native liver survival”. A pesquisa inicial resultou num total de 1938 artigos, posteriormente submetidos a uma seleção da qual resultaram 117 referências bibliográficas. A seleção realizada foi focada em artigos de revisão, guidelines e artigos randomizados controlados, redigidos em português e inglês. Consultaram-se também livros da área da doença hepática, em específico sobre o tema da colestase neonatal. De igual forma foram incluídas publicações fornecidas pelo orientador desta monografia, entendidas pelo mesmo como pertinentes. Foram excluídos relatos de casos isolados, estudos experimentais em animais ou em células. A pesquisa foi referente aos últimos 10 anos, incluindo outros artigos menos recentes sempre que o conteúdo fosse considerado relevante.



### 3. Fisiologia da Síntese, Conjugação e Metabolismo dos Sais Biliares

Através da figura 1, abordo brevemente este assunto complexo para explicar a fisiopatologia da CN.



**Figura 1-** Síntese de ácidos biliares, metabolismo e fluxo biliar, mostrando os genes associados às diferentes etapas fisiológicas. Abreviaturas: (Imagens) ABC- ATP Binding Cassette (Subfamilies B, C, G); AE2- anion exchange protein 2; ASBT- Apical Sodium Dependent Bile Acid Transporter; BSEP- bile salt export pump; ATP8B1-ATPase Phospholipid Transporting 8B1 (or FIC1- familial intrahepatic cholestasis 1-associated protein); BA- bile acid; CFTR- Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; ER- endoplasmic reticulum; FGF19- fibroblast growth factor 19; MDR- Multidrug resistant protein; MRP- multidrug resistance-associated protein; NTCP- Na<sup>+</sup> - taurocholate co-transporting polypeptide; OATP- organic anion transporting peptide; OST  $\alpha/\beta$ - organic solute transporter alpha and beta; PVP- peribiliary vascular plexus; T/G- taurine or glycine. (Caixa de genes 1-3) – ver <https://www.genecards.org/>; <https://panelapp.genomicsengland.co.uk/>

### **3.1 Síntese e Conjugação de Ácidos Biliares Primários nos Hepatócitos e Secreção Canalicular (Figura 1, caixa 1)**

A síntese de ácidos biliares desenvolve-se no citosol hepatocelular, retículo endoplasmático, mitocôndrias e peroxissomas, e envolve no mínimo 16 enzimas que permitem a transformação de moléculas de colesterol, pouco hidrossolúveis, em moléculas solúveis e facilmente excretáveis pelo fígado.(1) Etapas sequenciais de hidroxilação, saturação da dupla ligação C5-C6, epimerização do grupo 3-OH e encurtamento da cadeia lateral convertem o colesterol em ácidos biliares primários anfipáticos essenciais para a formação de micelas e digestão e absorção de lipídios.(1-4) Nos peroxissomas, os ácidos biliares primários são conjugados com os aminoácidos taurina e glicina, tornando-se moléculas impermeáveis de membrana solúvel, resistentes à precipitação em pH fisiológico e à ação de enzimas pancreáticas. Nos humanos, os principais ácidos biliares primários são os ácidos quenodesoxicólico e cólico.(3,4)

Após a síntese e conjugação dos ácidos biliares primários e reconjugação dos ácidos biliares secundários reabsorvidos provenientes do intestino através da circulação entero-hepática, os ácidos biliares movem-se com a ajuda do citoesqueleto em direção à membrana canalicular através da qual são transportados para o lúmen pela BSEP (**Figura 1, caixa 2**). Outras moléculas, como fosfolipídios, glutatona, ácidos orgânicos, aniões orgânicos também atravessam a membrana canalicular com a ajuda de ABC. As forças osmóticas geradas pelo enriquecimento da bile com esses solutos levam a água a fluir para o lúmen através das aquaporinas. A coexistência no ambiente luminal de ácidos biliares e fosfolipídios, ambas moléculas anfipáticas, possibilita a formação de micelas mistas, componentes cruciais para a digestão e absorção de lipídios. O fluxo passivo de água e solutos e o peristaltismo canalicular conduzem o conteúdo luminal em direção aos ductos biliares.(3,4)

### **3.2 Modificação da Bile Ductular e Derivação Cole-hepática (Figura 1, caixa 3)**

As células epiteliais do ducto biliar contribuem com cerca de 40% do volume total da bile ductular através do enriquecimento de água e bicarbonato, dois fatores protetores cruciais contra os efeitos nocivos dos ácidos biliares sobre o epitélio biliar. A secreção

luminal de bicarbonato é promovida pelo AE2 ativado pelo cálcio intracelular. Um distúrbio do estado REDOX pode interromper as vias moleculares envolvidas na secreção de bicarbonato, e isso pode explicar a correlação entre estresse oxidativo e agravamento de doenças colestáticas. A hormona Secretina induz a secreção luminal de cloreto por meio da ativação de CFTR durante a fase digestiva, mas outras vias moleculares podem representar o principal gatilho para a secreção de cloreto através de canais de membrana. Curiosamente, UDCA e TUDCA, após serem absorvidos em colangiócitos pelo ASBT, parecem aumentar a saída de cloreto através da estimulação precedente da liberação de cálcio. A presença de cloreto no lúmen ductular/ductal biliar leva o AE2 a aumentar a concentração de bicarbonato na bile. É importante ressaltar que a secretina também tem um papel na proliferação de células biliares. Os cílios primários presentes na membrana apical dos colangiócitos dos ductos e ductos biliares são organelas com funções mecano-, osmo- e quimiossensoriais críticas. O conteúdo de ácidos biliares, a intensidade do fluxo biliar e a tonicidade biliar atuam juntos em recetores ciliares específicos para regular os níveis de cálcio intracelular dos colangiócitos e afetam os processos de diluição e alcalinização da bile nas vias biliares.(3,4)

É importante ressaltar que devido à permeabilidade da membrana aos diidroxácidos biliares não conjugados essas moléculas são absorvidas passivamente através da membrana apical dos colangiócitos, processo denominado shunt cole-hepático, sendo encaminhadas ao sangue sinusoidal através do plexo vascular peribiliar e gerando uma hipercolerese. Nos sinusoides, os sais biliares reabsorvidos são recapturados pelos hepatócitos e secretados de novo na bÍlis, de modo a aumentar o fluxo biliar dependente de sais biliares.(3,4)

A via de shunt cole-hepático é pouco significativa em condições normais, mas pode tornar-se importante como uma rota de escape de sais biliares em situações de colestase com proliferação biliar. É ainda um importante fator de sinalização celular regulando as atividades de proliferação e secreção na árvore biliar.(1) Os sais biliares não conjugados, por serem, em condições fisiológicas, ácidos fracos sem carga, podem atravessar as membranas celulares por difusão passiva o que permite a recaptção dos sais biliares nos colangiócitos dos ductos, possibilitando a circulação cole-hepática. Por outro lado, permite também a absorção dos sais biliares secundários desconjugados para os enterócitos e daí para a circulação entero-hepática.(1,3-5) Em sentido contrário, os sais biliares conjugados precisam de ser ativamente transportados para o interior dos hepatócitos e dos enterócitos através do transportador ASBT.(1)

### **3.3 Bile nas Estruturas Extra-hepáticas e Circulação Entero-hepática**

Durante o período interdigestivo, devido ao encerramento do esfíncter de Oddi, a bile entra na vesícula biliar, a água e os eletrólitos são fortemente reabsorvidos e a concentração micelar crítica atingida, o que leva a um extenso enriquecimento da bile com micelas mistas. No intestino, sob a ação da flora intestinal, o ácido cólico e quenodesoxicólico são desconjugados e desidroxilados, transformando-se nos ácidos biliares secundários, ácido deoxicólico e litocólico, que são hidrofóbicos e absorvidos passivamente no epitélio ileal e no epitélio do intestino grosso, recirculando assim para o fígado através a circulação entero-hepática. Os rearranjos moleculares sofridos pelos ácidos biliares secundários, principalmente o ácido litocólico, torna-as moléculas hidrofóbicas tóxicas para o sistema hepatobiliar. É importante ressaltar que a maioria dos ácidos biliares primários são reabsorvidos na forma conjugada e hidroxilada no íleo através da ação do ASBT e SLC10A2 com a ajuda do OST $\alpha/\beta$ , sendo assim encaminhado para fígado através da circulação entero-hepática.(3–5)

Como os ácidos biliares são reabsorvidos de forma muito eficiente no intestino, a pool de ácidos biliares é amplamente conservada, e apenas uma pequena quantidade de síntese de novo de ácidos biliares é necessária diariamente para repor as perdas fecais.(1) Um conjunto de recetores localizados na membrana basolateral dos hepatócitos é responsável pelo transporte de sais biliares provenientes do sangue portal e que circulam nos sinusoides. O NTCP e SLC10A1 levam à recaptção de ácidos biliares conjugados, acoplando o transporte de ácidos biliares ao gradiente de sódio. Os transportadores de aniões orgânicos mediam a recaptção independente de sódio de ácidos biliares conjugados e não conjugados e aniões orgânicos, como esteroides e drogas. Por outro lado, em condições colestáticas, há aumento do efluxo basolateral de ácidos biliares para o sangue sinusoidal e depois para a circulação sistémica. Os transportadores responsáveis pelo efluxo basolateral incluem OST $\alpha/\beta$ , MRP3 e MRP4, aumentando os níveis séricos de ácido biliar e também levando à excreção renal dessas moléculas.(3,4) O tamanho da pool de ácidos biliares é normalmente mantido em nível constante pelo balanço entre a excreção fecal de ácidos biliares e a síntese hepatocelular.(1) A síntese e o transporte de ácidos biliares através das membranas são regulados pela sinalização de recetores nucleares, incluindo o FXR, de modo que a alteração dos níveis de sais biliares dentro dos hepatócitos induz o FXR a alterar a síntese de ácidos biliares, atuando no CYP7A1; a recaptção de ácidos biliares na membrana basolateral, afetando o

transportador NTCP; a secreção canicular, regulando a expressão de BSEP, e a reabsorção de conjugados por ácidos no íleo através da ação no ASBT. O FGF19 é uma das proteínas que pode servir em conjunto com outros fatores como mediador para a regulação nuclear hepatocitária, regulando a expressão de CYP7A1 e controlando a absorção ileal de ácidos biliares através do ASBT.(3,4)

O conhecimento das diferentes etapas envolvidas na síntese e metabolismo dos ácidos biliares é uma ferramenta útil para a compreensão da colestase, seu diagnóstico e opções terapêuticas.

### **3.4 Mecanismos Moleculares (genes e proteínas) Envolvidos em Cada uma das Etapas Acima (1)**

**CYP7A1:** promove a hidroxilação do núcleo esterol do colesterol na rota neutra.

**CYP27:** promove a hidroxilação da cadeia lateral do colesterol na rota ácida, formando o 5-colesteno-3-beta-27-diol, que é hidroxilado na posição 7 dos anéis de carbono.

**CYP27A1:** opera na síntese de sais biliares e atua na formação de oxisteróis, que são metabólitos intermediários do colesterol e de vitamina D.

**OATP:** são os transportadores responsáveis pela recaptação dos sais biliares reciclados do intestino pelos hepatócitos, levando-os desde os sinusóides até à membrana canicular pelo citoplasma.

**BSEP:** transportador específico da membrana canicular que secretam ativamente os sais biliares transportados pelo NTCP e OATP para os canalículos. É o principal responsável pelo fluxo biliar dependente de sais biliares.

**MDR1:** é uma lipase com função transportadora localizada na membrana basolateral hepatocitária. É responsável pela translocação de fosfolípidios para o folheto interno da membrana canicular, associada à lipase de fosfatidilserina, excretando também drogas e catiões orgânicos volumosos.

**MRP2:** transportador específico da membrana canicular que secretam ativamente os sais biliares transportados pelo NTCP e OATP para os canalículos juntamente com os aniões orgânicos e o glutatião.

**MDR3:** é uma Flopase, molécula que faz a transferência dos fosfolípidios do folheto interno da membrana canicular para o folheto externo, assim levando à secreção de fosfolípidios para a bÍlis.

**NTCP:** sistema de transporte para a captação hepatocitária de sais biliares.

**OATP:** sistema de transporte para a captação hepatocitária de sais biliares independente de sódio. São transportadores multiespecíficos em relação aos substratos, que trocam sais biliares por outros aniões, como bicarbonato e glutatião, ou mesmo por outros sais biliares. Captam sais biliares, especialmente os não conjugados, captam aniões orgânicos, como monogluconídeo de bilirrubina e hormona tiroideia, e captam xenobióticos.

**FIC1:** Transferem folfatidilserina do folheto externo da membrana canalicular para o folheto interno.

**OST-alfa/OST-beta:** transportador de sais biliares e de esteroides conjugados independente de sódio, que se expressa na membrana plasmática basocelular da célula hepática, promovendo a exportação de sais biliares do hepatócito para sinusoide na existência de colestase.

**CFTR:** é ativado pela secretina e inibida pela somatostatina, e leva à secreção de bicarbonato na bÍlis.

**ASBT ou ISBT:** responsável pela captação ativa de sais biliares por colangiócitos. É estimulada pela secretina pelo que a sua atividade aumenta a via do shunt cole-hepático no período pós-prandial. Atuam na via dependente de sódio e localizam-se na membrana apical dos enterócitos participando também da circulação entero-hepática.

**FXR:** media a expressão do transportador ASBT no intestino delgado, e altas concentrações de sais biliares detetadas pelo FXR induz a produção da proteína small heterodimer partner-1 (SHP-1) que passa a regular negativamente a expressão deste transportador. Controla também o OST-alfa/OST-beta aumentando a expressão deste transportador quando ativado. Portanto, os sais biliares regulam sua própria absorção intestinal por meio do FXR.

**SHP-1:** a sua expressão é induzida no fígado com a ligação dos sais biliares. Esta proteína interfere na transcrição de CYP1A e de NTCP reduzindo a sua biossíntese e a captação de sais biliares pelos sinusoides. Na colestase, a NTCP é infrarregulada por um mecanismo dependente da SHP-1.

**OATP3:** atua na via independente de sódio e é um transportador multiespecífico para aniões anfipáticos.

**FGF19:** fator de crescimento que participa em circuitos regulatórios do metabolismo biliar. Este fator é induzido por sais biliares intestinais, e torna-se intermediário numa via de retroalimentação inibitória à enzima CYP7A1 hepática, com participação do FXR.

**PXR, CAR e VDR:** são recetores nucleares que se ligam a sais biliares ou drogas e protegem o fígado contra a toxicidade dessas substâncias, atuando sobre a família do citocromo P450 e sobre as proteínas transportadoras ABC.

## 4. Colestase Neonatal

### 4.1 Definição

Colestase é o termo utilizado para descrever os estados patológicos que cursam com a redução da secreção biliar, por alterações anatômicas ou funcionais do sistema biliar (6–8), levando à acumulação de componentes biliares tóxicos no fígado, sangue e outros tecidos, podendo levar à insuficiência hepática.(9) Em termos bioquímicos, a colestase é caracterizada por níveis aumentados de bilirrubina de reação direta (conjugada), ácidos biliares ou seus metabólitos intermediários e outros compostos biliares. Do ponto de vista histopatológico, observa-se a acumulação de pigmento bilirrubínico nos hepatócitos e canálculos biliares, além de outros achados relacionados com a etiologia da colestase.(6) A colestase é definida como nível sérico de bilirrubina de reação direta acima de 1 mg/dL com valor de bilirrubina total de até 5 mg/dL ou quando a fração direta é superior a 20% com bilirrubina total acima de 5 mg/dL.(7,8,10)

A colestase é considerada neonatal quando começa nos três primeiros meses de vida, afetando 1 em cada 2.500 bebês em todo o mundo.(6,7,11) Relatórios recentes sugerem que durante os primeiros 5 dias de vida, níveis mais baixos de bilirrubina direta/conjugada ( $> 0,3-0,5$  mg/dL) e bilirrubina direta/conjugada  $> 10\%$  da bilirrubina total são anormais e devem levantar a suspeita de colestase nesta idade e requerem uma avaliação mais aprofundada.(6,11) Em bebês prematuros, a colestase é mais frequente com uma incidência de 10% até 20%.

Do ponto de vista clínico, um lactente com colestase, no diagnóstico apresenta icterícia, graus variados de hipocolia até acolia e colúria. No entanto, lactentes anictéricos e com fezes de coloração normal podem sofrer de formas específicas de colestase. Ocasionalmente, pode ocorrer esteatorreia ou sangramento abundante como primeiro sinal de CN.(12) Nos lactentes, visto que apresentam urina quase incolor, colúria não significa “urina escura” como em adultos colestáticos, mas sim uma urina amarelada que mancha as fraldas. Com a evolução progressiva da toxicidade hepática decorrente da ação dos componentes biliares sobre os hepatócitos e colangiócitos, e sem o tratamento adequado, a clínica da colestase pode culminar em cirrose hepática.(6,13)

## 4.2 Diagnóstico Diferencial

A CN é amplamente classificada em dois grupos etiológicos (**Tabela 1**): obstrução extra-hepática (envolvendo processos de obstrução mecânica biliar) e colestase intra-hepáticas (infecções, endocrinopatias, distúrbios genéticos e metabólicos, hipotensão com lesão isquêmica do fígado, em associação com doenças inflamatórias intestinais crônicas, medicamentos, associada ao uso de nutrição parentérica, entre outras causas).(8,11)

As causas mais comumente identificáveis são a atresia biliar 25-55%, a deficiência A1AT 10-20% e a síndrome de Alagille 2-14%.(8,11) A rápida evolução da AB pode ser retardada com a portoenterostomia de Kasai, uma operação que tenta restabelecer o fluxo biliar removendo os ductos biliares atréticos e criando uma anastomose fígado-intestino. O tratamento até os 45 dias de vida é a melhor abordagem para retardar ou prevenir a necessidade de transplante até aos 16 anos de idade.(10,14,15) No entanto, a implacável colangiopatia leva à necessidade de transplante hepático em 78% dos pacientes até a terceira década de vida.(15)

Em relação aos distúrbios intra-hepáticos, as terapias instituídas prontamente podem proteger contra os efeitos tóxicos dos ácidos biliares ou seus metabólitos no fígado. A Hepatite Neonatal Idiopática, constitui um padrão clínico-patológico de causa desconhecida.(16)

Atualmente, há uma crescente disponibilidade clínica de TGP's utilizando a tecnologia NGS ou WES ou WGS que podem testar simultaneamente e rapidamente um grande número de causas genéticas de colestase em um custo relativamente baixo apresentando também potencial para descobrir novas etiologias, o que tem aumentado o número de genes e mutações conhecidos na colestase.(11)

**Tabela 1-** Diagnósticos diferenciais da colestase neonatal.

<b>COLESTASE INTRAHEPÁTICA</b>
<b>1. HEPATITE IDIOPÁTICA NEONATAL</b>
<b>2. DITURBIOS DE ESTRUTURAS BILIARES NA EMBRIOGÉNESE</b> Síndrome de Alagille (JAG1; NOTCH2); Síndrome linfedema colestático (Síndrome Aagenaes) <b>Ciliopatias:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Malformação da placa ductal: ARKPD (PKHD1), Caroli (doença e síndrome), Síndrome de Joubert com fibrose hepática congénita (COACH), Síndrome de Meckel, Displasia Renal-hepática-pancreática (NPHP3).</li> <li>• Colangite esclerosante neonatal sem icterose (DCDC2).</li> </ul>
<b>3. DISTURBIOS NA SÍNTESE E CONJUGAÇÃO DE ÁCIDOS BILIARES PRIMÁRIOS</b> <b>Síntese:</b> Défice de $\beta$ -Hidroxi- $\Delta$ 5-C27-esteroide oxidoreductase (HSD3B7); Défice de oxosteroide $5\beta$ -reductase (AKR1D1); Défice de esterol 27-hidroxilase –Xantomatose Cerebrotendinosa (CYP27A1); Défice de oxisterol 7 $\alpha$ -hidroxilase (CYP7B1); Défice de 2-Meti-lacil-CoA racemase (AMACR). <b>Conjugação:</b> Défice de ácido biliar CoA ligase - Hipercolenémia familiar (BAAT and TJP2).
<b>4. TRANSPORTE E SECREÇÃO DE COMPOSTOS COLEFÍLICOS</b> <b>Regulação de recetores nucleares:</b> PFIC5 (defeito funcional de FXR, gene NR1H4) <b>Transporte intracelular de sais biliares:</b> PFIC6 (Proteína VB miosina, gene MYO5B); Artrogripose, Disfunção Renal, e Colestase (manutenção da polaridade apical, genes VPS33B, VIPAS39). <b>Secreção da membrana canalicular: sais biliares-</b> proteína BSEP (PFIC2, BRIC2, gene ABCB11); <b>fosfolípidos-</b> MDR3- proteína MDR3 (gene ABCB4); <b>colesterol-</b> sitosterolemia (ABCG5)
<b>5. COMPLEXOS JUNCIONAIS HEPATOCELULARES</b> PFIC4 (TJP2); Síndrome NISCH (CLDN1)
<b>6. DISTURBIOS COMPLEXOS OU MULTIORGÂNICOS</b> Distúrbio da translocação de fosfatidilserina: PFIC1, BRIC1 (ATP8B1); Artrogripose, Disfunção renal, e Colestase (VPS33B, VIPAS39); Xantomatose cerebrotendinosa (CYP27A1); Defeito congénito da glicosilação (CDG) (ALG3, ALG8, GLS1, PMM2, MPI, COG1, COG7, ATP6AP1). <b>Distúrbios dos peroxissomas-</b> Distúrbio do espectro Zellweger / adrenoleucodistrofia neonatal / doença neonatal Refsum / síndrome Heimler (Família do gene PEX). <b>Colestase intrahepática neonatal causada por Défice de CITRINA (NICCD),</b> Citrulinemia tipo II (SLC25A13). <b>Distúrbio da cadeia respiratória mitocondrial</b> Síndrome da depleção mitocondrial (DGK, POLG, MPV17, DGUOK); Défice do complexo III da cadeia respiratória – Síndrome GRACILE (BSC1L); Défice da cadeia-longa-3-hidroxil-CoA desidrogenase (LCHADD) (HADHA).
<b>7. DOENÇAS HEPÁTICAS METABÓLICAS</b> <b>Envolvendo o Sistema biliar-</b> Doença alfa 1-antitripsina (SERPINA 1); fibrose quística (CFTR, variante $\Delta$ F508) <b>Não envolvendo o sistema biliar-</b> Doença do armazenamento de glicogénio tipo IV (GBE1). <b>Intoxicação metabólica:</b> Galactosemia (GALT), Intolerância hereditária à frutose (ALDOB), Tirosinemia (FAH). <b>Doença endócrina-</b> Hipotireoidismo; Hipopituitarismo <b>Doença do metabolismo dos lípidos (armazenamento):</b> Síndrome Wolman (LIPA), Doença Niemann-Pick (NPC 1 and 2), Doença Gaucher tipo II (GBA); Doença de Farber tipo IV (ASAH1).

<p><b>8. INFEÇÕES CONGENTAS</b></p> <p><b>Bacteriana</b>- Sífilis, Sépsis bacteriana, infecção do trato urinário, Tuberculose, Listeriose.</p> <p><b>Viral</b>- CMV, Rubéola, Herpes Simplex; hepatite A, B, C; VIH, Parvovirus B19, varicela Zoster, Paramixovírus, sépsis entérica viral, Echovirus, Coxsackievirus, Adenovirus.</p> <p><b>Parasítica</b>- Toxoplasmose.</p>
<p><b>9. DISTURBIOS IMUNES</b></p> <p>Lupus eritematoso neonatal, Hepatite neonatal com anemia hemolítica autoimune, doença hepática gestacional aloimune (GALD)</p>
<p><b>10. OUTROS</b></p> <p><b>Colestase transitória.</b></p> <p><b>Doença hepática associada a nutrição parentérica (PNALD)</b></p> <p>Cirrose hepática, Histiocitose X, Hepatite fibrótica com leucemia transitória (Trissomia 21), Choque e Hipoperfusão, asfixia neonatal, associada com obstrução intestinal, lesão induzida por drogas (DILI).</p>
<p><b><u>COLESTASE OBSTRUTIVA EXTRAHEPÁTICA</u></b></p> <p><b>Atresia Biliar</b></p> <p>Quisto do colédoco; Perfuração espontânea do ducto biliar comum; rolhão mucoso/lama biliar; Colelitíase.</p>
<p><b>Fonte da informação genética:</b> <a href="https://panelapp.genomicsengland.co.uk/">https://panelapp.genomicsengland.co.uk/</a></p> <p><b>Referências-</b> The liver: Biology and Pathobiology. Arias, Irwin M. (editor, and six others). 6th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2020. Sections A-C.</p>

### 4.3 Avaliação da Icterícia

A icterícia é clinicamente evidente quando o valor de bilirrubina total excede 2,5 a 3,0 mg/dL (42–51 mmol/L). O primeiro passo para avaliar uma criança com icterícia é avaliar o valor da bilirrubina total e direta.(8) A icterícia é a descoloração amarelada da pele, escleras, mucosas e fluidos corporais, sendo um achado clínico comum nas primeiras 2 semanas de vida neonatal, ocorrendo em até 15% dos bebés amamentados.(7,11)

Na maioria dos casos, a icterícia neonatal é fisiológica e é caracterizada por hiperbilirrubinémia indireta, frequentemente associada a amamentação por leite materno, além de hemólise, síndrome de Gilbert ou mais raramente síndrome de Crigler-Najjar.(6,7,11) Já na icterícia que perdura depois das 2 semanas de idade em bebés amamentados ou em bebés alimentados com fórmula deve-se realizar o fracionamento da bilirrubina sérica. Outro aspeto muito importante é a coloração das fezes e da urina, que auxilia no diagnóstico diferencial entre os casos colestáticos e não colestáticos. No caso de haver icterícia acompanhada de hipocolia ou acolia em qualquer idade deve-se realizar o fracionamento da bilirrubina. Se a hiperbilirrubinémia direta for identificada,

devemos avançar imediatamente com uma avaliação adicional para as causas hepatobiliares e a urgência do tratamento depende da idade e condição do bebê, achados físicos, valores laboratoriais e história familiar.(6,11)

Concluindo, se um neonato de 2 semanas estiver em regime de amamentação e tiver um exame físico, sem história de colúria ou fezes acólicas, uma opção é fazer acompanhamento dentro de 1 semana de acordo com a prática local e o conforto dos cuidadores com o plano. Se este curso for feito e a icterícia persistir em 3 semanas de idade, recomenda-se avaliação laboratorial.(8) Se um neonato de 2 semanas icterico é alimentado com fórmula, então o fracionamento da bilirrubina é recomendado. Se a primeira consulta do neonato for às 4 semanas de idade, como é prática comum em muitos países europeus, então qualquer criança com icterícia deve ser investigada prontamente por meio da medição da bilirrubina total e direta.(6,8,11) Caso o bebê icterico apresente acolia deve ser imediatamente encaminhado para investigação especializada.(6)

#### **4.4 Propensão para a Colestase Neonatal**

A incidência de colestase em prematuros varia muito com o grau de prematuridade, peso ao nascer e presença de fatores de risco adicionais.(8,17) A incidência de CN aumenta em neonatos prematuros, mais naqueles nascidos nos limites da viabilidade do que os nascidos mais próximos do termo.(8) Isto deve-se à combinação de vários fatores de risco, como imaturidade, falta de alimentação enteral, uso de nutrição parenteral total, episódios frequentes de septicemia, insuficiência intestinal secundária à NEC, hipoxia perinatal e efeitos colaterais da medicação.(12,17) No subconjunto de bebês nascidos antes de 28 semanas da gestação, acredita-se que a incidência de colestase seja aumentado em 100-200 vezes em comparação com bebês a termo.(12) O aumento da incidência de colestase na maioria dos prematuros é em parte devido à imaturidade funcional do próprio sistema hepatobiliar.(17,18)

Comparados com bebês a termo, os recém-nascidos prematuros são ineficazes no processamento de ácidos biliares. Eles apresentam uma diminuição da captação hepática e da síntese de sais biliares, e também diminuição da circulação, levando à estase biliar.(17,18) O tamanho total da pool de sais biliares também é baixo. O fígado prematuro é mais suscetível à toxicidade, pois a solubilização de sais biliares tóxicos via

sulfatação, é deficiente no feto e no neonato em desenvolvimento.(17) Além disso, um bebê pequeno para a idade gestacional é um forte fator de risco independente para a CN.(19) A colestase ocorre em aproximadamente 18% a 24% dos recém-nascidos de MBP (1.500 g).(8,17)

A infecção é mais um componente da etiologia multifatorial da colestase em neonatos prematuros. De facto, qualquer causa de resposta inflamatória sistêmica, incluindo infecção congénita, sépsis relacionada ao cateter, supercrescimento bacteriano e enterocolite necrotizante, está intimamente relacionado com o desenvolvimento da PNALD.(17) Certos microrganismos, especificamente infecções do trato urinário por gram-negativos, *Pneumococcus* e *Candida*, são mais comumente associadas à CN.(8,17)

Alguns medicamentos frequentemente utilizados em UTIN têm sido associados à colestase. O fluconazol, por exemplo, é usado para prevenir infecções fúngicas invasivas, uma grande complicação do parto prematuro. As cefalosporinas, em particular a ceftriaxona, são conhecidas por serem um fator de risco para a hiperbilirrubinemia e pode causar lama biliar em neonatos, devido à precipitação de sais de ceftriaxona de cálcio.(17) A ceftriaxona pode deslocar bilirrubina da albumina, aumentando a toxicidade potencial da hiperbilirrubinemia não conjugada e o risco de kernicterus.

A colestase relacionada à nutrição parentérica está presente em até um quinto dos bebês que recebem esta nutrição por mais de 2 semanas. Uma maior duração da nutrição parentérica e a insuficiência intestinal são fatores de risco independentes para o desenvolvimento de colestase associada a nutrição parentérica em lactentes.(8) Assim, tem levado à consideração a redução da exposição a lipídios de soja sempre que apropriado.(8,20) Deve-se notar que a incidência de AB ou formas genéticas de colestase é a mesma em prematuros como em bebês a termo; assim, bebês prematuros justificam consideração para a mesma avaliação de CN como fazer bebês a termo. Após o ano 2000, vários estudos relataram um subconjunto emergente de pacientes colestáticos, denominados como “transitórios”, “associados à prematuridade”, “associados à NPT” ou “associados à sépsis”. O aumento desta colestase transitória pode ser explicado pelo aumento da taxa de prematuridade e sobrevida de recém-nascidos prematuros e doentes, e pelo aumento dos encaminhamentos destes para centros terciários. O diagnóstico de colestase transitória é de exclusão e as diretrizes atuais para abordagem diagnóstica não abordam totalmente esse problema.(21)

## 5. Estamos Perante Atresia Biliar?

Diferenciar em tempo útil a CN causada por uma obstrução extra-hepática de distúrbios intra-hepáticos ainda é um desafio. Do ponto de vista clínico, a CN em uma criança próspera com aparência saudável, níveis séricos de GGT aumentados e fezes acólicas de longa duração (7 dias ou mais), sugere o diagnóstico de AB. Mas isso não deve ser visto como uma regra infalível.(22)

**Tabela 2** – A primeira linha no diagnóstico diferencial entre Atresia Biliar e Causas de Colestase Neonatal Intrahepática.

### **1) Achados Sugestivos de Atresia Biliar**

- **Aspetto geral:** saudável, bom desenvolvimento e eutrófico.
- **Fezes:** Fezes acólicas (observação de 7 dias com cartão de cores das fezes).
- **Ecografia hepatobiliar:** corda triangular (triangular ou tubular, não vascularizada, densidade ecogénica na porta hepatis), vesícula biliar anormal/ausente, lúmen arterial hepático hipertrofiado no hilo, fluxo sanguíneo subcapsular.
- **Procedimentos invasivos:** biópsia hepática percutânea (padrão histopatológico obstrutivo).
- **Novas Abordagens:**
  - ELISA: Matrix Metalloproteinase 7 (MMP-7);
  - Laparoscopia abdominal: telangiectasia em aranha subcapsular com arteríolas dilatadas.
- **Excluir:**
  - Intercorrências gestacionais: colestase materna, fígado gordo agudo ou infeção;
  - Informação neonatal: Score APGAR, intercorrências clínicas (baixo peso à nascença, sépsis, anomalia intestinal ou falha, impossibilidade de alimentação enteral, uso de nutrição parenteral);
  - Lesão hepática induzida por drogas ou lesão hepática induzida por ervas;
  - Sinais sistémicos de Doença Aguda;
  - GGT normal ou diminuído;
  - Fezes com coloração normal.

### **2) Meios Complementares de Diagnóstico de primeira linha para diagnóstico diferencial da Colestase Neonatal**

- **Resultados da triagem neonatal (NBS)**
- **Testes Sanguíneos**
  - ALT, AST, GGT, AP, albumina, glucose, amónia;
  - Contagem de células sanguínea, contagem de plaquetas, reticulócitos, teste Coombs;
  - Coagulação: PT/INR, aPTT, fibrinogénio, antitrombina III;
  - Eletrólitos sanguíneos, cálcio, fosfato, magnésio;

- Lactato, piruvato, cetonas, ureia, ácido úrico, creatinina, ferritina, ferro, saturação de transferrina, creatina quinase, lipase, alfa-fetoproteína;
- Oximetria de pulso, gases sanguíneos;
- Eletroforese proteica.

• **Urina**

- Análises à urina;
- Substâncias reductoras na urina (recém-nascido com dieta normal).

• **Serologias (IgG/IgM)**

- HBV, HCV, EBV, CMV, HSV tipos 1/2, Parvovirus B19, Rubéola, VIH. Toxoplasma gondii. Ácidos nucleicos: EBV-DNA, CMV-DNA, HSV tipos 1/2 ADN.

• **Ácidos Nucleicos:** EBV-DNA, CMV-DNA, HSV tipos 1/2 ADN.

• **Culturas** (sangue, urina, lesões cutâneas e mucosas).

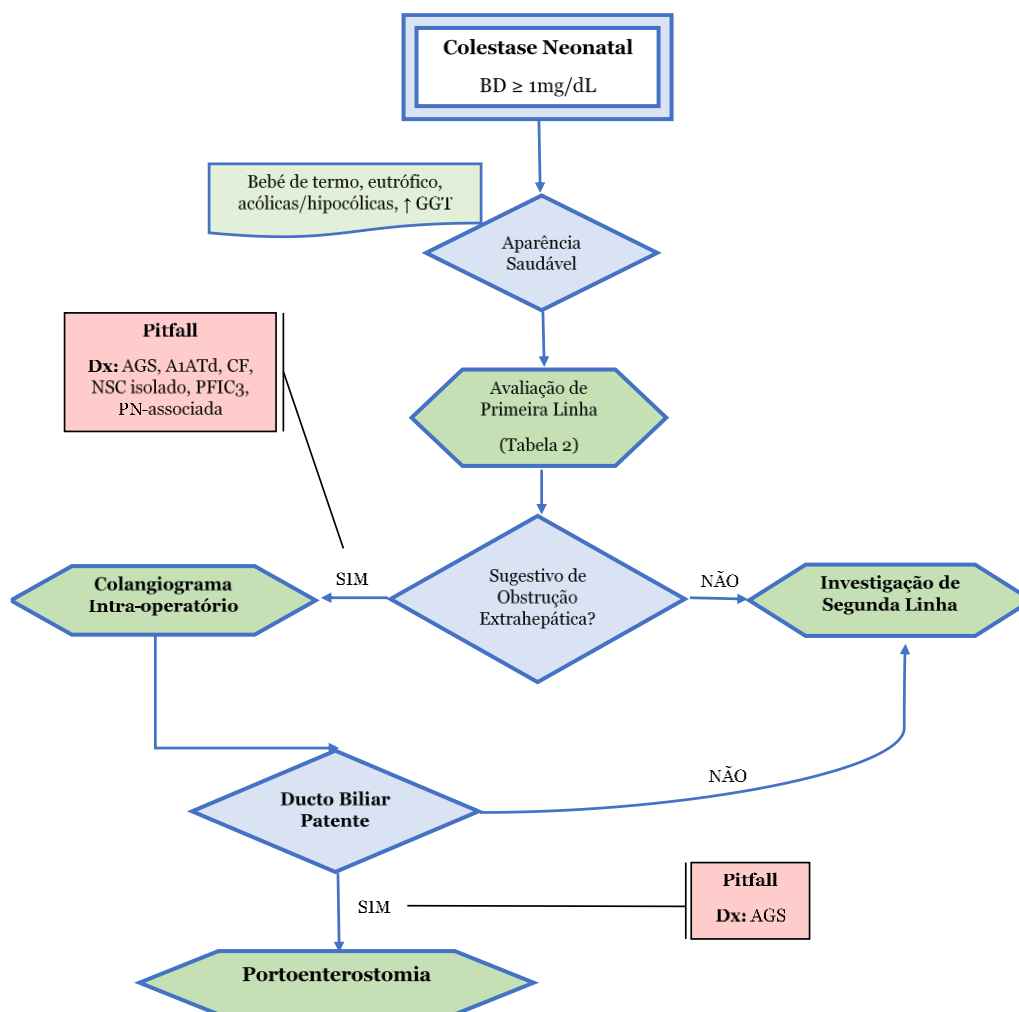
• **Ecografia** (abdominal, hepatobiliar, ecocardiograma).

• **Outros:**

- Atividade da enzima GALT e níveis de galactose-1-fosfato em eritrócitos, galactose no sangue;
- Níveis séricos de A1AT, tipagem de inibidor de protease (PI) através de focagem isoelétrica de poliacrilamida;
- Eletrólitos do suor, elastase fecal, tripsinogénio imunorreativo;
- Exame oftalmológico com fundoscopia;
- RX do Tórax e RX do Crânio;
- Procedimentos invasivos.

**Observação** - Amostra precoce de sangue para extração de ADN deve ser coletada precocemente para sequenciamento expandido de doenças suspeitas (A1ATd, Galactosemia, fibrose cística, etc).

**Referências:** 8, 34, 52, 65-66.

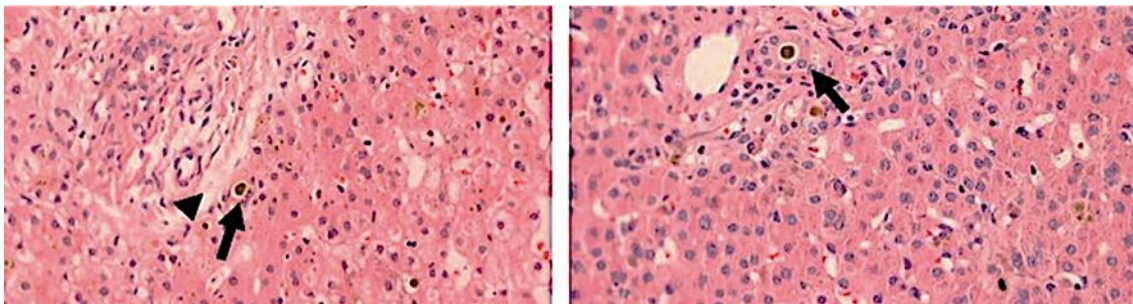


**Figura 2** - Algoritmo para investigação diferencial entre atresia biliar e doenças intra-hepáticas. Aparência saudável não sindrômica em lactente com quadro clínico-laboratorial (incluindo aumento dos níveis séricos de GGT), imagem e achados histopatológicos sugestivos de obstrução extra-hepática indicam a necessidade de realização de colangiograma operatório, embora algumas doenças intra-hepáticas possam mimetizar atresia biliar. Mesmo na colangiografia operatória permanece o risco de um teste não completamente específico para atresia biliar devido à presença de hipoplasia ductal biliar, ou outra lesão ductal obstrutiva associada à síndrome de Alagille.

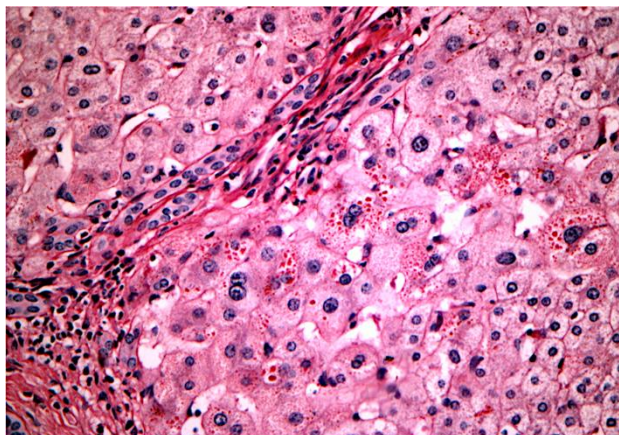
Entre os métodos utilizados para diferenciar as causas extra e intra-hepáticas da CN, a ultrassonografia abdominal costuma ser a primeira a ser realizada, pois é um exame não invasivo que descarta outras doenças extra-hepáticas e identifica o processo biliar atrético pelo sinal do “cordão triangular”.(23) No entanto, a inflamação do hilo hepático pode ocultar o sinal do “cordão triangular”, diminuindo a sensibilidade do método.(24) A ausência de vesícula biliar, forma anormal da vesícula biliar, aumento do lúmen arterial hepático e fluxo sanguíneo subcapsular são achados que aumentam a acurácia diagnóstica da ultrassonográfica para AB, mas pode ocorrer discordância entre os observadores.(25–27) A ultrassonografia pode não diferenciar entre AB e causas intra-hepáticas de colestase na infância, como AGS e outras doenças intra-hepáticas.(28–30)

A presença de hepatomegalia firme, embora sugestiva de AB, não pode ser tomada como um diagnóstico garantido desta doença.(31) Erros inatos do metabolismo envolvendo o fígado, incluindo A1ATd e fibrose quística, podem levar à hepatomegalia firme.(32,33) Além disso, está claramente demonstrado que os níveis séricos de GGT não fazem o diagnóstico de AB, uma vez que são frequentemente muito elevados na síndrome de Alagille, colangite esclerosante e em qualquer doença com envolvimento estrutural biliar extenso.(22,34,35)

A análise da biópsia hepática percutânea é uma ferramenta diagnóstica valiosa na avaliação inicial do lactente colestático, apresentando altos níveis de acurácia.(36–38) No entanto, esta tarefa apresenta três armadilhas: primeiro, o aparecimento de variáveis que indicam obstrução biliar extra-hepática é tempo-dependente e biópsias percutâneas de pacientes com AB podem não demonstrá-la precocemente (**Figura 3**); segundo, doenças intra-hepáticas, incluindo síndrome de Alagille, A1ATd, fibrose cística, colangite esclerosante neonatal isolada (gene DCDC2), PFIC3 e NC associada à nutrição parenteral podem apresentar as mesmas características obstrutivas; terceiro, as descrições de características típicas para o diagnóstico de doenças intra-hepáticas frequentemente citadas na literatura muitas vezes não são observadas no âmbito desse urgente desafio diagnóstico.(39) A escassez de ductos biliares pode surgir como um defeito primário de desenvolvimento ou por isquemia, atrofia ou mecanismos tóxicos e inflamatórios. Por outro lado, a presença de glóbulos PAS-positivos resistentes à diástase é considerada diagnóstica de A1ATd (**Figura 4**), mas essas estruturas só aparecem após a 12<sup>a</sup> semana de vida.(40)



**Figura 3** – Características histopatológicas dinâmicas no fígado de um paciente com atresia biliar. A – Paciente de 21 dias com atresia biliar (biópsia percutânea pré-operatória): ausência de reação ductular e presença de colestase canalicular (seta). Ponta de seta: placa limitadora do portal. B – Espaço portal do mesmo paciente com 30 dias de idade, em biópsia hepática em cunha obtida na laparotomia exploradora. Há uma reação ductular com a presença de tampões biliares nos neodúctulos (seta). Hematoxilina-eosina, 200x.



**Figura 4** – Glóbulos de alfa-1 antitripsina (A1AT) dentro de hepatócitos periportais em um paciente com doença hepática associada a A1AT. PAS com limpeza da diástase, 400x.

A colangiografia intraoperatória é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico de AB, mas o método pode ser enganoso em até 20% dos casos.(8,41–43) Isto porque, o bloqueio do fluxo biliar extra-hepático não ocorre exclusivamente por obstrução mecânica completa causada por AB, mas também por hipoplasia do ducto biliar extra-hepático causada pela diminuição do fluxo biliar intra-hepático como na FIG, embora a agenesia biliar extra-hepática possa estar associada à FIG.(44–46) A otimização da técnica da colangiografia por radiologistas e cirurgiões pediátricos, seja ela intraoperatória ou laparoscópica, pode aumentar a acurácia do método e evitar uma portoenterostomia desnecessária.(24,47–49)

## **5.1 Novas Abordagens para Identificação de AB**

Métodos promissores para a identificação precisa da AB têm sido propostos recentemente com base no conhecimento gerado pelas ciências básicas e estudos de imagem.

### **5.1.1 Marcadores Sanguíneos**

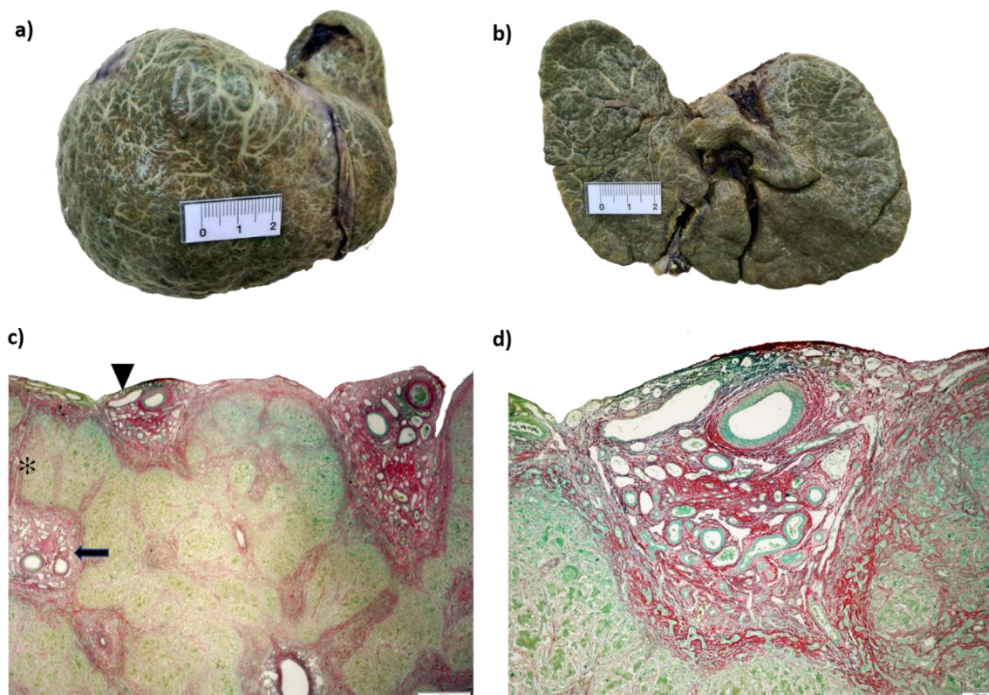
Marcadores potenciais da AB, como citocinas ligadas à patogênese da AB e outras colangiopatias, estão sob investigação.(50,51) A análise das proteínas sanguíneas no momento do diagnóstico de AB revelou níveis circulantes elevados de MMP-7 em comparação com os controles normais e colestatícos. A MMP-7 é secretada por colangiócitos normais, é enriquecida no sangue na lesão biliar e modula o fenótipo clínico no modelo experimental de AB. A avaliação dos níveis séricos de MMP-7 parece ser um

método preciso para o diagnóstico de AB, mas estudos populacionais em larga escala dessa abordagem não invasiva ainda são necessários.(52–55)

### 5.1.2 Anomalias Vasculares Arteriais

Uma nova área de investigação no diagnóstico da AB vem dos estudos microanatômicos das alterações vasculares arteriais observadas nesta doença. No fígado de pacientes com AB, há um padrão proliferativo de arteríolas e artérias, apresentando camadas musculares proeminentes, em tratos portais, septos fibrosos e região subcapsular.(56) Tal padrão vascular arterial alterado também foi claramente evidenciado por um estudo arteriográfico, que evidenciou especificamente em pacientes com AB no momento da portoenterostomia, irregularidades no contorno dos ramos da artéria hepática periférica intra-hepática, incluindo encapsulamento, estenoses, dilatação e angulação, e imagens sugestivas de oclusão periférica. O rubor vascular "semelhante a tufo" circunda os segmentos arteriais periféricos irregulares ou ocluídos.(57) Eventualmente, vários grupos de pesquisadores observaram achados de imagem de aumento do diâmetro luminal da artéria hepática no hilo hepático e vascularização subcapsular especificamente em pacientes com AB, servindo assim para o diagnóstico diferencial entre AB e casos de colestase intra-hepática.(26,34,58–63)

Recentemente, estudos laparoscópicos realizados antes da portoenterostomia confirmaram que a vascularização subcapsular observada na AB é causada por telangiectasias em aranha com vasos arteriais apresentando dilatação luminal. Alta acurácia para o diagnóstico de AB foi obtida com este método.(64,65) Estes achados, no entanto, precisam ser reproduzidos por outros grupos, e o mecanismo dessa proliferação e hiperplasia arteriolar deve ser investigado (**Figura 5**).



**Figura 5** - Aglomerados vasculares subcapsulares com características de telangiectasias no explante de paciente com atresia biliar – imagens macroanatómicas: a- telangiectasias subcapsulares na face diafragmática do explante hepático; b- telangiectasias subcapsulares na face visceral do explante hepático; imagens microanatómicas: c- aglomerados vasculares subcapsulares com continuação através de septos fibrovasculares (asterisco) até um trato portal apresentando (seta) características vasculares semelhantes (ampliação 100x); d- detalhe do aglomerado vascular subcapsular apresentado na figura 1c (ponta de seta): observe a hiperplasia de vasos arteriolas/arteriolas com camadas mediais proeminentes, veias e vasos linfáticos acumulados no estroma fibroso subcapsular. Fotografias: Departamento de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

### 5.1.3 Os Estudos Genéticos são Úteis para Diferenciar a AB de Causas Intra-hepáticas de AB?

Nas rotinas de diagnóstico atuais, permanece o risco de um diagnóstico errado de AB, implicando uma portoenterostomia desnecessária. As doenças intra-hepáticas que podem ser confundidas com a AB muitas vezes podem ser distinguidas, mas nem sempre. Por vezes, os exames laboratoriais são o método padrão-ouro, como os eletrólitos do suor e/ou a determinação de elastase fecal ou tripsina imunorreativa para fibrose quística.(66) Relativamente à A1ATd, os níveis séricos de  $\alpha$ 1AT podem ser avaliados e, se diminuídos, a variante deficiente da proteína A1AT pode ser identificada pelo inibidor de protease através de focalização isoelétrica de poliacrilamida (alelos PI-M, PI-S, PI-Z).(66,67) No entanto, A1AT é um reagente de fase aguda e resultados enganosos dos níveis séricos de A1AT ocorrem na presença de inflamação sistêmica.(8) A síndrome de Alagille pode apresentar características sindrômicas, mas algumas vezes essas características estão ausentes na investigação da CN, dificultando a sua identificação com

os métodos rotineiramente utilizados. A colangite esclerosante neonatal isolada é uma doença rara que pode ser confundida com a AB e, embora a PFIC3 comece mais tarde na infância, também merece consideração.

Uma primeira abordagem para excluir algumas dessas doenças confundíveis é incluir exames que as diagnosticam na primeira linha de avaliação da CN (**Tabela 2**, Ecocardiograma e Outros). Um TGS para JAG1, NOTCH2 (síndrome de Alagille), SERPINA 1 (A1ATd), DCDC2 (colangite esclerosante neonatal isolada) e ABCB4 (PFIC3) pode ser usado para excluir essas doenças intra-hepáticas e evitar erros de diagnóstico na primeira etapa da investigação? A primeira dificuldade em usar o TGS para este fim é o tempo de resposta atualmente necessário para obter os resultados. Com relação apenas a um TGS para doenças monogénicas, centros experientes podem ter os dados analisados adequadamente após pelo menos 10 dias. No entanto, na investigação da CN em todo o mundo, os resultados ficam disponíveis após trinta ou até noventa dias. Isso é muito longo para a primeira etapa da investigação da CN, como para as decisões envolvendo CN associada à insuficiência hepática fulminante. Atualmente, a decisão de realizar uma portoenterostomia não pode depender de análise genética, uma vez que variantes patogénicas, mesmo aquelas associadas à síndrome de Alagille ou A1ATd, ocorrem em pacientes com AB. No caso de A1ATd, a variante patogénica observada do gene SERPINA1 pode ser a verdadeira causa da CN ou pode ser um achado coincidente que pode estar a agir como um gene influenciador.(68,69) Em suma, o NGS não é atualmente apropriado para a primeira etapa da investigação do NC.

## **5.2 Qual é o Distúrbio Colestático Neonatal Presente?**

Após excluir a obstrução extra-hepática cirurgicamente corrigível, o próximo passo é a diferenciação dos distúrbios intra-hepáticos, sejam atualmente tratáveis ou não. Para causas intra-hepáticas tratáveis de CN, incluindo infeção, galactosemia, tirosinemia tipo 1, intolerância hereditária à frutose, hipotireoidismo, fibrose cística, hipopituitarismo e defeitos na síntese de ácidos biliares, a terapêutica oportuna pode salvar vidas ou pelo menos reduzir os efeitos nocivos do distúrbio infeccioso ou metabólico.(8,70–72)

Cerca de 25% a 50% dos casos de CN representam doenças monogénicas com herança autossômica recessiva causadas por mutações homozigóticas ou duplas heterozigotas,

exceto a síndrome de Alagille.(71) O uso da NGS trouxe uma nova era nesta etapa específica da avaliação da CN, constituindo um novo paradigma para a obtenção do diagnóstico e escolha do tratamento.(11,70–72) Em crianças com suspeita de doenças genéticas, a utilidade diagnóstica e clínica da NGS mostra melhores resultados do que o estudo de microarranjo cromossômico, principalmente quando feito em base hospitalar e avaliando trios. (73) No entanto, o uso intempestivo de testes genéticos ou sem seleção adequada de pacientes pode levar a informações não interpretáveis, complicando o diagnóstico. A investigação clínico-laboratorial do paciente com CN deve servir de base para a investigação diferencial, incluindo as informações do método NGS. A suspeita clínica deve direcionar a investigação em termos de EGS ou TGS em associação com análises moleculares, histopatológicas e de imagem confirmatórias, conforme necessário. Atualmente, em muitos centros, o tempo de resposta para obtenção dos resultados da NGS pode ultrapassar o desejável em termos de agilidade e precisão para o melhor tratamento possível.(74)

Um desafio importante é a integração precisa dos dados genéticos com o quadro clínico real por meio da análise bioinformática e essa dificuldade aumenta com o número de genes em avaliação.(74) A predição da variante patogénica é um desafio no cenário clínico. Uma variante com significado incerto (VUS) representa um diagnóstico suspenso em situações clínicas que podem exigir manejo preciso e rápido. No caso de variantes altamente suspeitas, o aprofundamento da avaliação da doença com reavaliação clínica, análises bioquímicas, de imagens histopatológicas, transcriptômicas e de proteínas pode-se tornar obrigatória. De fato, cerca de 30% dos pacientes que apresentam características semelhantes a PFICs não têm mutações identificadas dos genes conhecidos associados a PFICs.(75) O papel das variantes patogénicas heterozigóticas no desenvolvimento da CN dá origem a dificuldades adicionais na interpretação correta da NGS.(76) Na avaliação de um caso suspeito de síndrome de Alagille um teste de NGS não diagnóstico, dada a penetrância variável e a expressão clínica deste distúrbio autossômico dominante, testes genéticos adicionais devem ser feitos para identificar rearranjos estruturais, como variações no número de cópias de regiões do ADN.(71)

### 5.3 Investigação Clínico-laboratorial em Criança com Aparência de Doença Aguda

A investigação clínico-laboratorial é a principal abordagem para o tratamento da emergência de um lactente com CN com aparência doente. Muitos recém-nascidos com CN com doença aguda sofrem de distúrbios tratáveis e o diagnóstico oportuno é uma tarefa crucial para evitar insuficiência hepática aguda. A insuficiência hepática aguda é diagnosticada na presença de aumento acentuado dos níveis séricos de bilirrubina direta, aminotransferases em rápido aumento, coagulopatia não responsiva à vitamina K (INR  $\geq 1,5$ , ou mesmo sem encefalopatia se INR  $\geq 2$ ), além de hipoglicemia e amónia sérica aumentada.(77) A partir dos 28 dias de vida, pode-se suspeitar de encefalopatia se forem evidente irritabilidade, crises de choro e alterações no ritmo do sono.(78)

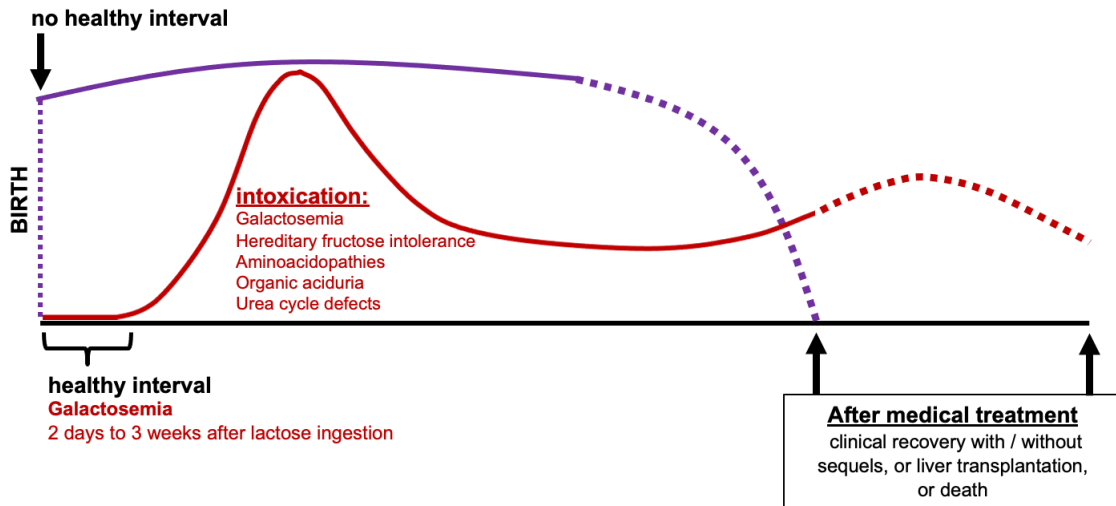
A aparência doente é uma emergência, causada por diversos distúrbios, muitos deles incluídos no grupo dos EIM. Os EIM são herdados principalmente de maneira autossômica recessiva e resultam da atividade deficiente de uma única enzima em uma via metabólica. Eles geralmente são um diagnóstico diferencial de sépsis, encefalopatia ou condições comuns persistentes, como infeção. A CN é uma manifestação comum de EIM com ou sem envolvimento renal.(32) Sépsis bacteriana ou viral são importantes diagnósticos diferenciais de EIM. No caso de infeção, o quadro clínico comumente inicia-se ao nascimento, enquanto no EIM caracterizado por intoxicação metabólica, como galactosemia, intolerância hereditária à frutose, distúrbios do metabolismo de aminoácidos, acidúrias orgânicas e defeitos do ciclo da ureia, há um intervalo saudável de o tempo de exposição ao agente insultante até o início do quadro clínico (**Figura 6**).(78)

Na Galactosemia, o intervalo saudável pode ser tão curto quanto 48 horas ou até 3 semanas. Testes NBS para EIM podem salvar vidas: um bebé que parece doente e apresenta na triagem neonatal níveis séricos de galactose total elevados devemos suspeitar de Galactosemia Clássica (**Tabela 3**).(79) Por outro lado, em um recém-nascido com má aparência ao nascer, apresentando sinais clínicos adicionais, como baixo peso ao nascer, microcefalia, coriorretinite ou púrpura, uma infeção viral deve ser fortemente suspeitada. As serologias e as culturas (**Tabela 2**) devem ser colhidas, mas se houver suspeita de infeção pelo vírus do herpes, doença precoce fatal e curável, o tratamento empírico deve ser iniciado antes dos resultados dos exames. Sífilis, Rubéola

e Toxoplasmose são agentes adicionais que se apresentam nos primeiros dias de vida e levam à CN com coagulopatia associada e restrição de crescimento.(8)

**Sepsis – collect serology and cultures. Treat herpesvirus empirically.**  
viral: low birth weight, microcephaly, chorioretinitis, purpura.

**Neonatal hemochromatosis (?) – intravenous immunoglobulin (1<sup>st</sup> dose)**



**Figura 6** – Comparação do comportamento clínico inicial das intoxicações metabólicas e outras hepatopatias neonatais graves – medidas preventivas. (Baseado na referência Hoffmann GF, Engelmann G. Liver Disease. In: Hoffmann GF, Zschocke J, Nyhan WL. (eds). Inherited Metabolic Diseases – A Clinical Approach. Springer-Verlag: Berlin. 2017. DOI:10.1007/978-3-662-49410-3)

Se uma criança parecer doente nos primeiros dias ou semanas de vida, devemos suspeitar de Galactosemia Clássica, mesmo sem nível de galactose total elevado acentuado. Na Galactosemia Clássica, há má alimentação, vômitos, hipoglicemia, diarreia, letargia/coma, hipotonia, abaulamento da fontanela anterior, hepatomegalia, icterícia (indireta e CN), diástese hemorrágica, acidose metabólica, sépsis por gram negativo (*Escherichia coli*) e encefalopatia, com alto risco de morte se não tratada. A ressonância magnética do cérebro mostra alterações causadas por edema citotóxico e acumulação cerebral de galactitol. A nível laboratorial mostra atividade da galactose-1-fosfato uridil transferase (GALT) marcadamente diminuída ou indetetável nos glóbulos vermelhos e níveis aumentados de galactose no plasma, galactose-1-fosfato eritrocitário e galactitol no plasma e na urina.(78) A positividade da NBS para Galactosemia não implica Galactosemia Clássica. A “Galactosemia Variante Clínica” (variante GALT S135L/S135L) apresenta um fenótipo diferente no período neonatal, com distúrbios do crescimento, doença hepática e cataratas.(80)

A Tirosinemia tipo 1 é uma doença de hereditária autossômica recessiva caracterizada pela falta de atividade da FAH, levando a acumulação de tirosina no sangue, succinil

acetoacetato e succinilacetona. Em lactentes, pode apresentar-se como um distúrbio colestatóico infantil associado a insuficiência hepática aguda, disfunção tubular renal, raquitismo hipofosfatémico, alterações do crescimento e crises neurológicas, sendo responsável por mortalidade precoce elevada. Mais tarde na infância, pode se manifestar como cirrose ou carcinoma hepatocelular. NST ideal para Tirosinemia tipo 1 pode salvar vidas.(81,82) O diagnóstico de Tirosinemia em lactentes é sugerido pela CN associada à insuficiência hepática aguda iminente ou evidente, e aumento ligeiro dos níveis séricos de  $\alpha$ -fetoproteína em face de aminotransferases. A disfunção renal leva à glicosúria, fosfatúria, proteinúria e aminoacidúria.(83,84) Um pequeno número de lactentes, principalmente os prematuros e aqueles que têm uma dieta rica em proteínas, apresentam Tirosinemia transitória nas primeiras 2 semanas de vida. Os níveis plasmáticos de tirosina podem estar acentuadamente aumentados e os pacientes podem apresentar letargia, má alimentação e atividade motora diminuída, embora a maioria seja assintomática e identificada por meio de NBS.(85)

A Intolerância Hereditária à Frutose é causada por uma deficiência da enzima aldolase B (gene ALDOB) resultando na acumulação do metabólito tóxico frutose-1-fosfato e na depleção das moléculas de fosfato indispensáveis à reposição do ATP<sub>101</sub> hepático. Os bebês afetados que ingerem frutose desenvolvem CN associada a um quadro clínico grave e agudo, incluindo náuseas, vômitos, dor abdominal, distensão, ascite e hepatomegalia. Os achados laboratoriais incluem hipoglicemia, acidemia láctica, hipofosfatemia, hiperuricemia, hipermagnesemia e hiperalaninemia. Eventualmente, os pacientes desenvolverão restrição de crescimento e distúrbios no crescimento. A frutose está na maioria dos medicamentos orais, incluindo vacinas, muitas fórmulas e chupetas às vezes são mergulhadas em açúcar para acalmar os bebês. A implementação da restrição dietética completa das moléculas agressoras no início da vida com adesão mantida pode resultar em um bom prognóstico, caso contrário, ocorre insuficiência hepática e renal.(86–88)

A GALD é atualmente reconhecida como a causa de quase todos os casos de hemocromatose neonatal e representa uma das principais causas de insuficiência hepática aguda. A Hemocromatose neonatal é a condição clínica na qual a doença hepática grave no período neonatal é acompanhada de siderose extra-hepática semelhante à Hemocromatose Hereditária. GALD é o processo causal da lesão hepática fetal.(89) Na GALD, os anticorpos IgG de uma mãe sensibilizada a antígenos derivados do feto são direcionados especificamente contra os hepatócitos fetais, desencadeando a resposta imune inata. Os lactentes apresentam, além de hiperbilirrubinemia acentuada,

incluindo porções conjugadas e não conjugadas, hipoglicemia, coagulopatia, hipoalbuminemia e edema. Pode ocorrer insuficiência renal e oligúria. A avaliação laboratorial mostra um pequeno aumento de aminotransferases, níveis séricos muito elevados de a-fetoproteína, altos níveis de ferritina, baixos níveis de transferrina e alta saturação de ferro. O tratamento com uma combinação de exsanguíneo-transfusão de duplo volume para remover os anticorpos reativos existentes seguido imediatamente pela administração de altas doses de imunoglobulina intravenosa para bloquear a ativação do complemento induzida por anticorpos leva a altas taxas de sobrevida sem transplante de fígado. O uso de uma dose de imunoglobulina intravenosa para qualquer lactente com insuficiência hepática é recomendado se a Hemocromatose Neonatal for a principal suspeita de diagnóstico (**Figura 6**). O diagnóstico pode ser confirmado através de biópsia da mucosa bucal (glândula salivar menor), fígado, pele e/ou músculo para detecção de deposição de ferro, bem como Ressonância Magnética em outros órgãos com a mesma finalidade.(90) Se a Hemocromatose Neonatal for confirmada, uma exsanguíneo-transfusão deve ser realizada seguida pela administração de uma segunda dose de imunoglobulina intravenosa.(90,91) Dado o alto risco de recorrência de Hemocromatose Neonatal na próxima gestação, com elevada frequência de óbito, justifica-se o uso preventivo de imunoglobulina intravenosa à mãe.(92)

#### **5.4 Abordagem Integrativa da Investigação Clínico-laboratorial, Molecular, Histopatológica e Genética para o Diagnóstico da CN**

Centros de referência em Hepatologia Pediátrica de todo o mundo possuem diversas experiências na investigação da CN, muitas vezes apoiados por Serviços de Genética Clínica e Cirurgia Pediátrica, equipados com laboratórios especializados para exames bioquímicos enzimáticos complexos e bem preparados para procedimentos invasivos como a biópsia hepática percutânea que é bastante segura em bebês.(93)

O paradigma da investigação clínica em que “as hipóteses surgem de dados clínicos e bioquímicos e levam à confirmação genética” não deve ser substituído, mas complementado por aquele em que o algoritmo diagnóstico parte da triagem genética. Isso é verdade, pelo menos atualmente, dadas as armadilhas inerentes ao NGS e as complexidades do CN.(71,72) A utilização da NGS não é imperativa, nem mesmo viável, em situações como a primeira abordagem de intoxicações metabólicas, caracterizadas

por insuficiência hepática aguda e cujo diagnóstico pode ser feito adequadamente com exames laboratoriais metabólicos. No caso da Galactosemia, no entanto, a TGS é uma opção valiosa no diagnóstico diferencial entre “Galactosemia Variante Clínica” e Galactosemia Clássica, com implicações prognósticas.(80) Em relação à A1ATd, uma das causas mais frequentes de CN, o diagnóstico é feito de forma eficiente por meio da avaliação dos níveis séricos de  $\alpha$ 1AT, que, se diminuídos, indica o uso de tipagem de IP por meio de focalização isoelétrica de poliacrilamida ou genotipagem (PI-M, PI -S, alelos PI-Z).(66,67,71)

A Fibrose Quística, embora não seja uma causa frequente de CN, dá origem a importantes implicações prognósticas para os pacientes afetados devido às suas consequências com risco de vida.(94) O teste padrão-ouro da fibrose quística é uma avaliação dos eletrólitos do suor que pode ser complementada com medição da elastase fecal, tripsinogénio imunorreativo e excreção de gordura fecal para avaliação da função pancreática.(95)

A **Tabela 3.h** é baseado em Nicastro E & D'Antiga L (2018) e Nicastro E, et al. (2019). A NGS é certamente o principal teste de triagem para investigação de CN associada a níveis séricos de GGT normais ou diminuídos. Nesse contexto, pacientes com concentração plasmática aumentada de ácidos biliares devem ser avaliados por TGS para PFICs, deficiência de transaldolase e hipercolanemia familiar. No caso de pacientes com baixo GGT e concentração reduzida de ácidos biliares no plasma, a TGS é útil na identificação de defeitos específicos da síntese primária de ácidos biliares (**Tabela 3.h.2**). No entanto, recomenda-se uma avaliação confirmatória de intermediários de ácidos biliares e ácidos biliares anómalos na urina por meio de espectrometria de massa.(71,72) A **Tabela 3.h.3** apresenta um painel sugerido de doenças que levam à CN com níveis séricos de GGT aumentados. Nesse grupo de doenças, o método NGS tem um papel importante na identificação das variantes patogénicas responsáveis.

Algumas das doenças genéticas apresentadas na **Tabela 3.h** são alterações clínicas complexas com fenótipos compostos, envolvendo a necessidade de WES, CES, ou mesmo WGS, numa avaliação a três tempos que necessita de uma íntima cooperação entre o geneticista, a bioinformática e equipas clínicas com elevada experiência na investigação genética da CN.(71) Além da NGS, é fundamental integrar os achados clínico-laboratoriais, moleculares e, quando indicado, histopatológicos. Os estudos NGS apresentam a vantagem de identificar a base genética de doenças causais e, de um ponto de vista prospetivo, levar ao desenvolvimento de novas abordagens de terapia

genética.(96) Por outro lado, a presença de CN associada a um quadro clínico agudo grave ao nascimento ou nos primeiros dias de vida, com características de insuficiência hepática aguda (**Tabela 3.a**), constitui um desafio em qualquer algoritmo de investigação e muitos pacientes são transplantado sem diagnóstico. Conforme discutido anteriormente, uma adequada investigação clínica seguida de exames laboratoriais realizados em caráter urgente pode levar ao diagnóstico e oferecer tratamento adequado para uma proporção razoável de pacientes. Extensa informação útil para investigação clínico-laboratorial pode ser encontrada em Götze T, et al (2015). O desenvolvimento de projetos para diminuir o tempo de resposta da TGS para menos de 7 dias na situação de RN com CN em unidade de terapia intensiva poderia otimizar o diagnóstico, tratamento e prognóstico.

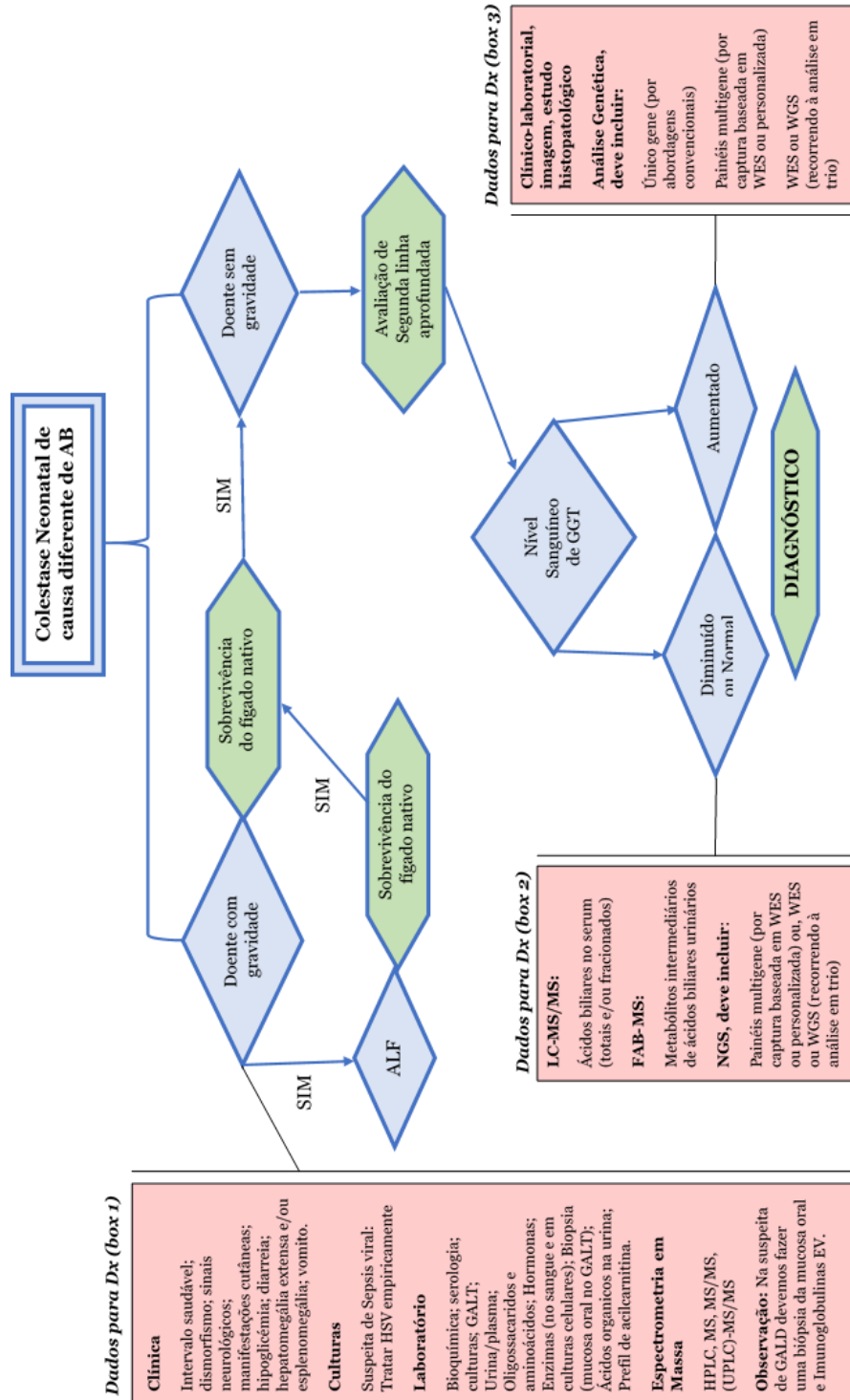
**Tabela 3-** Dados clínico-laboratoriais sugestivos de doenças diagnósticas específicas ou grupos de doenças

<p><b>3.a Doente agudo</b></p> <p>Infeção (suspeição de herpesvirus: tratar empiricamente);</p> <p>Hemocromatose neonatal (maioria dos casos de doença hepática gestacional aloimmune)</p> <p>Linfocitose hemofagocítica</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Intervalo saudável:</b> Galactosemia, Intolerância hereditária à frutose, tirosinemia tipo 1, distúrbios do metabolismo de aminoácidos, acidúria orgânica, defeitos do ciclo da ureia</li> <li>● <b>Presente ao nascimento/primeiro dia de vida</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Tolerância reduzida ao jejum: defeitos de oxidação de ácidos gordos, distúrbios da citogénese</li> <li>○ Metabolismo alterado de moléculas complexas: Doença de armazenamento lisossomal, distúrbios dos peroxissomas, distúrbios congénitos da glicosilação</li> <li>○ Distúrbios do metabolismo da energia: <ul style="list-style-type: none"> <li>● Distúrbios mitocondriais: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Distúrbios da cadeia respiratória</li> <li>▪ Distúrbios do ciclo da ureia (deficiência de OTC, deficiência de citrina)</li> <li>▪ Defeitos de oxidação de ácidos graxos (deficiência de MCAD, deficiência de LCHAD, deficiência de ornitina carbamoiltransferase) - envolvimento neurológico/sistémico com acidose láctica.</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> <p><b>Colestase + Insuficiência hepática aguda</b> - ↑↑↑ BD, rápido ↑ das aminotransferases, coagulopatia (INR ≥ 1.5) * não responsivo a vitamina K. Em bebês com mais de 28 dias: encefalopatia</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● ou INR ≥ 2, mesmo sem encefalopatia</li> <li>● Além disso, hipoglicemia e ↑ níveis séricos de amônia</li> </ul>
<p><b>3.b SINAIS CLÍNICOS SUGESTIVOS DE CAUSAS ESPECÍFICAS DE COLESTASE NEONATAL</b></p>

<p><b>Hipoglicémia</b>                  Infecção, insuficiência hepática aguda, galactosemia, tirosinemia tipo 1, intolerância hereditária à frutose, distúrbios do metabolismo de aminoácidos (incluindo tirosinemia tipo 1), distúrbios mitocondriais, distúrbio congênito da glicosilação 1B, panhipopituitarismo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ corpos cetônicos - defeitos de oxidação de ácidos graxos, síndrome de depleção mitocondrial</li> </ul>
<p><b>Sépsis</b>- colestase secundária à sepse; Gram- (E. coli), recorrente ou prolongada: Galactosemia.</p>
<p><b>Asfixia de causa desconhecida ou desconforto respiratório súbito imediatamente após o nascimento</b> – Doença mitocondrial</p>
<p><b>Diarreia</b>  <b>Aquosa</b>- Infecção, PFIC1, Fibrose Quística, Galactosemia, Tirosinemia tipo 1, Insuficiência Hepática Aguda  <b>Crônica com esteatorreia</b>- Defeitos primários de síntese de ácidos biliares, defeitos congênitos de glicosilação <b>MYO5B</b> (fenótipo misto: diarreia intratável e colestase)</p>
<p><b>Vômitos</b>                  Galactosemia, Tirosinemia tipo 1, Distúrbio congênito da glicosilação 1b, insuficiência hepática aguda</p>
<p><b>Hemorragia gastrointestinal na apresentação de colestase neonatal</b>                  Tirosinemia tipo 1, Defeito primário de síntese de ácidos biliares (tipo 1), insuficiência hepática aguda</p>
<p><b>Hepatomegalia de alto grau</b>                  Defeitos primários de síntese de ácidos biliares                  Tirosinemia tipo 1  <b>Doenças hepáticas de armazenamento</b> - Distúrbios congênitos da glicosilação, distúrbios de armazenamento de glicogênio, defeitos primários da síntese de ácidos biliares, síndrome de Wolman, doença de Niemann-Pick (NPC), doença de Gaucher tipo II, doença de Farber tipo IV  <b>Associada a esplenomegália:</b> Linfocitose hemofagocítica, anemia diseritropoiética congênita tipo 1</p>
<p><b>3.c Dismorfismos</b>                  Distúrbios cromossômicos - trissomias (18 e 21)                  Síndromes genéticas: Alagille, ARC, Aagenaes, Smith-Lemli-Opitz                  Distúrbios congênitos da glicosilação                  Distúrbios de armazenamento lisossomal                  Distúrbios mitocondriais (não na síndrome de Gracile)                  Distúrbios dos peroxissomas – distúrbios do espectro de Zellweger                  Acidemia orgânica - Acidemia glutárica tipo II</p>
<p><b>3.d Manifestações cutâneas</b>  <b>Síndrome de NISCH</b> - ictiose, alopecia e hipotricose  <b>Linfocitose hemofagocítica</b> - eritrodermia, máculas purpúricas, erupções morbiliformes.</p>
<p><b>3.e ODORES DISTINTOS</b>                  Doença da urina do xarope de maple (xarope de maple);                  Acidemia isovalérica ou acidemia glutárica tipo II (pés suados);                  Tirosinemia tipo I (manteiga rançosa)</p>
<p><b>3.f SINAIS NEUROLÓGICOS (convulsões, vômitos, choro fraco, apneia recorrente, irritabilidade, letargia, hipotonia)</b> - Infecção; pós-asfixia; Distúrbios dos peroxissomas; Distúrbios mitocondriais; Doenças de depósito lisossômico</p>
<p><b>3.g RESULTADOS LABORATORIAIS SUGESTIVOS DE CAUSAS ESPECÍFICAS DE COLESTASE NEONATAL – considerar TGS específico</b></p>

<p><b>Sangue</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Níveis séricos de GGT, níveis de ácidos biliares (consulte Testes genéticos direcionados abaixo)</b></li> </ul> <p>↓ <b>colesterol sérico</b>- síndrome de Smith-Lemli Opitz, PFIC 1 e PFIC 2, distúrbios dos peroxissomas, insuficiência hepática aguda</p> <p>↑↑↑ <b>amônia</b>: distúrbios do ciclo da ureia</p> <p>↑ <b>CK</b>: distúrbios mitocondriais, defeitos de oxidação de ácidos gordos</p> <p>↑ <b>α -fetoproteína</b>: tirosinemia tipo 1, doença hepática aloimune gestacional (100.000–600.000 ng/mL), deficiência de citrina</p> <p>↑ <b>ácido úrico</b>: defeitos de oxidação de ácidos gordos, distúrbios mitocondriais</p> <p>↑ <b>ferritina</b>: doença hepática aloimune gestacional (↑↑↑), distúrbios mitocondriais, linfocitose hemofagocítica</p> <p>↓ <b>transferrina</b>: defeito congênito da glicosilação 1b, doença hepática aloimune gestacional, distúrbios mitocondriais</p> <p>↑ <b>transferrina deficiente em carboidratos (CDT, por focalização isoeletrica)</b>: galactosemia, intolerância hereditária à frutose</p> <p>↑ <b>enzimas lisossômicas plasmáticas (aspartilglicosaminidase)</b>: galactosemia, intolerância hereditária à frutose, distúrbios congênitos da glicosilação.</p> <p>↑ <b>citulina</b> – deficiência de citrina</p> <p>↑ <b>lactato</b>: distúrbios mitocondriais (↑ lactato/piruvato), defeitos de oxidação de ácidos gordos</p> <p>↑ <b>cobre</b>: distúrbios dos peroxissomas</p> <p>↓ <b>sódio</b>, ↑ <b>potássio</b>: insuficiência adrenal (panhipopituitarismo)</p> <p>↓ <b>α-2-globulina (proteínas do sangue)</b>: deficiência de α-1-AT</p> <p><b>citopenia</b>: doença de Gaucher e Niemann-Pick tipo C, linfocitose hemofagocítica</p>
<p><b>Urina</b></p> <p><b>Síndrome de Fanconi (↑ glicosúria apesar dos níveis séricos normais, fosfato, aminoácidos)</b>: tirosinemia tipo 1, intolerância hereditária à frutose, distúrbios mitocondriais, drogas.</p>
<p><b>3.h TESTES GENÉTICOS DIRECIONADOS (com classificação baseada em testes laboratoriais) – Referências 87-89.</b></p>
<p><b>3.h.1 Normal ou diminuída GGT</b></p>
<p><b>Com ↑ sais biliares (plasma)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PFIC 1, BRIC1 - Proteína: FIC1; Gene: ATP8B1</li> <li>• PFIC 2, BRIC2 - Proteína: BSEP; Gene: ABCB11</li> <li>• TJP2 - Proteína: TJP2; Gene- TJP2</li> <li>• NR1H4- – Proteína: FXR; Gene: NR1H4</li> <li>• Miosina VB – Proteína: Miosina VB; Gene: MYO5B</li> <li>• Deficiência de transaldolase (TALDOD) – Proteína: TALDO; Gene: TALDO1</li> <li>• Hipercolanemia familiar, defeito de conjugação (BAAT)- Proteína: BAAT; Gene: BAAT</li> </ul>
<p><b>Sem aumento de sais biliares (plasma)</b></p> <p><b>Defeitos da síntese primária de ácidos biliares:</b></p> <p><u>IMPORTANTE: É indicada avaliação confirmatória dos níveis de intermediários de ácidos biliares e ácidos biliares anômalos por meio de espectrometria de massa na urina.</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Deficiência de 3β-hidroxi-Δ<sup>5</sup>-C<sup>27</sup>-esteróide oxidorreductase (HSD3B7);</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>● Deficiência de oxosteróide 5β-redutase (AKR1D1);</li> <li>● Deficiência de esterol 27-hidroxilase;</li> <li>● Xantomatose cerebrotendinosa (CYP27A1); Deficiência de Oxisterol 7α-hidroxilase (CYP7B1);</li> <li>● Deficiência de 2-Metilacil-CoA racemase (AMACR)</li> </ul>
<p><b>3.h.2 Colestase neonatal, com aumento dos níveis séricos de GGT, com AB excluída</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Síndrome de Alagille (JAG1; NOTCH2)</li> <li>● A1ATd (SERPINA 1)</li> <li>● PFIC3 (ABCB4)</li> <li>● Fibrose quística (CFTR)</li> <li>● Síndrome NISCH (CLDN1)</li> <li>● Colangite esclerosante neonatal isolada (DCDC2)</li> <li>● Défice de citrina (SLC25A13)</li> <li>● ARC (VPS33B; VIPAR)</li> <li>● Défice de transaldolase (TALDO1)</li> <li>● Niemann-Pick C (NPC1, NPC2)</li> <li>● Doença de Gaucher (GBA)</li> <li>● Síndrome de Wolman (LIPA)</li> <li>● Doença de Farber (ASAH1)</li> <li>● Doença de armazenamento de glicogénio IV (GBE1)</li> <li>● Galactosemia (GALT),</li> <li>● Intolerância hereditária à frutose (ALDOB),</li> <li>● Tirosinemia tipo 1 (FAH).</li> <li>● Défice de MCAD (ACADM)</li> <li>● Sitosterolemia (ABCG5)</li> <li>● Defeitos do ciclo da ureia (neonatal) - deficiência de citrinos (SLC25A13)</li> <li>● Deficiência do Complexo III mitocondrial (BCS1L)</li> <li>● Síndrome da displasia renal-hepática-pancreática (síndrome de Ivemark) (NPHP3)</li> <li>● Transtorno do espectro de Zellweger (genes PEX)</li> <li>● Defeitos congénitos de glicosilação (ATP6AP1, CCDC115, SLC37A4, MPI, PMM2, PGM1, ALG1, ALG3, ALG6, ALG8, ALG13, ATP6AP2, COG1, COG4 COG5, COG6, COG7)</li> </ul> <p>O sequenciamento de exão completa (<i>WES</i>) é indicado em diagnósticos incertos/complexos aparentemente hereditários sem diagnóstico específico disponível. Neste caso, recomenda-se a integração entre as equipas de geneticista clínica e laboratorial, e a análise em trio.</p>
<p><b>Referências</b> – 30, 87-89</p>



**Figura 7** - Algoritmo para diagnóstico diferencial de doenças colestáticas intra-hepáticas neonatais. Uma criança colestática pode apresentar-se não agudamente doente ou agudamente doente. Nesta última situação, é crucial identificar a insuficiência hepática aguda (FHA). Clínica, laboratorial e até mesmo uma biópsia oral segura podem ser usadas para fazer o diagnóstico e permitir um tratamento oportuno (caixa 1). Se o paciente se recuperar com seu próprio fígado, a investigação de segunda linha pode prosseguir. Níveis séricos de GGT normais ou diminuídos associados à avaliação de ácidos biliares no plasma e na urina indicam o uso de NGS e confirmam os resultados de NGS (caixa 2). Níveis séricos de GGT aumentados (quadro 3) indicam a necessidade de uma abordagem integrativa de investigação clínico-laboratorial, molecular, histopatológica e genética para o diagnóstico do paciente. Em situações de distúrbios complexos, é indicado o uso de sequenciamento de exoma inteiro em vez de um painel de genes de sequenciamento de genoma direcionado e análise trio (caixas 2 e 3).

## **5.5 O Papel da Investigação Histopatológica na Diferenciação da CN Intra-hepática**

Atualmente, nenhum teste de diagnóstico isolado pré-operatório pode identificar com certeza AB, nem mesmo um colangiograma. Na primeira etapa da investigação da CN, a biópsia hepática ainda é útil e precisa o suficiente e, embora invasiva, é um procedimento seguro em lactentes, particularmente quando guiado por ultrassonografia.(8,22,30,36,38,93,97) A biópsia hepática para além de confirmar no período neonatal alguns diagnósticos esperados, como síndrome de Alagille ou A1ATd, pode também revelar achados inesperados que podem orientar a investigação diagnóstica posterior, como a possibilidade de hepatopatias metabólicas pelo achado de esteatose microvesicular. A imunohistoquímica com a localização de marcadores específicos e os ensaios bioquímicos e moleculares ampliam as informações disponíveis através da biópsia hepática.(98) A avaliação histológica e a análise de imagem associada do fígado podem ajudar a prever os resultados pós-operatórios após a portoenterostomia, tendo em conta o grau de fibrose ou a extensão da reação ductular (22,99) e definir o prognóstico clínico das doenças como a hepatopatia associada à nutrição parentérica.(100)

A **Tabela 4** apresenta os achados histopatológicos associados à colestase neonatal intra-hepática.

**Tabela 4** - Achados histopatológicos associados à colestase neonatal intra-hepática

**Padrão hepático (inflamatório) inespecífico em CN - Pigmentos biliares em hepatócitos e células de Kupffer e tampões biliares canaliculares; transformação de células gigantes, pseudoácinos, degeneração hepatocítica emplumada e em balão e enfartes biliares:**

Colestase neonatal idiopática, atresia biliar, A1ATd, a apresentação inicial de distúrbios metabólicos (doença de Niemann-Pick tipo C, distúrbios do espectro de Zellweger, PFIC 2, distúrbios sintéticos de ácidos biliares (BASD), hemocromatose neonatal, fibrose cística, síndrome ARC, deficiência de citrina, deficiência de OTC e tirosinemia) e deficiência da hormona adrenocorticotrófico (ACTH).

**Achados sugestivos de doenças específicas ou grupos de doenças**

**Padrão de Esteatose**

- **Macrovesicular (ou misto):** Galactosemia, colestase associada à nutrição parentérica, colestase induzida por drogas, A1ATd, fibrose cística, doença de Wolman, distúrbios da cadeia respiratória mitocondrial, distúrbios da oxidação de ácidos gordos, deficiência de piruvato-desidrogenase, deficiência de piruvato-carboxilase, adrenoleucodistrofia, Doença de Refsum, acidúrias orgânicas, distúrbios do ciclo da ureia, deficiência de citrina
- **Microvesicular:** distúrbio da cadeia respiratória mitocondrial, defeitos de oxidação de ácidos gordos, deficiência de piruvato-desidrogenase, deficiência de piruvato-carboxilase, acidúrias orgânicas, defeitos do ciclo da ureia, toxicidade do valproato, síndrome de Reye.

**Padrão ductopênico**

Síndrome de Alagille, prematuridade, infecções (CMV, sarampo alemão, sífilis, hepatite B), doenças metabólicas (deficiência de alfa-1-antitripsina, fibrose cística, síndrome de Zellweger, PFIC, síndrome de Ivemark, síndrome de Prune-Belly, hipopituitarismo), distúrbios cromossômicos, hepatite neonatal idiopática, colestase induzida por drogas.

**Necrose hepatocelular**

Hepatite viral aguda, doenças metabólicas (intolerância hereditária à frutose, galactosemia, tirosinemia tipo 1, defeitos de oxidação de ácidos gordos, distúrbios da cadeia respiratória mitocondrial).

**Hiperglicuronidação nuclear**

Doenças de armazenamento de glicogênio e distúrbios do ciclo da ureia.

**Malformação da placa ductal**

Doença poliquística renal autossômica recessiva.

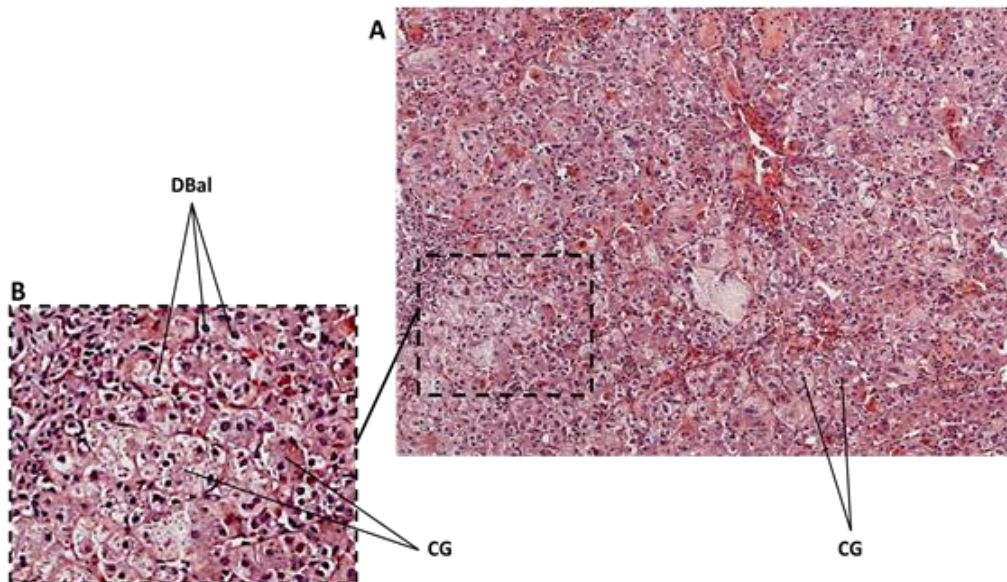
**Inclusões virais**

Infeções congénitas.

### 5.5.1 Padrão Inflamatório

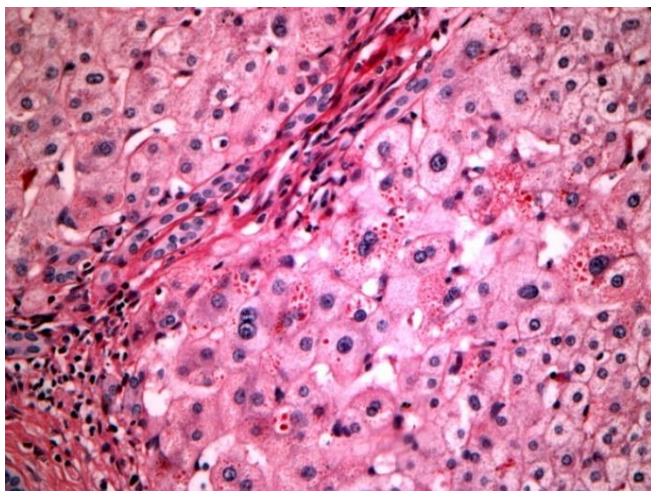
Este padrão é caracterizado como sendo composto por achados hepáticos inespecíficos e por isso acontece em todas as doenças que afetam o fígado do bebê. Estes achados resultam da acumulação de compostos colefilicos nos hepatócitos e células de Kupffer com inflamação associada.(101,104) Além da CN idiopática, A1ATd e AB, ocorre na apresentação inicial em várias doenças metabólicas e hormonais e, portanto, a correlação clínica é obrigatória.(103,105,106) Por exemplo, uma extensa transformação de células gigantes em um paciente com níveis séricos normais de GGT sugere PFIC2 ou defeitos na síntese de ácidos biliares, enquanto organomegália, ascite e consanguinidade parental sugerem doença de Niemann-Pick tipo C.(107–109) Neste caso, o TGS pode resolver a dúvida diagnóstica. Quando há suspeita de características clínicas de distúrbios do espectro de Zellweger, um estudo hepático com microscopia eletrônica é útil para revelar peroxissomas ausentes e mitocôndrias anômalas. (110)

Entre as características inespecíficas inclui-se a presença de hepatócitos gigantocelulares. **(Figura 8).**



**Figura 8** - Padrão inflamatório: A- Desorganização do parênquima, com presença de abundante transformação de células gigantes (CG); B- Detalhe da região especificada como retângulo na imagem A: hepatócitos arredondados com citoplasma claro, caracterizando Degeneração balonizante (DBal); adicionalmente, transformação de células gigantes (CG). Marcação: Hematoxilina-eosina (100X). Serviço de Patologia – Unidade de Hepatologia Pediátrica e Transplante Hepático Infantil (HCPA, Brasil).

Algumas doenças incluídas no padrão inflamatório podem ser distinguidas por características particulares, como os glóbulos PAS-Positivo de A<sub>1</sub>AT, resistentes à diástase, nas células hepatobiliares presentes na deficiência A<sub>1</sub>AT após as 12 semanas de vida (**Figura 9**).



**Figura 9** – Glóbulos de A<sub>1</sub>AT dentro dos hepatócitos periportais num doente com doença hepática associada a deficiência de A<sub>1</sub>AT: Serviço de Patologia – Unidade de Hepatologia Pediátrica e Transplante Hepático Infantil (HCPA, Brasil). PAS com compensação da diástase (400x).

### 5.5.2 Padrão Ductopénico

Um padrão histopatológico ductopénico deve ser adequadamente definido porque, embora geralmente associado a colestase proeminente, esta pode eventualmente diminuir. O prognóstico de pacientes com esta forma sindrómica é afetado, além da doença hepática, pelas complicações das manifestações extra-hepáticas da doença.(111) A característica escassez do ducto biliar desenvolve-se ao longo do tempo, sendo encontrada em apenas 60% dos fígados de bebés de 6 meses de idade, mas em até 95% dos fígados de pacientes afetados além dessa idade.(112)

Mais tarde na vida, os achados microscópicos podem ser heterogéneos com áreas de escassez de ductos biliares coexistindo com outras regiões exibindo espaços portais normais ou apenas uma reação ductular ténue. Várias outras doenças colestáticas neonatais podem apresentar escassez de ductos biliares e esse achado também é observável em bebés normais, especialmente em bebés prematuros.(8)

### 5.5.3 Padrão de Esteatose

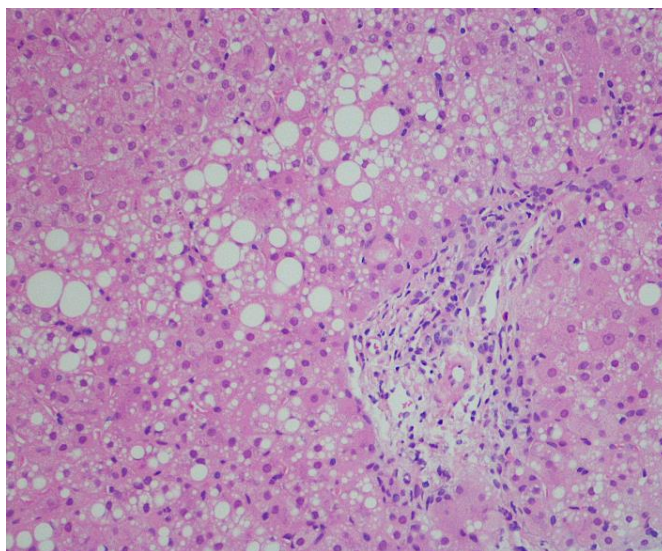
Este padrão (**Figura 10**) surge devido à acumulação hepatocelular de lípidos que resulta do aumento da libertação de ácidos gordos, da diminuição da oxidação hepática destes, da alteração do metabolismo das lipoproteínas e do armazenamento lisossomal. O distúrbio metabólico que induz a esteatose pode ser produzido por várias doenças caracterizadas por CN, como a colestase associada à NP total, associada a fármacos, associada a distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono, como Galactosemia e Intolerância Hereditária à Frutose, e associadas a distúrbios do metabolismo dos aminoácidos, como a Tirosinemia neonatal.(113)

A esteatose pode apresentar um padrão macrovesicular (**Figura 11**), microvesicular (**Figura 12**) ou misto. Os vacúolos citoplasmáticos macrovesiculares deslocam o núcleo para a periferia, enquanto na esteatose microvesicular o núcleo permanece em posição central. A forma de esteatose mais frequentemente encontrada na doença hepática metabólica infantil é macrovesicular e a ocorrência de um padrão microvesicular ou misto indica a presença de doenças envolvendo uma patologia mitocondrial.(114) Uma causa frequente do padrão de esteatose na histopatologia é a CN associada à NP. A CN associada à NP ocorre principalmente em bebés prematuros que não toleram alimentação oral ou enteral e está relacionada a altas taxas de mortalidade precoce. As complicações hepáticas variam de pequenos aumentos nas enzimas hepáticas séricas a esteatose, esteatohepatite, colestase, colangite, fibrose e cirrose. Algumas lesões hepáticas induzidas pela NP são reversíveis, mas pode ocorrer colestase persistente com cirrose precoce.(115)

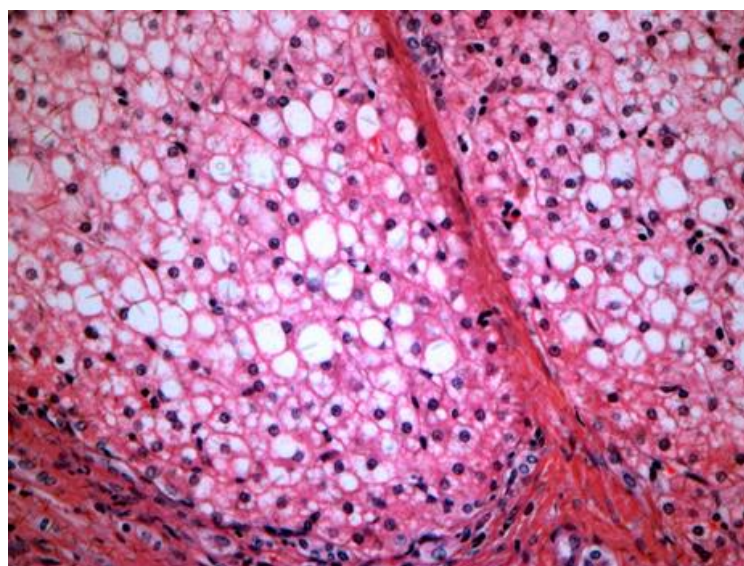
Do ponto de vista histopatológico, no momento do diagnóstico precoce, há sinais inespecíficos leves ou moderados de CN, mas em alguns pacientes já estão presentes inflamação portal e necrose. O uso contínuo de NP origina esteatose, esteatohepatite com colestase intensa associada a reação ductular, inflamação portal e fibrose progressiva. A deteção de cirrose e a manutenção de níveis elevados de bilirrubina sérica estão associadas a um risco aumentado de morte nos próximos 6 meses.(100, 103)

As intoxicações metabólicas também apresentam o padrão de esteatose, mas, dada a associação com insuficiência hepática aguda, a biópsia hepática muitas vezes é contraindicada nesses distúrbios, e o diagnóstico depende dos exames laboratoriais e/ou genéticos previamente relatados. Na Galactosemia, há esteatose macrovesicular associada e achados inespecíficos de CN, incluindo reação ductular.(116) Na Intolerância Hereditária à Frutose, há esteatose macrovesicular panlobular associada à fibrose portal,

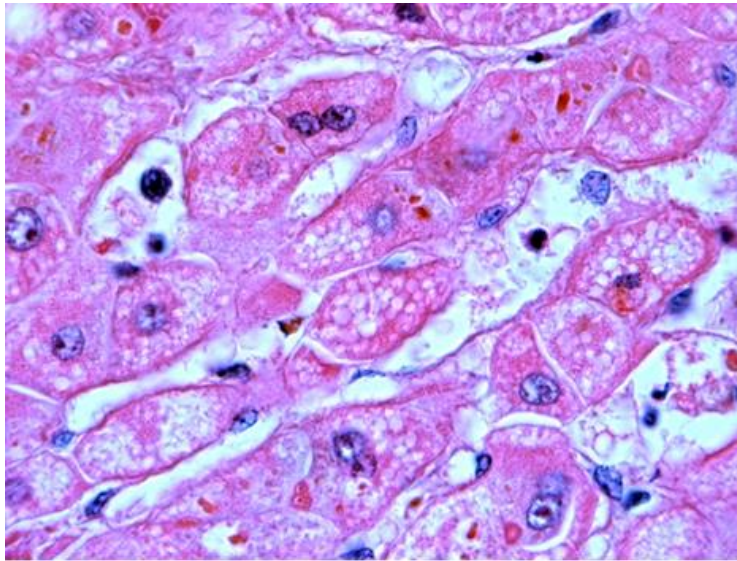
reação ductular, fibrose lobular com nódulos regenerativos, pseudoácinos, necrose com pouca inflamação, e na Tirosinemia tipo 1, a avaliação histopatológica mostra esteatose macrovesicular associada a pseudoácinos, hemossiderose e graus variados de necrose hepatocelular e apoptose. A fibrose desenvolve-se logo, eventualmente progredindo para cirrose micronodular.(84,117)



**Figura 10** – Padrão de esteatose misto. Hematoxilina-eosina, 200x.



**Figura 11** – Esteatose macrovesicular característico de Galactosemia, tirosinemia 1, IHF, NP, DILI, A1ATd, fibrose quística, DAG, Doença de Wolman, mitocondriopatias, desordens da oxidação dos ácidos gordos, deficiência da piruvato desidrogenase, deficiência da piruvato carboxilase, adrenoleucodistrofia do lactente, Doença de Refsum, acidúrias orgânicas, desordens do ciclo da ureia. Observa-se que os vacúolos lipídicos citoplasmáticos deslocam o núcleo para a periferia e a presença de pontes fibrosas associadas. Marcação: Hematoxilina-eosina (200x): Serviço de Patologia – Unidade de Hepatologia Pediátrica e Transplante Hepático Infantil (HCPA, Brasil).



**Figura 12** – Esteatose microvesicular observada em mitocondriopatias, desordens da cadeia respiratória mitocondrial, defeitos da oxidação dos ácidos gordos, deficiência de piruvato desidrogenase, deficiência da piruvato-carboxilase, acidúrias orgânicas e defeitos do ciclo da ureia, drogas (valproato), síndrome de Reye. Neste padrão o núcleo permanece na posição central e se encontra rodeado por múltiplas e pequenas vesículas lipídicas. Marcação: Hematoxilina-eosina (200x): Serviço de Patologia – Unidade de Hepatologia Pediátrica e Transplante Hepático Infantil (HCPA, Brasil).

#### 5.5.4 Padrão Obstrutivo

A maior utilidade do estudo histopatológico para o diagnóstico de Atresia Biliar assenta na identificação das variáveis que se associam especificamente a um quadro obstrutivo mecânico extra-hepático, onde se inclui a reação ductular envolvendo tanto o ducto interlobular como a interface portal lobular, a expansão portal por infiltrado inflamatório, edema e fibrose, os tampões biliares em ductulos e ductos maiores, e as pontes fibrosas porta-porta e porta-centro.(102)

#### 5.5.5 Padrão de Armazenamento

As doenças de armazenamento são distúrbios multiorgânicos que afetam o fígado (**Tabela 5**). (30,114) Em distúrbios de armazenamento não neuropáticos, como Gaucher e Niemann-Pick tipo C, o fígado é um importante alvo de biópsia para diagnóstico, enquanto doenças de armazenamento neurometabólico raramente requerem uma biópsia hepática porque a evidência patológica está presente em tecidos mais acessíveis. Nas doenças de armazenamento, há hepatomegalia atribuível à expansão citoplasmática por material acumulado em diferentes grupos de células hepáticas separadamente ou em

combinações, dependendo da etiologia. Achados sugestivos de doenças de armazenamento podem ser imitados por outras condições. A CN associada à NP pode levar à acumulação de lipídios hepatocelulares e lipofuscina. Degeneração balonzante e pseudoxantomas na CN podem ser confundidos com achados de armazenamento. A esteatose e a proteína eosinofílica no retículo endoplasmático também devem ser distinguidas. Mesmo condições normais podem ser confundidas com doenças de armazenamento, como células estreladas com aparência espumosa no espaço perissinusoidal devido à deposição excessiva de vitamina A ou hiperglicogenação nuclear de hepatócitos periportais observáveis em lactentes jovens.(114)

**Tabela 5-** Achados histopatológicos do fígado na apresentação de algumas doenças de armazenamento que causam CN

<b>Doença</b>	<b>Achados Histopatológicos</b>
A <sub>1</sub> ATd (PiZ)	Armazenamento de glóbulos citoplasmáticos resistentes à diástase PAS-positivos em hepatócitos periportais (após 12 semanas de vida)
Doença Gaucher	CK aumentado e macrófagos em sinusoides e espaços porta mostrando núcleo excêntrico e citoplasma eosinofílico e estriado (resultado do acúmulo de esfingolipídios). Os hepatócitos não estão envolvidos. Fibrose portal e lobular.
Doença Wolman	Vacuolização de CK e hepatócitos. Os histiócitos espumosos estão situados nas áreas portal e periportal. Fibrose portal e periportal, cirrose precoce. Na DW: reação ductular.
Niemann-Pick C	Padrão hepático (tabela C) com raros macrófagos espumosos ou células de Kupffer (células de Niemann-Pick).
GAG IV	Fibrose, cirrose precoce. Inclusões citoplasmáticas grandes, pálidas e eosinofílicas circundadas por um halo na maioria dos hepatócitos (> zona periportal). As inclusões resistentes à diástase podem corar com iodo de Lugol.
<b>Abreviações:</b> GAG- Doença de Armazenamento do Glicogénio, CK- Células de Kupffer	
Baseado na referência Jevon GP, Dimmick JE. Histopathologic approach to metabolic liver disease: Part 1. <i>Pediatr Dev Pathol.</i> 1998;1(3):179-99. DOI: 10.1007/s100249900026. PMID: 10463278	



## 6. Conclusão

O diagnóstico diferencial da CN inclui uma grande variedade de diferentes etapas. Em todas as etapas há a necessidade de integração de exames clínico-laboratoriais, incluindo métodos bioquímicos comuns e enzimáticos complexos, além de estudos de imagem e histopatológicos. A partir da década de 90, os testes genéticos tornaram-se cada vez mais disponíveis e mais baratos, auxiliando no entendimento fisiopatológico dos distúrbios colestáticos neonatais e na decifração de distintos fenótipos antes não reconhecidos.

Uma consequência do uso de testes genéticos é que estamos a descobrir complexidades genéticas humanas, por exemplo, o facto de que a presença de uma variante patogênica em um conjunto de pacientes não implica um fenótipo comum entre eles. Uma doença genética pode apresentar diversas apresentações clínicas. Ainda assim, um grupo razoavelmente grande de casos de PFIC atualmente escapa ao diagnóstico genético, talvez devido a variantes patogênicas desconhecidas ou a mutações atualmente não implicadas com PFIC. Assim, estamos a aprender sobre o método com o qual estamos a investigar pacientes com CN. Isso é verdade não só para NGS, mas para todos os testes de diagnósticos, no que diz respeito à decifração de detalhes fisiopatológicos. Nenhum teste de diagnóstico é 100% preciso em todas as etapas do diagnóstico diferencial da CN, e a integração adequada de diversos métodos de diagnóstico é a abordagem correta. O crucial é estar ciente das dificuldades e armadilhas relacionadas a cada um dos métodos de investigação, mesmo aqueles que envolvem as tecnologias mais sofisticadas.



## 7. Referências Bibliográficas

1. Santos J. Metabolismo e Fluxo Biliar. In: Silva LR, Ferreira CT, De Carvalho E. (eds). *Hepatologia em Pediatria – Série Gastroenterologia e Hepatologia em Pediatria*. 2012. 1ª Edição. São Paulo: Editora Manole.
2. Ferdinandusse S, Denis S, Faust PL and Wanders RJA. Bile acids: the role of peroxisomes. *Journal of Lipid Research*. 2009; 50:2139-2147. DOI: 10.1194/jlr.R900009-JLR200.
3. Boyer JL, Soroka CJ. Bile formation and secretion: An update. *Journal of Hepatology*. 2021; 75(1):190-201. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.02.011.
4. Arias I, et al. *The liver: biology and pathobiology*. 6ª Edição. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2020. Seção A-C.
5. Dawson P. “Role of the Intestinal Bile Acid Transporters in Bile Acid and Drug Disposition.” In Fromm M, Kim R. “Drug Transporters.” - *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 201. 2011. Doi: 10.1007/978-3-642-14541-4\_4.
6. Santos J, De Carvalho E, Seixas R. Colestase Neonatal. E Santos J, Silveira TR. *Atresia Biliar*. In Silva LR, Ferreira CT, De Carvalho E (eds). *Manual de Residência em Gastroenterologia Pediátrica*. 2012. 1º Edição. São Paulo: Editora Manole.
7. Andrianov MG, Azzam RK. Cholestasis in Infancy. *Pediatric Annals*. 2016;45(12): e414-e419. DOI: 10.3928/19382359-20161118-01.
8. Fawaz R, Baumann U, Ekong U, et al. Guideline for the Evaluation of Cholestatic Jaundice in Infants: Joint Recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2017; 64:154–168. DOI: 10.1097/MPG.0000000000001334.
9. Li Q, Sun Y, van I, Jzendoorn S. A Link between Intrahepatic Cholestasis and Genetic Variations in Intracellular Trafficking Regulators. *Biology*. 2021; 10: 119. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology10020119>.
10. Harpavat S, Garcia-Prats JA, et al. Diagnostic yield of newborn screening for biliary atresia using direct or conjugated bilirubin measurements. *JAMA*. 2020; 323(12):1141–1150. DOI: 10.1001/jama.2020.0837
11. Feldman AG, Sokol RJ. Neonatal cholestasis: emerging molecular diagnostics and potential novel therapeutics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2019 Jun; 16(6):346-360. DOI: 10.1038/s41575-019-0132-z.

12. Fischler B, Lamireau T. Cholestasis in the newborn and infant. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2014; 38:263-267. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinre.2014.03.010>.
13. Goldberg A, Mack CL. Inherited Cholestatic Diseases in the era of Personalized Medicine. *Clinical Liver Disease*. 2020; 15(3): 105–109. DOI: 10.1002/cld.872.
14. Chardot C, Buet C, Serinet MO, et al. Improving outcomes of biliary atresia: French national series 1986-2009. *Journal of Hepatology*. 2013; 58(6):1209-17. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.01.040.
15. Fanna M, Masson G, Capito C, et al. Management of Biliary Atresia in France 1986 to 2015: Long-term Results. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2019; 69(4):416-424. DOI: 10.1097/MPG.0000000000002446.
16. McKiernan PJ. Neonatal cholestasis. *Seminars in Neonatology*. 2002; 7(2):153–65. DOI:10.1053/siny.2002.010.
17. Satrom K, Gourley G. Cholestasis in Preterm Infants. *Clinics in Perinatology*. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clp.2016.01.012>.
18. Tanimizu N. “The neonatal liver: Normal development and response to injury and disease”. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2022; 27(1):101229. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.siny.2021.101229>.
19. Champion V, Carbajal R, Lozar J, et al. Risk factors for developing transient neonatal cholestasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012; 55:592–8. DOI: 10.1097/MPG.obo13e3182616916.
20. Jolin-Dahel K, Ferretti E, Montiveros C, et al. Parenteral nutrition-induced cholestasis in neonates: where does the problem lie? *Gastroenterology Research and Practice*. 2013; 163632. DOI: 10.1155/2013/163632.
21. Santos Silva E, Almeida A, Frutuoso S, Martins E, Valente MJ, Santos-Silva A, Lopes AI. Neonatal Cholestasis Over Time: Changes in Epidemiology and Outcome in a Cohort of 154 Patients From a Portuguese Tertiary Center. *Frontiers in Pediatrics*. 2020; 30(8):351. DOI: 10.3389/fped.2020.00351.
22. Shneider BL, Moore J, Kerkar N, et al. Childhood Liver Disease Research Network. Initial assessment of the infant with neonatal cholestasis-Is this biliary atresia? *PLoS One*. 2017; 11(12(5)):e0176275. DOI: 10.1371/journal.pone.0176275.
23. Yoon HM, Suh CH, Kim JR, et al. Diagnostic Performance of Sonographic Features in Patients With Biliary Atresia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Ultrasound in Medicine*. 2017; 36(10):2027-2038. DOI: 10.1002/jum.14234.
24. Karrer M, Roach JP. Error Traps and Culture of Safety in Biliary Atresia. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2019; 18:135–138. DOI: 10.1053/j.sempedsurg.2019.04.017.

25. Ho A, Sacks MA, Sapra A, Khan FA. The Utility of gallbladder Absence on Ultrasound for Children With Biliary Atresia. *Frontiers in Pediatrics*. 2021; 9:685268. DOI: 10.3389/fped.2021.685268.
26. Di Serafino, M., Gioioso, M., Severino, R. et al. Ultrasound findings in paediatric cholestasis: how to image the patient and what to look for. *Journal of Ultrasound*. 2020; 23: 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40477-019-00362-9>.
27. Han S, Jeon TY, Hwang SM, et al. Imaging findings of Alagille syndrome in young infants: differentiation from biliary atresia. *The British Journal of Radiology*. 2017; 90(1077):20170406. DOI: 10.1259/bjr.20170406.
28. Cho H-H, Kim WS, Choi YH, et al. Ultrasonography evaluation of infants with Alagille syndrome: In comparison with biliary atresia and neonatal hepatitis. *European Journal of Radiology*. 2016; 85(6):1045-1052. DOI: 10.1016/j.ejrad.2016.03.023.
29. Takamizawa S, Zaima A, Muraji T, et al. Can biliary atresia be diagnosed by ultrasonography alone? *Journal of Pediatric Surgery*. 2007; 42(12):2093-2096. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.
30. Götze T, Blessing H, Grillhösl C, et al. Neonatal Cholestasis - Differential Diagnoses, Current Diagnostic Procedures, and Treatment. *Frontiers in Pediatrics*. 2015; 3:43. DOI:10.3389/fped.2015.00043.
31. Alagille D. Cholestasis in the first three months of life. *Progress in Liver Diseases*. 1979; 6:471-85.
32. Agana M, Frueh J, Kamboj M, et al. Common metabolic disorder (inborn errors of metabolism) concerns in primary care practice. *Annals of Translational Medicine*. 2018; 6(24):469. DOI: 10.21037/atm.2018.12.34.
33. Robie DK, Overfelt SR, Xie L. Differentiating biliary atresia from other causes of cholestatic jaundice. *The American Surgeon*. 2014; 80(9):827-31.
34. El-Guindi MA, Sira MM, Konsowa HAS, et al. 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.
35. Cabrera-Abreu JC, Green A. Gamma-Glutamyltransferase: value of its measurement in paediatrics. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2002; 39: 22-25.
36. Zerbini MC, Gallucci SD, Maezono R, et al. Liver biopsy in neonatal cholestasis: a review on statistical grounds. *Modern Pathology*. 1997; 10(8):793-9.
37. Lee JY, Sullivan K, El Demellawy D, Nasr A. The value of preoperative liver biopsy in the diagnosis of extrahepatic biliary atresia: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Pediatric Surgeon*. 2016; 51:753–61. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2016. 02.016.

38. Russo P, Magee JC, Anders RA, et al. Childhood Liver Disease Research Network (ChiLDRen). Key histopathologic features of liver biopsies that distinguish biliary atresia from other causes of infantile cholestasis and their correlation with outcome. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2016; 40(12):1601-1615. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000755.
39. Grammatikopoulos T, Sambrotta M, Strautnieks S, et al. Mutations in DCDC2 (doublecortin domain containing protein 2) in neonatal sclerosing cholangitis. *Journal of Hepatology*. 2016; 65(6):1179-1187. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.07.017.
40. Talbot IC, Mowat AP. Liver disease in infancy: histological features and relationship to alpha-antitrypsin phenotype. *Journal of Clinical Pathology*. 1975; 28(7):559-63. DOI: 10.1136/jcp.28.7.559.
41. Mysore KR, Shneider BL, Harpavat S. Biliary atresia as a disease starting in utero: implications for treatment, diagnosis, and pathogenesis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2019; 69:396-403. DOI: 10.1097/MPG.0000000000002450.
42. Hope WW, Fanelli R, Walsh DS, et al. SAGES clinical spotlight review: intraoperative cholangiography. *Surg Endosc*. 2017;31:2007-16. DOI: 10.1007/s00464-016-5320-0.
43. Gunadi, Kaneshiro M, Okamoto T, et al. Outcomes of liver transplantation for Alagille syndrome after Kasai portoenterostomy: Alagille Syndrome with agenesis of extrahepatic bile ducts at porta hepatis. *Journal of Pediatric Surgery*. 2019; 54:2387-91. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2019.04.022.
44. Lin H, Zoll B, Russo P, Spinner NB, et al. Challenging case of focal extrahepatic duct obstruction/hypoplasia in Alagille syndrome. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2017; 64:e18-22. DOI: 10.1097/MPG.0000000000000563.
45. Takeda M, Sakamoto S, Uchida H, Shimizu S, Yanagi Y, Fukuda A, et al. The morphological and histopathological assessment of Alagille syndrome with extrahepatic bile duct obstruction: the importance of the differential diagnosis with subgroup “o” biliary atresia. *Pediatric Surgery International*. 2021; 37:1167-74. DOI: 10.1007/s00383-021-04932-z.
46. Emerick KM, Rand EB, Goldmuntz E, et al. Features of Alagille syndrome in 92 patients: frequency and relation to prognosis. *Hepatology*. 1999; 29:822-9. DOI: 10.1002/hep.510290331.
47. Kishore R, Kisku SMC, Thomas RJ, et al. Laparoscopic cholangiogram in biliary atresia: a refinement in the gallbladder hitch technique. *Pediatric Surgeon International*. 2018; 34(4):395-398. DOI: 10.1007/s00383-018-4236-2.

48. Nose S, Hasegawa T, Soh H, et al. Laparoscopic cholecystocholangiography as an effective alternative exploratory laparotomy for the differentiation of biliary atresia. *Surgery Today*. 2005; 35(11):925-8. DOI: 10.1007/s00595-005-3060-1.
49. Alkan M, Tutus K, Fakioglu E, et al. Laparoscopy-Assisted Percutaneous Cholangiography in Biliary Atresia Diagnosis: Comparison with Open Technique. *Gastroenterology Research and Practice*. 2016; 2016:5637072. DOI: 10.1155/2016/5637072.
50. Narayanaswamy B, Gonde C, Tredger JM, et al. Serial circulating markers of inflammation in biliary atresia - Evolution of the postoperative inflammatory process. *Hepatology*. 2007; 46:180–187.
51. Bessho K, Mourya R, Shivakumar P, et al. Gene expression signature for biliary atresia and a role for interleukin-8 in pathogenesis of experimental disease. *Hepatology*. 2014; 60:211–223.
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): ean8462. DOI:10.1126/scitranslmed.aan8462 56.
53. He L, Ip DKM, Tam G, et al. Biomarkers for the diagnosis and post- Kasai portoenterostomy prognosis of biliary atresia: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2021; 11:11692. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91072-y>.
54. Nomden M, Beljaars L, Verkade HJ, et al. Current concepts of biliary atresia and matrix metalloproteinase-7: a review of literature. *Frontiers in Medicine*. 2020; 7:617261. DOI: 10.3389/fmed.2020.617261.
55. Yang L, Zhou Y, Xu PP, et al. Diagnostic accuracy of serum matrix metalloproteinase-7 for biliary atresia. *Hepatology*. 2018; 68:2069-2077. DOI: 10.1002/hep.30234.
56. dos Santos JL, da Silveira TR, da Silva VD, et al. Medial thickening of hepatic artery branches in biliary atresia. A morphometric study. *Journal of Pediatric Surgery*. 2005; 40(4):637-42. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2004.12.002.
57. Uflacker R, Pariente DM. Angiographic findings in biliary atresia. *Cardiovascular and Interventional Radiology*. 2004; 27(5):486-490. DOI:10.1007/s00270-004-2636-2.
58. Caruso S, Miraglia R, Milazzo M, et al. Multidetector computed tomography hepatic findings in children with end-stage biliary atresia. *European Radiology*. 2010; 20(6):1468-1475. DOI:10.1007/s00330-009-1681-2.

59. Humphrey TM, Stringer MD. Biliary atresia: US diagnosis. *Radiology*. 2007; 244(3):845-851. DOI: 10.1148/radiol.2443061051.
60. Kim SS, Kim MJ, Lee MJ, Yoon CS, Han SJ, Koh H. Ultrasonographic findings of type IIIa biliary atresia. *Ultrasonography*. 2014; 33(4):267-274. DOI: 10.14366/usg.14016.
61. Mu SL, Kim MJ, Lee MJ, et al. Biliary Atresia: Color Doppler US findings in neonates and infants. *Radiology*. 2009; 252(1):282-289. DOI: 10.1148/radiol.2522080923.
62. Ramesh RL, Murthy GV, Jadhav V RS. Hepatic subcapsular flow: An early marker in diagnosing biliary atresia. *Indian Journal of Radiology and Imaging*. 2015; 25(2):196-197. DOI: 10.4103/0971-3026.155875.
63. Woo SK, Cheon JE, Byung JY, 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.
64. 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.
65. Li Y, Rong L, Tang J, et al. Re-evaluation of Laparoscopic Hepatic Subcapsular Spider-Like Telangiectasis Sign: A Highly Accurate Method to Diagnose Biliary Atresia in Infants. *Frontiers in Pediatrics*. 2022; 10:850449. DOI: 10.3389/fped.2022.850449.
66. Hoerning A, Raub S, Dechêne A, et al. Diversity of disorders causing neonatal cholestasis - the experience of a tertiary pediatric center in Germany. *Frontiers in Pediatrics*. 2014; 23:2:65. DOI: 10.3389/fped.2014.00065.
67. Perlmutter DH. Alpha-1-antitrypsin deficiency: diagnosis and treatment. *Clinical Liver Disease*. 2004; 8(4):839-59. DOI: 10.1016/j.cld.2004.06.001.
68. Wang AW, Newton K, Kling K. Successful outcome and biliary drainage in an infant with concurrent alpha-1-antitrypsin deficiency and biliary atresia. *Case Report in Surgery*. 2017; 2017:9348461. DOI: 10.1155/2017/9348461.
69. Nord KS, Saad S, Joshi VV, McLoughlin LC. Concurrence of alpha 1-antitrypsin deficiency and biliary atresia. *Journal of Pediatrics*. 1987; 111(3):416-8. DOI: 10.1016/s0022-3476(87)80470-5.
70. Feldman AG, Sokol RJ. Recent developments in diagnostics and treatment of neonatal cholestasis. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2020; 29(4):150945. DOI: 10.1016/j.sempedsurg.2020.150945.

71. Nicastro E, D'Antiga L. Next-generation sequencing in Pediatric Hepatology and liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2018; 24(2):282-293. DOI: 10.1002/lt.24964.
72. Nicastro E, Di Giorgio A, Marchetti D, Barboni C, Cereda A, Iascone M, D'Antiga L. Diagnostic Yield of an Algorithm for Neonatal and Infantile Cholestasis Integrating Next-Generation Sequencing. *Journal of Pediatrics*. 2019; 211:54-62.e4. DOI: 10.1016/j.jpeds.2019.04.016.
73. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genomic Medicine*. 2018; 9;3:16. DOI: 10.1038/s41525-018-0053-8.
74. Sun H, Yu G. New insights into the pathogenicity of non-synonymous variants through multi-level analysis. *Scientific Reports*. 2019; 7;9(1):1667. DOI: 10.1038/s41598-018-38189-9.
75. Henkel AS. Genetic Disorders of Bile Acid Transport. *Clinical Liver Diseases (Hoboken)*. 2021; 18(5):237-242. DOI: 10.1002/cld.1132.
76. Jeyaraj R, Bounford KM, Ruth N, et al. The Genetics of Inherited Cholestatic Disorders in Neonates and Infants: Evolving Challenges. *Genes (Basel)*. 2021; 12(11):1837. DOI: 10.3390/genes12111837.
77. Taylor SA, Whittington PF. Neonatal acute liver failure. *Liver Transplantation*. 2016; 22(5):677-85. DOI: 10.1002/lt.24433.
78. Hoffmann GF, Engelmann G. Liver Disease. In: Hoffmann GF, Zschocke J, Nyhan WL. (eds). *Inherited Metabolic Diseases – A Clinical Approach*. Springer-Verlag: Berlin. 2017. DOI:10.1007/978-3-662-49410-3.
79. Lak R, Yazdizadeh B, Davari M, et al. Newborn screening for Galactosaemia. *Cochrane Database of Systematic Reviews 2017, Issue 12*. Number CD012272. DOI: 10.1002/14651858.CD012272.pub2.
80. Demirbas D, Coelho AI, Rubio-Gozalbo ME, et al. Hereditary Galactosemia. *Metabolism*. 2018; 83:188-196. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.01.025.
81. De Jesús VR, Adam BW, Mandel D, et al. Succinylacetone as primary marker to detect tyrosinemia type I in newborns and its measurement by newborn screening programs. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2014; 113(1-2):67-75. DOI: 10.1016/j.ymgme.2014.07.010.
82. Chinsky JM, Singh R, Ficicioglu C, et al. Diagnosis and treatment of Tyrosinemia type I: a US and Canadian consensus group review and recommendations. *Genetic Medicine*. 2017; 19(12). DOI: 10.1038/gim.2017.101.

83. Äärelä L, Hiltunen P, Soini T, et al. Type 1 tyrosinemia in Finland: a nationwide study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2020; 15(1):281. DOI: 10.1186/s13023-020-01547-w.
84. Dehghani SM, Haghghat M, Imanieh MH, et al. Clinical and para-clinical findings in the children with Tyrosinemia referring for liver transplantation. *International Journal of Preventive Medicine*. 2013; 4(12):1380-5.
85. Kliegman RM. Defects in Metabolism of Amino Acids. In: Kliegman RM, MD, St Geme JW, Blum NJ, et al. (eds.). *Nelson Textbook of Pediatrics*, 21st edition. Chapter 103, 695-739. 2020 Elsevier Inc. ISBN: 978-0-323-52950-1.
86. Potter CJ. Cholestasis in the Premature Infant. *Clinics in Perinatology*. 2020; 47(2):341-354. DOI: 10.1016/j.clp.2020.02.009.
87. Pronicka E, Adamowicz M, Kowalik A, et al. Elevated carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and its normalization on dietary treatment as a useful biochemical test for hereditary fructose intolerance and galactosemia. *Pediatric Research*. 2007; 62(1):101-5. DOI: 10.1203/PDR.obo13e318068641a.
88. Gaughan S, Ayres L, Baker P. Hereditary Fructose Intolerance. 2015 Dec 17 [Updated 2021 Feb 18]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al. (eds.) *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Bookshelf URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>.
89. Deugnier Y, Turlin B. Pathology of hepatic iron overload. *World Journal of Gastroenterology*. 2007; 13(35):4755-4760. DOI: 10.3748/wjg.v13.i35.4755.
90. Rand EB, Karpen SJ, Kelly S, et al. Treatment of neonatal hemochromatosis with exchange transfusion and intravenous immunoglobulin. *Journal of Pediatrics*. 2009; 155(4):566–571.
91. Feldman AG, Whittington PF. Neonatal hemochromatosis. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2013; 3(4):313-20. DOI: 10.1016/j.jceh.2013.10.004.
92. Whittington PF, Hibbard JU. High-dose immunoglobulin during pregnancy for recurrent neonatal haemochromatosis. *Lancet*. 2004; 364(9446):1690-1698. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)17356-X.
93. Bilreiro C, Noruegas MJ, Gonçalves I, et al. Ultrasound-guided Liver Biopsies in Children: A Single-center Experience and Risk Factors for Minor Bleeding. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2017; 65(2):137-140. DOI: 10.1097/MPG.0000000000001601.
94. Fiorotto R, Strazzabosco M. Pathophysiology of Cystic Fibrosis Liver Disease: A Channelopathy Leading to Alterations in Innate Immunity and in Microbiota. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2019; 8(2):197-207. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2019.04.013.

95. Servidoni MF, Gomez CCS, Marson FAL, et al. Grupo Colaborativo de Estudos em Fibrose Cística. Sweat test and cystic fibrosis: overview of test performance at public and private centers in the state of São Paulo, Brazil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2017;43(2):121-128. DOI:10.1590/S1806-37562016000000076.
96. Bosma PJ, Wits M, Oude-Elferink RPJ. Gene Therapy for Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis: Current Progress and Future Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(1):273. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22010273>.
97. Clouston AD. Pathologic Features of Hereditary Cholestatic Diseases. *Surgical Pathology Clinics*. 2018; 11(2):313-327. DOI: 10.1016/j.path.2018.02.001.
98. Ovchinsky N, Moreira RK, Lefkowitz JH, et al. Liver biopsy in modern clinical practice: a pediatric point-of-view. *Advances in Anatomic Pathology*. 2012; 19(4):250-62. DOI: 10.1097/PAP.ob013e31825c6a20.
99. 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. *Journal of Pediatric Surgery*. 2009; 44(4):695-701. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2008.09.013.
100. Kelly DA. Preventing parenteral nutrition liver disease. *Early Human Development*. 2010; 86(11):683-687. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2010.08.012.
101. Li MK, Crawford JM. The Pathology of Cholestasis. *Seminars in Liver Disease*. 2004; 24(1):21-42. DOI: 10.1055/s-2004-823099.
102. Rastogi A, Krishnani N, Yachha SK, et al. Histopathological features and accuracy for diagnosing biliary atresia by prelaparotomy liver biopsy in developing countries. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2009; 24:97–102. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05737.x
103. Morotti RJD. Pediatric Cholestatic Disorders. Approach to pathologic diagnosis. *Surgical Pathology Clinics*. 2013; 6:205–390. DOI: 10.1016/j.path.2013.03.001
104. Woolbright BL, Jaeschke H. Inflammation and Cell Death During Cholestasis: The Evolving Role of Bile Acids. *Gene expression*. 2019; 4;19(3):215-228. DOI: 10.3727/105221619X15614873062730.
105. Zheng Q-Q, Zhang Z-H, Zeng H-S, et al. Identification of a Large SLC25A13 Deletion via Sophisticated Molecular Analyses Using Peripheral Blood Lymphocytes in an Infant with Neonatal Intrahepatic Cholestasis Caused by Citrin Deficiency (NICCD): A Clinical and Molecular Study. *BioMed Research International*. 2016; 2016:1-7. DOI: 10.1155/2016/4124263.

106. Alsaleem M, Saadeh L, Misra A, et al. Neonatal isolated ACTH deficiency (IAD): a potentially life-threatening but treatable cause of neonatal cholestasis. *BMJ Case Reports*. 2016; 2016:bcr2016215032. DOI: 10.1136/bcr-2016-215032.
107. Gumus E, Haliloglu G, Karhan AN, et al. Niemann-Pick disease type C in the newborn period: a single-center experience. *European Journal of Pediatrics*. 2017; 176(12):1669-1676. DOI:10.1007/s00431-017-3020-y.
108. Subramaniam P, Clayton PT, Portmann BC, et al. Variable Clinical Spectrum of the Most Common Inborn Error of Bile Acid Metabolism— $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C27-steroid Dehydrogenase Deficiency. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2010; 50(1):61-66. DOI: 10.1097/MPG.ob013e3181b47b34.
109. Alissa FT, Jaffe R, Shneider BL. Update on Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2008; 46(3):241-252. DOI:10.1097/MPG.ob013e3181596060.
110. Klouwer FCC, Berendse K, Ferdinandusse S, et al. Zellweger spectrum disorders: clinical overview and management approach. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2015; 10:151. DOI:10.1186/s13023-015-0368-9.
111. Sergi C, Benstz J, Feist D, et al. Bile duct to portal space ratio and ductal plate remnants in liver disease of infants aged less than 1 year. *Pathology*. 2008; 40(3):260-7. DOI: 10.1080/00313020801911538.
112. Libbrecht L, Spinner NB, Moore EC, et al. Peripheral bile duct paucity and cholestasis in the liver of a patient with Alagille syndrome: further evidence supporting a lack of postnatal bile duct branching and elongation. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2005; 29(6):820-6. DOI: 10.1097/01.pas.0000161325.36348.25.
113. Nassir F, Rector RS, Hammoud GM, et al. Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis. *Gastroenterology & Hepatology*. 2015; 11(3):167-175.
114. Jevon GP, Dimmick JE. Histopathologic approach to metabolic liver disease: Part 1. *Pediatric and Developmental Pathology*. 1998; 1(3):179-99. DOI: 10.1007/s100249900026.
115. Repa A, Lochmann R, Unterasinger L, et al. Aggressive nutrition in extremely low birth weight infants: impact on parenteral nutrition-associated cholestasis and growth. *PeerJ*. 2016; 20:4:e2483. DOI: 10.7717/peerj.2483.
116. Bosch AM. Classical galactosaemia revisited. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2006; 29(4):516-525. DOI: 10.1007/s10545-006-0382-0.
117. Aldámiz-Echevarría L, de Las Heras J, Couce ML, et al. Non-alcoholic fatty liver in hereditary fructose intolerance. *Clinical Nutrition*. 2020; 39(2):455-459. DOI: 10.1016/j.clnu.2019.02.019.

# Anexo I - Publicação do Artigo de Revisão baseado nesta Monografia na Revista Healthcare



Review

## Protocols of Investigation of Neonatal Cholestasis—A Critical Appraisal

Patricia Quelhas <sup>1</sup>, Joana Jacinto <sup>2</sup>, Carlos Cerski <sup>3</sup>, Rui Oliveira <sup>4</sup>, Jorge Oliveira <sup>5</sup>, Elisa Carvalho <sup>6</sup> and Jorge dos Santos <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Faculty of Health Sciences, Health Science Investigation Center of University of Beira Interior (CICS-UBI), 6200-506 Covilha, Portugal
  - <sup>2</sup> Medicine Department, University of Beira Interior (UBI), Faculty of Health Sciences, 6201-001 Covilha, Portugal
  - <sup>3</sup> Pathology Department of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Pathology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre 90035-903, Brazil
  - <sup>4</sup> Centro de Diagnóstico Histopatológico (CEDAP), 3000-377 Coimbra, Portugal
  - <sup>5</sup> Center for Predictive and Preventive Genetics (CGPP), IBMC, UnIGENE, i3S, University of Porto, 4200-135 Porto, Portugal
  - <sup>6</sup> Department of Gastroenterology and Hepatology, Hospital de Base do Distrito Federal, Hospital da Criança de Brasília, Brasília 70330-150, Brazil
- \* Correspondence: jsantos@fcsaude.ubi.pt; Tel: +351-911-563

**Abstract:** Neonatal cholestasis (NC) starts during the first three months of life and comprises extrahepatic and intrahepatic groups of diseases, some of which have high morbimortality rates if not timely identified and treated. Prolonged jaundice, clay-colored or acholic stools, and choloria in an infant indicate the urgent need to investigate the presence of NC, and thenceforth the differential diagnosis of extra- and intrahepatic causes of NC. The differential diagnosis of NC is a laborious process demanding the accurate exclusion of a wide range of diseases, through the skillful use and interpretation of several diagnostic tests. A wise integration of clinical-laboratory, histopathological, molecular, and genetic evaluations is imperative, employing extensive knowledge about each evaluated disease as well as the pitfalls of each diagnostic test. Here, we review the difficulties involved in correctly diagnosing the cause of cholestasis in an affected infant.

**Keywords:** cholestasis; neonatal; diagnosis; differential; biliary atresia; cholestasis; neonatal intrahepatic



**Citation:** Quelhas, P.; Jacinto, J.; Cerski, C.; Oliveira, R.; Oliveira, J.; Carvalho, E.; dos Santos, J. Protocols of Investigation of Neonatal Cholestasis—A Critical Appraisal. *Healthcare* **2022**, *10*, 2012. <https://doi.org/10.3390/healthcare10102012>

Academic Editor: Abdel-Latif Mohamed

Received: 29 August 2022  
Accepted: 8 October 2022  
Published: 12 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Definition

Cholestasis is defined as an anatomical or functional blockade to the biliary flow irrespective of the cause and site of obstruction, resulting in the accumulation of bile products in the liver, blood, and other tissues. Biochemically, cholestasis is characterized by increased levels of direct-reacting (conjugated) bilirubin, bile acids or their intermediate metabolites, and other bile compounds. From a histopathological point of view, there is an accumulation of bile pigment in hepatocytes and biliary canaliculi. Cholestasis starting in the first 3 months of life is named Neonatal cholestasis (NC) [1]. NC presents an incidence of 1:2500 live births [2,3]. Jaundice, hypocholic stools, and choloria are features of NC, although anicteric infants or presenting normal stools can present NC. Occasionally, steatorrhea or profuse bleeding can be the first signs of NC [4]. In infants, which present almost colorless urine, choloria does not mean “dark urine” as in cholestatic adults, but instead yellow-colored urine that stains diapers. Cholestasis is defined as a direct serum bilirubin level above 1 mg/dL at a total bilirubin value of up to 5 mg/dL or when the direct fraction is higher than 20% at total bilirubin over 5 mg/dL [5]. In clinical practice, direct bilirubin serum levels of 1 mg/dL or more are sufficiently accurate to indicate

## Anexo II – Certificado de participação na XXXIII Reunião Anual da Sociedade Portuguesa da Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica



### CERTIFICADO

Certifica-se que

Joana Maria Janela Jacinto

Participou como co-autora da intervenção:  
"Colestase neonatal", integrada no programa da  
XXXIII Reunião Anual da Sociedade Portuguesa  
de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica,  
realizada na Casa da Calçada, em Amarante,  
nos dias 25 e 26 de novembro de 2021.



Dr. Jorge Amil Dias | Comissão Organizadora