

Biliary Atresia: Clinical, Diagnostic, Therapeutic and Prognostic Considerations

José Luís Neves Vieira Martins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Medicina

(mestrado integrado)

Orientador: Dr. Jorge Luiz dos Santos

Coorientadora: Dra. Sandra Maria Gonçalves Vieira

abril de 2021

Dedicatória

À memória do meu tio,
Joaquim “O Alfaiate” Neves

Agradecimentos

Ao Dr. Jorge Luiz Santos, por toda a cordialidade e disponibilidade na orientação desta Dissertação, bem como a paixão contagiante pela investigação.

À Dra. Sandra Vieira, pelo conhecimento e ajuda na co-orientação desta Dissertação.

À Faculdade de Ciências da Saúde e a todos aqueles que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

Ao serviço de Gastroenterologia e Hepatologia Pediátricas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil, pela cooperação e partilha de conhecimentos.

À Dra. Michele Claire Breton, pela dedicação, contributo e cooperação na análise de dados.

Ao Prof. Jorge Gama, do Departamento de Matemática da Universidade da Beira Interior, por ter possibilitado a chegada a conclusões pertinentes e fidedignas.

Aos meus pais, exemplos de determinação e integridade que me apoiaram sempre, e por me fazerem acreditar que eu era capaz de alcançar os meus objetivos.

À minha irmã, por estar sempre lá para mim.

À Joana, pela paciência, confiança e por ser o meu alicerce.

Aos meus colegas de casa e amigos, pelo companheirismo e amizade incondicional.

Resumo

A atresia biliar é a causa mais comum de colangiopatia obstrutiva infantil e a indicação mais frequente para transplante hepático na população pediátrica. É uma patologia que se inicia exclusivamente na infância e que se caracteriza por uma obstrução de parte ou da totalidade das vias biliares extra-hepáticas. A portoenterostomia é um procedimento paliativo que visa corrigir o fluxo biliar de bebês diagnosticados com atresia biliar, de modo a possibilitar maior sobrevivência do fígado nativo até à realização, na maioria dos casos, da cirurgia definitiva, o transplante hepático.

Os aspetos que influenciam o prognóstico pós-portoenterostomia (sobrevivência do fígado nativo) incluem fatores corrigíveis e não-corrigíveis. Entre os não-corrigíveis são considerados relevantes os níveis de bilirrubinas aquando da portoenterostomia, a extensão de fibrose e de reação ductular e a forma clínica de apresentação enquanto entre os corrigíveis incluem-se a idade por ocasião do procedimento e a experiência dos centros que investigam e tratam pacientes com a doença. O objetivo desta investigação prendeu-se em estudar e compreender melhor alguns dos fatores acima citados e compreender como estes influenciam a sobrevivência do fígado nativo e em que medida os resultados pós-operativos podem ser otimizados. Para isso, fizemos uma análise retrospectiva, histórica, com registos do acompanhamento clínico até ao fim do estudo descrito nesta tese de um banco de dados histórico recolhido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil, na Unidade de Gastroenterologia e Hepatologia Pediátricas entre 2006 e 2015. Todos os dados foram, aquando da recolha, registados informaticamente com recurso ao software IBM SPSS versão 27, para Windows®. As amostras de fígado foram obtidas e analisadas usando anticorpo monoclonal de camundongo anti-citoqueratina para análise de intensidade da reação ductular, e picrossírius para estudo da extensão da fibrose hepática, bem como a expressão génica de citoqueratina 19 no caso das amostras ultracongeladas.

Os resultados do estudo, que constou apenas de uma análise subjetiva qualitativa devido ao pequeno número de amostras, demonstraram que as características da reação ductular em tecido marcado por imunohistoquímica com anticorpo anti-CK19 e a expressão génica desta mesma molécula, acompanharam a ampliação da área de fibrose hepática no fígado marcado com picrossírius. Ainda assim, não apresentaram diferenças estatísticas significativas nem em relação ao PCK19 nem à expressão génica de CK19. A idade aquando da portoenterostomia também não revelou diferenças significativas no que toca à expressão de CK19.

Em relação à idade aquando da portoenterostomia, quando dividida em faixas etárias, foram encontradas diferenças estatísticas significativas para procedimentos realizados

entre 60-90dias e >90dias. A análise dos dados permitiu concluir que uma portoenterostomia mais precoce aumenta a chance de sobrevivência do fígado nativo.

No momento da portoenterostomia, a medição da bilirrubina total e de reação direta permitiu concluir que pacientes que apresentaram valores mais elevados de bilirrubinas aquando da portoenterostomia tiveram um pior prognóstico no que toca à sobrevivência do fígado nativo. Os pacientes que não conseguiram uma sobrevivência de fígado nativo apresentaram médias de bilirrubina total e direta superiores aos que o conseguiram. Os valores de bilirrubina total e direta decorridos 3 meses da portoenterostomia influenciaram a sobrevivência do fígado nativo, sendo que indivíduos que apresentam valores superiores, tiveram pior prognóstico. Para o nosso estudo, o valor de bilirrubina total influenciou mais o prognóstico do fígado nativo que o valor de bilirrubina direta. Quando avaliamos a bilirrubina total em regressão multivariada, a sua expressão no desfecho do fígado nativo ganhou ainda mais impacto.

Os valores medidos de bilirrubina decorridos 3 meses da portoenterostomia foram o fator prognóstico estudado que mais influenciou a sobrevivência do fígado nativo, e o mais fiável para a sua avaliação.

Palavras-Chave

Atresia biliar, Colestase Neonatal, Histopatologia, Fatores Prognósticos, Idade na Portoenterostomia

Abstract

Biliary atresia is the most common cause of obstructive cholangiopathy in children and the most frequent indication for liver transplantation in the pediatric population. It is a pathology that begins exclusively in childhood and is characterized by complete obstruction of part or all of the extrahepatic bile ducts. Portoenterostomy is a palliative procedure that aims to correct the bile flow in infants diagnosed with biliary atresia, in order to allow a greater survival of the native liver until the definitive surgery, liver transplantation, is performed in most cases.

The aspects that influence post-portoenterostomy prognosis (native liver survival) include both correctable and non-correctable factors. Among the non-correctable factors, bilirubin levels at the time of portoenterostomy, the extent of fibrosis and ductular reaction, and the clinical form of presentation are considered relevant, while correctable ones include age at the time of the procedure and the experience of the centers investigating and treating patients with the disease. The aim of this investigation was to study and better understand some of the above factors and to understand how they influence native liver survival and to what extent post-operative outcomes can be optimized. To do this, we performed a retrospective, historical analysis with records from clinical follow-up to the end of the study described in this thesis of a historical database collected at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, in the Pediatric Gastroenterology and Hepatology service between 2006 and 2015. All data was, at the time of collection, recorded informatically using IBM SPSS version 27, for Windows®. Liver samples were obtained and analyzed using mouse anti-cytokeratin monoclonal antibody to analyze the intensity of the ductular reaction and picrosirius to study the extent of liver fibrosis, as well as the expression of citokeratin in the ultrafrozen samples.

The results of the study, which consisted only of a subjective qualitative analysis due to the small number of samples, showed that the characteristics of the ductular reaction in tissue marked by immunohistochemistry with anti-CK19 antibody and the gene expression of this same molecule, accompanied the enlargement of the area of liver fibrosis in the liver marked with picrosirius. Yet, it showed no statistically significant differences in either PCK19 or CK19 gene expression. Age at portenterostomy also showed no significant differences with respect to CK19 expression.

Regarding age at portoenterostomy, when divided into age groups, statistically significant differences were found for procedures performed between 60-90days and >90days. Data analysis allowed the conclusion that earlier portoenterostomy increases the chance of native liver survival.

At the time of portoenterostomy, measurement of total and direct reaction bilirubin allowed the conclusion that patients who have higher bilirubin values at the time of portoenterostomy have a worse prognosis regarding native liver survival. Patients who did not achieve native liver survival had higher mean total and direct bilirubin values than those who did. Total and direct bilirubin values 3 months after portoenterostomy influenced native liver survival, with individuals with higher measured values having a worse prognosis. For our study, the total bilirubin value influenced the prognosis of the native liver more than the direct bilirubin value. When we evaluated total bilirubin in multivariate regression, its expression on the outcome of native liver gained even more impact.

Measured bilirubin values 3 months after portoenterostomy were the prognostic factor studied that most influenced native liver survival, and the most reliable for its evaluation.

Keywords

Biliary Atresia, Neonatal Cholestasis, Histopathology, Prognostic Factors, Age at Portenterostomy

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Palavras-Chave	viii
Abstract.....	ix
Keywords	x
Lista de Acrónimos e Siglas	xv
Introdução	1
1.Métodos.....	7
1.1. Tipo de Estudo	7
1.2. Participantes e Métodos de Recolha de Dados	8
1.3. Recolha de Material para Revisão Bibliográfica	9
1.4. Análise histopatológica e imunohistoquímica	9
1.5. Análise da expressão génica de CK19	9
1.6. Análise Estatística	10
2.Resultados	13
2.1. Amostra	13
2.2. Relações das variáveis clínico-laboratoriais e histológicas com prognóstico dos pacientes	16
2.2.1. Achados Histopatológicos	16
2.2.2. Expressão génica por RT-PCR de CK19 entre Doentes e Controlo.....	18
2.2.3. Expressão génica de CK19 e Score de Fibrose	19
2.2.4. Expressão génica de CK19 e Faixa Etária.....	20
2.2.5. Influência das Variáveis na Sobrevivência do Fígado Nativo	21
3.Discussão	25
3.1. Doenças Raras	25
3.2. Extensão da Fibrose, Idade e Extensão da Reação Ductular.....	26
3.3. Influência das Variáveis na Sobrevivência do Fígado Nativo	27
3.4. Considerações Finais	30
3.5. Limitações ao Estudo e Perspetivas Futuras	31
Referências	33
Anexos	37

Lista de Tabelas

Tabela 1- Causas de Colestase Neonatal.....	2
Tabela 2 - Procedimentos que Permitem Chegar ao Diagnóstico de Atresia Biliar	4
Tabela 3- Variáveis Estudadas	10
Tabela 4- Análise Descritiva da Variável "Idade PE"	13
Tabela 5- Distribuição dos pacientes com atresia biliar em faixas etárias na ocasião da portoenterostomia.....	13
Tabela 6- Análise Descritiva das Variáveis "BT PE" e "BD PE" medidas nos pacientes com atresia biliar por ocasião da portoenterostomia	14
Tabela 7- Análise Descritiva das Variáveis "BT 90 dias após PE" e "BD 90 dias após PE" ..	14
Tabela 8- Análise Descritiva da Variável da expressão gênica de citoqueratina 19 na amostra de fígado coletada por ocasião da portoenterostomia.....	15
Tabela 9- Influência das Variáveis na Sobrevida do Fígado Nativo (Regressão Cox Univariada).....	21
Tabela 10- Influência das Variáveis na Sobrevida do Fígado Nativo (Regressão Cox multivariada).....	21

Lista de Figuras

Figura 1- (A) Visão Operatória da Atresia Biliar. (B) Portoenterostomia.....	5
Figura 2- Achados histopatológicos dos pacientes em estudo incluindo marcação imunohistoquímica para estudo da reação ductular e histoquímica com picrossírius para avaliação da extensão da fibrose..	17
Figura 3- Relação entre doentes (n=31) e controlo (n=9) com a expressão gênica de CK19	18
Figura 4- Relação da expressão gênica de CK19 analisada e scores de fibrose (n=10).....	19
Figura 5- Relação da expressão gênica de CK19 analisada e as faixas etárias dos pacientes (n=30).....	20
Figura 6- Variação da sobrevivência do fígado nativo ao longo do período de acompanhamento, tomando em consideração a média das covariáveis em estudo	23

Lista de Acrónimos e Siglas

AC	Amostra controlo
ALT	Alanina aminotransferase
ARPKD	Doença renal policística recessiva autossómica
AST	Aspartato aminotransferase
BASM	Malformação Esplénica associada a Biliar Atresia
BD	Bilirrubina de Reação Direta
BRIC1	Colestase intra-hepática benigna recorrente tipo 1
BRIC2	Colestase intra-hepática benigna recorrente tipo 2
BSEP	Bomba de exportação de sal biliar
BT	Bilirrubina Total
CA	Califórnia
CFTR	Regulador Transmembrana de Condutância da Fibrose Cística
CICS-UBI	Centro de Investigação em Ciências da Saúde- Universidade da Beira Interior
CK19	Citoqueratina 19
CK7	Citoqueratina 7
CMV	Citomegalovírus
CPER	Colangiopancreatografia retrógrada endoscópica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiamínico tetraacético
EP	Erro Padrão
EUA	Estados Unidos da América
FS	Score de Fibrose
FXR	Receptor Farnesoid X
GGT	Gama glutamil transferase

HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IgM	Imunoglobulina M
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
PAB	Pacientes com atresia biliar
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Portoenterostomia
PFIC1	Colestase intra-hepática familiar progressiva tipo 1
PFIC2	Colestase intra-hepática familiar progressiva tipo 2
PFIC3	Colestase intra-hepática familiar progressiva tipo 3
PFIC4	Colestase intra-hepática familiar progressiva tipo 4
PFIC5	Colestase intra-hepática familiar progressiva tipo 5
RH	Rácio de Hazard
RNA	Ácido ribonucleico
SFN	Sobrevida do fígado nativo
SPECT	Tomografia computadorizada de emissão monofotônica
TxH	Transplante hepático

Introdução

Colestase é o termo utilizado para descrever os estados patológicos que cursam com a redução do fluxo biliar, por alterações anatómicas ou funcionais do sistema biliar. Consequentemente, os pacientes colestáticos apresentam concentrações séricas elevadas de substâncias habitualmente excretadas na biliar, como bilirrubina conjugada (bilirrubina de ação direta), sais biliares e colesterol, entres outros.(1,2) A icterícia por predomínio de bilirrubina indireta em recém-nascidos é comum e, na maioria das vezes, fisiológica. No entanto, o aumento da bilirrubina direta (>1mg/dL) traduz a presença de doença hepatocelular ou biliar e necessita exploração clínica urgente.(2) Colestase neonatal define-se clinicamente como um quadro de icterícia no recém-nascido, geralmente iniciada nos primeiros 15 dias de vida, mas podendo surgir ao longo dos 3 primeiros meses, acompanhada de colúria (urina que mancha as fraldas de um bebê menor que 3 meses) e graus variados de hipocolia até acolia.(1) Dessa forma, definir se a condição é decorrente do aumento da bilirrubina indireta (associada a fezes e urina de coloração normal) ou da bilirrubina direta (associada a colúria e hipocolia ou acolia) é um passo importante para o diagnóstico diferencial do paciente icterico. O diagnóstico de uma colestase neonatal deve ser considerado em todo bebê que permanecer icterico após 14 dias de vida, devendo ser realizada, obrigatoriamente, em regime de urgência, uma investigação laboratorial inicial constando de dosagem de bilirrubinas séricas, total e de reação direta.(3)

A atresia biliar é a causa mais comum de colestase neonatal e a indicação mais frequente para transplante hepático na população pediátrica.(1,4) É uma patologia que se inicia exclusivamente no período neonatal e que se caracteriza por uma obstrução completa de parte ou da totalidade das vias biliares extra-hepáticas. Esta patologia é a causa mais frequente de colestase neonatal e, do ponto de vista clínico, caracteriza-se por icterícia colestática que inicia nas primeiras semanas de vida, além de hepatomegalia, frequentemente fibrose precoce, acolia e colúria persistentes.(4)

A tabela 1 explica as causas de colestase neonatal. (1,2,4)

Tabela 1- Causas de Colestase Neonatal

CAUSAS INTRA-HEPÁTICAS
<p>A. Hepatite neonatal idiopática – mecanismo desconhecido</p>
<p>B. Transtorno da embriogénese</p> <ol style="list-style-type: none">1. Síndrome de Alagille (genes JAG1 e NOTCH2)2. Malformação da Placa Ductal: ARPKD, ADPLD, doença de Caroli, Síndrome de Joubert com fibrose hepática congénita (Síndrome COACH), Síndrome de Meckel, Displasia renal-hepático-pancreática 1 (gene NPHP3)
<p>C. Transtorno da biossíntese e conjugação dos sais biliares</p> <ol style="list-style-type: none">1. Deficiência de 3-oxo-4-esteroid 5β-reductase2. Deficiência de 3β-hidróxi-5-C27-steroid desidrogenase3. Deficiência de oxisterol 7α-hidroxilase4. Deficiência de LCAT (Hipercolenémia familiar)5. Transtorno funcional da alfa-metilacil-CoA racemase – Defeito congénito da síntese de ácido biliar tipo 4
<p>D. Transtorno do transporte e secreção pela membrana</p> <ol style="list-style-type: none">1. <i>Transtorno da secreção canicular</i><ol style="list-style-type: none">a. Transporte de sais biliares – Deficiência de BSEP<ol style="list-style-type: none">i. Persistente progressiva (PFIC2)ii. Recorrente benigna (BRIC2)b. Transporte de fosfolípidos – Deficiência MDR3 (PFIC3)c. Transporte iónico –Fibrose Cística (CFTR)2. <i>Transtorno das complexos juncionais entre os hepatócitos e os canaliculos biliares</i><ol style="list-style-type: none">a. Anormalidade da proteína do complexo juncional 2 (PFIC4)3. <i>Transtornos complexos ou multiorgânicos</i><ol style="list-style-type: none">a. Deficiência da FIC1 (distúrbio da translocação da fosfatidilserina)<ol style="list-style-type: none">i. Persistente progressiva (PFIC1)ii. Recorrente benigna (BRIC1)b. Colangite esclerosante neonatal com ictiose (gene CLDN1)c. Colangite esclerosante neonatal sem ictiose (gene DCDC2)d. Disfunção artrogripose-renal-colestase (genes VPS33B, VIPAS39)e. Xantomatose cerebrotendinosa (gene CYP27A1)f. Disfunção da glicosilação congénita (ALG 3, ALG 8, GLS1, PMM2, MPI, COG1, COG7, ATP6AP1)g. Disfunção Secundária do metabolismo dos sais biliares: Síndrome de Zellweger, distúrbios dos peroxissomos com envolvimento de mutação do gene PEX e doença de Refsum neonatalh. Disfunção do ciclo de ureia: citrulinemia do tipo II (colestase por deficiência de citrina, gene SLC25A13)i. <i>Outras</i>: hepatopatias mitocondriais (síndrome de depleção mitocondrial, genes dGK, POLG, MPV17) e défice do complexo III (gene BCS1L).
<p>E. Distúrbio funcional dos recetores nucleares dos ácidos biliares</p>

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

F. Doenças hepáticas metabólicas

1. **Transtorno Glandular:** hipotireoidismo, hipopituitarismo
2. **Com envolvimento do trato biliar:** deficiência de α 1-antitripsina (fenótipo Z, gene SERPINA), fibrose cística (Gene Δ F508)
3. **Sem envolvimento do trato biliar:** *Transtorno do metabolismo de hidratos de carbono* (Galactosemia, Intolerância hereditária à frutose, Glicogenose IV, Síndrome de deficiência da glicoproteína dos hidratos de carbono), *Transtorno do metabolismo dos aminoácidos* (Tirosinemia), *Transtorno do metabolismo dos lípidos* (Síndrome de Wolman, Niemann-Pick, Gaucher tipo 2 e doença de Farber)

G. Infecções Congénitas

1. **Parasítica:** Toxoplasmose
2. **Viral:** Rubéola, Citomegalovírus, herpes simples, Vírus hepatotrópicos (A, B e C), HIV, Parvovírus 19, Varicela, Paramixovírus, Sepsis entérica viral (echo-, coxsackie e adenovírus)
3. **Bacteriana:** Sífilis, Sépsis bacteriana, Infecção do trato urinário, Listeriose, Tuberculose

H. Transtornos Imunes

1. Lúpus eritematoso neonatal
2. Hepatite neonatal com anemia hemolítica autoimune
3. Hemocromatose neonatal

I. Associado à nutrição parentérica total

J. Miscelânea

1. Histiocitose X
2. Hepatite fibrosante com leucemia transitória (trissomia 21)
3. Choque e hipoperfusão
4. Asfixia neonatal
5. Associada a obstrução intestinal

CAUSAS EXTRA-HEPÁTICAS

Atresia Biliar

Cisto do Colédoco

Perfuração Espontânea do Ducto Biliar Comum

Barro Biliar

Colelitíase

A diferenciação diagnóstica da atresia biliar de outras causas de colestase neonatal é crítica, porque a intervenção cirúrgica antes dos 60 dias de idade demonstrou melhorar o sucesso cirúrgico e o resultado clínico.(1,4,5) Sem intervenção rápida, a história natural é, na totalidade dos casos, uma fatalidade uniforme secundária a uma doença hepática em fase terminal progressiva, geralmente por volta dos 2 anos de idade.(3,6) Além da obstrução mecânica extra-hepática, a atresia biliar compõe-se de uma colangiopatia intra-hepática crónica e progressiva, cujos mecanismos permanecem ainda não completamente desvendados. Devido à colangiopatia intra-hepática e à fibrogénese intensa e continuada, apesar desobstrução ao fluxo biliar, a quase totalidade, senão a totalidade mesmo, vem a

necessitar de TxH. Assim sendo, considera-se que uma portoenterostomia tem sucesso quando um paciente permanece vivo com seu fígado até aos 2 anos de vida.(1,4,5)

Diversos estudos provaram existir diferentes tipos clínicos de atresia biliar, sugerindo que esta patologia pode ter diferentes etiologias. Assim sendo, as mais relevantes são as que envolvem doentes com síndrome de BASM (Biliary Atresia Splenic Malformation), CMV-IgM positivos no sangue e com alterações císticas num trato biliar previamente obliterado. Se não estivermos perante nenhuma anomalia congénita associada, a atresia biliar denomina-se isolada. (7,8)

A tabela 2 explica os procedimentos que levam ao diagnóstico de atresia biliar.(1,2,4)

Tabela 2 - Procedimentos que Permitem Chegar ao Diagnóstico de Atresia Biliar

Exame Clínico	<ul style="list-style-type: none"> • Anamnese; • Exame físico; • Avaliação de sinais e sintomas de anormalidades sistémicas; • Análise da cor da urina; • Análise da cor das fezes durante 7 dias.
Exame Laboratorial (triagem inicial)	<ul style="list-style-type: none"> • BT, BD, AST, ALT, GGT, fosfatase alcalina.
Exames de Imagem	<ul style="list-style-type: none"> • Ecografia abdominal; • Cintilografia biliar.
Exame Histopatológico (não invasivo)	<ul style="list-style-type: none"> • Biópsia hepática percutânea.
Exame Cirúrgico	<ul style="list-style-type: none"> • Laparotomia exploratória com colangiografia transoperatória.

O exame considerado padrão tem sido a biópsia percutânea, embora, devido à possibilidade de erro em até 10% dos casos (pois Alagille, Fibrose cística, Deficiência de alfa₁-antitripsina e colangite esclerosante neonatal isolada (sem ictiose), podem apresentar “padrão histológico obstrutivo”) seja fundamental a realização da colangiografia trans-operatória, de grande especificidade, ainda que pacientes com a síndrome de Alagille possam apresentar resultados falsos-positivos devido à hipoplasia biliar que ocorre em alguns destes pacientes.(1,2,4)

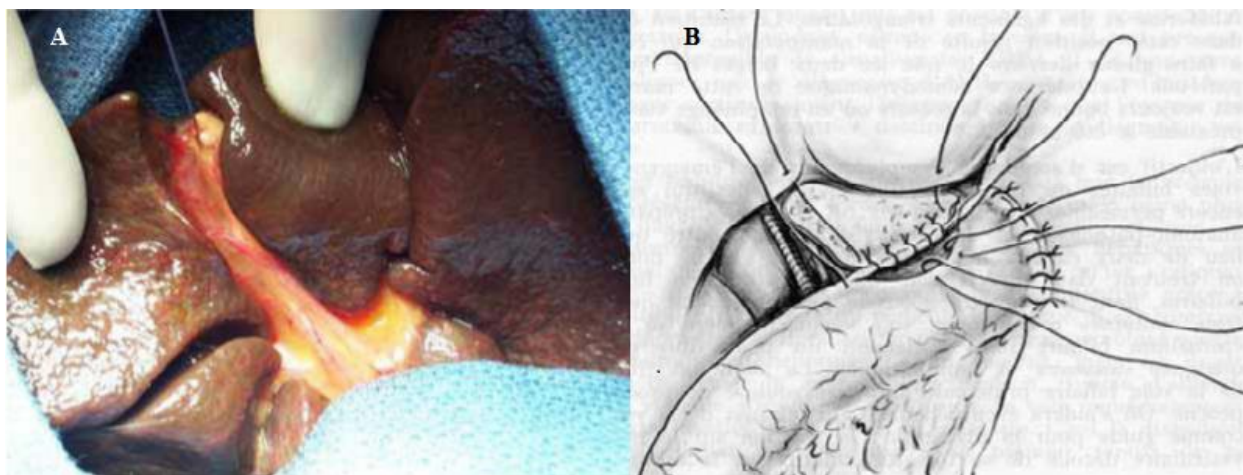


Figura 1- (A) Visão Operatória da Atresia Biliar. (B) Portoenterostomia. Modificado de (9)

Os lactentes são submetidos a uma laparotomia exploradora associada a colangiografia transoperatória que confirmam o diagnóstico e a presença de obstrução ao fluxo biliar, e encaminhados para intervenção cirúrgica, sendo a portoenterostomia utilizada com a finalidade de corrigir o fluxo biliar de bebês diagnosticados com atresia biliar.(1,4)

Os níveis de BT aos 3 meses são considerados como variáveis preditoras do sucesso da portoenterostomia, sendo o valor de 2mg/dL o ponto de corte. (5,6) Assim sendo, os aspetos que influenciam o prognóstico pós-portoenterostomia (sobrevida do fígado nativo) incluem fatores corrigíveis e não-corrigíveis. Entre os não-corrigíveis são considerados relevantes os níveis de bilirrubinas aquando da portoenterostomia, a extensão de fibrose e de reação ductular e a forma clínica de apresentação enquanto entre os corrigíveis incluem-se a idade por ocasião do procedimento e a experiência dos centros que investigam e tratam pacientes com a doença.(1,10)

O objetivo desta investigação prende-se em estudar e compreender melhor alguns dos fatores acima citados e compreender como estes influenciam a sobrevivência do fígado nativo (SFN) e em que medida os resultados pós-operativos podem ser otimizados.

1.Métodos

Tendo como referência o objetivo geral deste estudo – estudar e compreender melhor os fatores que influenciam o prognóstico pós-portoenterostomia e compreender como é que estes afetam a sobrevida do fígado nativo– foi colocada uma questão central: considerando as diversas variáveis que podem afetar a sobrevivência do fígado nativo num paciente com atresia biliar, qual a relevância prognóstica dos fatores idade do lactente aquando da operação, os níveis de bilirrubina pré-operação, bilirrubina pós-operação, extensão de fibrose e extensão da reação ductular sobre os resultados da portoenterostomia de uma amostra de pacientes afetados pela doença.

1.1. Tipo de Estudo

- Observacional – observação da população em estudo e das suas características;
- Retrospectivo – dados recolhidos referentes a um intervalo de tempo no passado;
- Prospetivo – dados dos pacientes recolhidos ao longo do tempo;
- Analítico – análise descritiva das variáveis em estudo, com estabelecimento de comparações entre as mesmas.

1.2. Participantes e Métodos de Recolha de Dados

Este estudo fez uma análise retrospectiva e prospetiva de um banco de dados histórico recolhido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil, na Unidade de Gastroenterologia e Hepatologia Pediátricas. Os indivíduos a ser estudados constituíram uma amostra de conveniência, e devido à raridade das doenças estudadas foi impossível realizar um cálculo amostral. Os dados foram recolhidos em dois momentos: por ocasião da laparotomia exploratória, e prospectivamente ao longo do acompanhamento dos pacientes até o final deste estudo. A recolha inicial ocorreu entre 2006 e 2015, embora os desfechos, nos casos que permanecem vivos e em acompanhamento, tenham sido analisados até o final deste estudo. Além de dados clínicos e laboratoriais, o estudo foi complementado por recolha de amostras de fígado por ocasião da laparotomia exploratória.

Em relação a cada um dos pacientes, os pais ou responsáveis legais assinaram um termo de consentimento informado livre e esclarecido permitindo, além dos exames e procedimentos cirúrgicos, o uso das amostras biológicas e dos dados clínicos e laboratoriais em pesquisas. Parte deste estudo incluiu amostras de fígado parafinizadas e amostras ultracongeladas de fígado que foram facultadas pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação e Banco de Tecidos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para estudos no CICS-UBI, sob a responsabilidade do orientador deste estudo. Salienta-se que o estudo teve início após parecer favorável por parte da Comissão de Ética da Universidade da Beira Interior (anexo 1). Após a aplicação de todos os critérios de inclusão (pacientes com atresia biliar, submetidos à portoenterostomia, acompanhados desde o diagnóstico, acompanhados prospectivamente e cuja colheita de dados foi feita pela Unidade de Gastroenterologia e Hepatologia Pediátrica, do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) e de exclusão (pacientes inicialmente atendidos noutro centro, pacientes cujos responsáveis não deram o consentimento informado para a colheita de dados, pacientes que não fizeram um acompanhamento adequado ao longo do tempo, restantes pacientes que não cumprem com os critérios de inclusão), foi obtida uma amostra de 31 doentes com atresia biliar e 9 pacientes controlo-doentes (pacientes com colestase intra-hepática que necessitaram de realizar laparotomia exploratória para definição diagnóstica). Para garantir confidencialidade e sigilo dos dados, a cada doente com atresia biliar foi atribuído um número (de 1 a 31), tendo a numeração sido atribuída por ordem cronológica da consulta dos registos clínicos.

Todos os dados foram, aquando da recolha, registados informaticamente com recurso ao software IBM SPSS versão 27, para Windows®.

1.3. Recolha de Material para Revisão Bibliográfica

Realizou-se uma exaustiva revisão bibliográfica narrativa, com recurso à base de dados digital PubMed. Foram incluídas nos critérios de pesquisa as publicações em inglês ou espanhol, a partir dos seguintes termos-chave: ((Clinical OR laboratory OR clinical-laboratory OR diagnosis OR “differential diagnosis” OR image OR (ultrasound OR ultrasonography OR sonography) OR tomography OR “magnetic resonance” OR “clinical forms” OR pathogenesis OR etiopathogenesis OR aetiology OR cause OR “animal model” OR “liver biopsy” or histopathology OR histology OR “biliary scintigraphy” OR scintigraphy OR “biliary scan” OR scintiscan OR “biliary scintiscan” OR “Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography” OR MRCP OR “Magnetic Resonance Cholangiopancreatography” OR “Hepatobiliary scintigraphy with SPECT” OR “Single Photon Emission Computed Tomography” OR chromosom OR gene OR genetic OR variants OR (genetic variants) OR environment OR mutation OR epigen OR therapy OR therapeutic OR care OR surgery OR surgic OR portoenterostomy OR hepatoportoenterostomy OR drugs OR phamaco OR medication OR prognosis OR evolution OR “liver transplant” or Kasai OR “native liver” OR survival OR death OR age OR “porta hepatis” OR fibrosis OR cirrhosis OR “medical treatment” OR fibrogenesis OR cirrhogenesis OR fibrosis OR cirrhosis)). A pesquisa foi realizada entre agosto e outubro de 2020, com recurso à plataforma de dados Rayyan, utilizada com o intuito de discriminar os artigos mais relevantes e com alto grau de fidedignidade.

1.4. Análise histopatológica e imunohistoquímica

Amostras de fígado embebidas em parafina foram cortadas em fatias de 5 µm, foram desparafinizadas com xileno e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95% e 70%) e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em tampão EDTA / Tris pH 8,0 em banho-maria por 20 min a 95 °C. Posteriormente, a coloração imuno-histoquímica foi realizada usando o sistema de detecção ABC e realizada no Ventana BenchMark ULTRA usando anticorpo monoclonal de camundongo Anti-Cytokeratin 19 (BA-17, Abcam) na diluição de 1:100. As fatias também foram coradas com Picosirius red (Sigma Aldrich) seguindo as instruções do fabricante, para avaliar a extensão da fibrose.

1.5. Análise da expressão génica de CK19

O RNA total foi extraído dos tecidos hepatobiliares usando AllPrep DNA / RNA / Protein Mini Kit (Qiagen, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A concentração e a pureza do RNA total foram avaliadas usando um espectrofotômetro (NanoFotômetro, Implen).

Para a síntese de cDNA, 1 µg de RNA total foi utilizado para realizar a transcrição reversa usando a NZY M-MuLV Reverse Transcriptase (Nzytech, PT). A PCR em tempo real foi

realizada com primers para o gene da Citoqueratina 19 humana (CK19), de acordo com Stathopoulou et al.(11) A expressão de mRNA foi determinada usando os valores de tempo de ciclo limite (Ct) normalizados para o gene de manutenção, ribossomal 18S. Os resultados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta CT}$ em relação às amostras de controlo.

1.6. Análise Estatística

Para garantir uma melhor organização e mais fácil interpretação dos dados, a análise estatística foi efetuada recorrendo-se ao programa estatístico IBM SPSS versão 27, para Windows® para a criação de diferentes variáveis, como indicado na tabela 3:

Tabela 3- Variáveis Estudadas

Variáveis Clínicas	Idade PE	
	Grupo PE	<60dias
		≥ 60 e ≤ 90 dias
		>90 dias
Sobrevivência do fígado nativo		
Variáveis Laboratoriais e Imunohistoquímicas	BD PE	
	BT PE	
	BD 3 meses após PE	
	BT 3 meses após PE	
	Expressão Génica CK19	
	Quantificação CK19	
	Score de Fibrose	

Relativamente às variáveis estudadas, de referir que:

- “Sobrevivência do fígado nativo” -> número de pacientes que permaneceram com o fígado nativo (vivos, não transplantados) até à data do fim do estudo;
- “BD PE” -> Valor de bilirrubina de reação direta medida na ocasião da portoenterostomia;
- “BT PE” -> Valor de bilirrubina total medida na ocasião da portoenterostomia;
- “BD 3 meses após PE” -> Valor de bilirrubina direta medida 90 dias após a portoenterostomia;
- “BT 3 meses após PE” -> Valor de bilirrubina total medida 90 dias após a portoenterostomia;
- “Expressão Génica CK19” -> Valor de expressão génica de citoqueratina 19, calculado utilizando o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$, em RNA de amostras de fígado dos pacientes;
- “Quantificação CK19” -> Extensão da reação ductular;

- “Score de Fibrose” -> Score de fibrose da amostra segundo Weerasooriya,(12) no qual a fibrose foi definida da seguinte forma: suave (FS1), com fibrose que vai desde a expansão fibrosa portal até à presença de pontes fibrosas envolvendo menos de 50% das vias de portal; moderado (FS2), com pontes fibrosas com mais de 50% das vias de portal envolvido sem arquitetura nodular; e severo(cirrose)(FS3), fibrose de ponte com mais de 50% das vias de portal envolvidos e arquitetura nodular.

Numa primeira instância os dados das variáveis categóricas foram descritos com base na média, no desvio padrão (DP), na mediana, e no valor mínimo e máximo utilizando frequências e percentagens.

A comparação das variáveis “Expressão CK19” entre doentes com atresia biliar e amostra controlo foram realizadas segundo o teste t-student.

A comparação das variáveis “Expressão CK19” com as variáveis “Score de Fibrose” e “Grupo PE” foram realizadas segundo o teste Kruskal-Wallis.

Com regressão de Cox foram obtidos modelos univariados e multivariados para a sobrevivência do fígado nativo durante o tempo de seguimento em 31 crianças. Foram estimados os rácios de Hazard (RH) e os respetivos intervalos de confiança a 95%. As versões ajustadas dos RH foram obtidas com um método de seleção de variáveis *forward*, baseado no rácio de verosimilhanças, com todas as variáveis disponíveis, onde foram considerados os níveis de significância de 5% e 10% para a entrada e exclusão de uma variável do modelo, respetivamente. Antes da obtenção do modelo multivariado foram imputadas duas observações em cada bilirrubina, total e direta, aos 90 dias usando-se como metodologia a regressão linear. A estimativa do RH para a bilirrubina direta, incluída no modelo multivariado, resultou da média dos RH das 5 replicas de imputação consideradas. Para o modelo multivariado foi verificada a não violação do pressuposto da proporcionalidade do rácio de Hazard (por observação dos resíduos de *Schoenfeld*) e a linearidade do *log hazard* para cada variável incluída no modelo (por observação dos resíduos *martingale*). A associação entre a sobrevivência do fígado nativo e cada uma das variáveis disponíveis no estudo foi avaliada pelo teste de Wald.

Todos os testes de hipóteses foram considerados significativos sempre que o respetivo valor de prova (p-value) não excedeu o nível de significância de 5%.

2. Resultados

2.1. Amostra

A recolha consistiu numa colheita retrospectiva de dados dos pacientes com atresia biliar atendidos entre 2006 e 2015, e numa colheita prospetiva de dados destes mesmos pacientes desde a inclusão de cada um deles no estudo até 2020 (fim do estudo). O presente estudo contou com a participação de 40 doentes, dos quais 9 fizeram parte da amostra de controlo-doentes. Dos 31 pacientes com atresia biliar, 18 (58%) eram do sexo feminino e 13 (42%) eram do sexo masculino. Por sua vez, a amostra de controlo era constituída por 3 (33%) doentes do sexo feminino e 6 (67%) doentes do sexo masculino. Terminada a recolha de dados em cada doente, a idade de cada indivíduo variou entre 2 e 141 (62±48) meses.

A tabela 4 apresenta a análise descritiva da idade dos pacientes com atresia biliar por ocasião da portoenterostomia.

Tabela 4- Análise Descritiva da Variável "Idade PE"

		Estadística	Standard Error
Idade PE	Média	65,81	3,61
	Mediana	65,00	
	Desvio Padrão	20,10	
	Valor Mínimo	19	
	Valor Máximo	101	

A tabela 5 apresenta a distribuição dos pacientes com atresia biliar em faixas etárias na ocasião da portoenterostomia. A idade destes doentes variou entre 19 e 101 (66±20) dias.

Tabela 5- Distribuição dos pacientes com atresia biliar em faixas etárias na ocasião da portoenterostomia

		Frequência	Percentagem	Percentagem Cumulativa
Grupo PE	<60 dias	8	41,9	41,9
	≥ 60 and ≤ 90 dias	14	45,2	87,1
	> 90 dias	4	12,9	100,0
	Total	31	100,0	

A tabela 6 apresenta a análise descritiva dos níveis de bilirrubinas séricas (total e de reação direta) medidos por ocasião da portoenterostomia.

Tabela 6- Análise Descritiva das Variáveis "BT PE" e "BD PE" medidas nos pacientes com atresia biliar por ocasião da portoenterostomia

		Estatística	Standard Error
BT PE	Média	12,07	1,76
	Mediana	9,50	
	Desvio Padrão	9,82	
	Valor Mínimo	1,00	
	Valor Máximo	38,20	
BD PE	Média	8,96	1,46
	Mediana	6,60	
	Desvio Padrão	8,11	
	Valor Mínimo	0,40	
	Valor Máximo	31,20	

A tabela 7 apresenta a análise descritiva dos níveis de bilirrubinas séricas medidos 3 meses após a portoenterostomia.

Tabela 7- Análise Descritiva das Variáveis "BT 90 dias após PE" e "BD 90 dias após PE"

		Estatística	Standard Error
BT 3 meses após PE	Média	8,22	1,29
	Mediana	6,40	
	Desvio Padrão	6,93	
	Valor Mínimo	0,50	
	Valor Máximo	25,70	
BD 3 meses após PE	Média	6,21	1
	Mediana	4,90	
	Desvio Padrão	5,41	
	Valor Mínimo	0,10	
	Valor Máximo	21,50	

Relativamente à sobrevivência do fígado nativo, apenas 11 de 31 (35,5%) pacientes com atresia biliar permaneceram vivos e com o fígado nativo até ao final do estudo. Assim sendo, dos 20 doentes com evidência de insuficiência hepática, 13 foram submetidos a TxH pós portoenterostomia, tendo a idade aquando da intervenção destes elementos variado entre 7 e 84 (27±23) meses. Dos doentes submetidos a esta intervenção, 4 de 13 (30,8%) foram

submetidos a cirurgia no primeiro ano de vida, 2 de 13 (15,4%) entre o primeiro e segundo anos de vida e 7 de 13 (53,8%) após os 2 anos de vida.

Foram verificados 4 óbitos de doentes submetidos a TxH, tendo 1 de 4 (25%) falecido no curso do primeiro ano de vida, 1 de 4 (25%) no curso do segundo ano de vida (faleceu entre o primeiro e o segundo ano de vida) e 2 de 4 (50%) após os 2 anos de vida. Foram ainda registados 7 óbitos de doentes não submetidos a TxH, dos quais 6 de 7 (86%) no primeiro ano de vida e 1 de 7 (14%) no segundo ano de vida. Considerando todos os óbitos, a idade aquando do falecimento (média de 17 ± 22) variou entre os 6 e 80 meses de vida.

A tabela 8 apresenta a análise descritiva da expressão génica de citoqueratina 19 por RT-PCR na amostra de fígado coletada por ocasião da portoenterostomia.

Tabela 8- Análise Descritiva da Variável da expressão génica de citoqueratina 19 na amostra de fígado coletada por ocasião da portoenterostomia

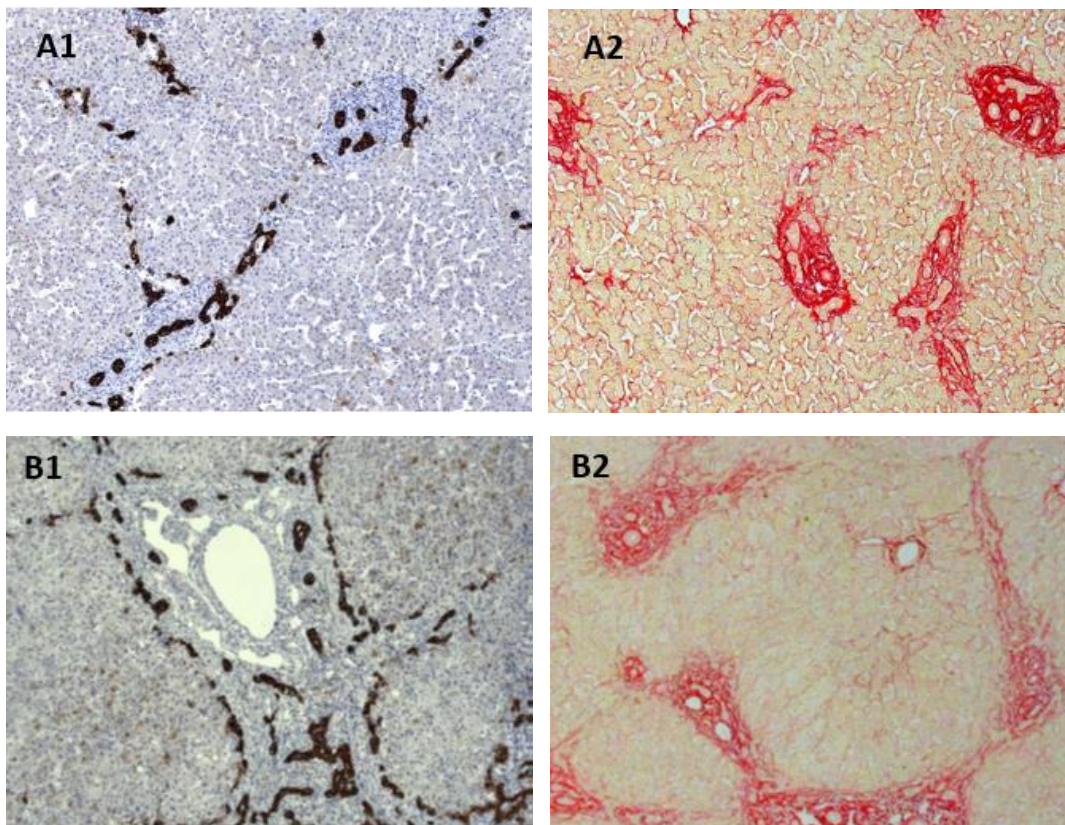
		Estadística	<i>Standard Error</i>
CK19	Média	5,44	2,41
	Desvio Padrão	13,41	
	Valor Mínimo	0,25	
	Valor Máximo	74,44	

Por fim, foram feitas medições de expressão génica da proteína CK19 de modo a aferir se a expressão da se correlaciona com a incidência de atresia biliar. Deste modo, na amostra controlo, a expressão da proteína CK19 variou entre 0,04 e 7,25 e na amostra de doentes com atresia biliar variou entre 0,25 e 74,44, com uma média de $5,44 (\pm 13,41)$.

2.2. Relações das variáveis clínico-laboratoriais e histológicas com prognóstico dos pacientes

2.2.1. Achados Histopatológicos

A figura 2 apresenta os resultados da avaliação da extensão da positividade imunohistoquímica de CK19, do score de fibrose avaliado em material marcado com picrossírius, relacionados com a expressão génica de CK19 e idade por ocasião da portoenterostomia.



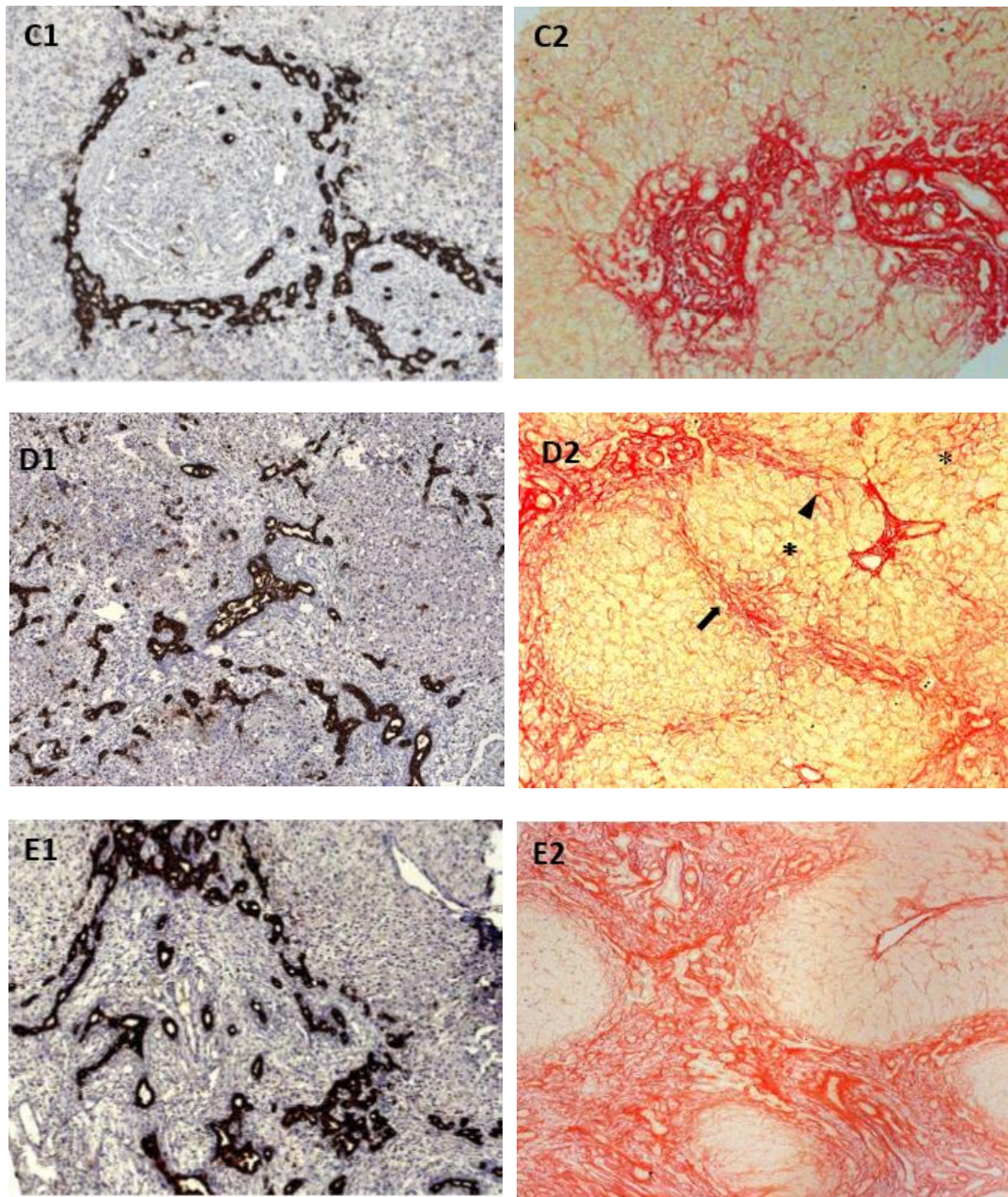


Figura 2- Achados histopatológicos dos pacientes em estudo incluindo marcação imunohistoquímica para estudo da reação ductular e histoquímica com picrossírius para avaliação da extensão da fibrose. A- 48 dias de vida: Expansão portal e reação ductular leve (A1) Pontes fibrosas em menos de 50% dos espaços porta, FS1 (A2). Expressão gênica CK19 = 2,71. B- 68 dias de vida: reação ductular portal e de interface moderada (B1). Pontes fibrosadas em mais de 50% dos espaços porta sem nódulos cirróticos, FS2 (B2). Expressão gênica de CK19 = 3,93. C- 92 dias de vida: Grande expansão portal e intensa reação ductular, com estruturas “semelhantes à Malformação de Placa Ductal” (C1). Pontes fibrosas em mais de 50% dos espaços porta, sem nódulos cirróticos FS2 (C2). Expressão gênica de CK19 = 3,85. D- 58 dias de vida: Grande expansão portal e intensa reação ductular com estruturas semelhantes a mini-placas ductais (D1). Pontes porta-porta em mais de 50% dos espaços porta, com nódulos cirróticos formados por pontes porta-porta (seta) e porta-centro (ponta de seta) (FS3). Expressão gênica CK19 = 6,16. Observar a presença de fibrose sinusoidal (asteriscos). E- 52 dias de vida: Grande expansão portal e intensa reação ductular (E1). Presença de nódulos cirróticos (FS3). Expressão gênica CK19 = 1,52. Magnificação- 100x. Marcação imunohistoquímica com citoqueratina 19 (CK19, imagens à Esquerda) e histoquímica com picrossírius (imagens à Direita).

2.2.2. Expressão génica por RT-PCR de CK19 entre Doentes e Controlo

A figura 3 apresenta a comparação entre doentes de atresia biliar e amostra controlo em relação à expressão génica de citoqueratina 19 no tecido hepático dos pacientes com atresia biliar. Não foram observadas diferenças significativas na comparação entre doentes e controlo em relação à expressão génica de CK19.

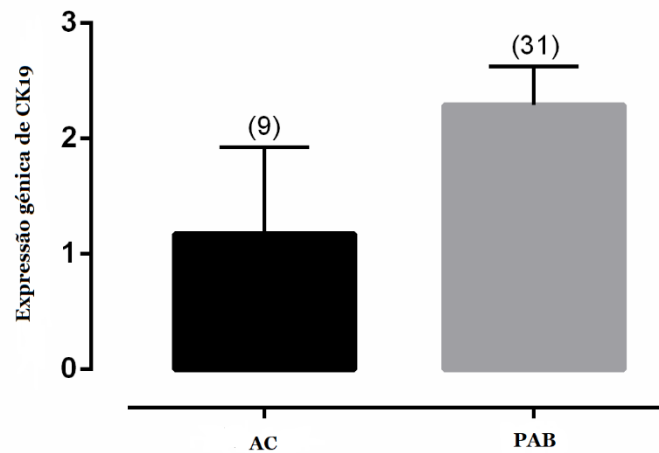


Figura 3- Relação entre doentes (n=31) e controlo (n=9) com a expressão génica de CK19

Abreviaturas- AC: amostra controlo / PAB: pacientes com atresia biliar / Ck19: citoqueratina 19
Estatística- t-student test; p-value=0,089

2.2.3. Expressão gênica de CK19 e Score de Fibrose

A figura 4 apresenta a comparação entre os scores de fibrose em relação à expressão gênica de citoqueratina 19 no tecido hepático dos pacientes com atresia biliar. Não foram observadas diferenças significativas na comparação entre os escores de fibrose em relação à expressão gênica de CK19.

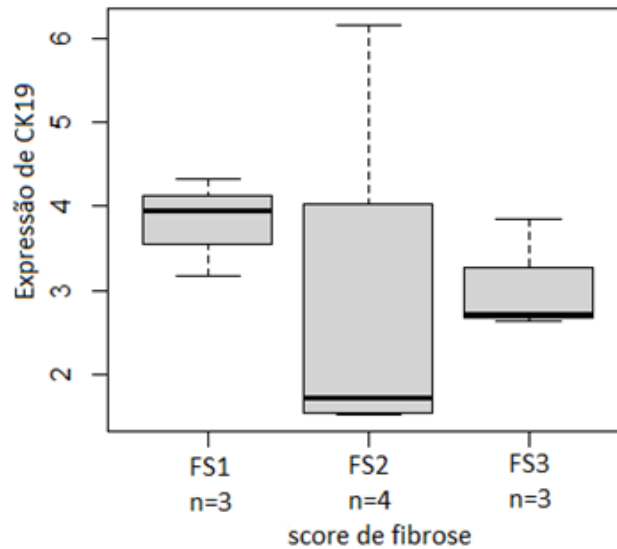


Figura 4- Relação da expressão gênica de CK19 analisada e scores de fibrose (n=10)

Abreviaturas - CK19: citoqueratina 19 / FS: Score de Fibrose

Estatística- Kruskal-Wallis; p-value=0,282

2.2.4. Expressão gênica de CK19 e Faixa Etária

A figura 5 apresenta a comparação entre as faixas etárias em relação à expressão gênica de citoqueratina 19 no tecido hepático de todos os pacientes com atresia biliar. Não foram observadas diferenças significantes na comparação entre as faixas etárias em relação à expressão gênica de CK19.

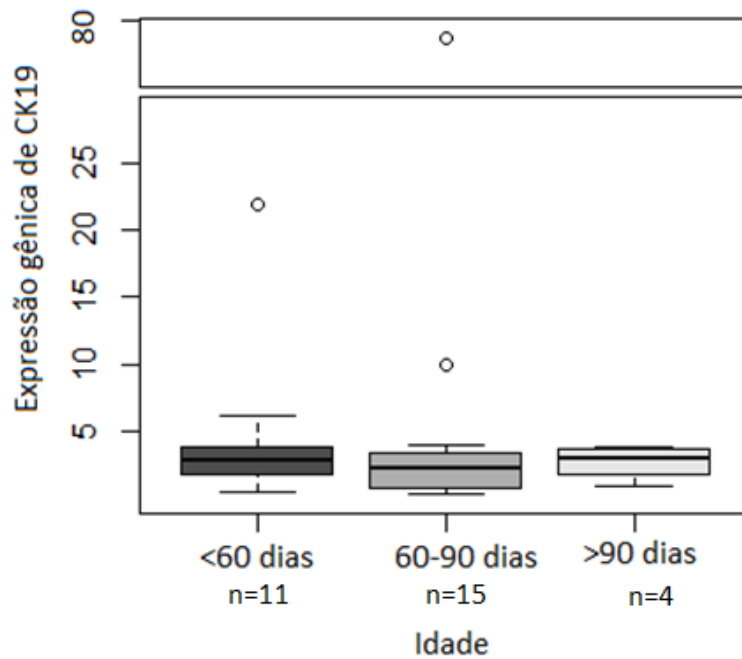


Figura 5- Relação da expressão gênica de CK19 analisada e as faixas etárias dos pacientes (n=30)

Abreviaturas- CK19: citoqueratina 19

Estatística- Kruskal-Wallis; p-value=0,283

2.2.5. Influência das Variáveis na Sobrevida do Fígado Nativo

As tabelas abaixo dividem a amostra de pacientes com atresia biliar em dois grupos: manutenção ou perda do fígado nativo durante o período de seguimento. Com a finalidade de identificar as variáveis associadas à sobrevida do fígado nativo, foram obtidos pela regressão de Cox modelos univariados (tabela 9) e multivariados (tabela 10).

Tabela 9- Influência das Variáveis na Sobrevida do Fígado Nativo (Regressão Cox Univariada)

Variáveis	Sobrevida do Fígado Nativo		RH (95% CI)	P ^a
	Não n=19	Sim n=12		
Idade PE (dias) Média±DP Mediana (min; max)	68,6±21,2 65 (19; 101)	61,3±18,1 65 (32; 90)	1,02 (0,99; 1,05)	0,200
Grupo PE (n) (%) ≤ 60 dias 61-90 dias >90 dias	8 (42,1) 7 (36,8) 4 (21,1)	5 (41,7) 7 (58,3) 0 (0,0)	0,26 (0,08; 0,91) 0,22 (0,06; 0,78) 1	0,051 0,035 0,020
BT PE Média±DP Mediana (min; max)	14,3±11,5 9,8 (1,0; 38,2)	8,5±4,9 8,3 (1,1; 18,2)	1,07 (1,01; 1,13)	0,019
BD PE Média±DP Mediana (min; max)	10,9±9,6 7,1 (0,4; 31,2)	5,8±3,5 5,3 (0,4; 12,8)	1,09 (1,02; 1,15)	0,008
BT 3 meses após PE Média±DP Mediana (min; max)	n=18 11,2±7,0 9,3 (2,2; 25,7)	n=11 3,4±3,1 1,4 (0,5; 9,4)	1,28 (1,14; 1,43)	<0,001
BD 3 meses após PE Média±DP Mediana (min; max)	n=18 8,5±5,4 7,2 (2,1; 21,5)	n=11 2,4±2,6 1,1 (0,1; 7,8)	1,40 (1,20; 1,64)	<0,001
Expressão CK19 Média±DP Mediana (min; max)	6,38±16,64 2,59 (0,37; 74,44)	3,95±5,80 2,62 (0,25; 21,90)	1,02 (0,99; 1,06)	0,143

Abreviaturas- PE: portoenterostomia / BT: bilirrubina total / BD: bilirrubina de ação direta / CK19: citoqueratina 19 / DP: desvio-padrão / min: valor mínimo / max: valor máximo / RH: rácio de Hazard Estática- ^a Wald test

Tabela 10- Influência das Variáveis na Sobrevida do Fígado Nativo (Regressão Cox multivariada)

Variáveis	Sobrevida do Fígado Nativo		RH (95% CI)	P ^a
	Não n=18	Sim N=11		
BT 3 meses após PE Média±DP Mediana (min; max)	8,5±5,4 7,2 (2,1; 21,5)	2,4±2,6 1,1 (0,1; 7,8)	1,45 (1,24; 1,70) ^b	<0,001 ^b

Abreviaturas- PE: portoenterostomia / BT: bilirrubina total / BD: bilirrubina de ação direta / CK19: citoqueratina 19 Estática- ^a Wald test Likelihood ratio; ^b estimado após imputação de dados

Para a regressão univariada, 19 (61,3%) doentes conseguiram sobrevivência do fígado nativo, no entanto 12 (38,7%) doentes não o conseguiram. A exceção prende-se na medição da depuração da bilirrubina 90 dias após a PE, na qual só foram obtidas avaliações de 29 doentes.

A média de idade aquando da PE para os dois grupos (“sim” e “não”) foi de $61,3 \pm 18,1$ dias de vida e $68,6 \pm 21,2$ dias de vida, respetivamente. Analisada a idade aquando da portoenterostomia, não se verificaram diferenças estatísticas significativas entre grupos (p-value=0,200), sendo que o RH teve um valor de 1,02 (0,99; 1,05). No entanto, dividindo esta variável em faixas etárias (“Grupo PE”), foi verificado que para idades compreendidas entre “60-90 dias” (p-value=0,035) e “>90 dias” (p-value=0,020), existiram diferenças estatísticas entre grupos no que toca à sobrevivência do fígado nativo. Por sua vez, para o grupo “<60 dias” (p-value=0,051) não alcançou um valor estatístico significativo. Relativamente ao Ratio Hazard, foi verificado que comparativamente ao grupo “<60 dias” [RH=0,26(0,08;0,91)] e “60-90 dias” [RH=0,22(0,06;0,78)], os doentes que se inserem no grupo “>90 dias” tiveram um RH superior, fixado em 1.

No que toca ao valor de bilirrubina direta (“BD PE”) e de bilirrubina total (“BT PE”) mensuradas no momento da PE, foi possível verificar que a média dos valores medidos foi superior para indivíduos que não conseguiram sobrevivência do fígado nativo ($14,3 \pm 11,5$ mg/dL para a variável “BT PE”, $10,9 \pm 9,6$ mg/dL para “BD PE”) relativamente aos que o conseguiram ($8,5 \pm 4,9$ mg/dL para a variável “BT PE”, $5,8 \pm 3,5$ mg/dL para “BD PE”). Para ambas as variáveis foram alcançadas diferenças estatísticas significativas, sendo que o Ratio de Hazard da variável “BT PE” (p-value=0,019) foi de 1,07 (1,01; 1,13) e da variável “BD PE” (p-value=0,008) foi de 1,09 (1,02; 1,15).

Estes parâmetros foram avaliados novamente decorridos 3 meses da PE. Para as variáveis “BT 3 meses após PE” e “BD 3 meses após PE”, foram obtidas medições de apenas 29 doentes (n=29), dos quais apenas 11 (37,9%) mantiveram sobrevivência do fígado nativo. Mais uma vez, a média dos valores medidos foi maior nos indivíduos que não conseguiram sobrevivência do fígado nativo ($11,2 \pm 7,0$ mg/dL para a variável “BT 3 meses após PE”, $8,5 \pm 5,4$ mg/dL para “BD 3 meses após PE”) relativamente aos indivíduos com sobrevivência do fígado nativo ($3,4 \pm 3,1$ mg/dL para a variável “BT 3 meses após PE”, $2,4 \pm 2,6$ mg/dL para “BD 3 meses após PE”). Foram verificadas diferenças estatísticas significativas para ambas as variáveis no cálculo univariado, com p-value<0,001. O valor médio do Ratio de Hazard da variável “BT 3 meses após PE” foi de 1,28 (1,14; 1,43) e da variável “BD 3 meses após PE” foi de 1,40 (1,20; 1,64). Em análise multivariada, a variável “BT 3 meses após PE” apresentou identicamente diferenças estatísticas significativas (p-value<0,001), sendo que após imputação de dados o Rácio de Hazard medido foi de 1,45 (1,24; 1,70).

A figura 6 apresenta a variação da sobrevivência do fígado nativo dos pacientes com atresia biliar durante 125 dias.

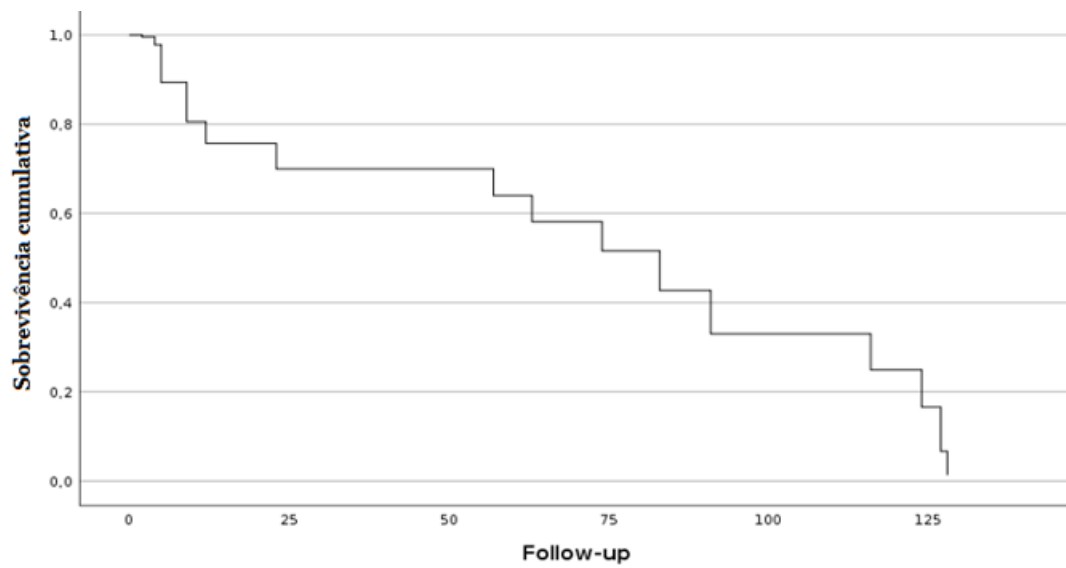


Figura 6- Variação da sobrevivência do fígado nativo ao longo do período de acompanhamento, tomando em consideração a média das covariáveis em estudo

Estatística: Regressão Cox

3. Discussão

3.1. Doenças Raras

O termo "doença rara" é utilizado para identificar qualquer doença que afete uma pequena percentagem da população e que seja frequentemente debilitante.(13) Existem aproximadamente 6.000 a 8.000 doenças raras a nível mundial.(13) A maioria das doenças estão associadas a doenças genéticas e permanecem subvalorizadas porque muitos profissionais de saúde não reconhecem os sintomas ou, em alguns casos, os doentes não estão informados dos meios adequados para o tratamento.(14) Diversos estudos têm demonstrado que algumas doenças raras têm um efeito mais nocivo na qualidade de vida relacionada com a saúde do que outras doenças graves.(13) Assim sendo, embora uma doença rara isolada tenha uma frequência baixa na população, as doenças raras como grupo, são numericamente relevantes entre as enfermidades humanas, representando enorme desafio diagnóstico e terapêutico.(9) Os doentes com doenças raras caracterizam-se pela singularidade da sua doença, sendo que na Europa uma doença é considerada rara quando a sua incidência é igual ou inferior a 5/10000 habitantes.(15) A atresia biliar tem uma incidência de cerca de 1/18000 nascimentos vivos na Europa Ocidental, tornando-a assim parte deste grupo. No mundo, o valor de incidência relatada varia de 5/100.000 a 32/100.000 nados vivos.(9) Estes valores são semelhantes para doentes com colestase neonatal extra-hepática de outras causas. Assim sendo, estas doenças são difíceis de diagnosticar devido às suas apresentações heterogêneas e variáveis bem como à falta de dados da população local relativos às mesmas.(15) Além disso, uma falta de especialização e de serviços de apoio laboratorial resulta muitas vezes em diagnósticos errados, bem como em atrasos diagnósticos de doenças raras.(13) Um estudo provou que estes doentes estão mal representados nas nomenclaturas médicas utilizadas nos sistemas de informação médica, o que dificulta a identificação dos participantes na investigação clínica dos registos médicos e torna a sua análise estatística difícil.(15) O nosso estudo recolheu dados unicamente de um banco de dados histórico (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil, na Unidade de Gastroenterologia e Hepatologia Pediátricas). Os indivíduos estudados constituíram uma amostra de conveniência, e devido à raridade da doença estudada, o estudo foi feito independentemente de realizar um cálculo amostral. Por conseguinte, o desenho do nosso estudo dificultou a chegada a conclusões consistentes com a teoria, devido ao reduzido número de amostras (n=31), sem impedir, contudo, que alguns achados relevantes fossem detetados.

3.2. Extensão da Fibrose, Idade e Extensão da Reação Ductular

O grau de extensão de fibrose é visto por muitos autores como um fator prognóstico tão ou mais importante que a idade aquando da portoenterostomia.(16) A extensão da fibrose deste estudo foi calculada utilizando o Score de Fibrose desenvolvido por Weerasooriya et al(12) especificamente para a atresia biliar.

A relação entre os danos dos canais biliares e a fibrose portal nas doenças crónicas do fígado permanece pouco compreendida.(17–19) A placa ductal é uma estrutura embrionária fulcral no desenvolvimento dos ductos biliares intra-hepáticos, sendo que a sua remodelagem e a organização em ductos biliares maduros configuram etapas imprescindíveis neste processo. Pensa-se que a malformação da placa ductal, que ocorre entre as 11 e 13 semanas de gestação, e conseqüente processo regenerativo hepatobiliar, seja uma das explicações para a incidência de atresia biliar, apesar de tal não ter sido comprovado.(20)

A colestase é geralmente acompanhada por um aumento das condutas biliares na interface com o parênquima - a chamada reação ductular - que, por sua vez, se pensa ser um condutor para a fibrose.(19) A reação ductular é caracterizada por uma proliferação de colangiócitos, os quais podem ser marcados por imunohistoquímica com CK7 e CK19.(21) Por sua vez, a fibrose é caracterizada pela deposição de colágeno fibrilar no tecido hepático, sendo a avaliação histológica dos estágios progressivos de fibrose feita por marcação histoquímica do colágeno fibrilar com um corante chamado picrossírius, entre outros marcadores.(17) Embora as causas da cirrose hepática sejam multifatoriais, existem algumas características patológicas comuns a todos os casos de cirrose hepática, incluindo degeneração dos hepatócitos e ductulos, e substituição do parênquima hepático por tecidos fibróticos e nódulos regenerativos, e perda da função hepática.(22)Um estudo em modelo animal observou a progressão da reação ductular em paralelo com a de fibrose.(16) A reação ductular provoca uma proliferação de células bipotenciais a partir do compartimento das células progenitoras hepáticas, mas também de células que originam macrófagos, angioblastos e precursores de células produtoras de colágeno, afetando a irrigação sanguínea das estruturas biliares e promovendo a fibrose. (17,18)

Na figura 2, conseguimos facilmente aferir que o aumento da expressão de CK19 é acompanhado por níveis crescentes de fibrose. No entanto, a progressão temporal da fibrogénese desencadeia cirrose, a qual envolve perda de tecido hepatobiliar, cicatrização tecidual e desarranjo da irrigação sanguínea. Ao longo do tempo, isto leva a uma rarefação dos ductos biliares interlobulares (*vanishing bile ducts*). (12,23) Esta destruição pode explicar o facto da lâmina E1 (figura 2) apresentar uma menor expressão de CK19, apesar de ter um grau de fibrose maior relativamente às outras imagens, já que existem menos tecido e estruturas

biliares que possam expressar esta citoqueratina. Em relação à atresia biliar, investigadores não conseguiram encontrar uma correlação entre a incidência da atresia biliar e uma maior expressão gênica de CK19.(24) A nossa investigação não encontrou diferenças significativas entre controlo e pacientes com atresia biliar (figura 3). Devido ao pequeno número de amostras, e não havendo significâncias estatísticas, a figura 2 teve como papel uma demonstração visual subjetiva da relação entre reação ductular, expressão gênica de CK19 e extensão da fibrose.

Estudos sugerem uma relação entre a idade na portoenterostomia e grau de lesão hepática e/ou fibrose.(25) Outro estudo afirma que embora a presença de fibrose avançada fosse um preditor de PE malsucedida isoladamente, ele não alcançou significado estatístico em análise com outras variáveis tal como a idade,(26) conclusões apoiadas por outros autores.(12) A nossa investigação não conseguiu encontrar diferenças estatísticas significativas para diferentes faixas etárias no que toca à expressão gênica da CK19.

3.3. Influência das Variáveis na Sobrevivência do Fígado Nativo

Muitos estudos têm sido realizados para determinar os fatores que podem influenciar os resultados cirúrgicos, e muito foi dada atenção à idade na altura da operação, que foi relatada como um fator prognóstico determinante na SFN.(27) Diversos autores afirmam que a intervenção cirúrgica antes dos 60 dias de idade demonstrou melhorar o sucesso cirúrgico e o resultado clínico.(1,4,5) Por outro lado, outro estudo observou resultados semelhantes entre grupos de doentes submetidos a PE em diferentes idades, até 90 dias.(28) Shinkai et al. (29) relataram ainda que a idade na operação não teve qualquer efeito significativo no prognóstico a curto ou longo prazo após a portoenterostomia. O nosso estudo explorou assim de que forma esta variável poderia ter influência no desfecho clínico destes doentes. Aproveitando os dados recolhidos, fizemos também uma comparação entre a expressão gênica de CK19 (um assunto pouco explorado neste nicho de investigação) e medições de bilirrubina com estes desfechos.

Investigadores brasileiros verificaram que a sobrevivência dos doentes 4 anos pós-portoenterostomia, com ou sem TxH, foi inversamente correlacionada à idade no momento da portoenterostomia (80%, 77,7%, 60,5% de sobrevivência de fígado nativo nos 4 primeiros anos de vida para <60, 60-90, >90 dias de vida no momento da portoenterostomia, respectivamente). (30) A nossa investigação não encontrou diferenças estatísticas significativas entre grupos para a variável “Idade PE (dias)” (p-value=0,200). No entanto, a divisão da amostra em 3 faixas etárias permitiu chegar a resultados estatisticamente significativos para “61-90 dias” e “>90dias”. Lykavieris et al. relataram que a taxa de sobrevivência do fígado nativo foi significativamente melhor em doentes cuja idade foi ≤90

dias no momento da cirurgia, ainda que menos de 18 % dos doentes na sua amostra que foram tratados com portoenterostomia evitaram o transplante de fígado.(31) Outro estudo referiu que a sobrevivência de 4 anos com fígado nativo foi de 36,8%, inversamente correlacionada à idade no momento da portoenterostomia (sobrevivência em 54%, 33,3%, 26,6% dos casos para <60, 60-90, >90 dias, respectivamente).(30) Ainda neste âmbito, outros investigadores constataram que embora a SFN a 2 anos fosse melhor em crianças submetidas a PE numa idade mais nova, a diferença não era significativa.(26) Analisando o RH para as diferentes faixas etárias verificamos que a chance de não sobrevivência do fígado nativo no tempo de seguimento diminuiu quando a PE foi efetuada com <60 dias [RH=0,26(0,08;0,91)] ou 60-90 dias [RH=0,22(0,06;0,78)], comparativamente a mais de 90 dias (RH=1). Deste modo podemos afirmar com os dados que uma PE mais precoce aumenta a chance de sobrevivência do fígado nativo, pelo menos quando comparada com a classe >90 dias.

As indicações para transplante em pacientes com atresia biliar pós-PE incluem: cirrose hepática, insuficiência hepática, hemorragia gastrointestinal devido a hipertensão portal, retardamento do crescimento, prurido, síndrome hepatopulmonar e colangite, quer isoladamente, quer em combinação. Um estudo concluiu que no seguimento pós-portoenterostomia a maioria dos pacientes com atresia biliar requerem transplante hepático, independentemente da idade da cirurgia, mesmo após um procedimento bem-sucedido.(28,32) De facto, existem estudos que insistem que a seleção da portoenterostomia contra o transplante de fígado não deve ser decidido com base na idade de um paciente.(33) Em relação à necessidade de transplante na nossa amostra, apenas 11 de 31 (35,5%) doentes conseguiram manter-se vivos com o fígado nativo após PE. Assim sendo, dos 20 doentes sem atividade hepática viável, 13 foram submetidos a transplante hepático pós-portoenterostomia, tendo a idade aquando da intervenção destes elementos variado entre 7 e 84 (27±23) meses. Dos doentes submetidos a esta intervenção, 4 de 13 (30,8%) foram submetidos a cirurgia no primeiro ano de vida, 2 de 13 (15,4%) entre o primeiro e segundo anos de vida e 7 de 13 (53,8%) após os 2 anos de vida.

Outro fator prognóstico muito abordado na literatura é a eliminação da icterícia no pós-operatório. O sucesso da portoenterostomia é medido pela eliminação da icterícia e definido como a obtenção de uma concentração normal de bilirrubina (<2mg/dL) após 6 meses da cirurgia,(5) alguns autores considerando 3 meses,(6,28) período aparentemente (após análise bibliográfica (6,28)) mais plausível. Alguns estudos verificaram ausência de relação significativa entre a idade na portoenterostomia e a depuração de icterícia pós-operatória,(33) outros o contrário,(34) pelo que esta variável gera alguma discórdia no que toca ao prognóstico pós-portoenterostomia. Os dados apoiam, contudo, relatórios anteriores que mostram que o nível total de bilirrubina de 2mg/dL a 3 meses pós-PE é preditivo da

necessidade de transplante hepático.(28) O nosso estudo prendeu-se não só no estudo da depuração da icterícia, mas também na medição da bilirrubina total e bilirrubina direta no momento da portoenterostomia, de modo a aferir se os parâmetros laboratoriais no momento da cirurgia influenciam o desfecho do fígado nativo. Assim sendo, no momento da portoenterostomia, a análise das medições de bilirrubina direta (p-value=0,008) e bilirrubina total (p-value=0,019) permitiu afirmar que existem diferenças estatísticas significativas entre grupos em relação à sobrevivência do fígado nativo. O HR de “BD PE” [1,09 (1,02; 1,15)] e “BT PE” [1,07 (1,01; 1,13)] permitiu concluir que pacientes que apresentam valores de bilirrubina superiores aquando da portoenterostomia têm, ainda que ligeiramente, um pior prognóstico no que toca à sobrevivência do fígado nativo. De facto, os pacientes que não conseguiram uma sobrevivência de fígado nativo apresentam médias de BT e BD superiores aos que o conseguiram. Em relação à medição posterior destes parâmetros, completados 90 dias pós-portoenterostomia, verificamos que existem diferenças significativas entre grupos, tanto para “BT 90 dias após PE” (p-value<0,001) e “BD 90 dias após PE” (p-value<0,001), em modelos de regressão univariados e multivariados. Para o modelo univariado, os valores de RH de “BT 90 dias após PE” e “BD 90 dias após PE” foram 1,28 (1,14; 1,43) e 1,40 (1,20; 1,64), respetivamente. Quando consideramos a “BT 90 dias após PE” para regressão multivariada, este valor ascende para valores médios de 1,45 (1,24; 1,70). Deste modo, para a regressão univariada, os valores de bilirrubina total e direta influenciam a sobrevivência do fígado nativo, sendo que indivíduos que apresentam valores mensurados superiores, têm pior prognóstico. Para o nosso estudo, o valor de BD parece influenciar mais o prognóstico do fígado nativo que o valor de BT. Quando avaliamos a BT em regressão multivariada, a sua expressão no desfecho do fígado nativo ganha ainda mais impacto, algo que seria naturalmente expectável. É de salientar ainda que, para a nossa investigação, os valores mensurados de BT e BD decorridos 90 dias da portoenterostomia são o factor prognóstico estudado que mais influencia a sobrevivência do fígado nativo, e as mais fiáveis para a sua avaliação.

A expressão génica de CK19 no fígado colhido na PE não pareceu relacionar-se aos desfechos que constituem a SFN, sendo que não se observaram diferenças significativas entre grupos. Uma possível explicação para isto é que a presença de cirrose, que se desencadeou por sinalização da reação ductular e que pode relacionar-se com desaparecimento progressivo das estruturas biliares devido à fibrogénese, como mencionado anteriormente.

3.4. Considerações Finais

A nossa investigação tinha como objetivo alargar o espectro de conhecimentos sobre o prognóstico da atresia biliar, e como finalidade otimizar os fatores corrigíveis da atresia biliar. Para tal, todos os procedimentos e análises foram realizados com o maior rigor e compromisso no desenvolver desta temática. Tendo em atenção os objetivos delineados enumeram-se, de seguida, os pontos de maior interesse.

Relativamente à fibrose como fator prognóstico na portoenterostomia, os achados histopatológicos dos pacientes em estudo (incluindo marcação imunohistoquímica para estudo da reação ductular e histoquímica com picrossírius para avaliação da extensão da fibrose) verificaram que consoante o grau de fibrose aumenta, os ductulos hepáticos expressam cada vez mais citoqueratina 19 (A-48 dias, FS1, expressão génica CK19 = 2,71/B-FS2, expressão génica CK19 = 3,93/ C-FS2, Expressão génica CK19 = 3,85/D-FS3, Expressão génica CK19 = 6,16). A exceção prende-se com a amostra representativa de cirrose avançada, cuja expressão de CK19 diminui (E- FS3, expressão génica CK19-1,52). Ainda assim, a nossa amostra verificou que o grau de fibrose não apresenta diferenças estatísticas significativas em relação à expressão génica de CK19. Para essa mesma amostra, apesar dos pacientes submetidos a portoenterostomia mais cedo (<60dias) apresentarem um maior valor de expressão génica de CK19 (=3,83), os cálculos estatísticos não revelaram diferenças entre grupos etários.

Em relação à idade aquando da portoenterostomia, a análise comparativa com toda a amostra (n=31), não apresentou diferenças significativas entre grupos, quando avaliada globalmente. No entanto, quando dividida em faixas etárias, foram encontradas diferenças estatísticas significativas para “60-90dias” e “>90dias”, com valores médios de RH de 0,22 e 1, respetivamente. Analisando o RH para as diferentes faixas etárias verificamos que a chance de não sobrevivência do fígado nativo no tempo de seguimento diminuiu quando a PE foi efetuada com <60 dias [RH=0,26(0,08;0,91)] ou 60-90 dias [RH=0,22(0,06;0,78)], comparativamente a mais de 90 dias (RH=1). Deste modo podemos concluir com os dados que uma PE mais precoce aumenta a chance de sobrevivência do fígado nativo, pelo menos quando comparada com a classe >90 dias.

A mensuração da BT e BD permitiu concluir que no momento da portoenterostomia, a análise das medições de “BD PE” e “BT PE” apresentam diferenças estatísticas significativas entre grupos em relação à sobrevivência do fígado nativo. O HR de “BD PE” [1,09 (1,02; 1,15)] e “BT PE” [1,07 (1,01; 1,13)] permitiu epilogar que pacientes que apresentam valores de bilirrubina superiores aquando da portoenterostomia têm, ainda que ligeiramente, um pior prognóstico no que toca à sobrevivência do fígado nativo. Os pacientes que não conseguiram

uma sobrevivência de fígado nativo apresentaram médias de BT e BD superiores aos que o conseguiram. Em relação à medição posterior destes parâmetros, completados 3 meses pós-portoenterostomia, verificamos que existem diferenças significativas entre grupos, tanto para “BT 90 dias após PE” e “BD 90 dias após PE”, em modelos de regressão univariados e multivariados. Para o modelo univariado, os valores de RH de “BT 90 dias após PE” e “BD 90 dias após PE” foram 1,28 (1,14; 1,43) e 1,40 (1,20; 1,64), respetivamente. Quando consideramos a “BT 90 dias após PE” para regressão multivariada, este valor ascende para valores médios de 1,45 (1,24; 1,70). Deste modo, para a regressão univariada, os valores de bilirrubina total e direta influenciam a sobrevivência do fígado nativo, sendo que indivíduos que apresentam valores mensurados superiores, têm pior prognóstico. Para o nosso estudo, o valor de BT parece influenciar mais o prognóstico do fígado nativo que o valor de BD. Quando avaliamos a BT em regressão multivariada, a sua expressão no desfecho do fígado nativo ganha ainda mais impacto.

Finalmente, no estudo da expressão génica de CK19 na amostra total (n=31), a média de expressão génica da citoqueratina 19 foi superior em indivíduos sem sobrevivência do fígado nativo (6,38±16,64), ainda assim sem diferenças estatísticas consideráveis, o que não permite concluir que esta variável tenha uma influência significativa no prognóstico do fígado nativo.

Para o nosso estudo, os factores que inequivocamente afetaram a sobrevivência do fígado nativo foram a idade no momento da portoenterostomia e valores medidos de BD e BT no momento da portoenterostomia e decorridos 3 meses pós-portoenterostomia. É de salientar que os valores mensurados de BT e BD decorridos 3 meses da portoenterostomia foram o factor prognóstico estudado que mais influenciou a sobrevivência do fígado nativo, e o mais fiável para a sua avaliação. Estas medições são exames custo-eficientes que podem ser aplicados para otimizar os resultados pós-portoenterostomia.

3.5. Limitações ao Estudo e Perspetivas Futuras

Tendo em consideração alguns resultados obtidos inconsistentes com estudos de maior envergadura já realizados, parece pertinente alertar para alguns possíveis vieses que poderão ter condicionado as conclusões obtidas por este estudo.

A atresia biliar é uma doença rara cujos estudos ainda estão numa fase de constante evolução e descoberta. A nossa amostra é, tal como na maioria dos estudos de doenças raras, muito reduzida. A análise estatística foi por isso o maior desafio desta dissertação, tendo requerido diversas reformulações de modo a obter resultados consistentes e fidedignos. À partida, quanto maior o número de registos clínicos, mais fiáveis seriam as conclusões retiradas. Posto isto, parecerá pertinente dar continuidade a estudos desta natureza de forma

a aprimorar as linhas de detecção e orientação dos doentes com atresia biliar e, dessa forma, minimizar os impactos associados à morbimortalidade desta patologia.

Que a leitura desta dissertação seja um incentivo a jovens investigadores de explorar esta área, e das doenças raras em geral. Aceitei este desafio porque este nicho de investigação merece e deve ser levado em conta pela comunidade científica. Este tipo de investigação é a mais difícil, porque não sabemos exatamente o que vamos encontrar, quão complexo será e quão variável é. Por isso, às vezes, é um pouco frustrante. Mas também é o tipo de pesquisa mais apaixonante que há. Todos os achados são como se fossem uma pedra que compõe um muro: umas menores, outras maiores, mas nenhuma menos importante que a outra. A ciência requer de nós paciência, persistência e muita paixão pelo que se faz.

Referências

1. Santos JL, Silveira TR. Atresia biliar. In: Silva, Luciana R, Targa Ferreira, Cristina, Carvalho, Elisa, editors. *Hepatologia em Pediatria*. Barueri, SP: Manole; 2012. p. 263-95.
2. Carvalho E, Dos Santos JL. Colestase Neonatal. In: Fraga, Gustavo Pereira; Sevá-Pereira, Gustavo; Lopes, Luiz Roberto, editors. *Atualidades em Clínica Cirúrgica - Intergastro e Trauma*. São Paulo: Atheneu; 2012, vol 1. p. 513-31.
3. Lane E, Murray KF. Neonatal Cholestasis. *Pediatr Clin North Am*. 2017; 64(3):621-639.
4. Santos JL, Carvalho E, Seixas RBPM. Colestase neonatal. In: Silva, Luciana R; Targa Ferreira, Cristina; Carvalho, Elisa, editors. *Hepatologia em Pediatria 1st ed*. Barueri, SP: Manole; 2012. p. 219-62.
5. Sanchez-Valle A, Kassira N, Varela VC, Radu SC, Paidas C, Kirby RS. Biliary Atresia: Epidemiology, Genetics, Clinical Update, and Public Health Perspective. *Advances in Pediatrics*. 2017; 64(1):285–305.
6. Shneider BL, Magee JC, Karpen SJ, Rand EB, Narkewicz MR, Bass LM, et al. Total Serum Bilirubin within 3 Months of Hepatoportoenterostomy Predicts Short-Term Outcomes in Biliary Atresia. *Journal of Pediatrics*. 2016; 170(1):211-7.
7. Lakshminarayanan B, Davenport M. Biliary atresia: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*. 2016; 73(1):1–9.
8. Zani A, Quaglia A, Hadzić N, Zuckerman M, Davenport M. Cytomegalovirus-associated biliary atresia: An aetiological and prognostic subgroup. *Journal of Pediatric Surgery*. 2015; 50(10):1739-45.
9. Chardot C. Biliary atresia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2006; 1(1):28-9.
10. Obayashi J, Kawaguchi K, Manabe S, Nagae H, Wakisaka M, Koike J, et al. Prognostic factors indicating survival with native liver after Kasai procedure for biliary atresia. *Pediatric Surgery International*. 2017; 33(10):1047–52.
11. Stathopoulou A, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Mavroudis D, Malamos N, et al. A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer. *International Journal of Cancer*. 2006; 119(7):1654–9.
12. Weerasooriya VS, White FV, Shepherd RW. Hepatic fibrosis and survival in biliary atresia. *Jornal Pediatrics*. 2004; 144(1):123-5.
13. Shafie AA, Supian A, Hassali MAA, Ngu LH, Thong MK, Ayob H, et al. Rare disease in Malaysia: Challenges and solutions. *PLoS ONE*. 2020; 15(4): e0230850.
14. Almalki Z.S., Abdullah K. Alahmari, Christina M.L. Kelton. Access to orphan drugs in the Middle East: Challenge and perspective. *Intractable Rare Dis Res*. 2012. 1(4):139–43.
15. Rath A, Salomon V, Peixoto S, Hivert V, Laville M, Segrestin B, et al. A systematic literature review of evidence-based clinical practice for rare diseases: what are the

- perceived and real barriers for improving the evidence and how can they be overcome? *Trials*. 2017; 18(1):556-7.
16. Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, Dumont S, Rey C, Lienhart A, et al. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Laboratory Investigation*. 2007; 87(3):292–303.
 17. Santos JL, Kieling CO, Meurer L, Vieira S, Ferreira CT, Lorentz A, et al. The extent of biliary proliferation in liver biopsies from patients with biliary atresia at portoenterostomy is associated with the postoperative prognosis. *Journal of Pediatric Surgery*. 2009; 44(4):695–701.
 18. Rókusz A, Veres D, Szücs A, Bugyik E, Mózes M, Paku S, et al. Ductular reaction correlates with fibrogenesis but does not contribute to liver regeneration in experimental fibrosis models. *PLoS ONE*. 2017;12(4): e0176518.
 19. Rygiel KA, Robertson H, Marshall HL, Pekalski M, Zhao L, Booth TA, et al. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. *Laboratory Investigation*. 2008; 88(2):112–23.
 20. Shimadera S, Iwai N, Deguchi E, Kimura O, Ono S, Fumino S, et al. Significance of ductal plate malformation in the postoperative clinical course of biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery*. 2008; 43(2):304–7.
 21. Bateman AC, Hübscher SG. Cytokeratin expression as an aid to diagnosis in medical liver biopsies. *Histopathology*. 2010; 56(1):415–25.
 22. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2014; 20(23):7312–24.
 23. Hubscher SG, Buckels JA, Elias E, et al. Vanishing bile-duct syndrome following liver transplantation—is it reversible? *Transplantation*. 1991; 51(5):1004-10.
 24. Sasaki H, Nio M, Iwami D, Funaki N, Ohi R, Sasano H. Cytokeratin subtypes in biliary atresia: Immunohistochemical study. *Pathol Int*. 2001; 51(7):511-8.
 25. Altman RP, Lilly JR, Greenfeld J, Weinberg A, van Leeuwen K, Flanigan L. A multivariable risk factor analysis of the portoenterostomy (Kasai) procedure for biliary atresia: twenty-five years of experience from two centers. *Ann Surg*. 1997; 226(3):348-53.
 26. Kumar R, Lal BB, Sood V, Khanna R, Kumar S, Bharathy KGS, et al. Predictors of Successful Kasai Portoenterostomy and Survival with Native Liver at 2 Years in Infants with Biliary Atresia. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2019; 9(4):453–9.
 27. Kasai M. Hepatic portoenterostomy and its modification. In: Kasai M, editor. *Cholestasis in infancy*. Tokyo: University of Tokyo Press; 1980. p. 337–44.
 28. Ramos-Gonzalez G, Elisofon S, Dee EC, Staffa SJ, Medford S, Lillehei C, et al. Predictors of Need for Liver Transplantation in Children Undergoing Hepatportoenterostomy for Biliary Atresia. *Journal of Pediatric Surgery*. 2019; 54(6):1127–31.
 29. Shinkai M, Ohhama Y, Take H, Kitagawa N, Kudo H, Mochizuki K, et al. Long-term outcome of children with biliary atresia who were not transplanted after the Kasai operation: >20-year experience at a children's hospital. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2009; 48(4):443-50.

30. Carvalho E, Santos JL, Silveira TR, Kieling CO, Silva LR, Porta G, et al. Biliary atresia: The Brazilian experience. *Jornal de Pediatria*. 2010; 86(6):473–9.
31. Lykavieris P, Chardot C, Sokhn M, Gauthier F, Valayer J, Bernard O. Outcome in adulthood of biliary atresia: a study of 63 patients who survived for over 20 years with their native liver. *Hepatology*. 2005; 41(2):366-71.
32. Kasahara M, Umeshita K, Sakamoto S, Fukuda A, Furukawa H, Uemoto S. Liver transplantation for biliary atresia: a systematic review. *Pediatric Surgery International*. 2017; 33(12): 1289–95.
33. Nio M, Wada M, Sasaki H, Tanaka H. Effects of age at Kasai portoenterostomy on the surgical outcome: a review of the literature. *Surgery Today*. 2015; 45(7):813-8.
34. Schreiber RA, Barker CC, Roberts EA, Martin SR, Alvarez F, Smith L, et al. Biliary atresia: the Canadian experience. *Jornal Pediatrics*. 2007; 151(6):659-65.

Anexos

Anexo 1- Parecer da comissão de ética da Universidade da Beira Interior



comissaodeetica@ubi.pt
Convento de Santo António
6201-001 Covilhã | Portugal

Parecer relativo ao processo n.º CE-UBI-Pj-2020-068:ID2080

Na sua reunião de 15 de setembro de 2020, a Comissão de Ética apreciou a documentação científica submetida referente ao pedido de parecer do projeto "**Biliary Atresia: Clinical, Diagnostic, Therapeutic and Prognostic Considerations**", do proponente **José Luís Neves Vieira Martins**, a que atribuiu o código n.º CE-UBI-Pj-2020-068.

Na sua análise não identificou matéria que ofenda os princípios éticos e morais, sendo de parecer que o estudo em causa pode ser aprovado.

Covilhã e UBI, 15 de setembro de 2020

A Presidente da Comissão de Ética

Assinado por : ANA LEONOR SERRA MORAIS DOS
SANTOS
Num. de identificação: BI112741975
Data: 2020.09.30 22:45:40+01'00'



(Professora Doutora Ana Leonor Serra Morais dos Santos)

(Professora Auxiliar)

Anexo 2- Autorização para exceder o limite de palavras na Dissertação

