**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**MARTA CELESTE DE OLIVEIRA MESQUITA**

# CARACTERIZAÇÃO DO PANORAMA EPIGENÉTICO GLOBAL EM CRIANÇAS COM COLESTASE NEONATAL NO ESTADO DE ALAGOAS

**SÃO PAULO**

**2025**

**MARTA CELESTE DE OLIVEIRA MESQUITA**

# CARACTERIZAÇÃO DO PANORAMA EPIGENÉTICO GLOBAL EM CRIANÇAS COM COLESTASE NEONATAL NO ESTADO DE ALAGOAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para o obtenção do titulo de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva.

**SÃO PAULO**

**2025**

Mesquita, Marta Celeste de Oliveira.
Caracterização do panorama epigenético global em crianças com colestase neonatal no Estado de Alagoas / Marta Celeste de Oliveira Mesquita. - 2025.
52 f. : il. color.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2025.
Área de concentração: Epigenética Materna e Fetal.
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva.

1. Atresia biliar. 2. Hepatopatias. 3. Doenças colestáticas. I. Silva, Rodrigo Augusto Foganholi da (orientador). II. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

**MARTA CELESTE DE OLIVEIRA MESQUITA**

# CARACTERIZAÇÃO DO PANORAMA EPIGENÉTICO GLOBAL EM CRIANÇAS COM COLESTASE NEONATAL NO ESTADO DE ALAGOAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para o obtenção do titulo de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

_____/__/___
Prof. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva
Universidade Paulista – UNIP

_____/__/___
Prof.ª Maria Marta Bernardi
Universidade Paulista – UNIP

_____/__/___
Prof. Welber Senteio Smith
Universidade Paulista – UNIP

_____/__/___
Prof. Kusai Baroudi
Universidade de Manchester

_____/__/___
Prof.ª Linda Délia Carvalho de Olive Pedrosa
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL

Dedico o meu doutorado à minha família querida: meu companheiro Ricardo, meus filhos Fernando, Bruna e Diego, minhas netas Lana e Mariana, minha nora Shaiani, meu genro Paulo Victor, minha enteada Beatriz, meus irmãos Mauricio e Mauro, minha mãe, dona Marinita, e meu pai, José Celestino, que são minha fonte de inspiração diária. Dedico também aos meus pequenos pacientes que por eles eu me levanto todos os dias em busca da minha realização como ser humano. E, por fim, dedico a Jesus Cristo que me abençoa e me ilumina diariamente.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu companheiro Ricardo, pelo apoio constante durante toda a minha jornada nesse doutorado, sua paciência foi, sem dúvida, fundamental para o meu sucesso.

Agradeço à minha filha Bruna pela contribuição como pediatra e pesquisadora.

Meu profundo agradecimento ao professor Rodrigo Augusto, que me orientou com paciência e sabedoria, ajudando-me a desenvolver esta pesquisa.

Agradeço, também, à professora Ivana Barbosa, pela contribuição na estatística e à professora Maria Marta pela constante inspiração. Suas dicas e conselhos foram, sem dúvida, essenciais para o meu crescimento.

Agradeço aos meus amigos, especialmente à Ana e ao João Lourival, por estarem sempre dispostos a ouvir minhas angústias e por me incentivarem nos momentos difíceis. Sua amizade e apoio foram, com certeza, fundamentais durante esse processo.

Agradeço ao Hospital Veredas através de sua diretoria e pela disposição de toda sua estrutura através da parceria nos atendimentos das crianças com doença de fígado.

Agradeço a todos do corpo docente e administrativo da UNIP que, de alguma forma, contribuiu com meu trabalho.

Agradeço, também, à CAPES pelo incentivo à pesquisa.

Portanto, não tenham medo deles.
Não há nada escondido que não venha a ser revelado,
nem oculto que não venha a se tornar conhecido.
Jesus Cristo – Bíblia Sagrada
Mateus 10:26

## RESUMO

As doenças hepáticas em pediatria são extremamante raras. Em todo mundo o diagnóstico e o manejo de doenças de figado em crianças têm sido um desafio. A colestase neonatal é uma forma de apresentação precoce dessas doenças e pode estar presente em doenças graves com evolução para insuficiência hepática nos primeiros meses de vida. No Estado de Alagoas, muitas vezes observamos algumas peculiaridades que nos fazem pensar na possibilidade de existir algo relacionado com a região, clima, condições socioeconomicas e culturais, que poderiam ter influenciado no aparecimento da doença hepática, algo que não estivesse relacionado a doenças infecciosas, doenças metabólicas e nem a doenças genéticas, como a existência de municípios que nunca tiveram crianças com doença de fígado a despeito de número de habitantes. Diante da escassez de pesquisas em relação a etiologias e evolução clínica de crianças com doenças de fígado, existe uma necessidade de correlacionar o padrão epigenético global desses pacientes com o objetivo de tentarmos encontrar respostas para o vazio que existe no diagnóstico. Assim, neste estudo observacional retrospectivo hipotetizamos que as amostras provenientes de biópsias hepáticas diagnósticas com colestase neonatal terão a região promotora das sequências repetitivas Alu e LINE 1 hipometiladas quando comparadas ao tecido hepático normal. Para isso, serão utilizados cortes histológicos de biópsias arquivadas nos Laboratórios de Anato patológica do Hospital Veredas. Após a extração do DNA e RNA e determinação do padrão de expressão das enzimas modificadoras do DNA e estado de metilação da região promotora das sequências repetidas Alu e LINE-1 por qPCR, esperamos encontrar correlacão positiva entre o padrão de metilação das regiões repetidas Alu e/ou LINE 1 com as diferentes doenças colestáticas, colaborando, assim, para a elucidação molecular da fisiopatologia das hepatopatias neonatais.



**Palavras-Chave:** Atresia biliar; hepatopatias; doenças colestáticas.

**ABSTRACT**

Liver diseases in pediatrics are extremely rare. Diagnosis and management of liver diseases in children has been a challenge worldwide. Neonatal cholestasis is an early presentation of these diseases and may be present in severe diseases that progress to liver failure in the first months of life. In the state of Alagoas, we often observe some peculiarities that make us wonder whether there is something related to the region, climate, socioeconomic and cultural conditions that could have influenced the onset of liver disease, something that is not related to infectious diseases, metabolic diseases or genetic diseases. Given the scarcity of research regarding the etiologies and clinical evolution of children with liver diseases, there is a need to correlate the global epigenetic pattern of these patients, with the aim of trying to find answers to the gap that exists in the diagnosis. Thus, in this retrospective observational study, we hypothesize that samples from liver biopsies diagnosed with neonatal cholestasis will have the promoter region of the Alu and LINE 1 repetitive sequences hypomethylated when compared to normal liver tissue. For this purpose, histological sections of biopsies archived in the Anatomic Pathology Laboratories of the Hospital Veredas will be used. After DNA and RNA extraction and determination of the expression pattern of DNA-modifying enzymes and methylation status of the promoter region of the Alu and LINE-1 repetitive sequences by qPCR, we expect to find a positive correlation between the methylation pattern of the Alu and/or LINE 1 repetitive regions and the different cholestatic diseases, thus contributing to the molecular elucidation of the pathophysiology of neonatal liver diseases.

**Keywords**: Biliary atresia; liver diseases; cholestatic diseases.

## LISTA DE FIGURAS


Figura 1. Mapa dos municípios alagoanos..... 25

Figura 2. Dados obtidos da análise hematológica dos participantes portadores de doenças hepáticas..... 28

Figura 3. Resultados obtidos referentes às análises bioquímicas hepáticas..... 30

Figura 4. Resultados hematológicos e bioquímicos hepáticos..... 32

Figura 5. Análise de Bioinformática..... 33

Figura 6. Rede extendida..... 34

Figura 7. Comparação entre os *clusters*..... 35

Figura 8. *Cluster* 1..... 36

Figura 9. *Cluster* 2..... 36

Figura 10. *Cluster* 3..... 37

Figura 11. *Cluster* 4..... 38

Figura 12. Enriquecimento 1..... 39

Figura 13. Enriquecimento 2..... 39

Figura 14. Enriquecimento 3..... 40

Figura 15. Enriquecimento 4..... 40

Figura 16. Classificação Histopatológica do hepático..... 44

Figura 17. Determinação do estado de metilação da região promotora do gene *L1TD1*..... 44

Figura 18. Determinação do panorama transcricional de LINE-1..... 45

Figura 19. Determinação do estado de metilação da região promotora do gene *GNAQ*..... 45

Figura 20. Determinação do estado de metilação da região promotora do gene *AMPD2*..... 46

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Porcentagem do diagnóstico de Atresia biliar, Colangite e Hepatite no grupo pesquisado..... 25
Gráfico 2. Porcentagem do gênero do grupo pesquisado..... 26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão gênica..... 22

Tabela 2. Top 5 genes por *cluster*..... 41

## SUMÁRIO


**1 INTRODUÇÃO..... 13**
1.1 Colestase neonatal..... 13

**2 JUSTIFICATIVA..... 18**

**3 OBJETIVOS..... 19**
3.1 Objetivo geral..... 19
3.2 Objetivos específicos..... 19

**4 MATERIAL E MÉTODOS..... 19**

4.1 Ética..... 19
4.1.1 Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)..... 20
4.1.2 Material biológico e seleção de amostras..... 20
4.1.3 Critério de inclusão..... 20
4.1.4 Critérios de exclusão..... 20
4.1.5 Riscos..... 20
4.1.6 Benefícios..... 21
4.1.7 Coleta e armazenamento de dados..... 21

4.2 **Parâmetros Moleculares.....** 21
4.2.1 Desparafinização..... 21
4.2.2 Extração de RNA..... 21
4.2.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)..... 22
4.2.4 Determinação da expressão gênica por RT-PCR..... 22
4.2.5 Extração do DNA..... 22
4.2.6 Tratamento do DNA..... 23
4.2.7 Determinação do padrão de metilação..... 23

**4.3 Análise Estatística..... 23**

**5 RESULTADOS..... 24**

5.1 Levantamento clínico..... 24
5.2 Estudo *in silico*..... 32
5.3 Estudo Molecular ..... 41
5.3.1 Desenho das sequências iniciadoras para o estudo de metilação região específica..... 41
5.3.2 Caracterização histopatológica e molecular..... 43

**6 DISCUSSÃO..... 46**

**7 CONCLUSÃO..... 49**

**- REFERÊNCIAS..... 50**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Colestase neonatal

Colestase neonatal é o termo utilizado para descrever a redução ou ausência do fluxo biliar canalicular, com elevação dos níveis séricos de todos os componentes da bile, sendo mais comumente avaliada por meio da elevação da bilirrubina direta. Sua frequência varia de 1:5.000 a 1:9.000 nascidos vivos e compreende um grupo de distúrbios raros de fluxo biliar (Feldman; Sokol, 2019). Seus sintomas podem variar de um indivíduo para outro, podendo ser o amarelecimento do branco dos olhos e da pele (icterícia), o aumento do fígado (hepatomegalia), o escurecimento da urina e o crescimento deficiente sintomas observados (Feldman; Sokol, 2019; Mckiernan, 2002).

Em relação à icterícia, um dos principais sintomas relacionados a colestase neonatal, a grande maioria dos recém-nascidos podem desenvolver um estado de hiperbilirrubinemia que é conhecido como icterícia neonatal. Apesar de ser uma situação fisiológica, este quadro pode se manter até 02 semanas de vida. A icterícia fisiológica é o tipo mais prevalente, porém caso este quadro se mantenha por um período mais longo é sinal de que estamos frente a uma situação patológica (Ullah; Rahman; Hedayati, 2016).

A icterícia fisiológica causada pela hiperbilirrubinemia se dá devido ao aumento do *turnover* eritrocitário que, associado à imaturidade hepática do recém-nascido, resulta num desnivelamento entre a produção e a conjugação de bilirrubina. A maioria dos bebês a termo que apresentam a icterícia fisiológica não necessitam de tratamento, e os que precisam costumam responder a um curto período de fototerapia e não requer outro tratamento (Mitra; Rennie, 2017). A icterícia prolongada, além dos 15 dias de vida, é normalmente considerada patológica. No entanto, recém-nascidos alimentados com leite materno nesta situação pode estar associada à presença de β glucuronidase no leite materno que provoca desdobramento a nível intestinal da bilirrubina conjugada em não conjugada, a qual é absorvida com consequente recirculação hepática. Ainda recém-nascidos prematuros em nutrição parenteral de longo prazo podem desenvolver icterícia conjugada que geralmente melhora com a introdução de alimentação enteral e desmame da nutrição intravenosa (Ullah; Rahman; Hedayati, 2016). Nestas situações, icterícia prolongada trata-se de uma situação possível e a interrupção do aleitamento materno não é aconselhada (Maruo *et al.*, 2000; Fujiwara *et al.*, 2015).

Níveis muito elevados de bilirrubina não conjugada são neurotóxicos. Assim, é importante que recém-nascidos, com fatores de risco para o desenvolvimento de

hiperbilirrubinemia significativa, sejam monitorados de perto e tratados precocemente para prevenir a neurotoxicidade. De acordo com a Sociedade Norte Americana de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica (NASPGHAN) e o Instituto de Excelência em Saúde e Cuidados (NICE) do Reino Unido, qualquer lactente que apresente bilirrubina sérica elevada ou um nível de bilirrubina em rápido aumento, urina escura e fezes claras na segunda semana de idade ou os que apresentarem estes mesmos sintomas na terceira semana que estejam em aleitamento materno sejam submetidos a medição da bilirrubina e tratados com urgência para evitar a neurotoxidade se for icterícia por bilirrubina indireta, e nos casos de aumento de bilirrubinas direta devem iniciar precocemente investigação de colestase (Mitra; Rennie, 2017; Bellomo-Brandao *et al.*, 2010; *Virginia Moyer et al., 2004*).

O esclarecimento precoce do diagnóstico etiológico e a instituição do tratamento adequado de uma criança com icterícia prolongada são de extrema importância e pode exercer influência decisiva tanto na sobrevivência como na qualidade de vida de muitos pacientes. Em condições patológicas colestáticas específicas, como galactosemia, sepse ou presença de cisto de colédoco, o tratamento médico-cirúrgico imediato é limitante para uma boa evolução clínica do paciente. Em lactentes com Atresia Biliar, a taxa de sucesso dos procedimentos cirúrgicos de hepatoportoenterostomia ou procedimento de Kasai na restauração do fluxo biliar é maior quando a cirurgia é realizada em lactentes antes dos 30-45 dias de idade (Feldman; Sokol, 2019).

Do ponto de vista anatômico, as doenças colestáticas eram classificadas como intra-hepática (CIH) e extra-hepática (CEH). Representando 60% a 70% de todas as causas de colestase neonatal, o grupo da CIH agrupa as seguintes doenças hepáticas: infecção congênita, doenças metabólicas, hipoplasia das vias biliares intra-hepáticas, tóxico-medicamentoso, transinfecciosa, genético-cromossômica e as formas classificadas como idiopática. Por outro lado, o grupo da CEH, que representa cerca de aproximadamente 40%, é representado por um pequeno número de afecções, como a Atresia Biliar, Cisto de Colédoco, Estenose do ducto biliar e Barro biliar (Sawamura; Fernandes; Taveira, [s.d.]; Götze *et al.*, 2015), porém a Atresia de Vias Biliares é uma das doenças hepáticas de acometimento intra e extra hepático. Das mais de 100 condições que resultam em colestase neonatal, as etiologias mais comumente identificáveis são Atresia Biliar (25-50%). As demais, como a colestase intra-hepática familiar progressiva e o parto prematuro, representam apenas 10%. Já os distúrbios metabólicos e endocrinológicos, 9 a 17%. A síndrome de Alagille, as doenças infecciosas, as mitocondriopatias e lodo biliar variam de 2 a 9% e, representando de 13 a 30%, temos os casos idiopáticos (Hoerning *et al.*, 2014).

As disfunções tratáveis, como sepse, hipotireoidismo, pan-hipopituitarismo e erros inatos do metabolismo, devem ser reconhecidas e tratadas rapidamente para evitar a evolução significativa da doença. Na Atresia Biliar, a urgência do diagnóstico está associada a realização da portojejunostomia de Kasai antes que o lactente tenha 60 dias de idade, fato este diretamente relacionado ao sucesso do tratamento cirúrgico (Bellomo-Brandao *et al.*, 2010). Para auxiliar na detecção precoce da colestase em recém-nascidos, a partir de 2009, foi inserida na caderneta de saúde da criança do Ministério da Saúde (MS) do Brasil a escala cromática das fezes, método já utilizado em outros países, que permite aos cuidadores e pediatras conferirem a presença ou não de hipocolia ou acolia fecal (Pinto, 2016).

A compreensão dos processos que envolvem o desenvolvimento da colestase neonatal prolongada composta, principalmente, pela Atresia Biliar, constitui ainda um desafio à hepatologia pediátrica. As dificuldades provém da complexa fisiopatologia hepática infantil, derivada das extensas alterações estruturais e metabólicas que se processam desde a organogênese até a fase pós-natal imediata. Adicionalmente, a interação dos inúmeros fatores etiológicos, frequentemente associados, torna ainda mais difícil a qualificação e a quantificação do comprometimento funcional e histopatológico das diversas áreas afetadas (Shneider *et al.*, 2017).

A Atresia Biliar (BA) pode ser classificada em diferentes subcategorias. Um esquema de classificação divide a BA em BA isolada (70-80%), BA sindrômica (10-15% e incluindo malformação esplênica de atresia biliar (BASM)), BA cística (5-10%) e BA CMV IgM (aproximadamente 10%) (Lendahl; Lui; Chung; Tam, 2021).

Embora a etiologia da Atresia de vias biliares ainda seja desconhecida, estudos experimentais e clínicos sugeriram que a infecção viral inicia a destruição do epitélio biliar e a liberação de antígenos que desencadeiam uma resposta imune Th1, que leva a uma lesão adicional do ducto biliar, resultando em inflamação e cicatrização obstrutiva da árvore biliar. Também foi postulado que a Atresia Biliar é causada por um defeito no processo normal de remodelação. A predisposição e anomalias genéticas também têm sido propostas como fator para o seu desenvolvimento. Entretanto, essas anomalias genéticas não parecem ser as únicas responsáveis pelos mecanismos patogênicos (Vij; Rela, 2020). Estudos realizados em gêmeos demonstram que fatores não genéticos desempenham um papel importante na mediação da patogênese da Atresia Biliar (Petersen; Davenport, 2013).

O passo fundamental em muitas colangiopatias pediátricas é a transformação dos colangiócitos em colangiócitos reativos. O processo exato de ativação dos colangiócitos é complexo e ainda não totalmente compreendido, mas inclui predisposições genéticas, bem

como o papel da sinalização pelos ácidos biliares. De forma geral, em resposta a vários estímulos nocivos, os colangiócitos tornam-se ativados e começam a secretar grandes quantidades de mensageiros químicos pró-inflamatórios e pró-fibróticos, como diferentes citocinas e quimiocinas, padrões moleculares associados ao dano, exossomos e muitos outros. Esses sinais inflamatórios desencadeiam a ativação de células imunológicas inatas, que produzem mais sinais inflamatórios, ativando os colangiócitos vizinhos. Algumas dessas citocinas são detectadas pelas células estelares hepáticas periductais, que, em resposta, tornam-se ativadas, transformando-se em miofibroblastos e começando a expressar e secretar componentes da matriz extracelular (Sutton; Karpen; Kamath, 2024).

Esse mecanismo de ativação dos colangiócitos, recrutamento inflamatório e início da fibrose, às vezes chamado de reação ductular, é o processo patológico comum que sustenta as colangiopatias. A Atresia Biliar e a colangite esclerosante primária (CEP) são as duas colangiopatias pediátricas mais comuns, e ainda assim a etiologia subjacente de ambas permanece incompleta. Embora ambas as doenças envolvam colangiócitos reativos, a forma como esses colangiócitos são ativados e as células imunológicas e moléculas sinalizadoras específicas envolvidas em sua progressão são diferentes, de modo que compartilham muito pouco em comum clinicamente (Sutton; Karpen; Kamath, 2024).

Evidências crescentes sugerem uma implicação mais profunda de mecanismos intrincados da imunidade inata desde o início da doença, a saber, estresse oxidativo, metabolismo alterado e indução de alterações epigenéticas de longo prazo/anormais. Entre eles, a via AGE-RAGE atraiu a maior parte da atenção, pois abrange circuitos-chave envolvidos na patogênese de várias doenças inflamatórias e degenerativas crônicas, incluindo Atresia Biliar. Mais investigação é necessária para determinar a extensão da implicação da via AGE-RAGE e sua interação com outros circuitos fibroinflamatórios. Como os macrófagos são um dos principais impulsionadores da AGE-RAGE e suas polarizações funcionais parecem ocupar um papel central na modulação da resposta do tecido e no resultado em condições crônicas, pesquisas futuras devem interrogar essas populações de células no contexto da atresia biliar. Imperativa, a necessidade de desenvolver novas plataformas experimentais ou melhorar as existentes para realizar estudos mecanísticos de eventos posteriores da doença e facilitar a identificação e implicação de populações e vias celulares (Ortiz-Perez *et al.*, 2020).

Os estudos recentes têm demonstrado que a etiologia da colestase neonatal é um campo de conhecimento que ainda se encontra em constante expansão. A compreensão da base molecular das doenças colestáticas obtida pela caracterização molecular através do sequenciamento do transcriptoma em larga escala, associado ao sequenciamento genômico, tem

permitido o diagnóstico molecular rápido e acessível para muitos desses distúrbios hepáticos que não podem ainda ser diagnosticados diretamente a partir de exames de sangue padrão ou biópsia hepática. Infelizmente, apesar de todos esses avanços, a etiologia e a abordagem terapêutica ideal do mais comum desses distúrbios, a Atresia Biliar, permanecem obscuras (Wang; Yang; Wang, 2022).

Um número crescente de biomarcadores séricos com valor diagnóstico e prognóstico em Atresia Biliar foram descobertos e promovidos nos últimos anos. Entre eles, a MMP-7 é atualmente o biomarcador mais confiável para o diagnóstico de Atresia Biliar, o que pode ajudar os médicos a avaliar o estágio da fibrose hepática e prever os resultados pós-cirurgia de Kasai até certo ponto. Alguns estudos avaliaram o valor diagnóstico da gama GT ao estudar a MMP-7. Eles também concluíram que, em comparação com a gama GT, a MMP-7 mostrou melhor sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de BA (Kong *et al.*, 2024).

A epigenética refere-se a mudanças herdáveis na atividade e expressão gênica em resposta a influência de desenvolvimento e ambiente, sem alterações na sequência do DNA. Informações epigenéticas herdadas através da linha germinal dos mamíferos em resposta a influências ambientais podem predispor o feto em desenvolvimento a alterações metabólicos e à rápida progressão da Doença Hepática Aloimune Gestacional. Alterações epigenéticas podem estar ligadas a fatores alimentares transgeracionais, como sugerido por um índice de massa corporal mais alto na prole de homens expostos à fome no útero. Estudos usando análises de enriquecimento gene-proteína e redes de interação proteica sugerem que a adaptação fetal a um ambiente nutricional prejudicado está associada a mudanças profundas na expressão gênica envolvendo metilação diferencial de DNA e acetilação de histonas em humanos. Da mesma forma, camundongos expostos perinatalmente a uma dieta indutora de obesidade exibem padrões diferenciais de metilação do DNA hepático e correspondentes assinaturas de genes pró-fibrogênicos e pró-inflamatórios. Quando expostos novamente à essa dieta na fase de adultos, esses camundongos desenvolvem um fenótipo NASH (Esteato-hepatite não alcoólica) acelerado com fibrose hepática proeminente (Ibrahim *et al.*, 2020).

É certo que os métodos de sequenciamento de última geração podem facilitar o diagnóstico imediato apenas das condições hereditárias que podem causar a colestase no recém-nascido (Jeyaraj *et al.*, 2021). Entretanto, um desafio adicional na elucidação de sua patogenicidade ainda está na complexa regulação transcricional e pós-traducional que é necessária para o tráfego, localização subcelular e função normal das proteínas na fisiologia hepática (Soroka; Boyer, 2014). Estudos têm demonstrado o envolvimento de fatores epigenéticos como metilação do DNA e os RNA não codificantes podem estar envolvidos na

patogênese da Atresia Biliar. Uma possível ligação etiológica entre diminuição da metilação do DNA e com a fisiopatologia da Atresia Biliar foi estabelecida através da constatação de que as células do ducto biliar de pacientes com Atresia Biliar eram hipometilada em comparação com o estado de metilação de células de pacientes com outros distúrbios colestáticos infantis (Matthews *et al.*, 2011).

Evidências demonstraram que alterações epigenéticas, em resposta a sinais ambientais ou mudanças genéticas, desempenham um papel crítico na patogênese da Doença Hepática Crônica (DHC). De fato, marcas epigenéticas específicas ppodem ser usadas como biomarcadores para diagnosticar ou prever a progressão da DHC, e sua identificação em biópsia líquida representa uma estratégia muito promissora para auxiliar no tratamento de pacientes com DHC (Arechederra *et al.,* 2021).

Também demonstramos que o DNA genômico isolado de células T CD4+ colhidas de lactentes com Atresia Biliar estava hipometilado em relação a controles saudáveis. Além disso, os níveis de mRNA das enzimas modificadoras do DNA, DNA metiltransferase 1 e 3A foram significativamente mais baixos em células T CD4+ dos pacientes com Atresia Biliar, correlacionando-se positivamente com a hipometilação metilação global do DNA observado nas células T CD4+ (Dong *et al.,* 2012).

Considerando as informações apresentadas e o fato de que a metilação do DNA pode contribuir para a apresentação e progressão das doenças colestáticas do recém-nascido, este projeto pretende caracterizar o padrão de metilação global pela análise da metilação das repetidas Alu e LINE-1 de biópsias hepáticas de lactentes acometidos pela colestase neonatal do Estado de Alagoas e correlacionar com o desenvolvimento da Atresia Biliar.

## 2 JUSTIFICATIVA

Efetivamente, a epigenética tem tornado evidente que a manifestação do fenótipo nos indivíduos depende diretamente da interação entre genótipo do indivíduo e o meio ambiente em que se inserem, constituindo-se, assim, como um dos temas de maior interesse da atualidade no estudo dos processos biológicos, uma vez que nos últimos anos inúmeros trabalhos têm demonstrado o envolvimento dos fatores epigenéticos na fisiopatologia de importantes doenças complexas. Embora os limitados estudos publicados tenham mostrado uma possível relação da metilação global com o desenvolvimento da Atresia Biliar, nenhum estudo tentou caracterizar o padrão de metilação das regiões repetidas Alu e LINE 1 com as diferentes doenças colestáticas. Assim, baseados na importância das sequências repetitivas Alu e LINE 1 para a

manutenção da estabilidade genômica, acreditamos que a realização deste projeto que pretende expandir a compreensão atual a respeito de possíveis alterações epigenéticas induzidas pela hiperbilirrubinemia direta no tecido hepático poderá contribuir de forma significativa para o campo Gastroenterologia Pediátrica.

# 3 OBJETIVOS

## 3.1 Objetivo geral

Caracterizar, através de análise molecular, o padrão de metilação das sequências repetidas LINE-1 de biópsias hepáticas de lactentes acometidos pela colestase neonatal atendidos no Hospital Veredas referencia de Hepatologia pediátrica no Estado de Alagoas e correlacionar com os possíveis diagnósticos diferenciais.

## 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar o levantamento retrospectivo dos últimos 6 anos do número de biópsias arquivadas no Laboratório de Anatomopatológica do Hospital Veredas;
- ✓ Revisar a classificação patológica das biópsias selecionadas para compor este estudo;
- ✓ Determinar o perfil transcricional da LINE-1;
- ✓ Determinar o perfil transcricional de genes codificadores das enzimas modificadoras do DNA; DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) e das DNA demetilases (TET1, TET2 e TET3);
- ✓ Determinar o estado de metilação da região promotora das sequências repetidas Alu e LINE-1;
- ✓ Correlacionar o estado de metilação com a quantidade dos transcritos das sequências repetidas LINE-1;
- ✓ Correlacionar o estado de metilação das sequências repetidas Alu e LINE-1 com a severidade das hepatopatias.

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Ética

### 4.1.1 Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

O projeto foi submetido a análise pelo CEP/UNIP sendo aprovado em 29 de junho de 2023, posteriormente separadas e processadas amostras e realizada coleta dos dados clínicos.

### 4.1.2 Material biológico e seleção de amostras

Em um estudo retrospectivo foram utilizados para realização do estudo molecular cortes histológicos de amostras parafinadas de biópsia hepática previamente classificadas macroscopicamente obtidas do Departamento de Patologia do Hospital Veredas, ligado ao ambulatório de gastroenterologia pediátrica referência em doenças hepáticas pediátricas em Alagoas. O estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos e boas práticas clínicas, sendo os responsáveis pelas instituições verbalmente informados sobre os objetivos da pesquisa, e escolheram livremente por sua autorização sendo documentada através da assinatura do Termo de Intenção de Pesquisa (TIP). Em levantamento preliminar realizado durante as consultas médicas de 22 crianças submetidas à biópsia hepática, no período 2017 a 2023, que apresentavam colestase hepática.

### 4.1.3 Critério de inclusão

Foi utilizado como critério de inclusão todas as biópsias realizadas no Hospital Veredas em 06 anos. O grupo controle será constituído pelas amostras em que o resultado da biópsia não tenha sido Atresia de vias biliares**.**

### 4.1.4 Critérios de exclusão

Nesse critério, foram excluídas as amostras com tamanho reduzido da peça parafinada (biópsia) que devido ao tamanho reduzido poderia comprometer a segurança do arquivo da mesma pelo Laboratório de Patologia do respectivo hospital, local onde as amostras foram depositadas.

### 4.1.5 Riscos

Considerando que toda pesquisa oferece algum tipo de risco, nesta pesquisa pode ser avaliado como mínimo. Em virtude de o desenho experimental desta proposta ter como base o estudo retrospectivo e a coleta dos dados clínicos e amostra biológica serem de prontuários (dados clínicos) e de biópsias depositadas no Laboratório de Patologia o risco está associado a uma possível quebra do anonimato dos pacientes. Neste sentido, os nomes dos pacientes serão substituídos pelos respectivos números de depósito da biópsia no laboratório.

### 4.1.6 Benefícios

Devido ao fato do desenho experimental deste estudo ser retrospectivo, pois abrangerá uma janela de 6 anos, não podemos associar nenhum benefício direto para o participante. Como benefício indireto, após a conclusão desta pesquisa com o levantamento dos dados clínicos e obtenção dos dados moleculares teremos informações, que após serem compiladas e confrontadas com a literatura científica nacional e internacional, poderão orientar os cuidados médicos.

### 4.1.7 Coleta e armazenamento de dados

Os dados clínicos [idade, sexo, município de residência, exames laboratoriais (albumina tempo e atividade de protrombina, colesterol, triglicerídeos, glicemia, bilirrubina sérica total e conjugada), referentes às biópsias dos pacientes selecionadas para compor o n amostral deste estudo, foram extraídos do prontuário médico e utilizados para compor o banco de dados. Os nomes do paciente foram substituídos por número em ordem crescente a fim de manter o anonimato dos pacientes.

## 4.2 Parâmetros Moleculares

### 4.2.1 Desparafinização

Como etapa inicial, os cortes histológicos foram incubados por 30 minutos a 57°C com 1 mL de xilol. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e ao precipitado (amostras de tecido desparafinizadas) foram 0,5 mL de tampão de extração (10 mM Tris HCl pH 7,8, 5 mM EDTA, 0,5% SDS) nas amostras que foram submetidas a extração do DNA e 250 μL de TRIzol® nas amostras que foram submetidas aextração de RNA e então armazenadas à -80°C para posterior processamento.

### 4.2.2 Extração de RNA

Após a desparafinização o RNA total foi isolado do tecido hepático proveniente das biópsias utilizando o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol, de acordo com as especificações do fabricante. Após a extração, a quantidade e pureza do RNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 (≥ 1,8) e OD 260/230 (≥ 1,0) (NanoDrop 2000, *Thermo Scientific*, *Uniscience*).

### 4.2.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

cDNA foi sintetizado a partir da transcrição reversa de aproximadamente 2000 ng de RNA total, na presença de 1 U da enzima transcriptase reversa (*Kit Superscript* II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante.

### 4.2.4 Determinação da expressão gênica por RT-PCR

Para o estudo da expressão gênica as reações foram realizadas com iniciadores específicos (Tabela 1). Todas as reações terão volume final de 10µL; contendo 5 µL de SYBR Green I Master, 0,4 µM de iniciadores específicos, 1,5 µL do cDNA sintetizado (100 ng) e q.s.p. de água ultrapura livre de endonucleases. A quantidade relativa dos transcritos será determinada pelo método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta Ct}$. Neste método, a média do Ct do gene alvo é subtraída pela média dos Cts dos controles endógenos (ΔCt). Para o cálculo da expressão foi substituído o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de 5 a 7 animais independentes realizados em duplicata técnica e normalizados em relação ao controle (atribuído valor 1).

**Tabela 1**. Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão gênica.

| Gene (ID) | Iniciador | 5'- 3' Sequencia | Condições da reação | Produto do PCR |
|---|---|---|---|---|
| L1TD1 (54596) | Forward | AAA CAG GGA TGG TAG GGA AAA | 95°C – 10s; 59°C – 30s; 72°C – 30s | 237pb |
| | Reverse | GGA CATT GCG ATT TCC ATC T | | |
| DNMT1 (1786) | Forward | AGG ACC CAG ACA GAG AAG CA | 95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s | 201 pb |
| | Reverse | GTA CGG GAA TGC TGA GTG GT | | |
| DNMT3A (1788) | Forward | AGG AAG CCC ATC CGG GTG CTA | 95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s | 225 pb |
| | Reverse | AGC GGT CCA CTT GGA TGC CC | | |
| DNMT3B (1789) | Forward | TCG ACT TGG TGG TTA TTG TCT G | 95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s | 129 pb |
| | Reverse | TCG AGC TAC AAG ACT GCT TGG | | |
| TET1 (80312) | Forward | GCC CCT CTT CAT TAC CAA GTC | 95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s | 211 pb |
| | Reverse | CGC CAG TTG CTT ATC AAA ATC | | |
| TET2 (54790) | Forward | GGT GCC TCT GGA GTG ACT GT | 95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s | 245 pb |
| | Reverse | GGA AAA TGC AAG CCC TAT GA | | |
| TET3 (200424) | Forward | GGT CAG GCT GGT TTA CAA CG | 95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s | 198 pb |
| | Reverse | GGC ATA GAC CCA CAC ACA TCT | | |
| GAPDH ( 2597) | Forward | AAG GTG AAG GTC GGA GTC AA | 95°C – 10s; 58°C – 30s; 72°C – 30s | 345 pb |
| | Reverse | AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG | | |
| β-actin (60) | Forward | GCA CAG AGC CTC GCC TT | 95°C – 10s; 58°C – 30s; 72°C – 30s | 253 pb |
| | Reverse | GTT GTC GAC GAC GAG CG | | |
| 18S (100008588) | Forward | CGG ACA GGA TTGACA GAT TGA TAG C | 95°C – 10s; 60°C – 30s; 72°C – 30s | 118 pb |
| | Reverse | TGC CAG AGT CTC GTT CGT TAT CG | | |

**pb** = pares de base.
Fonte: Fonte própria.

### 4.2.5 Extração do DNA

Após a desparafinização o DNA genômico (gDNA) foi isolado pelo método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Trevilato; Line, 2000). A quantidade e pureza do gDNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 (≥ 1,8) e OD 260/230 (≥ 1,0) (NanoDrop 2000, *Thermo Scientific*, Uniscience).

### 4.2.6 Tratamento do DNA

Cada amostra de gDNA foi dividida em três tubos contendo a mesma concentração (400 ng) e incubados a 37°C por 2 horas com 1X NE buffer, 40 mM de glicose UDP e 1 unidade da enzima T4- β-glicosiltransferase (T4-BGT) em reação com volume final de 20 μL. Após a inativação da enzima T4-BGT por incubação a 65°C por 15 min, as amostras foram então digeridas em reações separadas com as endonucleases *Msp*I e *Hpa*II (*New England Biolabs*, Beverly, MA, EUA). No terceiro tubo foi adicionado a mesma quantidade de $H_2O$ (gDNA não digerido controle 100%). Todas as reações foram realizadas separadamente com volume final de 25 μL a 37°C por 16 horas (*overnight*), seguida por inativação por 15 min (incubação a 65°C).

### 4.2.7 Determinação do padrão de metilação

O padrão de metilação (5-meC) e hidroximetilação (5-hmeC) de LINE-1 e dos genes AMRD2 e GNAQ1 foram determinado em reações de qPCR contendo SYBR Green I Master 2x (5 μL) 0,4 μM de iniciadores específicos, 1,5 μL (24 ng) de gDNA tratado (nas 3 condições; $H_2O$, *Msp*I e *Hpa*II) e q.s.p de $H_2O$ livre de nuclease. As sequências dos iniciadores foram desenhadas em regiões regulatórias com ilhas CpG dentro de regiões de hipersensibilidade a DnaseI, reguladas por marcas de modificações de histonas e com sítios de ligação de fatores de transcrição utilizando o programa *Primer3 Input* (versão 0.4.0) (Untergasser *et al.*, 2012). A determinação de estruturas secundárias e temperaturas de anelamento foi analisada pelo programa *Beacon Designer* (http://www.premierbiosoft.com/). Todas as sequências foram alinhadas ao genoma humano [Dec. 2013 (GRCh38/hg38)] para confirmação da localização cromossômica utilizando a ferramenta de PCR *in-silico* (https://genome.ucsc.edu/). A obtenção dos valores percentuais referentes a metilação (5-meC) e hidroximetilação (5-hmeC) foram calculados utilizando a fórmula: 5-meC = Ct (tubo digerido com *Hpa*II) – Ct (tubo digerido com *Msp*I) × 100/Ct (tubo não digerido) e para 5-hmeC = Ct (tubo digerido com *Msp*I) - Ct (tubo não digerido), de acordo com (Nestor *et al.*, 2012).

## 4.3 Análise Estatística

Os dados obtidos foram armazenados em uma planilha do Excel e posteriormente analisados pelo teste de variância ANOVA *two-way*, seguido pelo teste de *Tukey* como um teste

de comparação múltipla, para avaliar os efeitos das diferentes doenças pertencentes ao grupo da colestase neonatal, usando o programa *GraphPad Prism 7*. Em todas as medidas o □ será de 5% bicaudal, ou seja, a significância estatística será considerada para valores de $p \leq 0{,}05$. Os resultados serão expressos como média ± desvio. Todas as reações de qPCR para determinação da expressão gênica e do estado de metilação serão realizadas em duplicata técnica. A correlação entre a expressão gênica e o padrão de metilação das sequências repetidas LINE 1 será testada utilizando o Coeficiente de correlação de Pearson (r), sendo considerado significativo os valores de $r \geq 0.6$.

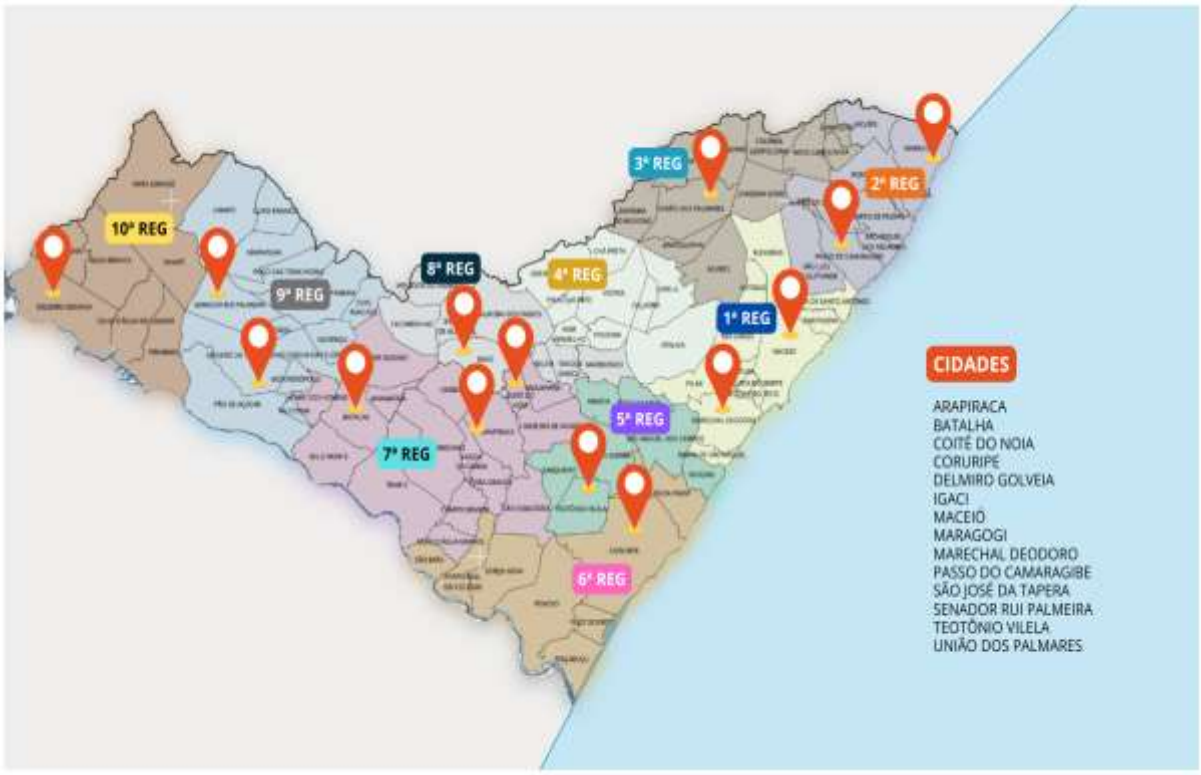
## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos pela execução do projeto foram apresentados em 3 tópicos; **1**) Levantamento Clínico; **2**) Estudo *in silico;* e, **3**) Análise Epigenética. Ressaltamos que as etapas 1 e 2 aconteceram de forma sumultânea, entretanto iremos apresentar os dados obtidos pelo levantamento clínico e, em seguida, os dados obtidos pelo estudo *in silico*, finalizando a parte descritiva dos resultados com as análises molecures.

### 5.1 Levantamento clínico

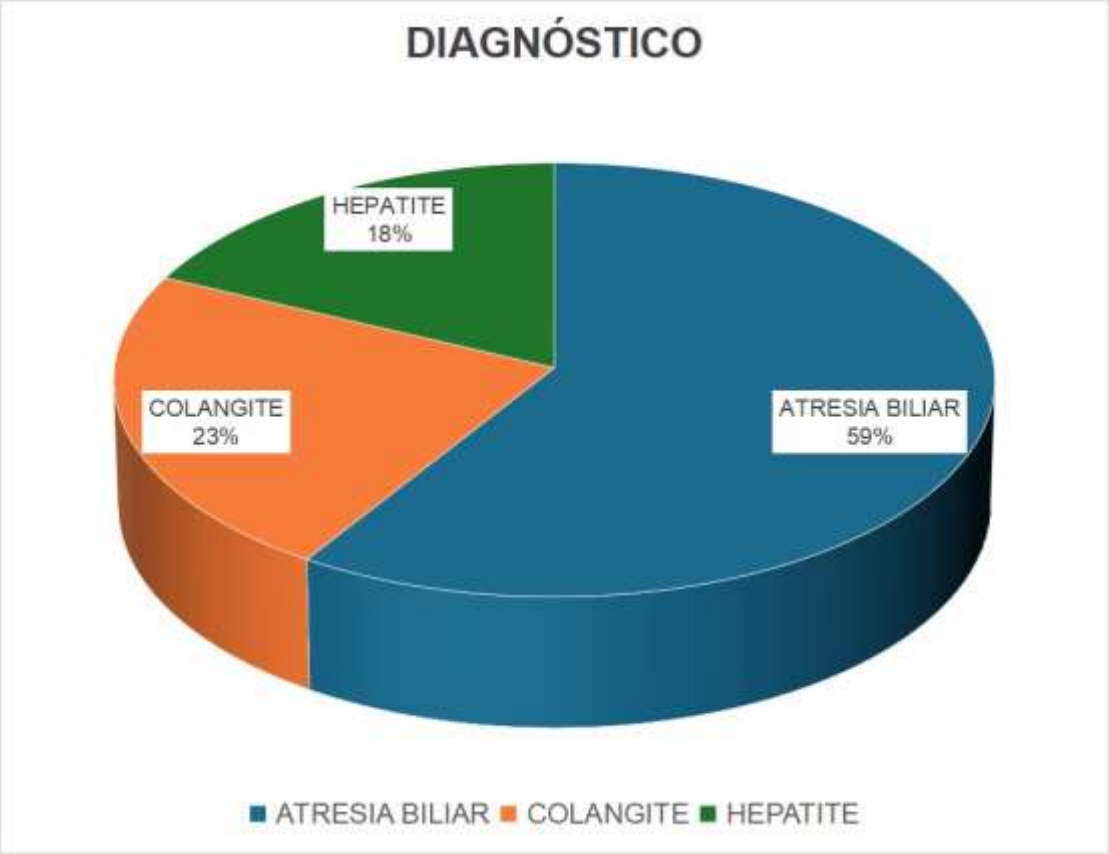
O estudo clínico foi realizado em crianças com diagnóstico inicial de colestase neonatal (colestase diagnosticada até 4 meses de idade) acompanhados no ambulatório de Gastroenterologia e Hepatologia Pediátrica do Hospital Veredas na cidade de Maceió (AL), sendo esse serviço a referência estadual para crianças com doenças de fígado e vias biliares. Num período de aproximadamente 06 anos foram realizadas biópsias hepáticas nos 22 pacientes estudados. Dessas 22 crianças a maioria era Atresia de vias biliares (n 13 – 59%), hepatite (n 4 – 18%) e colangite (n 5 – 23%) (Gráfico 1), acreditamos que a maioria era Atresia de vias biliares, devido a evolução e a história clínica exigir mais frequentemente a biópsia para esses casos. Em relação ao gênero, das 22 crianças (Gráfico 2), 15 eram feminino (68%) e masculino eram 7 (32%). A distribuição por municípios está representada no mapa abaixo, onde a maioria dos pacientes residiam na cidade de Maceió (n7 – 32%).

**Figura 1**. Mapa dos municípios alagoanos.




Fonte: Fonte própria.

**Gráfico 1**. Porcentagem do diagnóstico de Atresia biliar, Colangite e Hepatite no grupo pesquisado.




Fonte: Fonte própria.

**Gráfico 2**. Porcentagem do gênero do grupo pesquisado.

Fonte: Fonte própria.

## Análise estatística

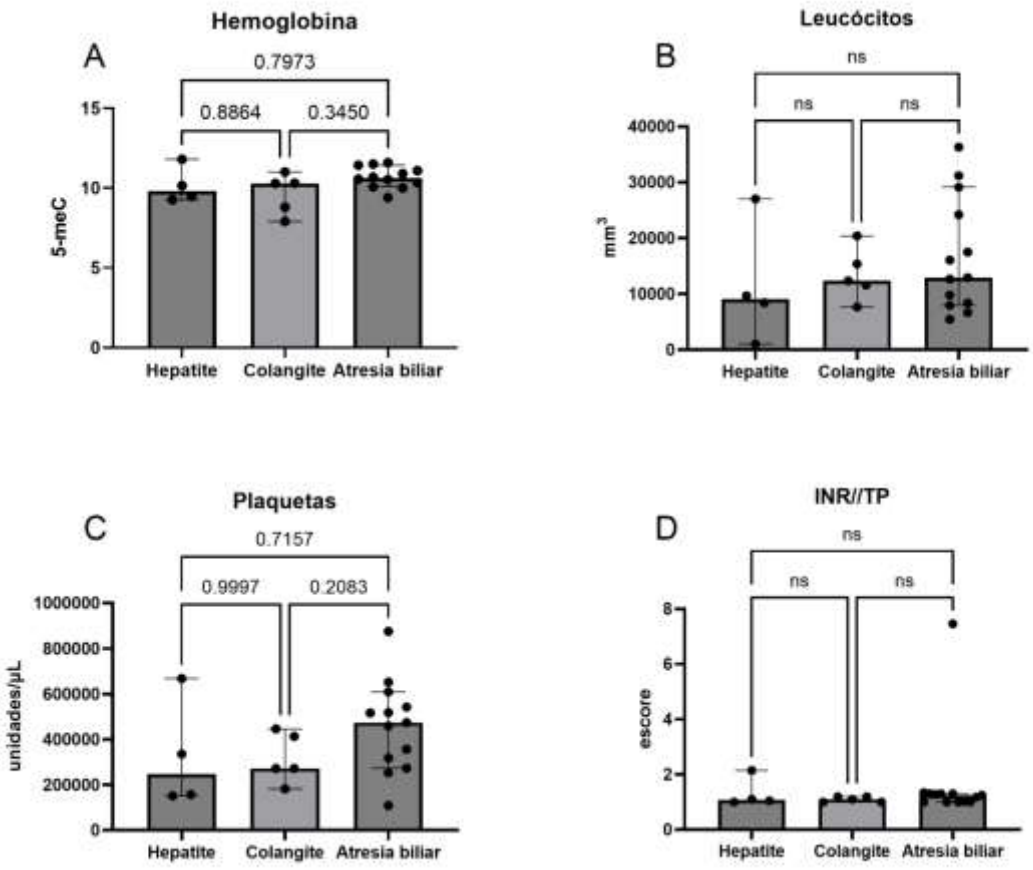
Foram recrutados 22 participantes, sendo quatro com hepatite, cinco com colangite e 13 com Atresia Biliar. Com o objetivo de se prospectar a variação de alguns parâmetros bioquímicos, hematológicos e epigenéticos desses participantes, foram feitos os seguintes testes estatísticos, considerando-se as premissas de verificação da normalidade e de ocorrência de *outliers* e que os dados foram obtidos de uma amostra de ocasião. A normalidade foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk e a identificação de *outliers* através do método ROUT (Q=5%). Uma vez identificada a ocorrência de *outliers* estes foram removidos e o teste de normalidade foi reaplicado. Dados que confirmaram a hipótese nula H0 para o teste de normalidade foram submetidos à análise de variância do tipo ANOVA de um fator, seguido do teste de comparação múltipla entre médias de Dunnet. Nesses casos, em função da diferença de n amostral por grupo, foi adotada a correção de Welch. No caso de os dados não terem confirmado a hipótese nula, foi usado o teste de Kruskal-Wallis e a comparação entre medianas de Dunn's. Um estudo prospectivo para a verificação do aparecimento de agrupamentos e gradientes com os dados bioquímicos e hematológicos foi feito com a análise de componentes principais (ACP, ou PCA, da sigla em inglês para *principal component analysis*). Os resultados

relativos à contagem de leucócitos e de plaquetas foram utilizados após terem sido transformados por log, para se adequarem aos outros dados usados. Os dados epigenéticos foram obtidos a partir de uma ou mais amostras de tecido hepático dos pacientes.

**Resultados**

A Figura 2 representa os dados obtidos da análise hematológica dos participantes com doenças hepáticas. A ANOVA de um fator realizada com os resultados da hemoglobina dos participantes (Figura 2.A) mostra que não há diferença entre as médias ($W_{(3, 21)}$= 1,482 (2,000, 5,522); p=0,3053). As médias e erros padrão observados para o grupo hepatite (10,18±0,5732), colangite (9,658±0,5674) e Atresia Biliar (10,68±0,1931) apresentam-se pouco abaixo dos valores de referência (12-15 g/dL). A Figura 2.B, que mostra os resultados obtidos para leucócitos, apresentam resultados semelhantes aos anteriores ($W_{(3, 22)}$= 0,5322 (2,000, 7,437); p=0,6081). As médias e erros padrão observados para o grupo hepatite (11559±5509), colangite (13504±2121) e atresia biliar (16800±2837) apresentam-se dentro dos valores de referência (8,000-12.000 $mm^3$). O mesmo foi observado para os dados de plaquetas (Figura 2.C; $W_{(3, 22)}$= 0,2413 (2,000, 7,231); p=0,2413), e as médias e erros padrão observados para o grupo hepatite (327750±121181), colangite (317000±49057) e atresia biliar (458000±55277) apresentam-se dentro dos valores de referência (150.000-450.000 unidades/µL). A Figura 2.D mostra que não houve diferença entre os escores de INR/TP entre os grupos ($X^2_{(3,22)}$=1,064; p=0,6083) e que as medianas e valores mínimos e máximos dos grupos, como hepatite (1,075 (1,00; 2,15), colangite (1,1 (1,00; 1,20) e atresia biliar (1,25 (1,00; 7,46) estão dentro dos índices esperados (0,96-1,30).

**Figura 2**. Dados obtidos da análise hematológica dos participantes portadores de doenças hepáticas.

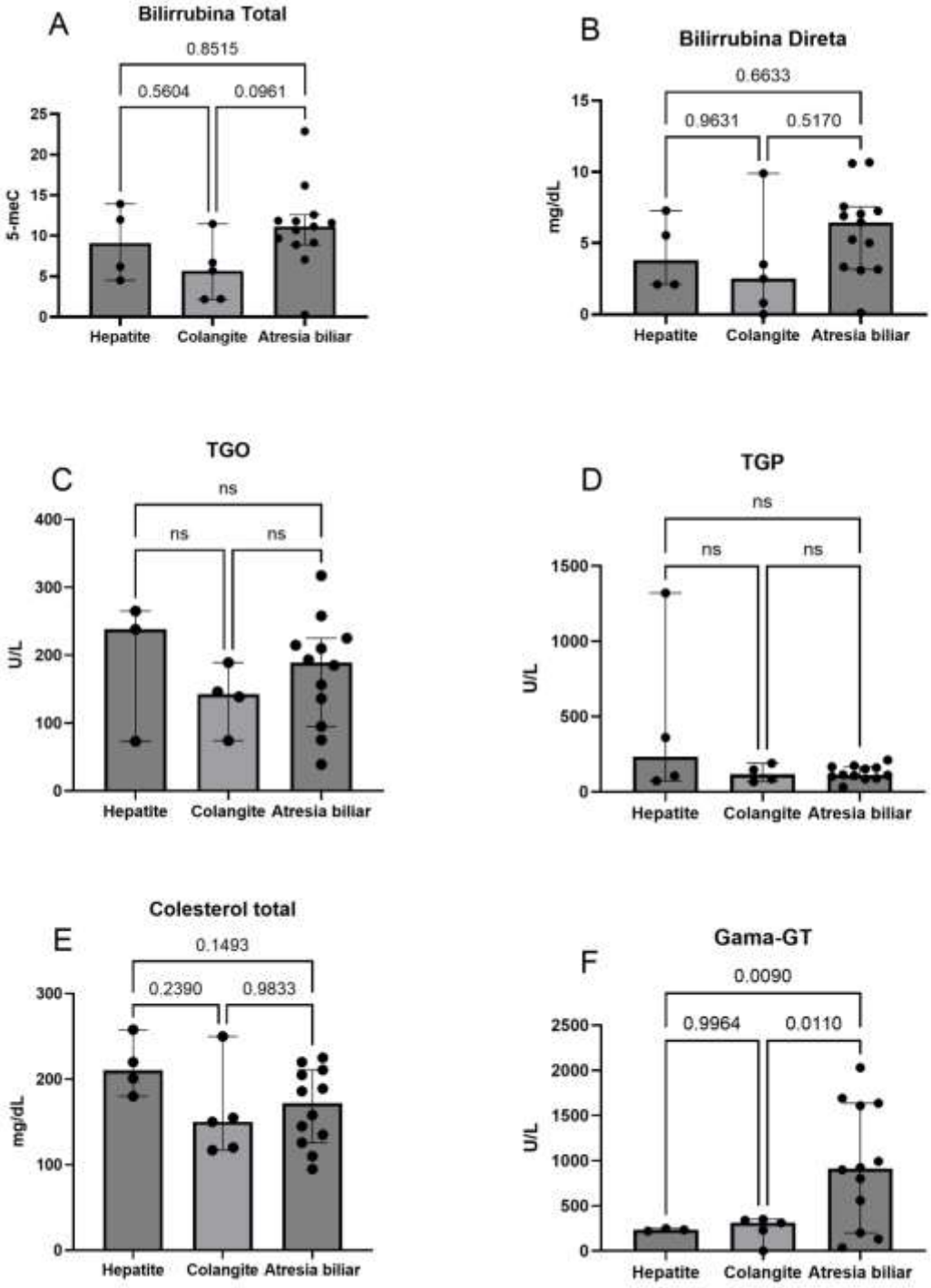



Fonte: Fonte própria.

A Figura 3 mostra os resultados obtidos referentes às análises bioquímicas hepáticas. A Figura 3.A mostra que não foram observadas diferenças entre as médias para os dados de bilirrubina total ($W_{(3, 22)}$= 3,755 (2,000, 5,628); p=0,1284). As médias e erros padrão observados para o grupo hepatite (9,153±2,258), colangite (5,654±1,714) e atresia biliar (10,98±0,7159) apresentam-se muito acima dos valores de referência (0,1-1,4 mg/dL). A Figura 3.B mostra os dados obtidos de bilirrubina direta e não foram observadas diferenças entre as médias ($W_{(3, 22)}$= 1,057 (2,000, 6,939); p=0,3974). As médias e erros padrão observados para o grupo hepatite (4,255±1,294), colangite (3,340±1,749) e atresia biliar (5,882±0,8344) apresentam-se muito acima dos valores de referência (0,1-1,4 mg/dL). A Figura 3.C mostra que não foram observadas diferenças entre as médias para TGO ($W_{(3, 19)}$= 0,7363 (2,000, 4,781); p=0,5263). As médias e erros padrão observados para o grupo hepatite (192,0±60,01), colangite (136,90±23,73) e atresia biliar (175,40±22,94) também se apresentam muito acima dos valores de referência (homem até 41 U/L e mulher até 33 U/L). A Figura 3.D mostra que não foram observadas diferenças entre as médias para TGP ($W_{(3, 20)}$= 0,5985 (2,000, 4,862); p=0,5857). As médias e erros padrão observados para o grupo hepatite (464,5±292,3), colangite

(121,90±28,00) e atresia biliar (124,80±14,07) também se apresentam muito acima dos valores de referência (homem até 40 U/L e mulher até 32 U/L). A Figura 3.E mostra que não foram observadas diferenças entre as médias para colesterol total ($W_{(3,\ 20)}$= 2,841 (2,000, 7,539); p=0,1204). As médias e erros padrão observados para o grupo hepatite (214,80±16,57), colangite (158,40±24,15) e atresia biliar (167,10±12,95) apresentam-se dentro da normalidade, com exceção do grupo hepatite, que se encontra muito acima dos valores de referência (crianças e adolescentes abaixo de 170 mg/dL). A Figura 3.F mostra que foram observadas diferenças entre as médias para gama-GT ($W_{(3,\ 20)}$= 6,576 (2,000, 8,047); p=0,0203). As médias e erros padrão observados para o grupo hepatite (234,60±9,009), colangite (246,60±64,89) e atresia biliar (959,30±192,00) apresentam-se dentro da normalidade, com exceção do grupo hepatite, que se encontra muito acima dos valores de referência (homem 8-61 U/L e mulher 5-36 U/L).

**Figura 3**. Resultados obtidos referentes às análises bioquímicas hepáticas.

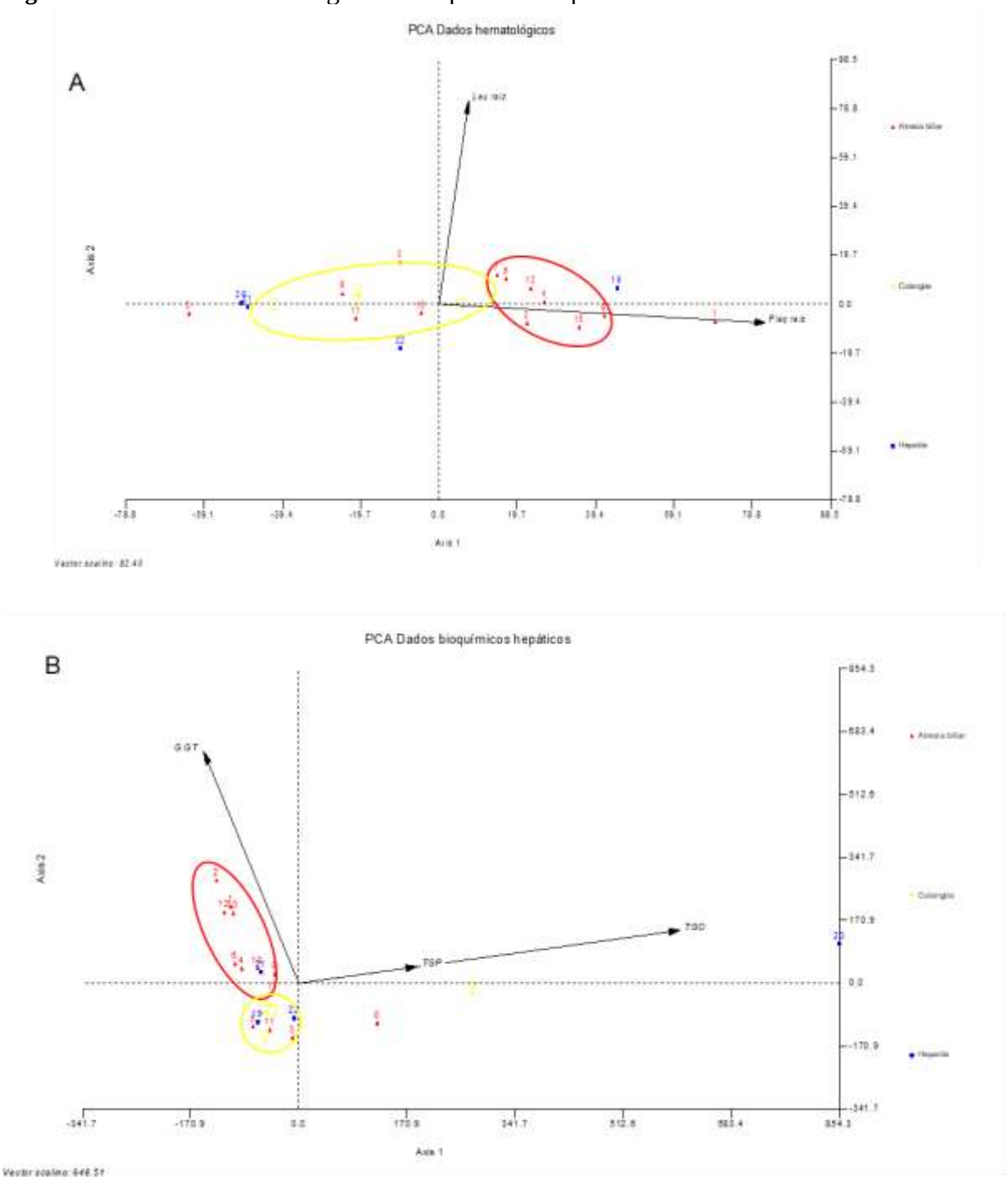



Fonte: Fonte própria.

Os resultados hematológicos e bioquímicos hepáticos foram analisados quanto à possibilidade de resultarem em gradientes estabelecidos segundo análise de componentes principais. Considerando-se apenas os dados hematológicos, em análise realizada a partir de

três variáveis (hemoglobina, leucócitos e plaquetas) e 22 casos, verificou-se que houve a formação de gradiente no primeiro eixo (porcentagem cumulativa de 95,133), onde se observa o agrupamento dos participantes com colangite, em amarelo, e com atresia biliar, em vermelho (Figura 4.A). Os resultados bioquímicos hepáticos, obtidos a partir de seis variáveis e 22 casos, também foram analisados por análise por principais componente (APC). Foi observada a formação de gradientes, visualizados em amarelo e vermelho para os grupos colangite e atresia biliar respectivamente, mais aparente no segundo eixo (porcentagem cumulativa de 71,121 no primeiro eixo), muito influenciada pelos parâmetros que se encontram acima dos que são considerados normais, como TGO, TGP e gama-GT (Figura 4.B).

**Figura 4**. Resultados hematológicos e bioquímicos hepáticos.




Fonte: Fonte própria.

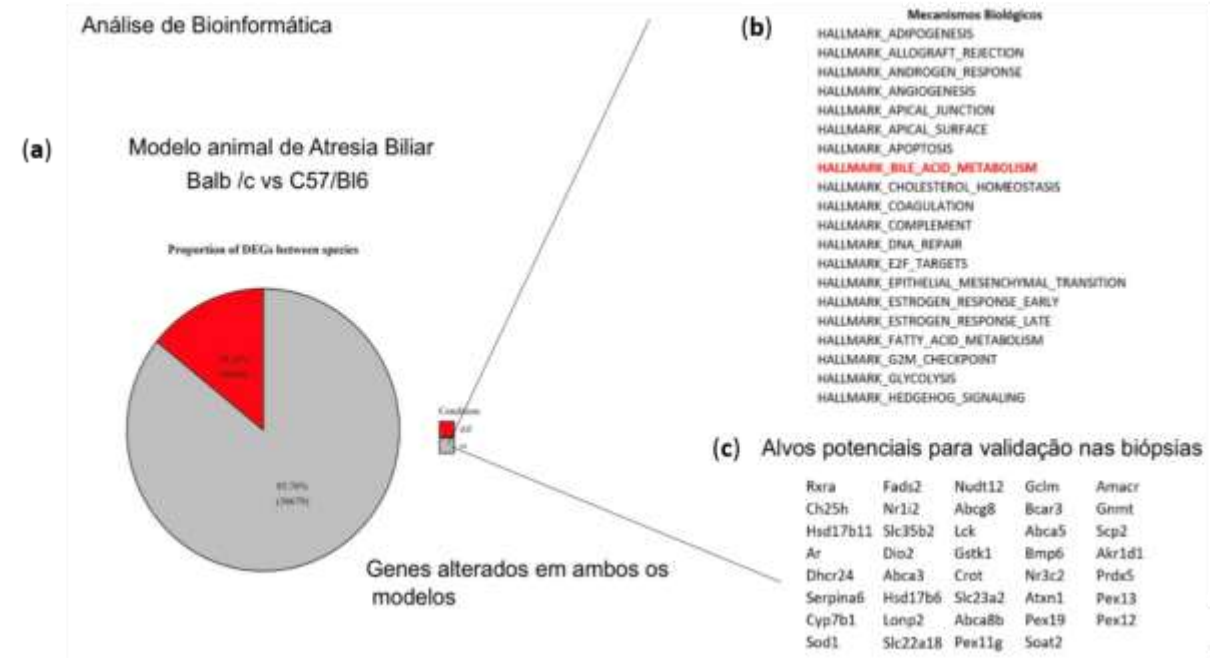
## 5.2 Estudo *in silico*

Em paralelo ao levantamento clínico, optamos por realizar um estudo *in silico* utilizando dados de transcriptoma depositados em banco de acesso público referentes ao estudo molecular de modelos *in vivo* de atresia de vias biliares. Esta etapa do desenvolvimento do projeto teve como objetivo a seleção de potenciais genes que poderiam ser alvos moleculares para o estudo

Epigenético de biópsias hepáticas de lactentes acometidos pela colestase neonatal do Estado de Alagoas.

Como estratégia metodológica, optamos por inicialmente filtrar todos os genes que tiveram sua expressão modulada de forma positiva ou negativa nos dois diferentes tipos de camundongo utilizados no estudo em questão (Balb/c e C57/BL6). Os dados referentes às análises de bioinformática apresentados na Figura 5 revelaram que aproximadamente 85% dos genes que foram modulados pela Atresia de Vias Biliares foram semelhantes em ambos os camundongos (Figura 5a). Em seguida, utilizando o programa *Cytoscape* foram determinados os possíveis mecanismos biológicos que poderiam impactar os genes modulados. Dentre os mecanismos apontados, podemos destacar a angiogênese, a coagulação, a glicólise, a homeostase do colesterol e, de especial interesse, o metabolismo de ácidos biliares (Figura 5b). Expandindo as análises na busca de potenciais alvos moleculares, foi extraído do banco de dados apenas os genes que faziam parte do metabolismo de ácidos biliares (Figura 5c).

**Figura 5**. Análise de Bioinformática.

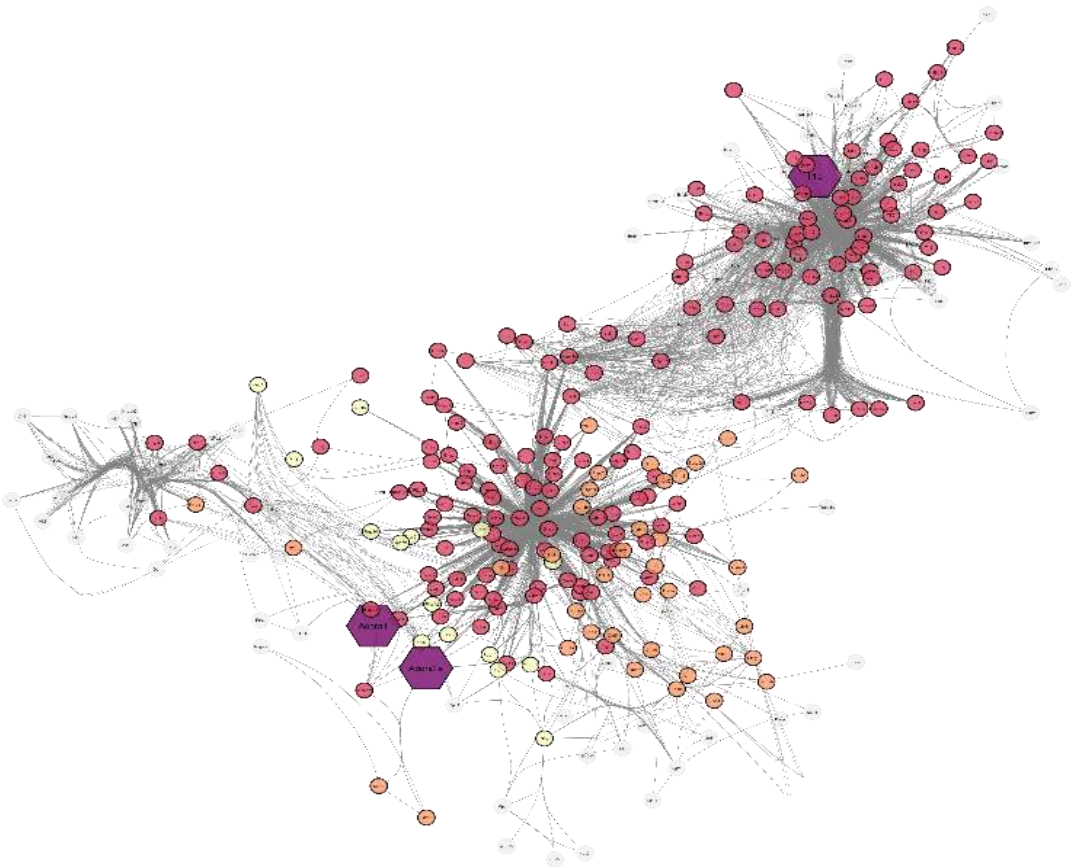



Fonte: Fonte própria.

Para investigar o envolvimento dos genes modulados pelo modelo animal de Atresia de Vias Bialares, os genes selecionados com alvos potenciais foram usados como entrada para construir uma rede expandida. Essa rede foi, então, analisada com Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003), usando a ferramenta *Network Analyzer*, buscando por centralidades importantes, como proximidade e intermediação, sendo possível observar 4 *clusters* principais que se interligavam

para formar a rede expandida e que foram demarcados com um círculo em vermelho (Figura 6).

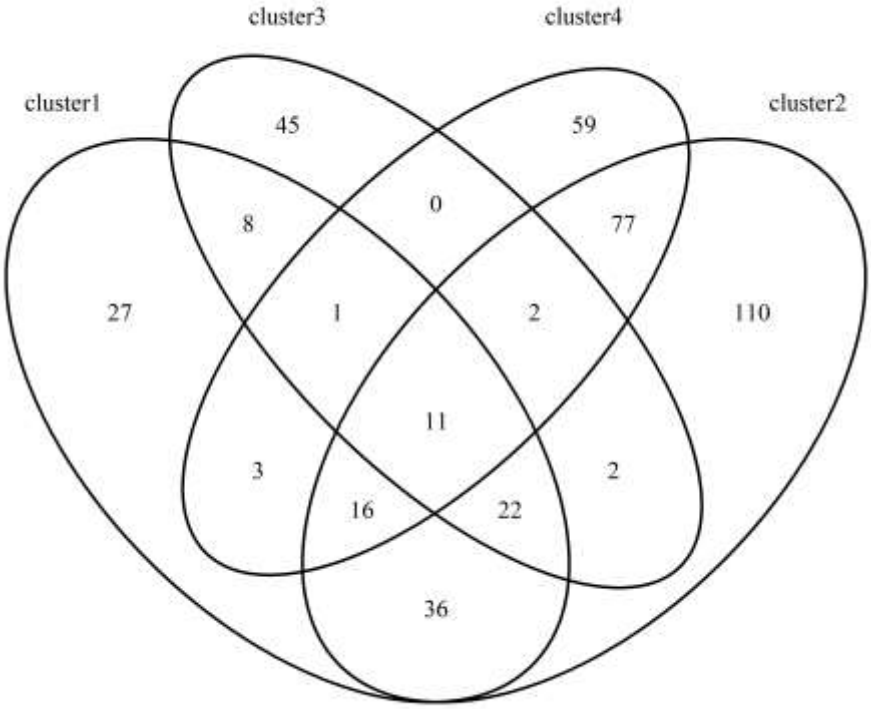
**Figura 6**. Rede extendida.



Fonte: Fonte própria.

A análise comparativa entre os componentes de cada *cluster* revelou que o *cluster* 2 foi o *cluster* com maior número, sendo constituído por 110 genes, seguido pelo *cluster* 4 com 59, *cluster* 3 com 45 e, por último, o *cluter* 1 com 27 genes em sua rede de interação. Destes, apenas 11 genes foram compartilhados pelos 4 *clusters* (Figura 7).

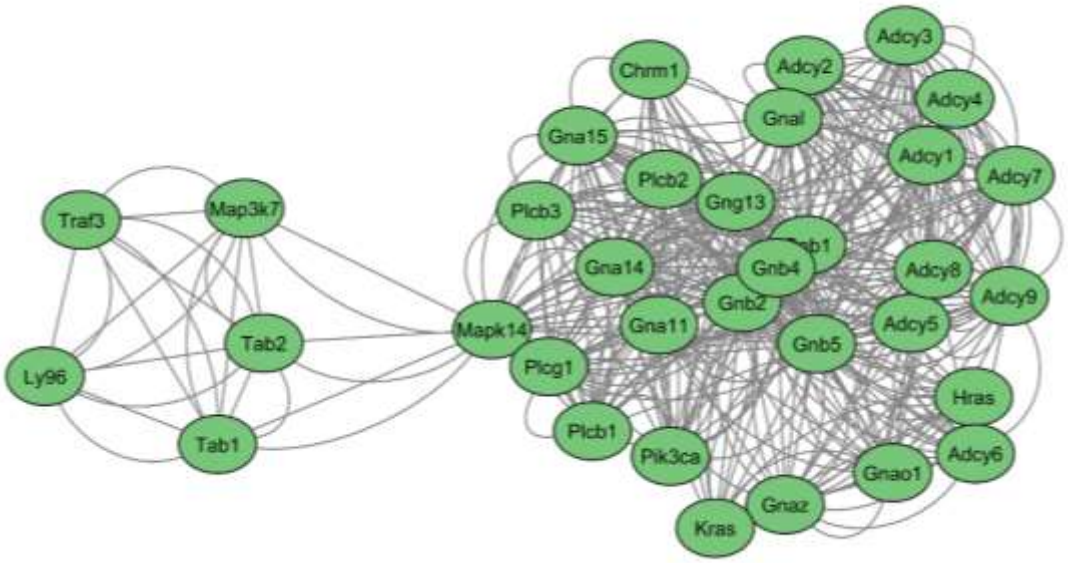
**Figura 7**. Comparação entre os *clusters*.




Fonte: Fonte própria.

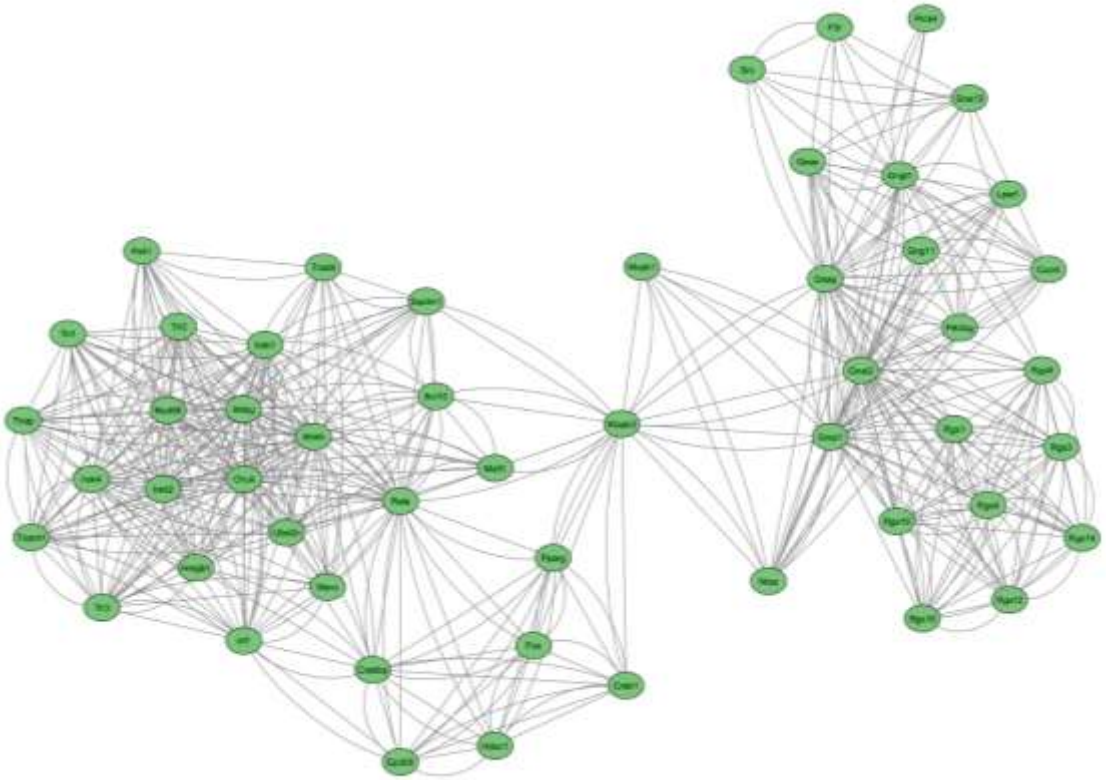
Em seguida, para melhor visualizar e entender a rede de interação expandida e possibilitar a melhor visualização de seus componentes, *clusters* foram apresentados de forma isolada. Visualmente, foi possível observar o gene *Mapk14* fazendo a ponte entre dois centros de redes no *cluster* 1 (Figura 8).Para os *clusters* 2 e 3 com resultados semelhantes pode ser observado tendo o gene *Mapk3* como ponte entre os dois blocos de interaçãoes do *cluster* 2 (Figura 9) e o gene *Ampd2* interligando os blocos de interações do *cluster* 3 (Figura 7). Por outro lado, os resulados do *cluster* 4 revelaram o gene *Traf6* como central (Figura 8).

**Figura 8**. *Cluster* 1.



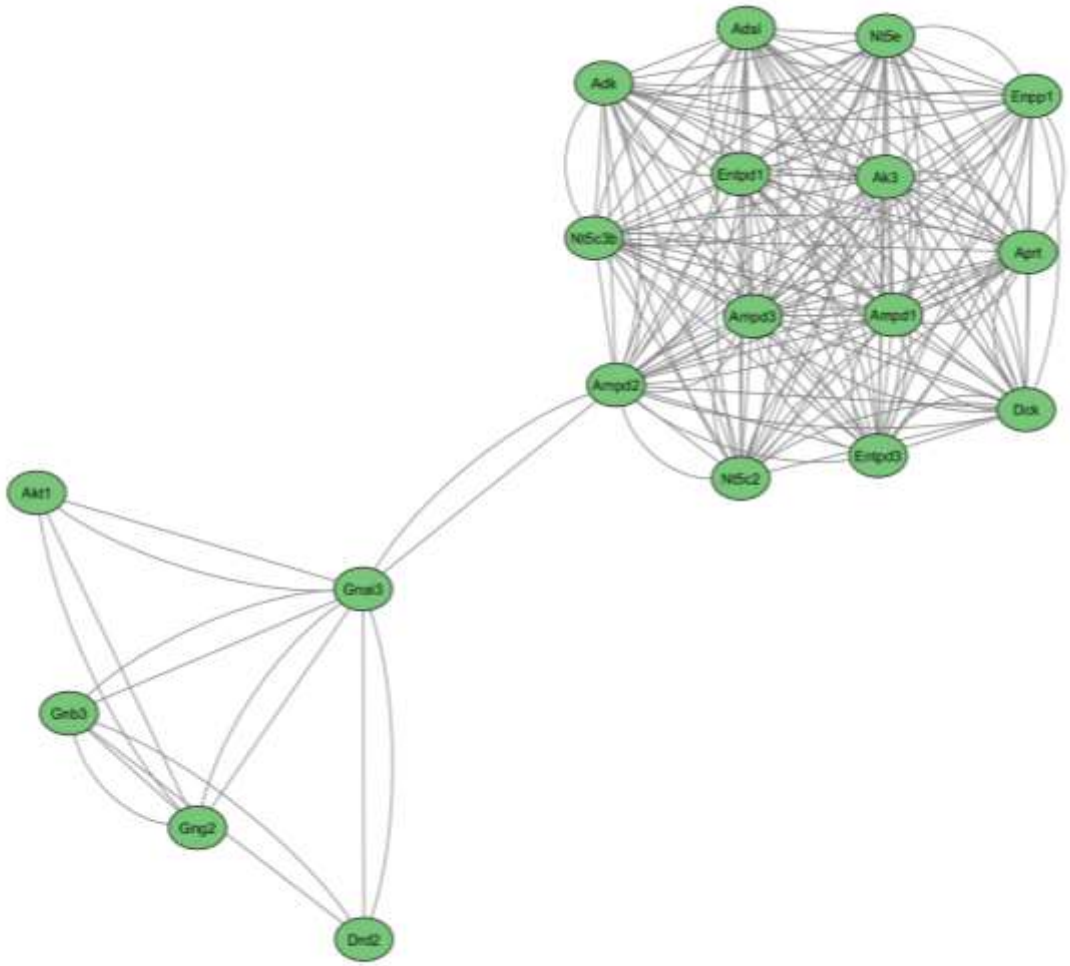

Fonte: Fonte própria.

**Figura 9**. *Cluster* 2.



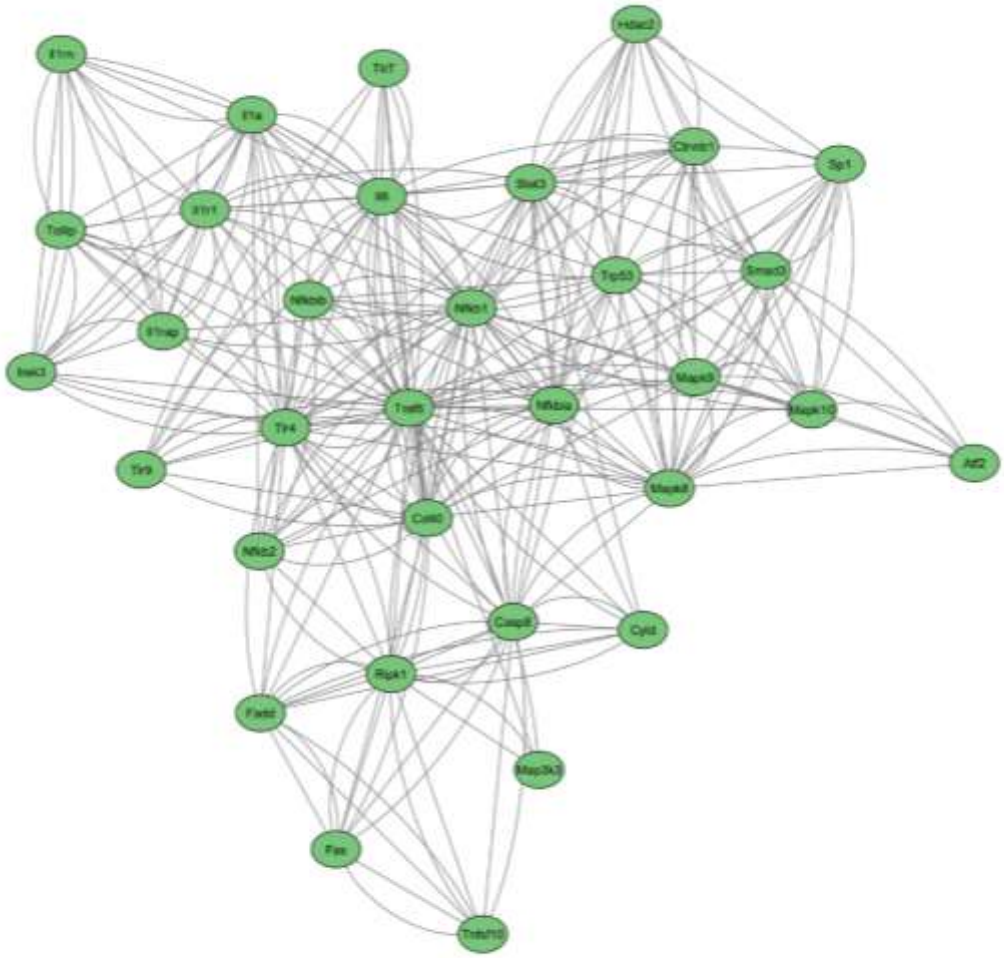
Fonte: Fonte própria.

**Figura 10**. *Cluster* 3.



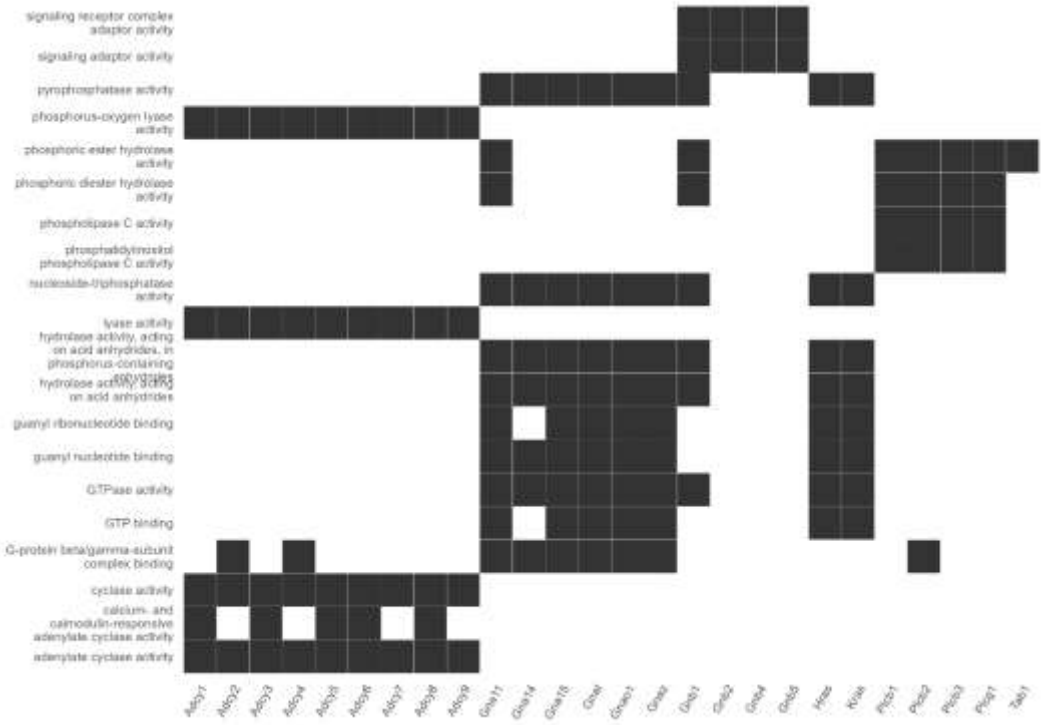

Fonte: Fonte própria.

**Figura 11**. ***Cluster* 4.**



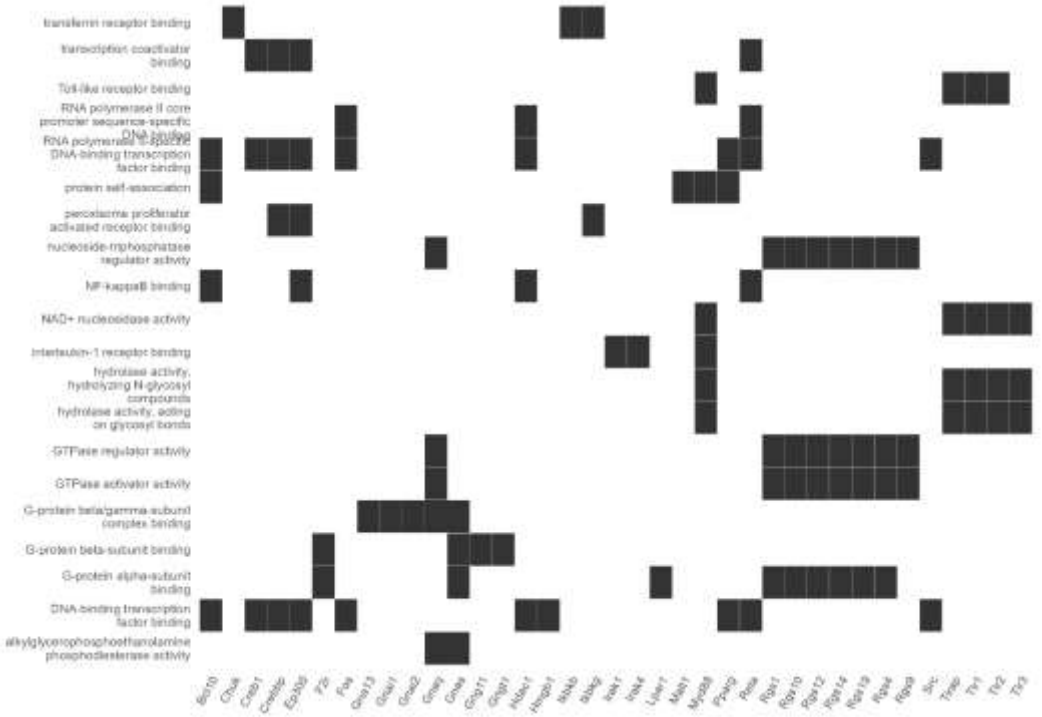

Fonte: Fonte própria.

**Figura 12**. Enriquecimento 1.



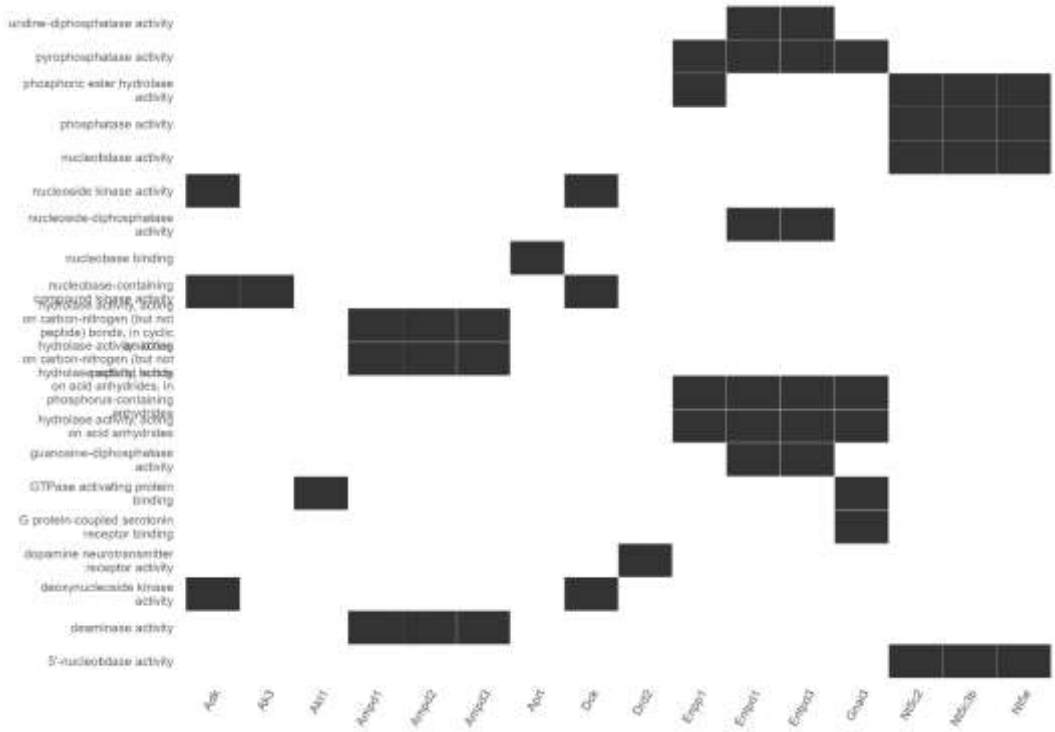

Fonte: Fonte própria.

**Figura 13**. Enriquecimento 2.



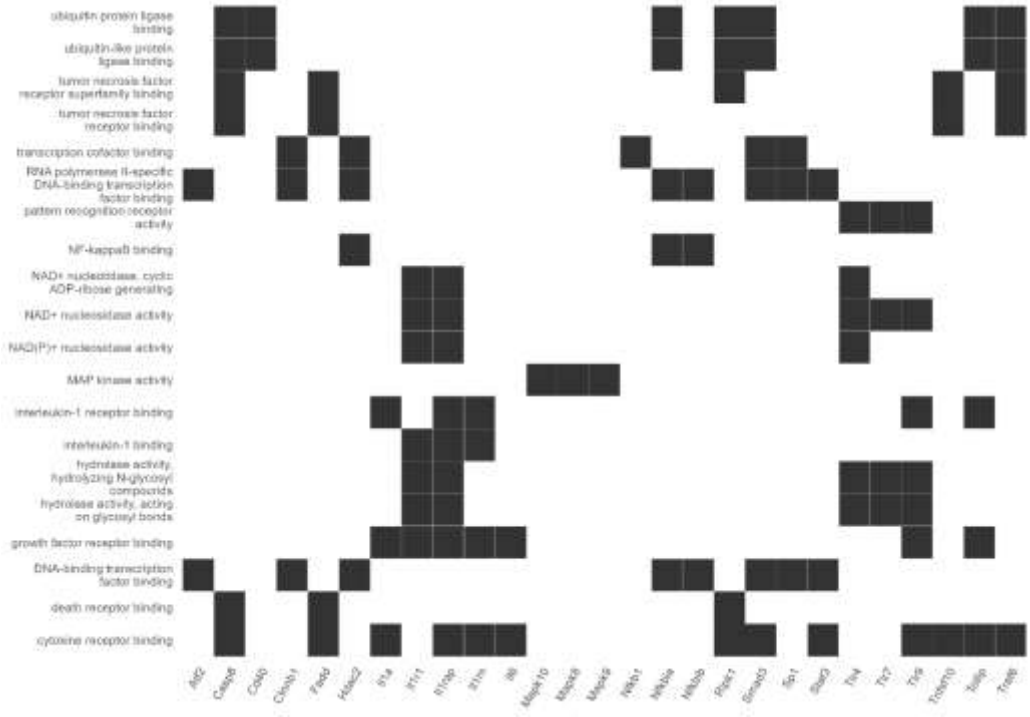

Fonte: Fonte própria.

**Figura 14**. Enriquecimento 3.




Fonte: Fonte própria.

**Figura 15**. Enriquecimento 4.




Fonte: Fonte própria.

Em etapa seguinte, cada *cluster* foi então analisado com *Cytoscape* (Shannon *et al.*, 2003), usando a ferramenta *Network Analyzer* foi possível buscar por centralidades importantes, como proximidade e intermediação de interações para ranquear os genes por grau de relevância dentro na rede. Os resultados apresentados na Tabela 2, mostra os 05 genes de maior importância para cada *cluster*.

**Tabela 2**. Top 5 genes por *cluster*.

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Cluster 1** | *Gnb1* | **Cluster 2** | *Gnaq* | **Cluster 3** | *Gnai3* | **Cluster 4** | *Traf6* |
| | *Gna11* | | *Gnas* | | *Nt5e* | | *Nfkb1* |
| | *Mapk14* | | *Rela* | | *Drd2* | | *Tlr4* |
| | *Gnb4* | | *Mapk3* | | *Ampd2* | | *Nfkbia* |
| | *Gnb2* | | *Chuk* | | *Gnb3* | | *Il6* |

Fonte: Fonte própria.

### 5.3 Estudo Molecular

Tendo como base a classificação por grau de importância dos genes na rede apresentada anteriormente, selecionamos os genes *Gnaq* do *cluster* 2 e o *Ampd2* do *cluster* 3 para determinarmos seu estado de metilação em etapa seguinte.

#### 5.3.1 Desenho das sequências iniciadoras para o estudo de metilação região específica

A seguir, apresentamos os dados referentes ao estudo das sequências iniciadoras para a determinação do estado de metilação gene específico. Em vemelho, foi demarcado as sequências dos iniciadores 5' (*Forward*) e dos iniciadores finais 3' (*Reverse*), delimitando o fragmento amplificado, os quais possuem em amarelo os sítios de reconhecimento (CCGG) de corte das endonecleases (*Msp*I e *Hpa*II) metalição específica. Na cor azul, foi representado o cromossomo (Ch) em que o gene está localizado e delimitação da região que foi amplificada dos genes *LITD1*, *AMPD2 GNAQ*.

***L1TD1;* LINE1 type transposase domain containing 1 [Homo sapiens (human)]**
**Gene ID: 54596**

>hg38_cpgIslandExt_CpG: 33 range=chr1:62194884-62195274 5'pad=0 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none

CGCTCCTCAGTCGTCCAGGCGG**ATTCCTTTTTCGCCAGGTAAGGCT**GGCCCGGG
TGCATGGGGCCCGGCGTGCCCTGGGTAAGGCTGGCCCAGGCGCGTGGGGTCCGG
GGCGCGCCGGGTAAGGCTGGGCCAGGCGCGTGGGGTCCGGGGTGCCCCGGGTAA
GGCTGGTCCAGGGGCGTGGGGTCCGGGGTGCCCCGGGTAAGGCTGGTCTAGGCG

CGTGGGGTCCGCAGCGCCCCAAGTAAGGCTGGTCCAGGAGCGTGAGGTCCAGGG
TGCCCCGGATAAGGCTGGTCCAGGCGCGAAGGGCGCGGGGTGCCCCGGGTAAGG
CTGGCCCAGGTACGTGAGGCCCGAGG
TGCCCCAGGCAAGGCTGATCCGGGTGCGTGCGTGGGGCCCG

Sequências iniciadoras**:**

F: ATT CCT TTT TCG CCA GGT AAG GCT

R: CGG GCC CCA CGC ACG C

Resultado do alinhamento das sequências iniciadoras ao genoma humano (localização do fragmento estudado (chr1:62073510+62073878) e tamanho do fragmento amplificado = 369bp.

***AMPD2;* Adenosine monophosphate deaminase 2 [Homo sapiens (human)]**
**Gene ID: 271**

- >hg38_dna range=chr1:109619843-109620094 5'pad=0 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none

CGCAGAGCCTGGCGCGGAGCCGGCGAGATTTTGGTGGGGTCTCACCTGTTGCGT
GACTCCCCCACAGTCCGGCCGCGGGAGTCCGACCCTGAATGCCCAGGGAGTGTTG
AGAGAAATCTGGACGAGTTTCGGGTCCCGCTCCCTTGGGAGCACGTGGCCTACCA
GCCTCTCGATTGCAGGGTTGGGTGGTCGCGACACCGGGGTCGCCTTGAGGCCAGT
CCGGCTGCCGAGGTCTGCGGGAGTCCACCTCCG

Sequências iniciadoras**:**

F: GCAGAGCCTGGCGCGGA

R: GAGGTGGACTCCCGCAGACCTCGGCA

Resultado do alinhamento das sequências iniciadoras ao genoma humano (localização do fragmento estudado (chr1:109619844+109620092) e tamanho do fragmento amplificado = 249bp.

***GNAQ;* G protein subunit alpha q [*Homo sapiens* (human)]**

**Gene ID: 2776**

>hg38_dna range=chr9:78030931-78032587 5'pad=0 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none

CGCGCCCGCGCGCCCGCGCGGGTGAAGGCAGTGGCCGGGGGCGCGCCCGGGA
GGGTAGGGGCGAACCGCGGGCGCCGGGGGGCGGGGGCGCCGAAGGCAGCTGCC
CCGCAGGGCCAAGGATGGTGGGCTGGGGGCGCAGAGGCCCGGCGGGGCCCCGGA
CGGTACTCACCGAGCAGCAGCAGCTTGAGCTCCCGGCGGGCGTCCCGCTTGTCCC
TGCGGAGCTGCCGCTCGATCTCGTCGTTGATCCGCCGGGCTTCCTTGGCCTCCTCG
CTCAGGCAGCACGCCATGATGGACTCCAGAGTCATTCTTCCAAAGTGCCTCCGCT
GCAGCCCCGCCGGCACCCCCTGCTCACAGCGCGCACACACACCCTCCCGCCCTCG

CTCCCCCGAGGCAGCGGTGGCCGCCGAGCCCCCGCCGCCCGGGCGCGCGTCCGG
GACGAGCTCCGGGAACCGCCGCGGGGGCGGCGGCCAGGGCCGGGGCCACCAGGT
GGGCCGGGGGCGCGGTGGGAGCGGATAGTCTGGGCCGACGGGAGAAGAGAGGC
GGGCGCGGGAGGCGGGCGCTGGCTCGGGGGGCGCGTGAGAGAAGGCCGCCGCG
CCCGGCCTCGCTCAGACGCCCGCGCCTCCTTCCCCGGGAACAGGCGGCCCGCCTC
GCCCCCCGAGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCTGCGAGGCTCCCCTACGCCGTGCGC
CTGGCGGCGAGAGCTCATTCACCGGGGTGTCCCCGCAGCGAGCGGCCGCCGACG
GCTCCCCGCGCCCGGCGCGCCCGCTCCTCGCCGCCGCCTGACACGGCTCCCGGGC
GCCCTCGGCCCTGTCCGCGCCCACCGCCCGGCTCGCGCGCAGACCCGGTTCCCGT
CCCGCCCGGCA**ACCGCGCGCTCCTCCGCCTCCGCC**TCCGCCCCCGCCCCCGCC
AGACGCCCACCCCCTGCCCCGATTGCCAGGCGCGGAGCGGCTGCTCAGTGCGAGC
CCTC

Sequências iniciadoras**:**

F**:** CGCGCCCGCGCGGGTGAAGGC

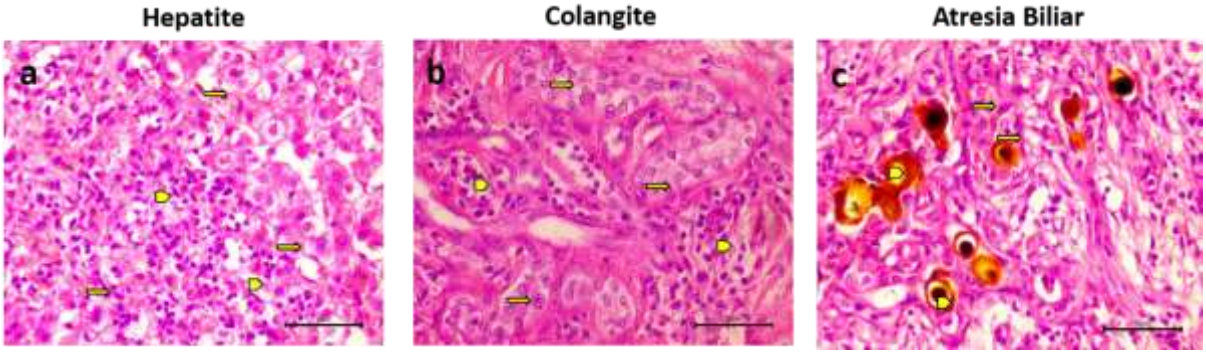
R: GGCGGAGGCGGAGGAGCGCGCGGT

Resultado do alinhamento das sequências iniciadoras ao genoma humano (localização do fragmento estudado (chr9:78030939+78031833) e tamanho do fragmento amplificado = 895bp.

### 5.3.2 Caracterização histopatológica e molecular

Na Figura 16 é apresentada a caracterização histopatológica dos grupos estudados. Na fotomicrografia representativa do grupo Hepatite foi possível observar distorção e descontinuidade cordonal, com eventual degeneração vacuolar de hepatócitos (setas amarelas) e importante infiltrado leucocitário, com predomínio mononuclear (pontas de seta a arela) (Figura 16a). No grupo Colangite, as fotomicrografias dos cortes histológicos apresentou expansão de estruturas ductulares biliares (setas amarelas), acompanhada por densificação estromal e infiltrado leucocitário, com predomínio mononuclear (pontas de seta amarelas) (Figura 16b). Por outro lado a análise histopatologica das fotomicrografias dos cortes histológicos do grupo Atresia Biliar, revelou expansão de estruturas ductulares biliares (setas), e a presença de plugs biliares (ponta de seta). Infiltrado leucocitário em interstício (Figura 16c).

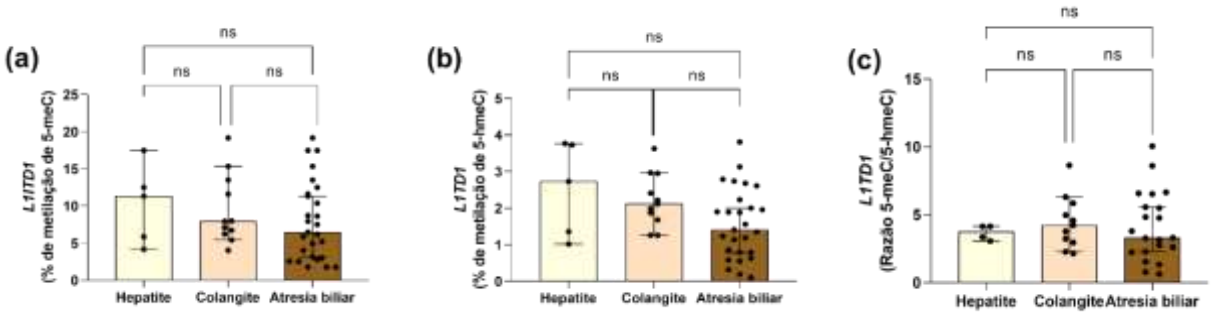
**Figura 16**. Classificação Histopatológica do Fígado.




Fotomicrografia repesentativa de corte histológico hepático corado com Hematoxilina-eosina apresentando processo de hepatite (**a**), processo de colangite (**b**) e processo de Atresia Biliar (**c**) e atresia de vias biliares.
Fonte: Fonte própria.

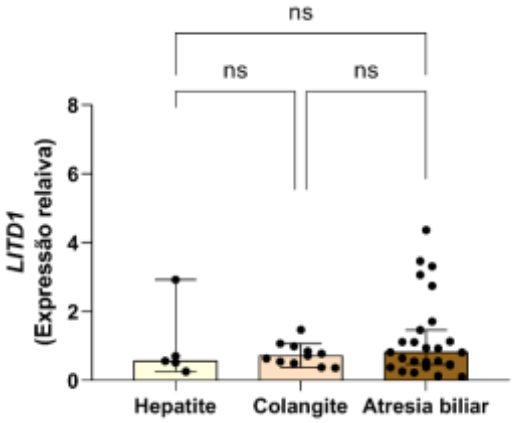
Após a finalização da confirmação dos diagnósticos das biópsias hepáticas arquivadas no Laboratório de Anato patológica do Hospital Veredas após a padronização das condições ideais de ciclagem dos conjuntos de iniciadores específicos para o estudo de expressão e metilação foi realizada a caracterização molecular das amostras. Os resultados apresentados na Figura 17 referentes à caraterização da metilação da região regulatória do gene L1TD1 revelou os valores percentuais das marcas 5-meC (Figura 17a) e 5-hmeC (Figura 17b), como também a razão entre elas (Figura 17c) não apresentou diferenças significatntes entre os grupos. Resultado semelhante foi observado para a expressão do gene LINE-1 (Figura 18).

**Figura 17**. Determinação do estado de metilação da região promotora do gene *L1TD1*.




Após extração de RNA total pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol o perfil transcricional dos elementos repetitivos do elemento 1 de nucleotídeos intercalados longos (LINE-1) nas biópsias hepáticas o estado de metilação das marcas (a) 5-meC, (b) 5-hmeC e da razão (c) 5-meC/5-hmeC da região regulatória de LINE1 foram investigados por qPCR utilizando DNA previamente tratado pelas endonucleases T4-BGT e *Msp*I e *Hpa*II com iniciadores específicos. Os valores de metilação (5-meC) foram obtidos pelo cálculo Ct [*Hpa*II] - Ct [*Msp*I] / Ct [SE] e os valores de hidroximetilação (5-hmeC) pelo Ct [*Msp*I] Ct [SE]. Os resultados foram representados como média ± SEM das amostras realizadas em duplicata técnica.
Fonte: Fonte própria.

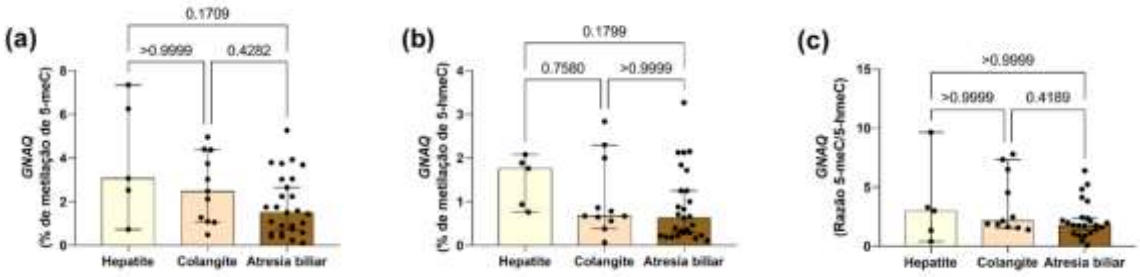
**Figura 18**. Determinação do panorama transcricional de LINE-1.




Após extração de RNA total pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol o perfil transcricional dos elementos repetitivos do elemento 1 de nucleotídeos intercalados longos (LINE-1) nas biópsias hepáticas foi avaliado por reações de qPCR no tecido placentário. Os genes *GAPDH, 18S* e *β-actina* foram utilizados como normalizadores. Os resultados foram representados como média ± SEM das amostras realizadas em duplicata técnica.
Fonte: Fonte própria.

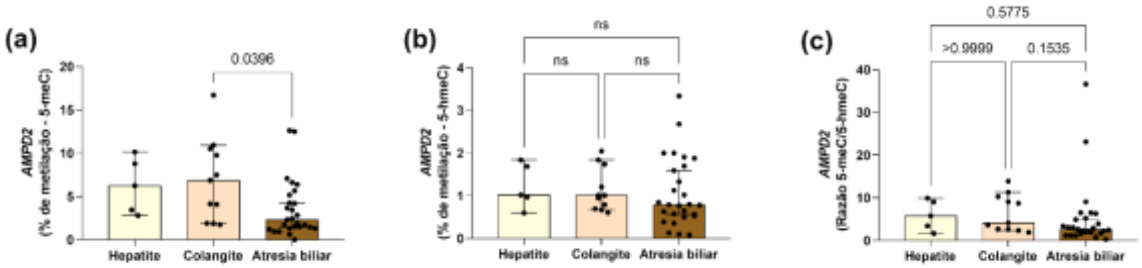
Como etapa seguinte foi determinado o estado de metilação da região promotora dos genes *GNAQ* e *AMPD2*. Como mostrado na Figura 19, nossos resultados revelaram que a porcentagem de metilação/hidroximetilação das marcas do gene *GNAQ* não se mostraram estatisticamente diferentes entre os grupos avaliados (Figura 19a, 19b, 19c). Por outro lado, os resultados referentes ao gene *AMPD2* mostraram diferença significativa apenas entre a porcentagem da marca 5-meC entre o grupo Colangite *versus* Atresia Biliar, sendo observado um estado hipometilado para o grupo Atresia Biliar em relação ao grupo Colangite (Figura 20a), não sendo observados outras diferenças significantes para a marca 5-hmeC (Figura 20b), e para a razão 5-meC/5-hmeC (Figura 19c).

**Figura 19**. Determinação do estado de metilação da região promotora do gene *GNAQ*.




Após extração de RNA total pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol o perfil transcricional dos elementos repetitivos do elemento 1 de nucleotídeos intercalados longos (LINE-1) nas biópsias hepáticas o estado de metilação das marcas (a) 5-meC, (b) 5-hmeC e da razão (c) 5-meC/5-hmeC da região regulatória de LINE1 foram investigados por qPCR utilizando DNA previamente tratado pelas endonucleases T4-BGT e *Msp*I e *Hpa*II com iniciadores específicos. Os valores de metilação (5-meC) foram obtidos pelo cálculo Ct [*Hpa*II] - Ct [*Msp*I] / Ct [SE] e os valores de hidroximetilação (5-hmeC) pelo Ct [*Msp*I] Ct [SE]. Os resultados foram representados como média ± SEM das amostras realizadas em duplicata técnica.
Fonte: Fonte própria.

**Figura 20**. Determinação do estado de metilação da região promotora do gene *AMPD2*.




Após extração de RNA total pelo método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol o perfil transcricional dos elementos repetitivos do elemento 1 de nucleotídeos intercalados longos (LINE-1) nas biopsias hepáticas o estado de metilação das marcas (a) 5-meC, (b) 5-hmeC e da razão (c) 5-meC/5-hmeC da região regulatória de LINE1 foram investigados por qPCR utilizando DNA previamente tratado pelas endonucleases T4-BGT e *Msp*I e *Hpa*II com iniciadores específicos. Os valores de metilação (5-meC) foram obtidos pelo cálculo Ct [*Hpa*II] - Ct [*Msp*I] / Ct [SE] e os valores de hidroximetilação (5-hmeC) pelo Ct [*Msp*I] Ct [SE]. Os resultados foram representados como média ± SEM das amostras realizados em duplicata técnica.
Fonte: Fonte própria.

## 6 DISCUSSÃO

Icterícia colestática é uma característica comum de disfunção hepatobiliar e/ou metabólica em recém-nascidos, sendo um grande desafio para a comunidade pediátrica. Sua detecção oportuna da colestase, seguida de uma avaliação rápida e gradual para determinar a etiologia, é crucial para identificar as causas que são passíveis de intervenção médica ou cirúrgica e para otimizar os resultados para todos os bebês. Nas duas últimas décadas, as etiologias genéticas foram elucidadas para muitas doenças colestáticas, como também houve significativos avanços na compreensão dos fatores de risco para colestase/doença hepática associada à nutrição parenteral. Neste sentido, a estratificação de risco com base na gravidade do defeito genético tem sido promissora para orientar a decisão de buscar transplante primário de fígado *versus* terapia médica ou cirurgia sem transplante, bem como triagem precoce para as doenças hepáticas colestáticas.

A colestase neonatal é uma condição complexa, caracterizada por hiperbilirrubinemia conjugada no recém-nascido e na criança pequena e é um sinal comum a mais de 100 distúrbios hepatobiliares e/ou metabólicos que ainda desafiam a comunidade científica. Dentre os diagnósticos, quando estamos diante de uma criança com aumento de bilirrubina direta, a atresia de vias biliares é um dos mais temidos. O acometimento da via biliar nessa doença requer diagnóstico precoce para o paciente ser submetido a um procedimento cirúrgico (cirurgia de Kasai) na tentativa de reestabelecer um bom fluxo biliar, e impedir o acometimento hepático e

evolução para cirrose e suas complicações, e necessidade de transplante hepático.

A atresia biliar é uma doença rara e seu diagnóstico, assim como a maioria das doenças hepáticas que acometem as crianças, necessita sempre de um boa avaliação clínica e exames complementares (imagem, laboratoriais e anatomopatológico). O fato de não ter terapias médicas eficazes para retardar sua progressão a faz ser a indicação mais comum para transplante de fígado pediátrico. A contribuição variável de fatores genéticos, imunológicos e ambientais contribui para a heterogeneidade da doença entre os pacientes, dificultando assim o diagnóstico precoce. Acreditamos que desenvolver uma compreensão mais profunda dos mecanismos moleculares subjacentes a doença poderá contribuir no desenvolvimento de terapias médicas direcionadas. Assim, este estudo buscou avançar na compreensão das bases epigenéticas de doenças colestáticas, fornecendo dados sobre o padrão de metilação de genes específicos e sequências repetitivas em crianças atendidas no Estado de Alagoas.

Por se tratar de uma doença rara, conseguimos acesso aos dados clínicos de 22 participantes, sendo 04 com diagnóstico de hepatite, 05 com colangite e 13 com atresia biliar. Em relação aos dados clínicos, nosso estudo encontrou relação direta entre os valores aumentados de gama GT com o diagnóstico de Atresia de Vias Biliares, estando nossos dados de acordo com a literatura médica. Para os demais parâmetros clínicos, nenhuma relação significativa foi observada. Em relação a exames laboratoriais de rotina para investigação de crianças com doenças de fígado que evoluam com colestase, frequentemente observamos alterações de enzimas hepáticas como as aminotransferases, enzimas canaliculares (gama GT e fosfatase alcalina), bilirrubinas, dislipidemias (elevação de colesterol), alargamento no tempo de protrombina seja pela má absorção de vitaminas lipossolúveis como pela própria disfunção hepática, hipoalbuminemia, dentre outras alterações. Porém, o padrão de alteração dos exames laboratoriais acima citados não possui diferença significativa entre as doenças causadoras de colestase em lactentes jovens, com a exceção da maior elevação de gama GT nos casos de Atresia de Vias Biliares. Justamente por essa dificuldade em encontrar padrões característicos, que buscamos uma forma de identificar dentro da epigenética algum marcador específico com o objetivo de diagnóstico precoce, para reduzirmos o número de crianças com indicação de transplante hepático antes de um ano de idade ou menores de 10 quilos, evitando as complicações pós-transplantes existentes mais frequentemente em crianças pequenas.

Sua patogênese ainda é desconhecida e, embora haja algumas evidências de causas virais, tóxicas e genéticas complexas, a ocorrência exclusiva de Atresia Biliar durante um período de crescimento e remodelação biliar sugere a importância de fatores de desenvolvimento. Estudos *in vivo* têm demonstrado envolvimento de mecanismos epigenéticos

na promoção dos defeitos biliares provocados pela inibição da metilação do DNA e ativação das vias inflamatórias. Ainda, neste mesmo estudo, mostrou que eventos de hipometilação nas células do ducto biliar de pacientes com Atresia Biliar em comparação com pacientes com outros distúrbios colestáticos infantis, estabelecendo assim uma possível ligação etiológica entre a diminuição da metilação do DNA, a ativação da sinalização do IFN-γ e os defeitos biliares em pacientes.

Num primeiro momento, optamos por avaliar o estado de metilação do região promotora dos elementos LINE-1, devido ao fato da ativação transcricional destes retrotransposons poderem causar instabilidade genômica, especificamente relacionada ao comprimento do telômero. Os resultados obtidos neste estudo relacionados a porcentagem de metilação da região promotora de LINE-1 não se mostram semelhantes ao dado publicado por Udomsinpraserte colaboradores, 2016, que mostraram relações positivas entre a hipometilação de LINE-1 e o comprimento relativo do telômero em pacientes com Atresia de vias biliares. A este respeito é importante ressaltar que nosso estudo teve como limitação o fato de não termos determinado a porcentagem de metilação de LINE-1 de um tecido hepático saudável, pois todas as biópsias que tivemos acesso tinham como diagnóstico algum comprometimento fisiológico. Por outro lado, todos os voluntários do grupo controle do estudo em questão não tinham nenhuma doença hepática subjacente. Como etapa seguinte, o acesso a bancos públicos e a utilização de ferramentas de bioinformática nos possibilitou identificar uma gama de genes relacionados ao metabolismo dos ácidos biliares, os quais foram modulados significativamente em modelos *in vivo* de Atresia. Dentre os diferentes genes, optamos por avaliar a metilação dos genes *AMPD2* e *GNAQ*.

O gene *AMPD2*, um membro da família de genes AMPD que codifica a AMP desaminase, é amplamente expresso em tecidos não musculares. No fígado, desempenha papéis importantes na regulação do metabolismo da glicose e dos lipídios, podendo sua desregulação desencadear o aparecimento de vários distúrbios metabólicos, incluindo obesidade, dislipidemia, resistência à insulina, diabetes tipo 2 e doença hepática gordurosa. Em nosso estudo, foi possível observar resultados relevantes apenas para o gene *AMPD2* que mostrou diferença significativa entre a porcentagem da marca 5-meC entre o grupo Colangite *versus* Atresia Biliar.

A hipometilação da região promotora do gene *AMPD2*, observada particularmente no grupo das biópsias diagnósticas com atresia biliar reforça a hipótese de que alterações epigenéticas podem influenciar a expressão de genes-chave, contribuindo para a não progressão da doença. Em relação a sua ativação transcrional, a literatura traz que sua superexpressão é

comumente observada em pacientes com câncer colorretal e atua como um oncogene metabólico induzindo a progressão do câncer através da via de sinalização Notch, contudo não existe relatos na literatura de seu envolvimento na fisiopatologia da Atresia de vias biliares. Por outro lado, o fato do gene *AMPD2* estar envolvido no metabolismo celular e desempenhar um papel central na resposta inflamatória hepática e na fibrose, mecanismos críticos em doenças como a atresia biliar. Estes achados são consistentes com estudos que demonstram a relevância de padrões epigenéticos na regulação de vias inflamatórias e metabólicas (Dong *et al.*, 2012; Matthews *et al.*, 2011).

Os estudos epigenéticos em doenças hepáticas de crianças ainda são poucos, acredito que com essa alteração acima citada no gene AMPD2 na marca 5-meC, embora diante de um número pequeno de pacientes, porém dentro de uma região delimitada, e em se tratando de uma doença rara, devemos considerar a continuidade da pesquisa pensando na possibilidade de em um futuro encontrarmos uma forma de avaliação laboratorial com dosagem sanguínea para diagnóstico de atresia de Vias Biliares.

A relevância de alterações epigenéticas na colestase neonatal não corroborada por estudos que demonstram o impacto de fatores ambientais no desenvolvimento de padrões epigenéticos anormais em populações pediátricas. Estudos prévios indicam que alterações em genes moduladores do metabolismo biliar e da inflamação, como o GNAQ, estão associadas a progressão de doenças hepáticas (Ortiz-Perez *et al.*, 2020). No entanto, os resultados deste trabalho não identificaram diferenças significativas na metilação do GNAQ, sugerindo que outros fatores regulatórios podem estar envolvidos em seu controle.

A possibilidade do diagnóstico de atresia de vias biliares está relacionado a alguma alteração epigenética e a chance dessa investigação ser realizada de uma forma não invasiva e rápida traria uma boa expectativa para a vida das crianças com essa enfermidade.

## 7 CONCLUSÃO

Este estudo buscou caracterizar o panorama epigenético global em crianças com colestase neonatal no Estado de Alagoas, utilizando análises moleculares para investigar a metilação do DNA em genes específicos e sequências repetitivas. Os achados reforçam a relevância da epigenética na compreensão das doenças colestáticas e sugerem que a regulação epigenética pode desempenhar um papel fundamental na fisiopatologia dessas condições.

Os resultados apontaram uma hipometilação significativa no gene AMPD2 no grupo de crianças com atresia biliar, sugerindo que alterações epigenéticas podem estar diretamente

ligadas à ativação de vias inflamatórias e fibrogênicas no fígado neonatal. Esse achado é consistente com estudos prévios que destacam o impacto da metilação do DNA na regulação da resposta inflamatória hepática. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas na metilação global das sequências LINE-1 e Alu, o que indica que a desregulação epigenética na colestase neonatal pode ocorrer de forma mais específica, sem comprometer amplamente a estabilidade genômica.

A partir desses resultados, este estudo contribui para o avanço do conhecimento sobre a influência da epigenética na colestase neonatal, abrindo novas perspectivas para futuras pesquisas. Estudos adicionais são necessários para validar esses achados em coortes maiores e para explorar o potencial do AMPD2 como biomarcador epigenético na identificação precoce da atresia biliar. Além disso, investigações futuras poderiam avaliar a relação entre fatores ambientais, predisposição genética e alterações epigenéticas na manifestação das doenças colestáticas em diferentes populações.

Dessa forma, este trabalho representa um passo importante na compreensão dos mecanismos epigenéticos subjacentes às doenças colestáticas neonatais, com possíveis implicações para o diagnóstico precoce e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

## REFERÊNCIAS

ARECHEDERRA, M. *et al*. Biomarcadores epigenéticos para diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas. Cânceres (Basileia). 12 de março de 2021;13(6):1265. doi: 10.3390/cancers13061265. PMID: 33809263 Artigo PMC gratuito. Análise.

BELLOMO-BRANDAO, M. A. *et al.* Differential diagnosis of neonatal cholestasis: clinical and laboratory parameters. **Jornal de pediatria**, v. 86, n. 1, p. 40–44, 2010.

BROWN, Z. J. *et al*. Diagnóstico e tratamento de cistos de colédoco. HPB (Oxford). 2023 janeiro;25(1):14-25. doi: 10.1016/j.hpb.2022.09.010. Epub 2022, 5 de outubro. PMID: 36257874 Revisão.

DONG, R. *et al.* Abnormal DNA methylation of ITGAL (CD11a) in CD4+ T cells from infants with biliary atresia. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 417, n. 3, p. 986–990, jan. 2012.

FELDMAN, A. G.; SOKOL, R. J. Neonatal cholestasis: emerging molecular diagnostics and potential novel therapeutics. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 6, p. 346–360, jun. 2019.

FUJIWARA, R. *et al*. Role of extrahepatic UDP-glucuronosyltransferase 1A1: Advances in understanding breast milk-induced neonatal hyperbilirubinemia. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 289, n. 1, p. 124–132, nov. 2015.

GÖTZE, T. *et al.* Neonatal Cholestasis – Differential Diagnoses, Current Diagnostic Procedures, and Treatment. **Frontiers in pediatrics**, v. 3, p. 43, 2015.

HOERNING, A. *et al.* Diversity of disorders causing neonatal cholestasis - the experience of a tertiary pediatric center in Germany. **Frontiers in pediatrics**, v. 2, p. 65, 2014.

IBRAHIM S. H *et al*. Doenças Hepáticas no Período Perinatal: Interações entre Mãe e Bebê. Hepatologia. abril de 2020;71(4):1474-1485. doi: 10.1002/hep.31109. Epub 2020, 18 de março. PMID: 31925801 Artigo PMC gratuito. Análise.

ISLEK A, TUMGOR G. Atresia biliar e distúrbios congênitas dos ductos biliares extra-hepáticos. Mundial J Gastrointest Pharmacol Ther. 5 de julho de 2022;13(4):33-46. doi:/ 10.4292/wjgpt.v13.i4.33. PMID: 36051179 Artigo PMC gratuito. Análise.

JEYARAJ, R. *et al.* The Genetics of Inherited Cholestatic Disorders in Neonates and Infants: Evolving Challenges. **Genes**, v. 12, n. 11, nov. 2021.

LEVY, C.; MANNS, M.; HIRSCHFIELD, G. Novos Paradigmas de Tratamento na Colangite Biliar Primária. Clin Gastroenterol Hepatol. 2023 julho;21(8):2076-2087. doi: 10.1016/j.cgh.2023.02.005. Epub 2023, 19 de fevereiro. PMID: 36809835 Revisão.

LUDWIG, K. *et al*. Anomalias congênitas do trato gastrointestinal: fígado, árvore biliar extra-hepática e pâncreas. Patológica. 2022 fevereiro;114(1):55-63. doi: 10.32074/1591-951X-709. PMID: 35212316 Artigo PMC gratuito. Análise.

MARUO, Y. *et al.* Prolonged unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast milk and mutations of the bilirubin uridine diphosphate- glucuronosyltransferase gene. **Pediatrics**, v. 106, n. 5, p. E59, nov. 2000.

MATTHEWS, R. P. *et al.* DNA hypomethylation causes bile duct defects in zebrafish and is a distinguishing feature of infantile biliary atresia. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 53, n. 3, p. 905–914, mar. 2011

MCKIERNAN, P. J. Neonatal cholestasis. **Seminars in neonatology : SN**, v. 7, n. 2, p. 153–165, abr. 2002.

MITRA, S.; RENNIE, J. Neonatal jaundice: aetiology, diagnosis and treatment. **British journal of hospital medicine (London, England : 2005)**, v. 78, n. 12, p. 699–704, dez. 2017.

NESTOR, C. E. *et al.* Tissue type is a major modifier of the 5- hydroxymethylcytosine content of human genes. **Genome research**, v. 22, n. 3, p. 467–477, mar. 2012.

PETERSEN, C.; DAVENPORT, M. Aetiology of biliary atresia: what is actually known? **Orphanet journal of rare diseases**, v. 8, p. 128, ago. 2013.

PINTO, R. B. Colestase neonatal: uma abordagem prática. **Boletim científico de Pediatria**, v. 05, n. 3, p. 92–102, 2016.

SANHA, V.; FRANZINI, T. A.; JUNIOR, W. F..; KALIL, A. N. Os resultados pós-transplante da falha precoce e da falha tardia de Kasai são comparáveis aos do transplante primário de fígado? Cureus. 31 de dezembro de 2023;15(12):e51424. doi: 10.7759/cureus.51424. eCollection 2023 Dez. PMID: 38299129 Artigo PMC gratuito. Análise.

SAWAMURA, R.; FERNANDES, M.; TAVEIRA, A. Colestase neonatal ou do lactente. **Usp**, [s.d.].

SHNEIDER, B. L. *et al.* Initial assessment of the infant with neonatal cholestasis- Is this biliary atresia? **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0176275, 2017.

SOROKA, C. J.; BOYER, J. L. Biosynthesis and trafficking of the bile salt export pump, BSEP: therapeutic implications of BSEP mutations. **Molecular aspects of medicine**, v. 37, p. 3–14, jun. 2014.

SUTTON, H.; KARPEN, S.J.; KAMATH, B. M. Doenças Colestáticas Pediátricas: Mecanismos Patogênicos Comuns e Únicos. Annu Rev Pathol. 24 de janeiro de 2024;19:319-344. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-031521-025623. PMID: 38265882 Revisão.

TRALONGO, P. *et al*. Atresia biliar em uma criança com síndrome de Kabuki: relatório de autópsia e revisão da literatura. Pediatr Dev Pathol. 2023 maio-junho;26(3):318-320. doi: 10.1177/10935266231161384. Epub 2023, 28 de março. PMID: 36974991 Artigo PMC gratuito. Análise.

ULLAH, S.; RAHMAN, K.; HEDAYATI, M. Hyperbilirubinemia in Neonates: Types, Causes, Clinical Examinations, Preventive Measures and Treatments: A Narrative Review Article. **Iranian journal of public health**, v. 45, n. 5, p. 558– 568, maio 2016.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3-new capabilities and interfaces. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 15, p. e115, ago. 2012.

VIJ, M.; RELA, M. Biliary atresia: pathology, etiology and pathogenesis. **Future science OA**, v. 6, n. 5, p. FSO466, mar. 2020.

VIJ, M.; RELA, M. Atresia biliar: patologia, etiologia e patogênese. Ciência futura OA. 17 de março de 2020;6(5):FSO466. doi: 10.2144/fsoa-2019-0153. PMID: 32518681 Artigo PMC gratuito. Análise.

ZHANG, B.P.; HUANG, Z.H.; DONG, C. Atresia biliar combinada com colestase intra-hepática familiar progressiva tipo 3: relato de caso e revisão da literatura. Medicina (Baltimore). Maio de 2019;98(19):e15593. doi: 10.1097/MD.0000000000015593. PMID: 31083246 Artigo PMC gratuito. Análise.

WANG, H.; YANG, L.; WANG, J. Etiology of neonatal cholestasis after emerging molecular diagnostics. **Translational pediatrics**, v. 11, n. 3, p. 359–367, mar. 2022.

WANG, Y.F.; FU, J.H.; ZHANG, Z. B. Novos avanços no diagnóstico e tratamento da atresia biliar. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. 2022 15 de novembro;24(11):1269-1274. doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2205180. PMID: 36398555 Artigo PMC gratuito. Análise. Chinês.