

A placa ductal e a organização do sistema biliar intra-hepático

Jorge L. dos Santos¹, Aristóteles de A. Pires¹, Themis R. da Silveira³

Os autores estudam a placa ductal e a sua relação com o desenvolvimento do sistema biliar intra-hepático. Alguns aspectos deste processo são destacados, como a formação e a relação temporal da placa ductal com os diversos estágios de formação do sistema biliar. É salientado o papel de marcadores imunohistoquímicos, como as citoqueratinas, no estudo e na compreensão do desenvolvimento embriológico hepato-biliar. A compreensão destes aspectos é importante para entender a gênese de algumas entidades patológicas que acometem a via biliar, como a atresia biliar e a fibrose hepática congênita.

Unitermos: Placa ductal; embriologia do sistema biliar; atresia biliar; fibrose hepática congênita.

The ductal plate and the organization of the intra-hepatic biliary system

The authors study the ductal plate and its relationship to the development of the intra-hepatic biliary system. Some aspects of the process are highlighted, such as ductal plate formation and its temporal relationship to several stages in the formation of the biliary system. The authors emphasize the role of immunohistochemistry markers, such as cytokeratines, in the study and understanding of hepato-biliary embryological development. The comprehension of these aspects is important for the understanding of the genesis of some pathological entities which affect the biliary tract, such as biliary atresia and congenital fibrosis.

Key-words: Ductal plate; biliary system embryology; biliary atresia; congenital hepatic fibrosis.

Revista HCPA 1998;18 (3):302-10

Introdução

Há três teorias básicas para explicar a formação do sistema biliar intra-hepático (1). A primeira propõe que todo esse sistema provém do contato entre os hepatócitos, organizados sob a forma de placa ductal, com o mesênquima periportal. A segunda sugere que o sistema intra-

hepático se origina a partir da invaginação dos ductos extra-hepáticos pré-existentes (2). A terceira engloba essas duas teorias iniciais, sugerindo que o sistema intra-hepático provém tanto da invaginação de ductos extra-hepáticos pré-existentes como também dos hepatócitos (3). Embora alguns estágios deste desenvolvimento ainda permaneçam

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Correspondência: Dr. Aristóteles de A. Pires, Rua Dona Eugênia, 75/404, CEP 90610-220, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone:+55-51-321.1480.

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³ Departamento de Pediatria e Puericultura, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Unidade de Gastroenterologia Pediátrica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

desconhecidos, sabe-se que a formação da placa ductal, a sua remodelagem e a organização em ductos biliares configuram etapas imprescindíveis neste processo (4). Alterações na formação da placa ductal e sua organização em ductos maduros são englobadas em um termo amplo denominado de “malformação da placa ductal” (MFPD) (3-4). Já foi proposto que alterações neste processo podem explicar algumas hepatopatias. Desmet postulou que variações de MFPD resultariam em um amplo espectro de doenças dos ductos biliares intra-hepáticos, especialmente em casos de AVBEH e fibrose congênita (5).

Serão estudados alguns aspectos básicos da formação do sistema biliar intra-hepático, enfatizando-se a origem e a importância da placa ductal neste desenvolvimento.

Placa ductal e organização do sistema biliar intra-hepático

Durante o desenvolvimento embriológico do fígado humano, uma estrutura chamada de divertículo hepático origina-se como um grupo de células primitivas que crescem na borda crânio-ventral do intestino primitivo. Estas células precursoras originam-se do endoderma da parede ventral do intestino primitivo. O divertículo hepático cresce em direção ao septo transversal, e já está presente por volta da quarta semana de gestação (5). O cordão hepatocitário é composto por células imaturas que penetram no mesênquima do septo transversal, o qual dá origem aos elementos conectivos, o estroma hepático. A porção cranial do divertículo hepático origina os hepatoblastos, células precursoras dos hepatócitos, enquanto que a porção caudal, o ducto hepático comum, o ducto cístico e a vesícula biliar (4-5).

Tanto os hepatoblastos como as células precursoras do epitélio biliar são originadas de células bipotenciais (6). Essas células progenitoras diferenciam-se de acordo com a interação delas com o mesênquima circunjacente. Aquelas células que interagem mais intensamente com o tecido conectivo diferenciam-se em células com características da via biliar (6,7,8).

Os hepatoblastos migram entre os

sinusóides em processo de desenvolvimento e estabelecem a estrutura do parênquima hepático (8). Em torno da oitava a nona semana de gestação, uma população de hepatócitos adjacentes aos maiores ramos da veia porta, em contato com o mesênquima periportal, transforma-se em células epiteliais cubóides chatas, as quais desenvolvem expressão imunohistoquímica de ducto biliar (1,5,8). Esses hepatócitos são organizados na forma de uma bainha cilíndrica periportal, que, em alguns pontos, é duplicada, originando, desse modo, uma estrutura bilaminada e cilíndrica com lúmen em forma de fenda, que foi denominada placa ductal por Hammar et al (2). O mesmo processo ocorre em outros segmentos portais, e, como resultado, as várias ramificações da veia-porta, desde o hilo até a periferia hepática, são cingidas por placas ductais em processo de formação (8, 9).

Aproximadamente na décima segunda semana de gestação, o desenvolvimento continua com a remodelagem da placa ductal no sentido de individualizar as estruturas ductais (9). As células de algumas porções da placa ductal começam a separar-se do anel inicial e migram para dentro do mesênquima periportal, tomando gradualmente a forma de cordões e túbulos (10).

A remodelagem é um processo complexo que envolve a “seleção” de algumas porções da placa ductal (10). É necessário, portanto, que ocorra uma ação conjunta entre parênquima e mesênquima, para que seja obtida a plena maturação da via biliar (7, 10). Os elementos que determinam essa interação ainda não foram estabelecidos, mas postula-se que o contato existente entre aqueles hepatócitos primitivos com o mesênquima periportal seria um estímulo importante para o desencadeamento da formação da placa ductal e a sua posterior organização em estruturas ductais (11).

Estima-se que a partir de 12 semanas de gestação, a bile já está presente em hepatócitos e colangiólos, e neste período as áreas de remodelagem e formação de ductos biliares são infiltradas por eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares (11). Por volta da décima oitava semana de vida gestacional, aquelas porções da placa ductal que atingem a maturação completa

Tabela 1. Etapas da formação dos ductos biliares intra-hepáticos

Período de desenvolvimento	Estágios de Formação
I) 9-12 semanas de gestação	Placa ductal
II) 13-17 semanas de gestação	Migração das células da placa ductal para o mesênquima (estágio de remodelagem)
III) 18-40 semanas de gestação	Ductos biliares imaturos (estágio de placa ductal remodelada)
IV) Até um ano após o nascimento	Ductos biliares em processo de maturação
V) Acima de um ano de vida	Ductos biliares maduros

Fonte: Terada et al. (Gastroenterology 1995;108:1236-45).

são as que possuem maior condensação de células no mesênquima circunjacente (10, 11). Os túbulos, já no interior do mesênquima, assumem a forma de estruturas semi-circulares, em forma de fenda, com elementos ductais primitivos aderidos, sendo chamados ductos biliares imaturos (9, 11) (tabela 1).

O processo de remodelagem organiza-se em torno dos grandes ramos da veia porta no hilo hepático, estendendo-se em direção à periferia do fígado até os menores ramos vasculares (4, 12). É importante ressaltar que apenas algumas porções da placa ductal amadurecem completamente, enquanto que aquelas não utilizadas para esse fim são desprezadas. Como resultado, a placa ductal é induzida a formar estruturas ductulares, e os elementos não utilizados para essa finalidade são, em grande parte, reabsorvidos (1, 9, 13).

Após o encerramento da remodelagem do segmento selecionado da placa ductal em ducto biliar, as células restantes apresentam-se como anéis descontínuos e grupos lineares de células localizadas nas margens dos espaços-porta. São os chamados "remanescentes da placa ductal" (RPD) (9, 13). Em neonatos, agrupamentos lineares destes RPD são encontrados em torno dos grandes e pequenos espaços-porta. Em crianças maiores, e mesmo em adultos, estes RPD formam grupos isolados, ocasionais, de

células primitivas que podem ser encontradas nas margens dos espaços-porta (13). Especula-se que os RPD sejam fontes da proliferação ductular que ocorre nas hepatobileopatias (14, 15).

Desenvolvimento dos ductos biliares intra-hepáticos

Podemos dividir o processo de maturação dos ductos biliares intra-hepáticos de acordo com as várias etapas de desenvolvimento, mostradas na tabela 1.

No primeiro estágio (I), os hepatócitos periportais estão organizados sob a forma da placa ductal. A seguir (II), algumas células que compõem a placa ductal organizam-se em estruturas tubulares e começam a migrar para dentro do mesênquima periportal. No estágio III, aqueles cordões tubulares já constituem-se em ductos biliares imaturos, os quais continuam o seu desenvolvimento até atingir a forma de ductos biliares maduros (períodos IV e V) (10).

Aproximadamente na décima oitava semana de gestação, inicia-se a formação dos ductos biliares imaturos, já com uma estrutura tubular definida (9). Esta etapa do desenvolvimento prolonga-se até a quadragésima semana de gestação. Após o nascimento, os ductos biliares imaturos

umentam em tamanho e número, e este processo (de amadurecimento) pode se estender por cerca de 1 ano de vida pós-natal (4, 11).

Em torno da décima primeira semana de gestação, o lúmen do ducto hepático comum já tem comunicação com o lúmen da placa ductal no hilo, através da confluência de várias estruturas tubulares com origem na placa ductal (12). Há, porém, uma sobreposição de estágios de desenvolvimento dos DBIH num mesmo fígado, coexistindo migração de placa ductal junto a pequenos ramos periféricos da veia porta com ductos biliares em fases mais avançadas de amadurecimento nas proximidades do hilo (11, 13, 14) (figura 1).

O papel das citoqueratinas como marcadores dos ductos biliares em formação

O processo de desenvolvimento da árvore biliar já foi razoavelmente estudado, tanto em humanos (11, 14, 15), como em modelos animais (16). Um dos principais avanços neste campo de pesquisa se deve à associação da microscopia óptica e eletrônica com o método imuno-histoquímico (17).

Este, como se sabe, fundamenta-se no uso de anticorpos monoclonais e/ou policlonais específicos contra determinadas estruturas das células hepáticas e na posterior análise dos padrões histológicos resultantes (18). Através deste método, elucidaram-se vários passos do desenvolvimento embriológico do tecido hepático humano e proporcionou-se a visualização de aspectos da diferenciação celular. São utilizados, na análise, alguns marcadores hepatobiliares, os quais possibilitam a identificação de estruturas hepáticas específicas, como também a sua relação temporal com o restante do desenvolvimento embriológico humano (19). Dentre os vários marcadores, destacam-se as citoqueratinas (17, 19).

As citoqueratinas (CQ) compreendem um grande grupo de estruturas filamentosas intermediárias das células epiteliais, as quais têm a função de manter a arquitetura celular, e que estão presentes em vários tipos de epitélios (18, 19). Moll et al., utilizando método bidimensional de eletroforese, identificaram 19 tipos diferentes

de CQ. Elas podem ser divididas em dois grupos: tipo I (acídico) e tipo II (básico). As CQ são expressas como pares de polipeptídeos constituídos dos dois tipos (I e II). Todo epitélio humano pode ser classificado de acordo com a expressão de CQ específicas a um determinado tecido (20). A importância das CQ para o estudo embriológico reside no fato de que anticorpos específicos, monoclonais ou não, contra CQ, podem ser identificados através do método imuno-histoquímico ao longo das etapas de desenvolvimento (18-20). Assim, baseando-se na análise dos padrões imunohistoquímicos encontrados, pode-se "mapear" a expressão fenotípica de um determinado tecido. Por exemplo, os hepatócitos e os ductos biliares expressam CQ específicas: os primeiros expressam polipeptídeos compatíveis com CQ 8 e 18, enquanto que o epitélio biliar, CQ 7 e 19 (21).

Alguns estudos elucidaram a expressão das CQ em relação aos ductos biliares intra-hepáticos (DBIH). Van Eyken et al. em 1987, utilizaram um anticorpo monoclonal denominado CAM 5.2 dirigido contra CQ 8, 18 e 19, o qual corou fortemente os ductos biliares (22). Em 1988, Van Eyken, Sciôt e Desmet (23), utilizaram o método imuno-histoquímico para o estudo do desenvolvimento de ductos biliares intra-hepáticos em ratos e, posteriormente, em humanos. Neste último estudo (24), utilizaram os anticorpos CAM 5.2 e KL-1, além de outros anticorpos monoclonais específicos contra CK determinadas (CK 7, 8, e 19). Utilizaram, na análise, material recolhido de biópsias hepáticas de pacientes com idade variando entre 6 semanas gestacionais e 1 mês de vida extra-uterina. Os autores demonstraram que as CQ 7, 8, 18 e 19 estão presentes nos DBIH. Também identificaram que houve expressão fenotípica de determinadas CQ de acordo com o desenvolvimento de ductos biliares, ou seja, à medida em que os ductos foram individualizados, houve expressão de CQ específicas deste epitélio biliar. Estes autores corroboraram a idéia de que o processo inicia-se no hilo hepático, estendendo-se à periferia, e que ao nascimento, o sistema biliar intra-hepático ainda não está maduro. Haruna et al. (6), estudando a expressão imunohistoquímica de células progenitoras

(reportar ao início) em humanos, demonstraram que é a partir do período entre a oitava e a décima quarta semana de gestação que ocorre a diferenciação entre a linhagem hepatocitária e a linhagem da via biliar. Shah e Gerber (25), utilizando estudo de moldes similares ao anterior, também chegaram a resultados semelhantes. Estes estudos demonstraram que, efetivamente, os DBIH provém de um anel de hepatócitos primitivos em torno dos ramos da veia porta, os quais lentamente sofrem transformação fenotípica até tornarem-se biliares (4, 25).

A aplicação do estudo imunohistoquímico não se restringe apenas à compreensão da gênese dos ductos biliares. Também, este método tem auxiliado no entendimento dos defeitos relacionados com determinadas doenças hepáticas, como a atresia das vias biliares e fibrose hepática congênita (5, 21, 25). A tabela 2 resume os dados sobre alguns anticorpos anti CQ citados.

Papel dos marcadores imunohistoquímicos na organização da rede biliar

Segundo Tan et al. a proliferação de mesênquima circundante parece moldar de uma forma ativa as estruturas da placa ductal durante sua transformação de ductos biliares definitivos (12). Conforme comentado, apenas um segmento da placa ductal migra para o mesênquima, havendo deleção quase completa das células restantes da bainha epitelial primitiva. O padrão seleção/deleção, migração e remodelagem é bem orquestrado, provavelmente incorporando intrincadas seqüências de sinalização molecular entre as células epiteliais e mesenquimatosas (4, 5, 10 e 22).

Recentes estudos têm demonstrado que não apenas estímulos químicos, mas também influências mecânicas entre a matriz extracelular e o epitélio desempenhem alguma função na

Tabela 2. Alguns anticorpos anti - CQ específicas

Anticorpo	Especificidade	Característica
Monoclonal	CQ 7	Expresso tardiamente no desenvolvimento dos ductos biliares intra-hepáticos.
Monoclonal	CQ 8	Cora hepatócitos e ductos biliares e placa ductal após 14 semanas de gestação.
Monoclonal	CQ 18	Cora hepatócitos e ductos biliares e placa ductal após 14 semanas de gestação.
Monoclonal	CQ 19	Cora placa ductal após 14 semanas de gestação.
CAM 5.2	CQ 8, 18 e 19	Cora fortemente hepatócitos primitivos (até 18 semanas após a gestação) e ductos biliares. Cora fortemente placa ductal até 34 semanas, diminuindo após.
AE1	CQ 10, 14, 15, 19	Cora hepatócitos primitivos precocemente. Cora placa ductal de ductos biliares fortemente até o final da gestação.
KL-1	CQ de 55 a 57Kd	Cora hepatócitos primitivos e placa ductal.

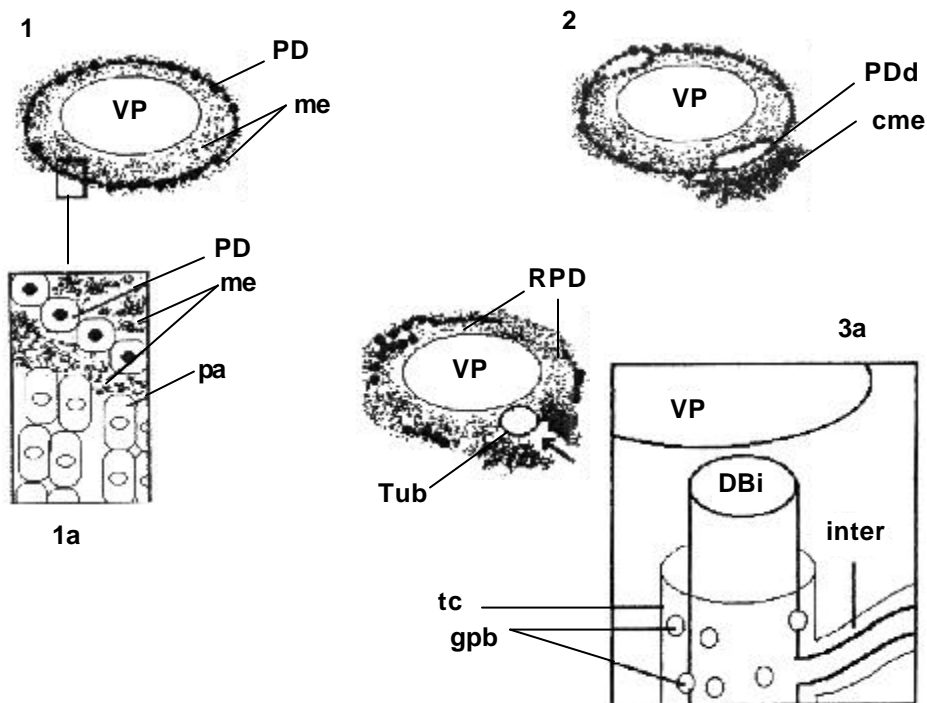


Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento dos ductos biliares intra-hepáticos (DBIH). 1 e 1a - a placa ductal (PD) surge a partir de hepatócitos primitivos no mesênquima (me) circundante aos ramos da veia porta (VP); 2 - ocorre duplicação da placa ductal em alguns pontos (Pdd) e há concentração de mesênquima (cme) em torno de um segmento selecionado da placa ductal; 3 - a porção selecionada migra para dentro do mesênquima assumindo a forma de túbulo (Tub), enquanto as porções não selecionadas são deletadas, ou permanecem como remanescentes da placa ductal (RPD); 3a - o processo completa-se com a formação de uma camada de tecido conjuntivo (tc) em torno do ducto biliar imaturo (DBi) e com a formação das glândulas peri-biliares (gpb). Observar as interconexões (inter) entre os ductos biliares.

diferenciação e proliferação do sistema biliar (26). Já foi estabelecido, principalmente em cultura de células, que algumas substâncias (denominadas de integrinas) medeiam a adesão celular, assim como, a adesão epitélio-mesênquima. A ação destas substâncias seria relacionada com a sinalização no sentido de modular o crescimento e a expressão genética, resultando em alterações fenotípicas (como a expressão de determinada CQ, por exemplo) dos hepatócitos em processo de amadurecimento (27).

Vários marcadores imuno-histoquímicos têm auxiliado na compreensão da interação epitélio e mesênquima. Dentre esses, podemos

destacar:

a) Laminina: esta glicoproteína de alto peso molecular é a primeira proteína da matriz-celular a aparecer no embrião. Shah et al. (13) evidenciaram estreita associação entre a deposição de laminina e a diferenciação da placa ductal, como também durante o processo de migração das estruturas tubulares para dentro do trato portal. Esses achados fortalecem a hipótese de que a laminina possa desempenhar um papel determinado na morfogênese e na migração dos ductos biliares humanos (28).

b) Enzimas pancreáticas: Terada et al. observaram que as células dos ductos biliares do hilo hepático embrionário expressam alfa-

amilase, tripsinogênio e lipase no citoplasma, de forma difusa, provavelmente secretando essas enzimas para a luz ou para a matriz extra-celular. Estas enzimas podem ser secretadas para o mesênquima, onde agiriam de forma similar às proteinases da matriz (10).

c) Enzimas proteolíticas: coletivamente denominadas de proteinases da matriz, atuam na migração celular durante o desenvolvimento de órgãos embriônicos. A migração de células biliares primitivas para o mesênquima é um evento crítico no desenvolvimento dos ductos biliares intra-hepáticos. Como já foi demonstrado que essas enzimas degradam a matriz extra-celular e que as células biliares primitivas contêm e secretam essas proteinases, suscita-se que estas enzimas tenham fundamental importância para a migração das células biliares da placa ductal no mesênquima, facilitando o processo migratório (11, 28).

d) TGF beta 1: Esta citocina (transforming growth factor b - 1) foi identificada em áreas com intensas alterações morfológicas durante a embriogênese. O TGF - b age como importante mensageiro molecular na sinalização entre epitélio e mesênquima, estimulando a proliferação mesenquimatosa e inibindo o crescimento epitelial. Também atua na expressão gênica, na diferenciação, na migração celular e na produção de elementos da matriz extra-celular. Recentemente, Tan et al demonstraram que a imunoreatividade desta citocina esteve aumentada nos hepatócitos primitivos humanos, concomitantemente ao processo de remodelagem da placa ductal. Esses achados sugerem que o TGF- β provavelmente esteja relacionado com as duas principais características do processo de remodelagem da placa ductal, ou seja, o estímulo à proliferação mesenquimal e a inibição do crescimento epitelial (29).

A formação das glândulas biliares

Outro elemento importante da árvore biliar intra-hepática, as glândulas peri-biliares originam-se também da placa ductal. A formação dessas glândulas e de uma cobertura de tecido conjuntivo completam o processo de formação dos DBIH (12). Terada e Nakanuma (30)

estudaram, através de imunohistoquímica, o seu desenvolvimento desde o período embrionário até a idade adulta demonstrando o surgimento das glândulas peri-biliares a partir da placa ductal, começando no hilo hepático. Desta estrutura primitiva migram para o mesênquima brotamentos celulares em forma de cordões que dão origem a túbulos a partir da sétima semana de gestação. Por volta da trigésima semana de gestação os brotamentos estão completamente transformados em túbulos. Estes gradualmente aumentam em número e se agregam até formarem, em torno da quadragésima semana, estruturas acinares cercadas por tecido fibroso denso. Nesta etapa, são glândulas biliares incompletas, não produzindo mucinas. Aproximadamente aos três meses de vida extra-uterina, as estruturas acinares tornam-se mais densas, sendo chamadas de "glândulas biliares intra-hepáticas imaturas". O muco surgirá nesta fase, e mucina neutra, sialomucina e sulfomucina poderão ser identificadas no citoplasma das células produtoras de muco. Lentamente, o processo de maturação das glândulas prossegue, com aumento do seu tamanho e número, e se completará por volta dos 15 anos após o nascimento (4, 30).

Relação da placa ductal com AVBEH e fibrose hepática congênita (FHC)

A idéia de que a placa ductal tem relação com a gênese da AVBEH, FHC e outras hepatopatias já foi proposta por vários autores. Jorgensen propôs que cistos de ductos biliares resultam de formas embriológicas anormais da placa ductal (malformações da placa ductal). Desmet postulou que a persistência anormal da placa ductal, ou defeitos no seu processo de remodelagem, resultam em malformações da placa ductal, e variações do espectro destas malformações seriam as responsáveis por várias formas de doenças congênitas dos ductos biliares intra-hepáticos (31).

Em cerca de 20% dos casos de AVBEH, a alteração intra-hepática aparece como ductos biliares aumentados em número, sugerindo um processo de hiperplasia ductal congênita (4, 5).

A lesão básica dos ductos intra-hepáticos nestes casos corresponde a carência de

reabsorção e de remodelagem do excesso de estruturas epiteliais durante a formação da placa ductal (malformação da placa ductal). O padrão histológico destes casos de AVBEH mostra uma combinação de hiperplasia dos ductos biliares intra-hepáticos e as características clássicas da AVBEH: edema, infiltrado inflamatório e proliferação ductular. Há também dilatação do trato portal, com aumento dos ramos da artéria hepática e ramos da veia hepática relativamente pequenos. Em vários casos, tem-se formação de estruturas concêntricas ao redor da veia porta, correspondente a placa ductal parcialmente remodelada ou com o seu processo de remodelagem interrompido, sugerindo formação de placa ductal de modo sucessivo durante as primeiras semanas de vida destes pacientes (3-5, 31).

Propõe-se que estas formações concêntricas da placa ductal correspondam a um tipo embrionário de reação ductular, denominado de hiperplasia ductal. Esta idéia se apoia no achado de que várias áreas dilatadas do trato portal apresentam-se, aparentemente, como fusões de ramos portais menores, já que é possível identificar-se múltiplos complexos de placa ductal circundando os ramos arteriais numa mesma área de mesênquima. Sugere-se que estas fusões da placa ductal sejam o resultado de uma hipoplasia dos ramos da veia porta, levando à formação de brotos que permanecem anormalmente próximos (4).

A presença de reduplicação da placa ductal nos casos de AVBEH e a secundária formação de hiperplasia ductal são padrões histológicos similares encontrados na fibrose hepática congênita. É possível que esta alteração ductal peculiar seja a responsável pelo desenvolvimento posterior do padrão chamado fibrose hepática congênita - like. Este padrão caracteriza-se por aumento do trato portal, fibrose periportal, aumento do número de ductos, os quais exibem formas curvas e circulares típicas de placa ductal e, freqüentemente, descreve-se ramos hipoplásicos de veia porta. Importante ressaltar que todos os pacientes com este padrão de FHC - like exibem malformação da placa ductal (4, 31).

Estes achados sugerem que a presença de malformação da placa ductal representa o denominador comum de alguns casos de

AVBEH, segundo Desmet, e a FHC. A alteração histopatológica comum entre as duas patologias é basicamente a hiperplasia ductal, secundária à malformação da placa ductal (31).

Conclusões

A partir desta descrição, pode-se avaliar a complexidade dos processos que originam as estruturas biliares. A melhor compreensão destes eventos pode contribuir para o esclarecimento de questões relacionadas com a gênese de algumas hepatopatias, em especial a AVBEH e a fibrose hepática congênita, conforme sugerido por Desmet et al (4, 5, 31).

Referências

1. Ruebner BH, Tikoes AB, Debarah MD, Burrows MD, Soohoo W, Lund JK. Development and transformation of ductal plate in the developing human liver. *Pediatr Pathol* 1990;10:55-68.
2. Hammar JA. Uber die erste Entstehung der nicht Kapillaren intra-hepatischen Gallengänge beim Mensch. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1926;5:59.
3. Jogensen MJ. The ductal plate malformation. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1977;(supp 257):1-87.
4. Desmet VJ. Embriology of the liver and intrahepatic biliary tract, and an overview of malformations of the bile duct. In: Mc Intyre N, Benhamou JP, Bircher J, Rizzeto M, Rodes J, editors. *The Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. Vol I. Oxford England: Oxford University Press; 1991. 497-519.
5. D'agata IDA, Maureen MD, Jonas M, Perez-Atahide AR, Guay-Wooford LM. Combined Cystic Disease of the liver and Kidney. *Semin Liver Dis* 1994;14:215-28.
6. Haunay Y, Sato K, Spaulding S, Nalensnik M, Gerber M. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology* 1996;23:476-81.
7. Raweily EA, Gibson AAM, Burt AD. Abnormalities of intrahepatic bile ducts in extrahepatic biliary atresia. *Histopatologia* 1990;17:521-7.
8. Tan CEL, Moscoso GF. The developing human biliary system at the porta hepatis level between 29 days and 8 weeks of gestation: A way to understanding biliary atresia. Part 1. *Pathol Int* 1994;44:587-599.
9. Tan CEL, Moscoso GF. The developing human biliary system at the porta hepatis level between 11 and

- 25 weeks of gestation: A way to understanding biliary atresia. Part 2. *Pathol Int* 1994;44:600-10.
10. Terada T, Nakamura Y. Expression of pancreatic enzymes (alpha-amylase, trypsinogen, and lipase) during human liver development and maturation. *Gastroenterology* 1995;108:1236-45.
 11. Terada T, Okada Y, Nakamura Y. Expression of matrix proteinases during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol* 1995;147:1207-13.
 12. Tan CEL, Driver M, Howard ER, Moscoso GJ. Extrahepatic biliary atresia: A first-trimester event? Clues from light microscopy and immunohistochemistry. *J of Pediatr Surg* 1994;29:808-14.
 13. Shah KD, Gerber MA. Development of intrahepatic bile duct in humans: Possible role of laminin. *Arch pathol Lab Med* 1990;114:597-600.
 14. Balistrelli WF. Neonatal Cholestasis. In: *Liver biopsy - Interpretation for the 1990's. Clinicopathologic correlations in Liver Diseases. American Association for the study of Liver Disease*, 1991;76-91.
 15. Desmet VJ. Pathology of paediatric cholestasis. *Falk Symposium 63 Paediatric Cholestasis: Novel approaches to treatment. Kluwer Academic Publishers. London*, 1992.
 16. Rescan PY, Clement B, Grimaud GA, Guillois B, Strain A, Guilouzo A. A participation of basement membrane components in human and rat liver during the perinatal period. *Cell Differ Dev* 1989;26:131-44.
 17. Denke H. The intermediate filament cytoskeleton in neoplastic and non-neoplastic liver disorders. *J Submicrosc Cytol* 1984;16:141-5.
 18. Lane EB. Monoclonal antibodies provide specific intramolecular marker for the study of epithelial tonofilament organization. *J Cell Biol* 1982;92:665-73.
 19. Battifora H. Clinical applications of the immunohistochemistry of filamentous proteins. *Am J Surg Pathol* 1988;12(suppl. 1):24-8.
 20. Moll R, Franke WW, Schiller DC, Griger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratin polypeptides: patterns of expression of specific cytokeratins in normal epithelia, tumor and cultured cells. *Cell* 1982;31:11-24.
 21. Osborn M. Intermediate filaments as histological markers: an overview. *J Invest Dermatol* 1983;81:104s-9.
 22. Van-Eyken P, Sciort R, Van-Damme B, Wolf-Petters C, Desmet V. Keratin immunohistochemical in normal human liver. Cytokeratin pattern of hepatocytes, bile ducts and acinar gradient. *Virchows Arch Pathol* 1987;412:63-72.
 23. Van-Eyken P, Sciort R, Desmet V. Intrahepatic bile duct development in the rat: A cytokeratin-immunohistochemical study. *Lab Invest* 1988;52-9.
 24. Van-Eyken P, Sciort R, Callea F, Steen KVD, Moeman P, Desmet VJ. The development of the intrahepatic bile ducts in man: a keratin-immunohistochemical study. *Hepatology* 1988;8:1586-95.
 25. Shah KD, Gerber MA. Development of intrahepatic bile duct in humans: Immunohistochemical study using monoclonal cytokeratin antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:1135-8.
 26. Vassy J, Beil M, Irinopoulou T, Rigaut JP. Quantitative Image Analysis of Cytokeratin distribution during fetal rat liver development. *Hepatology* 1996;23:630-8.
 27. Blakolmer K, Jaskimirsz K, Dunsford HA, Robson S. Hematopoietic stem cell markers are expressed by ductal plate and bile duct cells in developing human liver. *Hepatology* 1995;21:1510-6.
 28. Terada T, Nakamura Y. Expression of tenascin, type IV collagen and laminin during human intrahepatic bile duct development and in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology* 1994;25:143-50.
 29. Tan CEL, Chan VSW, Yong RYY, et al. Distortion in TGF- β peptide immunolocalization in biliary atresia: Comparison with the normal pattern in developing human intrahepatic bile duct system. *Pathol Int* 1995;45:815-24.
 30. Terada T, Nakamura Y. Development of human intrahepatic peribiliary glands: Histological, keratin immunohistochemical, and mucus histochemical analyses. *Lab Invest* 1993;68:261-9.
 31. Desmet VJ. What is congenital hepatic fibrosis? *Histopathology* 1992;20:465-9.