

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PEDIATRIA

**PRESENÇA DE ALTERAÇÕES EM ARTÉRIAS E
ARTERÍOLAS E DE MALFORMAÇÃO DE PLACA
DUCTAL NOS ESPAÇOS-PORTA DE PACIENTES
COM ATRESIA BILIAR**

Jorge Luiz dos Santos

T-1528

TESE DE DOUTORADO

**BIBLIOTECA
FAMED/HCPA**

Porto Alegre, Brasil

2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PEDIATRIA

**PRESENÇA DE ALTERAÇÕES EM ARTÉRIAS E
ARTERÍOLAS E DE MALFORMAÇÃO DE PLACA
DUCTAL NOS ESPAÇOS-PORTA DE PACIENTES
COM ATRESIA BILIAR**

Jorge Luiz dos Santos

Orientadora: Dra. Themis Reverbel da Silveira

Co-Orientador: Dr. Vinícius Duval da Silva

*A apresentação desta tese é exigência do
Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Pediatria, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, para obtenção do título de
Doutor.*

Porto Alegre, Brasil

2002

MED
T
WS310 S237p 2002

05330576

[0313425] Santos, Jorge Luiz dos. Presença de alterações em artérias e arteriolas e de malformação de placa ductal nos espaços-porta de pacientes com atresia biliar. 2002 207 f.

CATALOGAÇÃO NA FONTE

S237p Santos, Jorge Luiz dos.

Presença de alterações em artérias e arteriolas e de malformação de placa ductal nos espaços-porta de pacientes com atresia biliar. / Jorge Luiz dos Santos. -- Porto Alegre: UFRGS, 2002.

207 f.

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina:Pediatría.

1. Atresia biliar: anormalidades. 2. Histopatologias. 3. Sistema digestivo: doença. 4. Placa ductal: anormalidades. I.Título. II. Themis Reverbel da Silveira, orientadora. III. Vinicius Duval da Silva, co-orientador.

CDU : 616.361

Dedico o presente estudo à Dra. Themis Reverbel da Silveira.

Foram-se as catedrais.

O olhar nublado, que procurava Deus nos pergaminhos.

Olhou afora e, finalmente, viu caminhos

E vales e montanhas e formas e corpos e mistérios tantos,

Que transformou a fé que havia em espanto

(O mesmo espanto que empolgara a Tales de Mileto

Nos albores da grega Sofia).

Voltou-se ao mundo, perquirindo a um feto

O que é a vida e sua anomalia...

A vida respondeu-lhe com seus dados

Como a um grego antigo ela faria.

E a mente, iluminada, teve a Idéia.

Ao tê-la, o homem frágil tremeria,

O descuidado a esqueceria,

Mas em Themis era outra a paidéia:

A mente clara, sol do dia,

Banhou a terra fértil da emoção

E a Idéia frutificou em Obra Humana

No misterioso processo de criação,

A transcendente Alquimia.

Jorge Luiz dos Santos

O sistema de vasos sangüíneos no corpo pode ser comparado àqueles cursos de água que são construídos nos jardins: eles surgem de uma fonte, ou nascente, e ramificam-se em numerosos canais, e então em outros mais, e assim progressivamente, de forma a levar água a toda parte do jardim.

Aristóteles

Nada é tão simples quanto parece.

Albert Einstein

Agradecimentos

Este estudo, por envolver as áreas de patologia e análise de imagens, só se tornou realidade pelo concurso competente de diversas pessoas. Deste modo, agradeço

- aos **profissionais do Serviço de Patologia do HCPA**, em especial ao **Dr. Carlos Thadeu Cerski**, colaborador incansável na produção e na análise do material histológico;
- à técnica em histologia **Flávia Giusti**, pela dedicação e pelo capricho na realização da técnica imunoistoquímica;
- à **Dra. Jane Maria Ulbrich Kulczynski**, patologista, pelas sugestões relativas ao modelo de arteriopatia pulmonar;
- ao **Dr. Vinicius Duval da Silva**, pela orientação no método de análise de imagens, pois, sem seu auxílio, teria sido impossível a criação e o desenvolvimento das técnicas empregadas no estudo;
- ao **Dr. Evandro Sobroza de Mello**, patologista da Universidade de São Paulo, por sua boa vontade em revisar o material histológico e discutir as dúvidas surgidas na avaliação histológica;
- ao **Dr. Valeer J. Desmet**, do *Hospital Universitário Saint Rafaël de Leuven*, Bélgica, pela opinião abalizada em relação ao tema e pelas sugestões ao final do estudo;
- ao **Dr. Mário Wagner** que, durante meses, realizou conosco a avaliação estatística dos dados. Sua ajuda competente possibilitou a análise aprofundada dos achados e a criação do complexo banco de dados;
- ao **Dr. Sérgio Pinto Ribeiro**, pneumologista, pelas ponderações em relação ao tema da hipertensão pulmonar;
- aos **Drs. Janaína Nei Campello e Aristóteles Pires** que, durante o período final de seu curso na Faculdade de Medicina, dispuseram-se a participar na coleta de dados e da pesquisa bibliográfica, assim como à estudante de Medicina, **Giselle Nei Campello**;
- aos **Drs. Sandra Vieira e Carlos Kieling**, gastroenterologistas pediátricos, pela ajuda na seleção dos casos e controles estudados;

- ao **pessoal do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA**, especialmente à secretária **Marta Regina Dotto**, pela colaboração diária e pela simpatia;
- ao **Dr. João Carlos Prolla**, por permitir a utilização do espaço e do precioso material do Laboratório de Citologia do HCPA;
- ao colega **Dr. João Luiz de Mello**, pela colaboração;
- ao **Gustavo Carlos González Zeblis** pela enorme paciência;
- à **Profa. Maria do Horto Motta**, pela maravilhosa revisão de linguagem e padronização técnica do trabalho;
- à **Clair Azevedo**, pela elaboração da arte final da tese.

Agradeço, finalmente, às demais **pessoas que trabalham nos Serviços de Patologia e Citologia do HCPA** pela recepção amigável durante o período em que frequentei essa área do hospital.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

RESUMO

SUMMARY

1 - INTRODUÇÃO	23
1.1 - Considerações sobre o Sistema Arterial Hepático	23
1.2 - Desenvolvimento das Estruturas Hepatobiliares	28
<i>1.2.1 - Placa Ductal</i>	30
<i>1.2.2 - Vasculatura Hepática</i>	34
1.3 - Marcadores Imunoistoquímicos das Estruturas Hepatobiliares	36
1.4 - Atresia Biliar	39
<i>1.4.1 - Etiopatogenia</i>	40
<i>1.4.2 - Anomalias Congênitas Extra-Hepáticas Associadas</i>	41
<i>1.4.3 - Etiopatogenia Pós-Organogênese</i>	43
1.5 - Atresia Biliar e Alterações da Artéria Hepática	45
1.6 - Atresia Biliar e Malformação da Placa Ductal	46
2 - MODELO TEÓRICO	49
3 - JUSTIFICATIVA	52
4 - OBJETIVOS	54
4.1 - Objetivo Geral	54
4.2 - Objetivos Específicos	54
5 - MATERIAL E MÉTODOS	56
5.1 - Amostra	56

5.2 - Variáveis em Estudo	57
5.3 - Método Computacional da Análise de Imagens	62
5.3.1 - <i>Captação de Imagens</i>	62
5.3.2 - <i>Avaliação Morfométrica</i>	62
5.3.3 - <i>Quantificação Morfométrica dos Elementos Estruturais dos Ramos da Artéria Hepática</i>	63
5.3.4 - <i>Quantificação da Densidade de Colágeno</i>	64
5.4 - Preparação Histológica e Imunoistoquímica	65
5.5 - Estudo Histológico das Estruturas dos Espaços-Porta	66
5.6 - Análise Estatística	67
5.7 - Considerações Éticas	68
6 - RESULTADOS	70
6.1 - Caracterização a Amostra	70
6.1.1 - <i>Pacientes com Atresia Biliar</i>	70
6.1.2 - <i>Pacientes sem Hepatopatia</i>	74
6.1.3 - <i>Pacientes com Colestase Intra-Hepática</i>	75
6.1.4 - <i>Pacientes Transplantados com Atresia Biliar e com Outras Hepatopatias</i>	76
6.2 - Evolução dos Pacientes com Atresia Biliar	77
6.3 - Achados Histológicos de pacientes com Atresia Biliar e Controles	80
6.3.1 - <i>Estruturas Biliares</i>	80
6.3.2 - <i>Ramos Arteriais Hepáticos</i>	84
6.4 - Relações entre as Variáveis	102
7 - DISCUSSÃO	114
7.1 - Caracterização da Amostra	114
7.1.1 - <i>Pacientes com Atresia Biliar</i>	114
7.1.2 - <i>Controles</i>	116
7.1.3 - <i>Anomalias Congênitas em Pacientes com Atresia Biliar</i>	118
7.2 - Evolução dos Pacientes com Atresia Biliar	120
7.3 - Achados Histológicos	126
7.3.1 - <i>Estruturas Biliares</i>	126
7.3.2 - <i>Densidade de Colágeno</i>	129

7.3.3 - <i>Estruturas Vasculares Arteriais</i>	130
7.3.3.1 - Valores Normais dos Elementos Vasculares	130
7.3.3.2 - Etapas do Estudo Histológico Vascular	131
7.4 - Relações entre as Variáveis	140
7.4.1 - <i>Relações entre Variáveis Histológicas e Fatores Prognósticos</i>	140
7.4.2 - <i>Correlações entre Idade por Ocasão da Portoenterostomia, Densidade de Colágeno, Número de Vasos e Elementos Estruturais dos Ramos Arteriais Hepáticos e suas Relações</i>	140
7.4.3 - <i>Relação entre Alterações Vasculares e Prognóstico</i>	141
7.4.4 - <i>Relação entre Achados Histológicos nas Estruturas Biliares e Alterações Vasculares Arteriais Hepáticas</i>	141
7.5 - Considerações sobre as Possíveis Repercussões do Espessamento da Parede Vascular Arterial em Casos de Atresia Biliar	142
8 - CONCLUSÕES	146
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	Atresia biliar
AEH	Anomalia congênita extra-hepática associada à atresia biliar
AIDS	Síndrome de imunodeficiência adquirida
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DBM	Ducto biliar maduro
DINT	Diâmetro luminal do ramo arterial
DTOT	Diâmetro externo do ramo arterial
ESP	Espessura da túnica média do ramo arterial
FSH	feto sem hepatopatia
INT	Espessura da túnica íntima do ramo vascular
MPD	Malformação de placa ductal
LAB	Lactente com atresia biliar
LCIH	Lactente com colestase intra-hepática
LSH	Lactente sem hepatopatia
PERIM	Perímetro
PVP	Plexo vascular peribiliar
RDIDE	Relação diâmetro luminal/diâmetro externo
RDIEM	Relação diâmetro luminal/espessura da túnica média
RDIET	Relação diâmetro luminal/espessura total da parede vascular
REMD	Relação espessura da túnica média/diâmetro externo
RETD	Relação espessura total da parede vascular/diâmetro externo
RID	Espessura da túnica íntima/diâmetro externo
RINTESP	Relação espessura da túnica íntima/espessura da túnica média
TEP	Tamanho do efeito padronizado
TGF β -1	<i>Transforming growth factor beta-1</i>

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da microvasculatura hepática.....	24
Figura 2 - Representação esquemática do desenvolvimento do divertículo hepático embriônico no septo transversal.....	29
Figura 3 - Representação esquemática do desenvolvimento dos ductos biliares.....	31
Figura 4 - Representação esquemática do desenvolvimento do sistema arterial hepático.....	35
Figura 5 - Representação esquemática do método de mensuração morfométrica dos elementos vasculares arteriais.....	59
Figura 6 - Placa ductal em feto.....	81
Figura 7 - Espaço-porta em lactente sem hepatopatia.....	81
Figura 8 - Malformação de placa ductal em paciente com atresia biliar.....	83
Figura 9 - Agrupamento de vasos em espaço singular porta alargado de paciente com atresia biliar por ocasião da portoenterostomia.....	85
Figura 10 - Agrupamento de vasos em região subcapsular em paciente com atresia biliar por ocasião da portoenterostomia.....	85
Figura 11 - Espaço-porta de feto sem hepatopatia.....	86
Figura 12 - Espaço-porta em lactente sem hepatopatia.....	86
Figura 13 - Representação gráfica das distribuições de média e desvio padrão da relação espessura da túnica média/diâmetro externo em arteríolas segundo os grupos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles.....	92
Figura 14 - Representação gráfica das distribuições de média e desvio padrão da relação espessura da túnica média/diâmetro externo em artérias segundo os grupos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles.....	95

Figura 15 - Agrupamento vascular em ponte fibrosa de paciente com atresia biliar por ocasião do transplante hepático.....	96
Figura 16 - Arteriola extremamente espessada em paciente com atresia biliar por ocasião do transplante hepático.....	96
Figura 17 - Proliferação do plexo vascular peribiliar em paciente com colestase intra-hepática.....	100

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características dos grupos de pacientes com atresia biliar quanto a idade, peso de nascimento, peso e comprimento por ocasião do estudo.....	70
Tabela 2 - Classificação por faixa etária por ocasião da portoenterostomia dos grupos de pacientes com atresia biliar.....	71
Tabela 3 - Características dos grupos de pacientes com atresia biliar quanto a idade gestacional e sexo.....	71
Tabela 4 - Características dos pacientes com atresia biliar e anomalias congênitas extra-hepáticas quanto à classificação de <i>CARMI et al. (1993)</i>	72
Tabela 5 - Características das anomalias congênitas extra-hepáticas encontradas nos pacientes com atresia biliar de acordo com os sistemas orgânicos.....	73
Tabela 6 - Características quanto à idade dos pacientes por ocasião do estudo segundo os grupos com atresia biliar, lactentes sem hepatopatia e pacientes com colestase intra-hepática.....	75
Tabela 7 - Características quanto à idade dos pacientes transplantados segundo os grupos com atresia biliar e com outras hepatopatias.....	77
Tabela 8 - Evolução pós-operatória dos pacientes com atresia biliar segundo os grupos com e sem anomalias congênitas extra-hepáticas associadas.....	77
Tabela 9 - Relação entre prognóstico e idade por ocasião da portoenterostomia.....	78
Tabela 10 - Relação entre faixas etárias por ocasião da portoenterostomia e densidade de colágeno.....	79
Tabela 11 - Relação entre prognóstico e densidade de colágeno nos pacientes com atresia biliar.....	80
Tabela 12 - Características dos achados histológicos nas estruturas biliares segundo os grupos com atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles.....	82

Tabela 13 - Alterações vasculares arteriolares segundo os grupos de atresia biliar com e sem anomalias congênitas extra-hepáticas associadas e controles.....	87
Tabela 14 - Alterações vasculares arteriais segundo os grupos de atresia biliar com e sem anomalias congênitas extra-hepáticas associadas e controles.....	89
Tabela 15 - Alterações vasculares arteriolares segundo os grupos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles.....	90
Tabela 16 - Alterações vasculares arteriais segundo os grupos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles.....	93
Tabela 17 - Progressão das alterações vasculares arteriolares hepáticas desde a dada da portoenterostomia até o transplante hepático no grupo de atresia biliar.....	97
Tabela 18 - Progressão das alterações vasculares arteriais hepáticas desde a portoenterostomia até o transplante hepático no grupo de atresia biliar.....	98
Tabela 19 - Alterações vasculares arteriolares segundo os grupos de atresia biliar transplantados e pacientes transplantados por outras hepatopatias.....	100
Tabela 20 - Alterações vasculares arteriais segundo os grupos de atresia biliar transplantados e pacientes transplantados por outras hepatopatias.....	101
Tabela 21 - Relações entre achados histológicos em estruturas biliares e faixas etárias no grupo de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia.....	103
Tabela 22 - Relações entre achados histológicos em estruturas biliares e prognóstico nos casos de atresia biliar acompanhados em ambulatório.....	104
Tabela 23 - Características da densidade de colágeno segundo os grupos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles.....	105
Tabela 24 - Relação entre os achados histológicos nas estruturas biliares e a densidade de colágeno no grupo de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia.....	105
Tabela 25 - Correlações entre idade por ocasião da portoenterostomia, densidade de colágeno, número de vasos e elementos estruturais das arteríolas e suas relações no grupo de atresia biliar.....	106
Tabela 26 - Correlações entre idade por ocasião da portoenterostomia, densidade de colágeno, número de vasos e elementos estruturais das artérias hepáticas e suas relações no grupo de atresia biliar.....	107

Tabela 27 - Relação das alterações vasculares arteriolares hepáticas no grupo de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e o prognóstico	108
Tabela 28 - Relação das alterações vasculares arteriais hepáticas no grupo de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e o prognóstico	109
Tabela 29 - Relação entre alterações vasculares arteriais hepáticas e distribuição de ducto biliar maduro em espaços-porta no grupo de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia.....	110
Tabela 30 - Influência da hipertensão arterial sistêmica sobre as alterações vasculares arteriolares hepáticas no grupo de atresia biliar por ocasião do transplante hepático	111
Tabela 31 - Influência da hipertensão arterial sistêmica sobre as alterações vasculares arteriais hepáticas no grupo de atresia biliar por ocasião do transplante hepático	112

Lista de Quadros

Quadro 1 - Estágios de desenvolvimento dos ductos biliares intra-hepáticos.....	32
Quadro 2 - Marcadores imunoistoquímicos empregados no estudo do desenvolvimento dos ductos biliares e da etiopatogenia da atresia biliar.....	38
Quadro 3 - Condições descritas como associadas à atresia biliar.....	40
Quadro 4 - Interpretação da estatística TEP segundo HOPKINS (1997).....	68
Quadro 5 - Condições clínico-cirúrgicas e laboratoriais relacionadas com a evolução dos casos submetidos à cirurgia de Kasai.....	121
Quadro 6 - Condições histopatológicas, hemodinâmicas e imunoistoquímicas relacionadas à evolução dos casos submetidos à cirurgia de Kasai.....	122
Quadro 7 - Possíveis mecanismos envolvidos na eventual arteriopatia observada no presente estudo.....	136

RESUMO

RESUMO

A atresia biliar apresenta etiopatogenia complexa. Casos com e sem anomalias congênitas extra-hepáticas associadas podem representar distintos grupos etiopatogênicos. Entre as anomalias histopatológicas envolvidas com a doença têm sido descritas malformação de placa ductal e alterações nos ramos da artéria hepática. No presente estudo foram avaliadas essas anormalidades em 47 casos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e em controles com colestase intra-hepática (n = 3), além de fetos (n = 7) e lactentes sem hepatopatia (n = 7). Avaliou-se a progressão das alterações nos ramos arteriais em casos de atresia biliar transplantados (n = 7) desde a portoenterostomia até o transplante hepático e compararam-se os dados obtidos por ocasião do último procedimento com os de pacientes transplantados por outras hepatopatias (n = 4). Malformação de placa ductal foi detectada em 55% dos casos de atresia biliar, não se observando relação entre sua ocorrência e a presença de anomalias congênitas extra-hepáticas. Em relação aos vasos foram avaliados 1.274 ramos arteriais, sendo 1.108 arteríolas e 166 artérias. Em 28% dos casos de atresia biliar, por ocasião da portoenterostomia, além de proliferação arteriolar, detectaram-se, através de método morfométrico, artérias com paredes musculares mais espessas que as dos lactentes sem hepatopatia. No intervalo entre a portoenterostomia e o transplante hepático, o espessamento da túnica média arterial progrediu, passando a ocorrer também em arteríolas. Essa alteração não foi encontrada em transplantados por outras hepatopatias. Tal espessamento progressivo da túnica média assemelha-se ao modelo de remodelagem vascular. As características da túnica média arterial dos casos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia foram independentes da densidade de colágeno, da presença de malformação de placa ductal e da ocorrência de anomalias congênitas extra-hepáticas associadas, e pareceram influenciar a distribuição dos ductos biliares maduros em espaços-porta.

SUMMARY

SUMMARY

Biliary atresia has complex etiopathogenesis. Cases with and without congenital associated anomalies may represent different etiopathogenic groups. Ductal plate malformation and alterations of the hepatic arterial branches have been associated to biliary atresia. In the present study these histopathological abnormalities were evaluated in 47 cases of biliary atresia at the time of portoenterostomy and in controls with intrahepatic cholestasis (n = 3), besides fetuses (n = 7) and infants (n = 7) without liver disease. The progress of the vascular alterations since portoenterostomy until liver transplantation was evaluated in 7 cases of biliary atresia who underwent the last procedure. Data obtained in liver transplantation were compared with those of patients who underwent this procedure because of other liver diseases (n = 4). Ductal plate malformation was observed in 55% of cases with biliary atresia and its occurrence was unrelated to congenital extrahepatic anomalies. With reference to the vessels, 1.274 arterial branches were evaluated, including 1.108 arterioles and 166 arteries. At the time of portoenterostomy, in 28% of biliary atresia cases, besides arteriolar proliferation, arteries with muscle walls thicker than those of infants without liver disease were identified by morphometry. In the interval between portoenterostomy and liver transplantation, the thickness of the medial layer increased even more in arteries and arterioles. This alteration was not observed in patients with other liver diseases who underwent transplantation. Progressive thickening of medial layer may be explained by the vascular remodeling model. The medial layer features in cases of biliary atresia at the time of portoenterostomy were unrelated to the density of collagen, the occurrence of ductal plate malformation and of congenital extrahepatic anomalies, and influenced the distribution of mature bile ducts in portal spaces.

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações sobre o Sistema Arterial Hepático

As considerações formuladas nesta seção inicial do trabalho basearam-se, fundamentalmente, nos textos de revisão de LAUTT e GREENWAY, 1987; McCUSKEY, 1994; WANLESS, 1998; EKATAKSIN e KANEDA, 1999; EKATAKSIN, 2000; TAKASAKI e HANO, 2001, não se deixando, porém, de recorrer a outros autores.

Cerca de 20% a 33% do fluxo sanguíneo que aporta ao fígado provém da artéria hepática. Os ductos biliares extra-hepáticos são irrigados por ramos da artéria hepática ou da gastroduodenal que, neste último caso, anastomosam-se com a artéria hepática no *porta hepatis* (CHO e LUNDERQUIST, 1983). A artéria hepática cruza anteriormente à veia porta em 91% dos indivíduos e à esquerda e posteriormente ao ducto biliar em 64% dos casos. Divide-se em artérias hepáticas direita e esquerda para suprir os lobos hepáticos correspondentes. Junto à veia porta penetra no fígado na região do *porta hepatis* e, incluída pela bainha de Glisson, forma no parênquima extensa arborização de vasos com calibre progressivamente decrescente e termina na margem dos lóbulos hepáticos. A distribuição hepática das terminações arteriais tem sido lentamente desvendada. TAKASAKI e HANO (2001) observaram que a artéria hepática divide-se em dois ramos: o ramo axial e, derivado deste, o peribiliar. Estes dois sistemas interconectam-se por raras anastomoses. Segundo os autores, o primeiro ramo contribui com sangue arterial para a nutrição do parênquima hepático; o segundo forma as camadas do plexo vascular peribiliar (PVP) em torno dos ductos biliares. Os ramos arteriais axiais acompanham os ramos da veia porta e os ductos biliares intra-hepáticos, estruturando o ácino, unidade microvascular do fígado. Grupos de hepatócitos reúnem-se em torno da tríade porta. A entrada do fluxo sanguíneo ocorre invariavelmente na região periportal, e a saída, na periferia acinar, produzindo gradientes de oxigênio e de substâncias absorvidas ou excretadas em diferentes regiões do ácino. A zona 1 acinar, mais central, apresenta maior oxigenação. A zona 3 é suprida por sangue menos oxigenado, porém rico em enzimas microsossomiais. Atual-

mente, porém, o conceito acinar de Rappaport tem sido discutido, propondo-se que seria mais adequada a divisão do tecido hepático em termos de subunidades microvasculares hepáticas (McCUSKEY, 1994). Essas subunidades consistem de todos os vasos intra-hepáticos com diâmetro interno inferior a 300 μm , incluindo vênulas porta, arteríolas hepáticas, sinusóides, vênulas centrais e linfáticos. A figura 1 apresenta esquematicamente aspectos da microcirculação hepática.

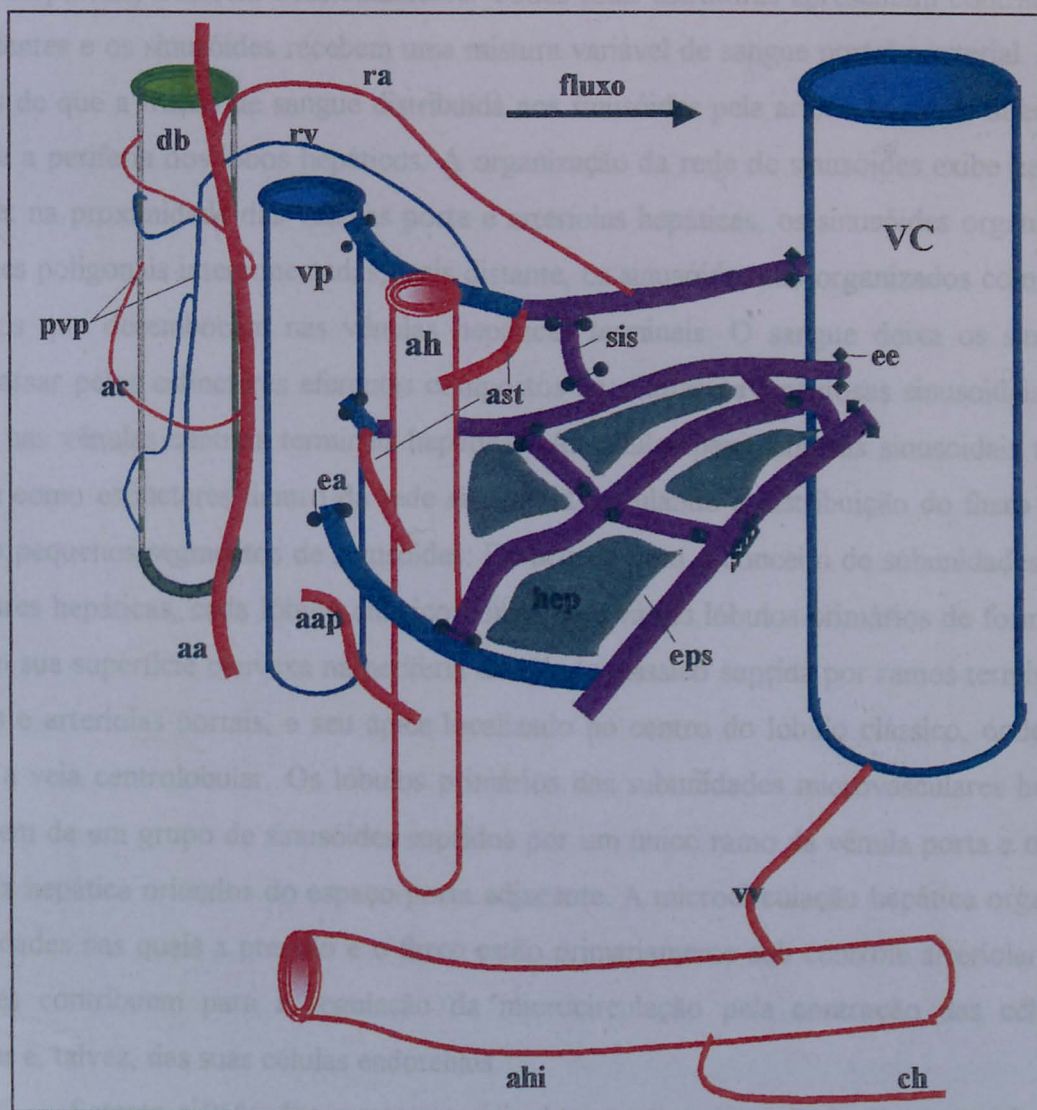


Fig. 1 - Representação esquemática da microvasculatura hepática. Modificado a partir de McCUSKEY, 1994

aa - artéria acompanhante; aap - anastomose artério-portal; ac - artéria comunicante; ah - artéria hepática; ahi - artéria hepática isolada; ast - arteriosinus twigs; ch - ramo que nutre a cápsula hepática; db - ducto biliar; ea - esfíncter aferente; ee - esfíncter eferente; eps - espaço peri-sinusoidal; hep - hepatócitos; pvp - plexo vascular peribiliar; ra - rota arterial do PVP; rv - rota venular do PVP; sis - sinusóides; sis - sinusóide intersinusoidal com esfíncteres; VC - veia centrolobulillar; vp - veia porta; vv - ramos dos *vasa vasorum* para veia porta e veia centrolobulillar. Observar seta: o fluxo sanguíneo segue desde o espaço-porta na direção da periferia acinar.

Os fatores reguladores do fluxo sanguíneo através das subunidades microvasculares hepáticas e sua relação com a estrutura e a função do fígado ainda não estão totalmente esclarecidos. A maior parte do sangue que penetra nos sinusóides deriva das vênulas porta, cujo fluxo usualmente é controlado por esfíncteres compostos por células sinusoidais denominadas esfíncteres aferentes. O sangue arterial penetra nos sinusóides através de ramos das arteríolas hepáticas chamados de brotos de seios arteriais (*arteriosinus twigs*), os quais desembocam próximo às entradas das vênulas porta. Conexões diretas entre vênulas e arteríolas (anastomoses arteriportais) ocorrem ocasionalmente. Todas estas estruturas apresentam contrações independentes e os sinusóides recebem uma mistura variável de sangue portal e arterial. Há evidências de que a fração de sangue distribuída aos sinusóides pela artéria hepática difere entre o hilo e a periferia dos lobos hepáticos. A organização da rede de sinusóides exibe heterogeneidade: na proximidade das vênulas porta e arteríolas hepáticas, os sinusóides organizam-se em redes poligonais interconectadas; mais distante, os sinusóides são organizados como vasos paralelos que desembocam nas vênulas hepáticas terminais. O sangue deixa os sinusóides após passar pelos esfíncteres eferentes compostos de células pavimentosas sinusoidais, penetrando nas vênulas centrais terminais hepáticas. As células pavimentosas sinusoidais também servem como esfíncteres dentro da rede sinusoidal, regulando a distribuição do fluxo sanguíneo em pequenos segmentos de sinusóides. De acordo com o conceito de subunidades microvasculares hepáticas, cada lóbulo clássico consiste de vários lóbulos primários de forma côncava, com sua superfície convexa na periferia do lóbulo clássico suprida por ramos terminais das vênulas e arteríolas portais, e seu ápice localizado no centro do lóbulo clássico, onde se encontra a veia centrolobular. Os lóbulos primários das subunidades microvasculares hepáticas consistem de um grupo de sinusóides supridos por um único ramo da vênula porta e outro da arteríola hepática oriundos do espaço-porta adjacente. A microcirculação hepática organiza-se em unidades nas quais a pressão e o fluxo estão primariamente sob controle arteriolar. Os sinusóides contribuem para a regulação da microcirculação pela contração das células de Kupffer e, talvez, das suas células endoteliais.

Setenta a 96% dos ramos arteriais dos espaços-porta de fígados normais correm paralelamente aos ductos biliares (NAKANUMA e OHTA, 1979; CRAWFORD *et al.*, 1998). Ductos biliares e ramos da artéria hepática que cursam paralelos têm dimensão semelhante: o ducto apresenta 0,7 a 0,8 vez o tamanho da artéria e o número e as dimensões das artérias são estimativas válidas para estes mesmos dados em relação aos ductos (NAKANUMA e OHTA, 1979). Ocorre, deste modo, “paralelismo” entre essas estruturas: artérias acompanham ductos biliares que têm dimensão luminal equivalente à sua. Existem, porém, ramos da artéria hepá-

tica que não acompanham ductos (EKATAKSIN, 2000). Essas artérias hepáticas isoladas ramificam-se e anastomosam-se amplamente, formando plexo capsular e nutrem o plexo intramural (*vasa vasorum*) das veias hepáticas, drenando em sinusóides de lóbulos adjacentes ou no lúmen das veias hepáticas irrigadas. Esse sistema, portanto, parece desviar sangue do parênquima hepático. As artérias hepáticas isoladas podem representar o produto de uma dissociação arterial a partir de uma tríade portal ou de díade bilio-arterial ou artério-portal. A artéria hepática não irriga os hepatócitos e sim os sinusóides, já que seus leitos vasculares primários formam-se no estroma e não no parênquima. Segundo EKATAKSIN e KANEDA (1999), a artéria hepática supre cinco compartimentos, quais sejam: 1) PVP, 2) interstício do espaço-porta, incluindo nervos, 3) *vasa vasorum* da veia porta, 4) cápsula hepática e 5) *vasa vasorum* da veia central hepática (sublobular), sendo os três primeiros dentro do espaço-porta e os últimos dois fora dele, ou seja, pelas artérias hepáticas isoladas.

O PVP é uma rede vascular densa, incluída nas subunidades microvasculares hepáticas, derivada dos ramos arteriais peribiliares, composta por artérias acompanhantes, que cursam paralelamente aos ductos, das quais se ramificam vasos que se comunicam com os ductos, as artérias comunicantes (YAMAMOTO *et al.*, 1985; TAKEMURA *et al.*, 1991). O PVP drena, através da “rota venular”, em sub-ramos das vênulas porta circunjacentes ao ducto biliar, formando as raízes internas da vênula porta. Alguns ramos arteriais e vênulas inseridas no plexo, porém, partem das artérias acompanhantes e drenam, através da “rota arterial” diretamente nos sinusóides, sem contato com ductos biliares. Os PVPs em torno dos ductos biliares septais e grandes ductos biliares organizam-se em três camadas, enquanto os vasos associados aos pequenos ductos interlobulares e dúctulos não apresentam essa organização. A camada interna do PVP consiste de um colar único de capilares, organizado em padrão regular, imediatamente adjacente à membrana basal dos ductos. A camada intermediária é caracterizada por pequenos ramos dispersos irregularmente no interior da parede do ducto, que podem corresponder a vasos aferentes e eferentes. A camada externa consiste de capilares, vênulas e arteríolas dispersas pelo tecido periductal (KOBAYASHI *et al.*, 1994; WASHINGTON *et al.*, 1997). Os capilares que correm muito próximos aos ductos biliares periféricos e dúctulos são as ramificações das arteríolas hepáticas terminais, na camada interna do PVP, que não desembocaram em sinusóides nas margens lobulares. Eles formam o “plexo capilar peribiliar”, uma rede compacta de capilares que envolve a totalidade da superfície biliar e que, situada tão próxima aos pequenos ductos, eventualmente localiza-se em ranhuras de sua superfície. A camada externa, eferente, situa-se na margem do tecido fibroso peribiliar. Os vasos desse plexo capilar correm longitudinalmente e em torno dos ductos,

interconectando-se. Alguns ramos eferentes ramificados formam estruturas saculares localizadas entre dois ductos biliares periféricos, denominadas “seios pós-capilares”. Esses seios escoam pelas margens lobulares ao longo das paredes da bainha de Glisson; não se conectam com sinusóides diretamente, exceto por pequenos canais ramificados, próximos à placa limitante. Anastomosam-se ainda com ramos da veia porta, próximo à margem lobular. Essas estruturas poderiam controlar a microcirculação do PVP já que possuem uma camada muscular semelhante à da veia porta. (TAKASAKI e HANO, 2001).

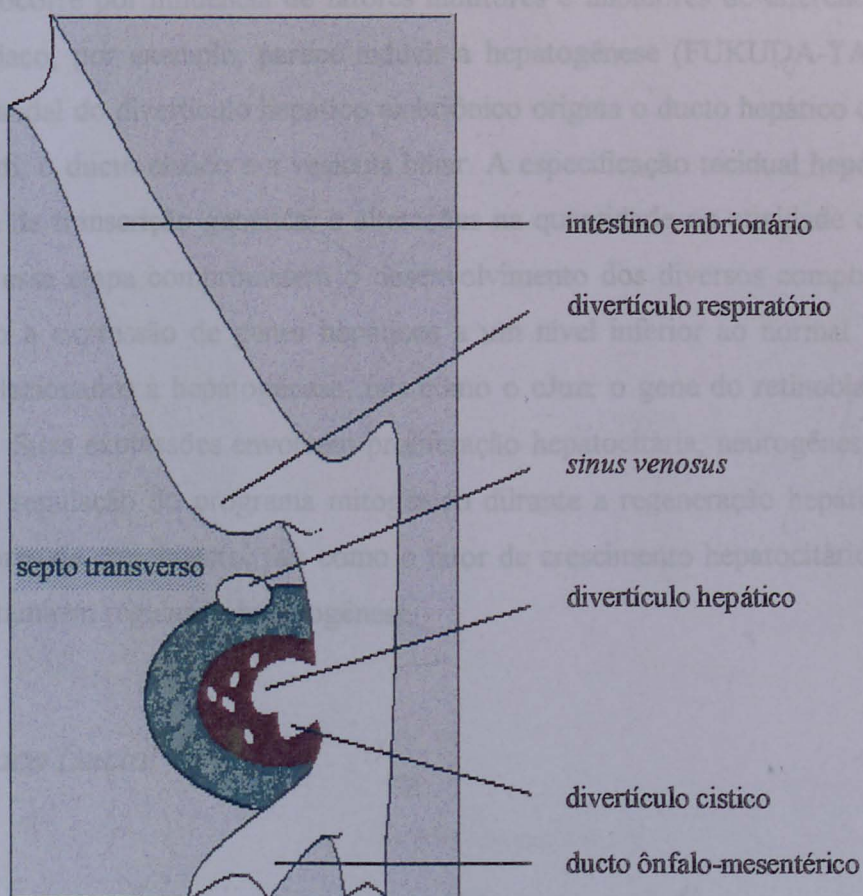
A ligadura da artéria hepática em indivíduo sem hepatopatia não é fatal, especialmente quando ocorre por oclusão gradual. O fígado passa a desenvolver suprimento arterial colateral (CHO e LUNDERQUIST, 1983; EKATAKSIN, 2000) com sangue oriundo das artérias adjacentes ao tronco celiaco e à artéria mesentérica superior e, desta forma, sobrevive. O controle de fluxo sanguíneo hepático ocorre pela ação da artéria hepática já que o fígado não é capaz de controlar diretamente o fluxo venoso portal (LAUTT e GREENWAY, 1987). Atualmente acredita-se que a contração das células de Kupffer e do endotélio sinusoidais contribua para o controle da microcirculação hepática (McCUSKEY, 1994). A mistura do sangue arterial e venoso ocorre na intimidade da unidade microcirculatória hepática, invariavelmente desde a região periportal em direção à periferia acinar, não ocorrendo difusão de substâncias do sangue venoso para o leito arterial. Embora os hepatócitos liberem grandes quantidades de substâncias vasoativas, não são capazes, portanto, de regular a artéria hepática de acordo com suas necessidades metabólicas. A artéria hepática é regulada por, no mínimo, dois fatores intrínsecos. A auto-regulação arterial clássica, ou seja, a constrição da artéria hepática secundária a aumento da pressão arterial é o primeiro. O segundo fator intrínseco, a resposta tampão da artéria hepática, é condicionado pelo fluxo sanguíneo porta e ajusta o desequilíbrio causado pela diferença de pressão entre sistema porta, sinusóides e artéria hepática, podendo colaborar na manutenção do fluxo sanguíneo durante as hepatopatias. Consiste na contração dos ramos arteriais hepáticos secundária à vasodilatação dos ramos venosos porta. Relaciona-se à concentração da adenosina, produzida constantemente pelo metabolismo, a qual, sendo eliminada mais lentamente com a redução do fluxo sanguíneo portal, acumula-se e dilata as arteríolas terminais (GANONG, 2001).

A razão entre o fluxo sanguíneo arterial hepático e o fluxo sanguíneo total do fígado, conhecida como índice de perfusão hepática, é alta na hipertensão porta, independentemente da etiologia, refletindo a deterioração funcional do fígado. O sangue venoso portal é o adequado para os hepatócitos e vascularização arterial copiosa em torno dessas células é sinal de transformação maligna ou pré-maligna (PARK *et al.*, 1998; EKATAKSIN, 2000).

Pelo menos dois padrões de alterações do PVP ocorrem em hepatopatias: proliferativo e vasopênico. A proliferação do PVP se verifica na hipertensão porta (TERADA *et al.*, 1989; RONCALLI *et al.*, 1999). Nessa situação parece ocorrer regurgitação de sangue portal para o PVP, através das raízes internas, levando à proliferação do plexo e à dilatação dos vasos, e aumento da frequência de anastomoses entre PVP e ramos das vênulas porta, ou sinusóides, as quais servem como rotas colaterais para o fluxo sanguíneo (HARATAKE *et al.*, 1991 I). Na cirrose biliar primária, por outro lado, observa-se diminuição do número de vasos da PVP com o avanço da doença, assim como nos casos de colangite esclerosante em qualquer estágio de evolução (WASHINGTON *et al.*, 1997) e nas situações de rejeição ao enxerto hepático (TAKEMURA *et al.*, 1991).

1.2 - Desenvolvimento das Estruturas Hepatobiliares

O período da morfogênese ocorre entre a 6^a e a 10^a semanas gestacionais e nele se realiza a maior parte do desenvolvimento embrionário, num rápido processo de crescimento e estruturação (CHANDRA, 1974; SILVEIRA, 1991; TAN *et al.*, 1994 I). Esse período é vulnerável, de modo único, à ação deletéria de agentes externos, denominados teratógenos, tais como vírus ou drogas, os quais aumentam a ocorrência de anomalias congênitas. Nessa fase, ocorre o dobramento embriônico nos planos mediano e horizontal, dando à estrutura uma forma aproximadamente cilíndrica (MOORE e PERSAUD, 1998). O septo transversal, o coração primitivo, o celoma pericárdico e a membrana bucofaringea deslocam-se sob a superfície ventral do embrião desde sua posição cranial. Ao fim do dobramento, o septo transversal passa a situar-se caudalmente ao coração e, mais tarde, nessa localização, origina o tendão central do diafragma. No dobramento, parte do endoderma do saco vitelino é incorporada pelo embrião, constituindo o intestino anterior. É na região do septo transversal que a porção cefálica do divertículo hepático embriônico irá desenvolver-se para formar o figado (figura 2).



Fonte: Bezerra J. Seminars in Liver Disease 1998; 18: 203 – 216.

Fig. 2 - Representação esquemática do desenvolvimento do divertículo hepático embrionário no septo transverso

O divertículo hepático embrionário é uma projeção tubular da parte ventral do intestino primitivo, de origem endodérmica, que cresce na direção do septo transverso a partir do 22º dia da vida embrionária (DESMET *et al.*, 1999). O septo transverso consiste de uma massa de células mesodérmicas arranjadas de modo frouxo, entre as quais surgem pequenos espaços isolados, limitados por células mesodérmicas, que formam endotélio. Na área dorso-lateral do divertículo hepático embrionário alguns desses espaços são contínuos com os vasos vitelinos. Os brotamentos endodérmicos do divertículo hepático embrionário estendem-se entre esses espaços, estabelecendo-se, assim, a estrutura de cordões celulares entre sinusóides (D'AGATA *et al.*, 1994; DESMET *et al.*, 1999). Os hepatoblastos originam-se do endoderma do divertículo hepático embrionário. A expansão de tecido endodérmico no cerne do mesoderma do septo transverso, circundando sinusóides pré-existentes é chamada de "invasão inters-

ticial”. Ela ocorre por influência de fatores indutores e inibidores de diferenciação. O mesoderma cardíaco, por exemplo, parece induzir a hepatogênese (FUKUDA-TAIRA, 1981). O segmento caudal do divertículo hepático embrionário origina o ducto hepático comum, o ducto biliar comum, o ducto cístico e a vesícula biliar. A especificação tecidual hepática é controlada na etapa de transcrição genética, e alterações na quantidade ou atividade dos fatores relacionados a essa etapa comprometem o desenvolvimento dos diversos componentes do sistema, levando a expressão de genes hepáticos a um nível inferior ao normal. Diversos genes têm sido relacionados à hepatogênese, tais como o cJun, o gene do retinoblastoma e o fator nuclear kB. Suas expressões envolvem proliferação hepatocitária, neurogênese, hematopoiese adequada e regulação do programa mitogênico durante a regeneração hepática (BEZERRA, 1998). Fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento hepatocitário (SCHMIDT *et al.*, 1995), também regulam a hepatogênese.

1.2.1 - Placa Ductal

Os ductos biliares intra-hepáticos originam-se de hepatócitos primitivos que estão em contato direto com o mesênquima em torno dos ramos da veia porta. Num primeiro momento, entre 5 e 6 semanas de gestação, um anel desses hepatoblastos mais próximo aos vasos transforma-se em células cuboidais chatas, com expressão imunistoquímica de ducto biliar, seguido de uma segunda camada que sofre o mesmo processo (VAN EYKEN *et al.*, 1988). Tal cilindro de paredes duplas, com lúmen em forma de fenda, chama-se placa ductal (JORGENSEN, 1977), a qual é posteriormente remodelada, até formar uma rede de estruturas tubulares interconectadas (figura 3). De acordo com VIJAYAN e TAN (1997), quanto aos ductos biliares extra-hepáticos, há continuidade do seu lúmen com o sistema biliar em formação durante todo o desenvolvimento embrionário, inexistindo uma fase sólida na 5ª semana de gestação conforme se acreditava.

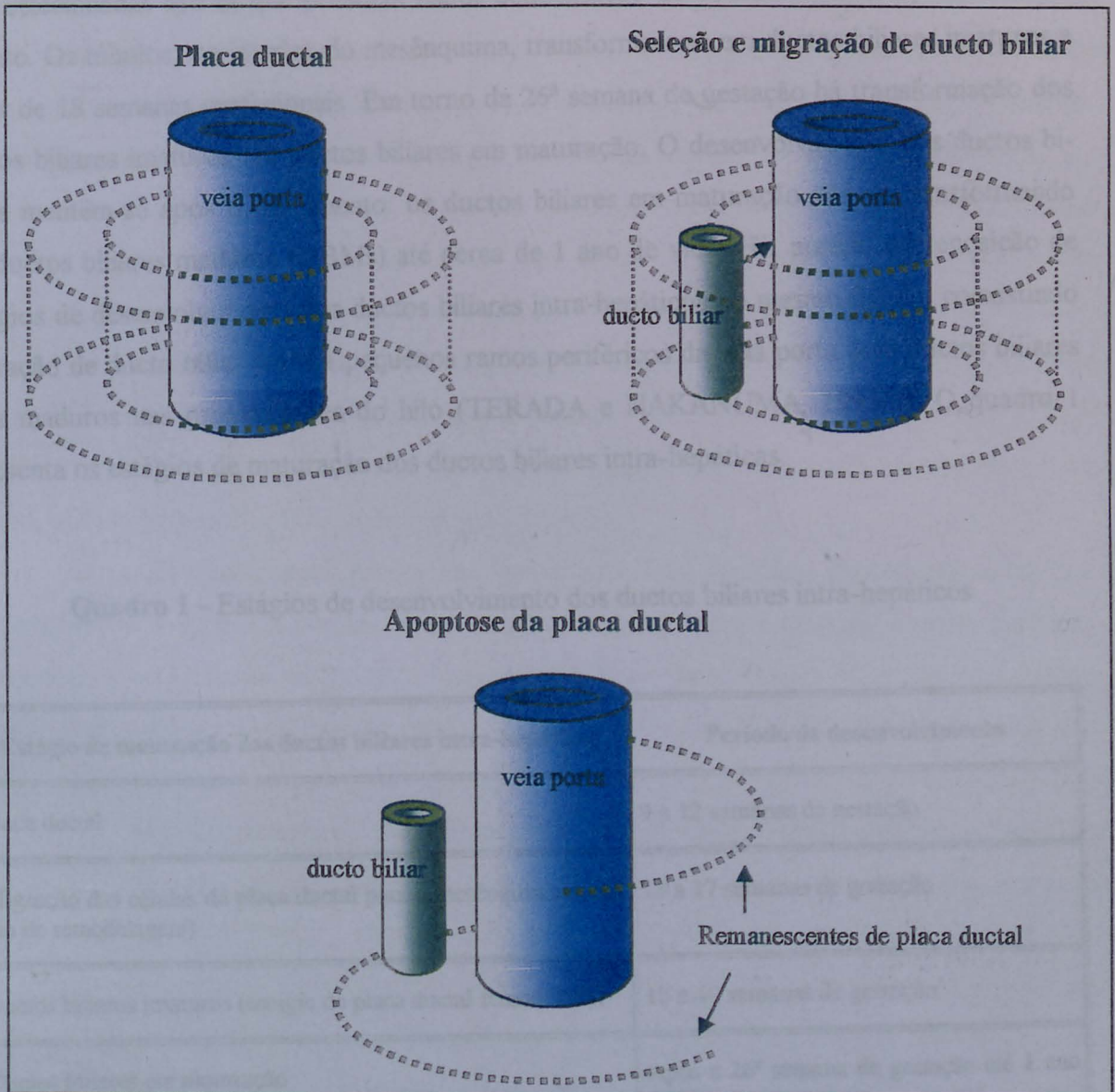


Fig. 3 - Representação esquemática do desenvolvimento dos ductos biliares

A duplicação da placa ductal é segmentar e o processo de formação dos ductos biliares intra-hepáticos inicia-se em torno dos grandes ramos da veia porta no hilo hepático, estendendo-se para a periferia do fígado e acompanhando até os menores ramos vasculares. Em torno da 11^a semana gestacional, o lúmen do ducto hepático comum já tem comunicação com o lúmen da placa ductal no hilo através da confluência de várias estruturas tubulares dela ori-

ginadas (TAN *et al.*, 1994 I). Aproximadamente na 13^a semana, as células de algumas porções da placa ductal começam a separar-se do anel inicial, migrando para o interior do mesênquima e tomando, gradualmente, a forma de cordões e túbulos (TERADA *et al.*, 1995). Essas porções selecionadas são as que possuem maior condensação de células no mesênquima circunjacente. Os túbulos, no interior do mesênquima, transformam-se em ductos biliares imaturos a partir de 18 semanas gestacionais. Em torno da 26^a semana de gestação há transformação dos ductos biliares imaturos em ductos biliares em maturação. O desenvolvimento dos ductos biliares mantém-se após o nascimento: os ductos biliares em maturação vão-se transformando em ductos biliares maduros (DBMs) até cerca de 1 ano de vida. Há, porém, sobreposição de estágios de desenvolvimento dos ductos biliares intra-hepáticos no mesmo fígado, coexistindo migração de ducto biliar junto a pequenos ramos periféricos da veia porta com ductos biliares mais maduros nas proximidades do hilo (TERADA e NAKANUMA, 1995 I). O quadro 1 apresenta os estágios de maturação dos ductos biliares intra-hepáticas.

Quadro 1 - Estágios de desenvolvimento dos ductos biliares intra-hepáticos

Estágio de maturação dos ductos biliares intra-hepáticos	Período de desenvolvimento
Placa ductal	9 a 12 semanas de gestação
Migração das células da placa ductal para o mesênquima (estágio de remodelagem)	13 a 17 semanas de gestação
Ductos biliares imaturos (estágio de placa ductal remodelada)	18 a 40 semanas de gestação
Ductos biliares em maturação	Após a 26 ^a semana de gestação até 1 ano de vida
Ductos biliares maduros	Após o 1 ^o ano de vida

Fonte: TERADA T.; NAKANUMA Y. *Gastroenterology* 1995 I

A partir de 12 semanas de gestação a bile está presente em hepatócitos e dúctulos (TAN e MOSCOSO, 1994 e 1994 I). Outro elemento importante da árvore biliar intra-hepática, as glândulas peribiliares, originam-se também da placa ductal. A formação dessas glândulas e de

uma cobertura de tecido conjuntivo espesso completa o processo de morfogênese dos ductos biliares intra-hepáticos. TERADA e NAKANUMA (1993 I) estudaram, por imunoistoquímica, o seu desenvolvimento, desde o período embrionário até a idade adulta, demonstrando o surgimento das glândulas peribiliares a partir da placa ductal, a começar no hilo hepático. Dessa estrutura primitiva, migram para o mesênquima brotamentos celulares em forma de cordões, que dão origem a túbulos a partir da 7ª semana gestacional. Por volta da 30ª semana, os brotamentos estão completamente transformados em túbulos, os quais, gradualmente, aumentam em número e agregam-se, até formar estruturas acinares cercadas por tecido fibroso denso em torno da 40ª semana gestacional. São, nessa etapa, glândulas biliares incompletas, não produzindo mucinas. Após o nascimento, próximo aos 3 meses, as estruturas acinares tornam-se mais densas, sendo chamadas de glândulas biliares intra-hepáticas imaturas. O muco surge no ácino nessa fase, e mucina neutra, sialomucina e sulfomucina podem ser identificadas no citoplasma das células mucoprodutoras. Lentamente, aumentam em tamanho e número, até atingir a maturidade, próximo aos 15 anos.

A adequada morfogênese das vias biliares intra-hepáticas depende de complexas interações entre epitélio e mesênquima. Propõe-se que, durante o desenvolvimento embrionário, a matriz extracelular, em contato com as células epiteliais, forneça estímulos para diferenciação, migração e outros eventos morfogenéticos (SHAH e GERBER, 1990). O tecido mesenquimatoso circunjacente à placa ductal parece ser fundamental ao processo de sua remodelagem em ductos biliares intra-hepáticos. A proliferação mesenquimatosa circundante molda de forma ativa as estruturas da placa ductal durante sua transformação em ductos biliares definitivos (TAN *et al.*, 1994 I). Os componentes da matriz extracelular regulam a expressão gênica hepática, tendo função crucial na diferenciação hepatocitária. As integrinas seriam mediadoras da adesão celular à matriz extracelular, ligando-a à rede de actina que forma o citoesqueleto citoplasmático; funcionariam como receptores para transdução de sinais capazes de modular a expressão gênica e o crescimento celular. Influências não só químicas mas também mecânicas do ambiente celular poderiam afetar a atividade gênica, atuando na diferenciação e proliferação celulares (COUVELARD *et al.*, 1998). Esses mecanismos envolveriam a matriz extracelular extensa, que inclui a matriz extracelular, a matriz do núcleo celular e o citoesqueleto (VASSY *et al.*, 1996). Apenas um segmento da placa ductal migra para o mesênquima, havendo deleção quase completa das células restantes da bainha epitelial primitiva. O padrão consistente de seleção/deleção, migração e remodelagem é bem orquestrado, incorporando intrincadas seqüências de sinalização molecular entre as células epiteliais e mesenquimatosas (BLACKOLMER *et al.*, 1995). Após o encerramento da remodelagem do seg-

mento 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 chamados de remanescentes da placa ductal. Em neonatos, agrupamentos lineares desses remanescentes da placa ductal são encontrados em torno dos grandes e pequenos espaços-porta. Em crianças maiores e mesmo em adultos, eles formam grupos isolados, ocasionais, de células primitivas, marginais aos espaços-porta (SHAH e GERBER, 1989). Talvez eles sejam fonte da proliferação ductular que ocorre nas hepatopatias (HARUNA *et al.*, 1996).

1.2.2 - Vasculatura Hepática

O arcabouço hepático inicial está em contato com as veias vitelinas. Elas formam um plexo capilar que é, gradativamente, cercado pelas placas de hepatoblastos em expansão. Cranialmente ao fígado, tal plexo conecta-se às veias umbilicais que cursam pela parede corporal embriônica, ainda unida, nessa fase, à esplancnopleura pelo septo transverso. Os segmentos inferiores das veias vitelinas alimentam os sinusóides e, posteriormente, originam a veia porta, enquanto os segmentos superiores formam as veias hepáticas, recebem o sangue sinusoidal e o drenam no *sinus venosus* (veia cava inferior supra-hepática) (BEZERRA, 1998). Por sua vez, as veias umbilicais organizam a vasculatura intra-hepática e a segmentação do fígado. Em torno de 28 a 30 dias de gestação, três comunicações anastomóticas são estabelecidas entre as porções caudais das veias vitelinas, sendo a mais cranial localizada no interior do fígado e as outras duas, em posição inferior ao órgão. O vaso comunicante mais caudal cruza o intestino ventralmente, enquanto o intermediário cruza a alça dorsalmente, formando-se dois anéis sobrepostos. Por volta de 33 a 36 dias, a metade direita do anel superior e a esquerda do inferior desaparecem, dando à veia porta uma forma de S, que cruza o duodeno dorsalmente. O padrão definitivo da vasculatura venosa hepática estabelece-se em torno da 6ª semana. Quanto ao sistema vascular arterial, em torno de 37 a 40 dias de gestação, um ramo hepático da artéria celiaca chega ao fígado em desenvolvimento. Os ramos desta artéria seguem o sistema venoso porta. O fígado do feto é nutrido, inicialmente, através da circulação porta; a emergência posterior das artérias intra-hepáticas relaciona-se à expansão do estroma, que dá suporte ao parênquima em expansão, coincidindo com o desenvolvimento das estruturas ductais biliares (EKATAKSIN e KANEDA, 1999; EKATAKSIN, 2000). HARATAKE *et al.* (1991) estudaram a relação entre a maturação do sistema ductal biliar e da microvas-

culatura hepática, especialmente o PVP, em ratos recém-nascidos. Observaram a presença do PVP no hilo hepático em torno dos grandes ductos biliares e sua ausência, assim como de ductos biliares interlobulares, na periferia hepática durante este estágio de desenvolvimento. TERADA e NAKANUMA (1993) descreveram o desenvolvimento do PVP em humanos, incluindo fígados de fetos, lactentes, crianças maiores, adolescentes e adultos (figura 4).

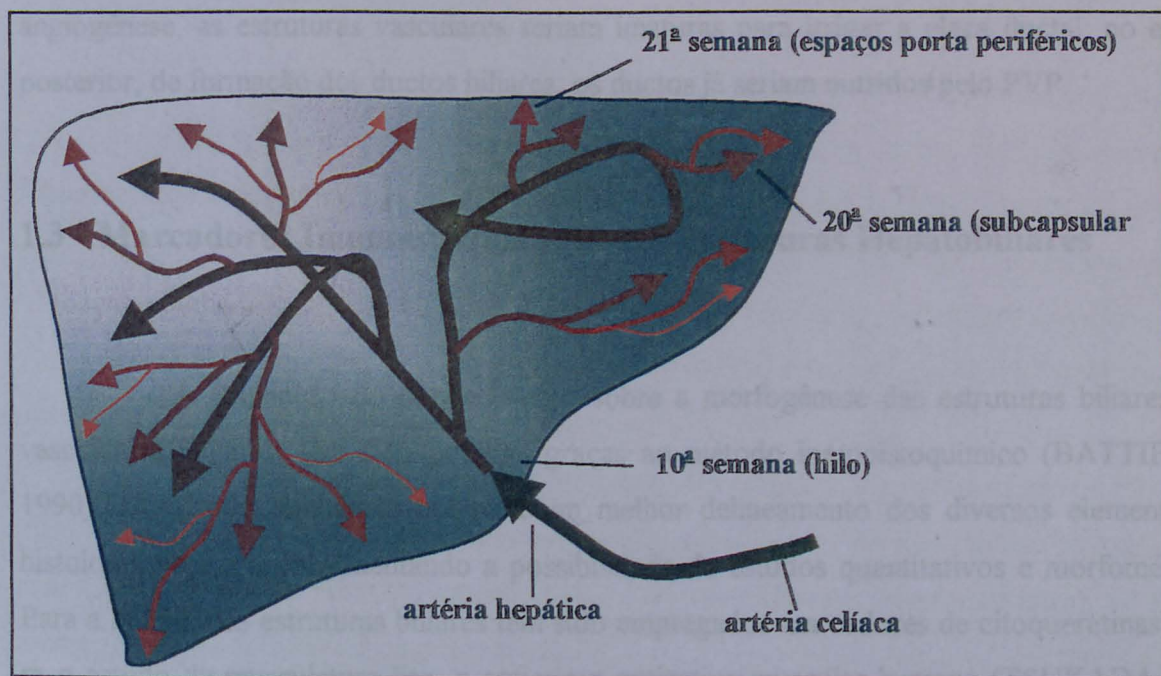


Fig. 4 - Representação esquemática do desenvolvimento do sistema arterial hepático

Relativamente aos grandes ductos biliares, entre a 6ª e a 8ª semanas gestacionais, não há ainda vasculatura em torno da placa ductal. Na região do hilo, a artéria hepática surge a partir da 10ª semana, quando pequenos vasos (capilares, arteríolas e vênulas) são identificados em torno das estruturas biliares em migração. Por volta da 15ª semana gestacional, esses vasos agregam-se em torno dos grandes ductos biliares e tomam a forma de PVP, ainda sem formarem camadas. O número de vasos continua a aumentar e, em torno da 40ª semana, passam a dispor-se em duas camadas: uma interna, formada por capilares localizados junto às células epiteliais biliares, e outra externa, composta de vasos dispersos em áreas mais exteriores do mesênquima em torno dos ductos. Os autores chamaram essa estrutura com dupla camada vascular de PVP prematuro.

Em torno dos pequenos ductos biliares da periferia hepática, o processo mostra-se mais tardio: antes da 20ª semana gestacional não são encontrados vasos, exceto artéria hepática e veia porta, nos espaços-porta da região subcapsular. No final desse período, raras estruturas vasculares são observadas. Somente em torno da 21ª semana gestacional, período de migração das células biliares no mesênquima, observam-se vasos cercando as estruturas biliares na periferia hepática. O desenvolvimento do PVP mantém-se após o nascimento, e o estágio adulto somente é alcançado por volta dos 15 anos. Desta forma, a migração de células biliares pelo estroma acompanha-se da angiogênese do PVP. Segundo os autores, no estágio inicial da angiogênese, as estruturas vasculares seriam imaturas para irrigar a placa ductal; no estágio posterior, de formação dos ductos biliares, os ductos já seriam nutridos pelo PVP.

1.3 - Marcadores Imunoistoquímicos das Estruturas Hepatobiliares

A ampliação do conhecimento sobre a morfogênese das estruturas biliares e da vasculatura hepática tem sido possível graças ao método imunoistoquímico (BATTIFORA, 1990). O método também é útil para um melhor delineamento dos diversos elementos da histologia hepática, incrementando a possibilidade de estudos quantitativos e morfométricos. Para a análise das estruturas biliares têm sido empregados marcadores de citoqueratinas e, para o estudo da musculatura lisa, o anticorpo antiactina muscular humana (TSUKADA *et al.*, 1987). Certos marcadores têm possibilitado apreciar as relações entre mesênquima e epitélio, identificando os elementos envolvidos. A técnica imunoistoquímica permite, ainda, identificar a presença de fenômenos imunológicos em desordens hepáticas, pela marcação de reagentes como a *interferon inducible protein-10* (TERUYA-FELDSTEIN *et al.*, 1997) entre outros.

O processo de desenvolvimento da árvore biliar já foi razoavelmente estudado, tanto em humanos (DESMET, 1992; TERADA e NAKANUMA 1994 e 1994 I; TERADA *et al.*, 1995; BALISTRERI, 1996; SANTOS *et al.*, 1998 I) quanto em modelos animais. Um dos principais avanços nesse campo de pesquisa deve-se à associação da microscopia óptica com o método imunoistoquímico (DENKE, 1984), o qual se fundamenta no uso de anticorpos monoclonais e/ou policlonais específicos contra determinadas estruturas das células hepáticas e posterior análise dos padrões histológicos resultantes (LANE, 1982). Por esse 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 das estruturas hepáticas específicas, como também sua relação temporal com o restante do desenvolvimento embriológico humano (LANE, 1982). Dentre os vários marcadores, destacam-se as citoqueratinas. Os filamentos intermediários das células epiteliais são compostos por elas, que estão presentes em vários tipos de epitélio (BATTIFORA, 1988 e 1990) e cuja função é a manutenção da arquitetura celular. MOLL *et al.* (1982), utilizando método bidimensional de eletroforese, identificaram 19 diferentes tipos. Todo epitélio humano pode ser classificado de acordo com a expressão de citoqueratinas específicas a um determinado tecido (MOLL, 1982; SHAH e GERBER, 1989). Sua importância para o estudo embriológico reside no fato de que anticorpos específicos, monoclonais ou não, contra citoqueratinas podem ser identificados pelo método imunistoquímico, ao longo das etapas de desenvolvimento. Assim, baseando-se nos padrões imunistoquímicos encontrados, pode-se mapear a expressão fenotípica de um determinado tecido. Por exemplo, os hepatócitos e os ductos biliares expressam citoqueratinas específicas: os primeiros expressam polipeptídios compatíveis com as de números 8 e 18, enquanto o epitélio biliar, 7 e 19 (OSBORN, 1983; VAN EYKEN *et al.*, 1987; VAN EYKEN *et al.*, 1988 e 1988 I).

Outros marcadores imunistoquímicos têm ampliado o conhecimento da interação entre epitélio e mesênquima no desenvolvimento hepatobiliar. As substâncias marcadas por eles e sua atuação do desenvolvimento das estruturas biliares e na etiopatogenia da atresia biliar (AB) estão apresentadas no quadro 2.

Os dados obtidos nos estudos com os diversos marcadores, pelo método imunistoquímico, resultam numa melhor compreensão das interações entre epitélio e mesênquima que regulam o desenvolvimento dos ductos biliares intra-hepáticos. Alterações nesses processos poderiam relacionar-se à maturação incompleta dos ductos associada a alguns casos de AB. Outros estudos propõem a hipótese de um distúrbio imunologicamente perpetuado nas vias biliares nessa doença.

Quadro 2 - Marcadores imunistoquímicos empregados no estudo do desenvolvimento dos ductos biliares e da etiopatogenia da atresia biliar

Substâncias marcadas	Autores	Ação das substâncias marcadas
Laminina	SHAH e GERBER, 1990 BLAKOLMER, 1995	Atua na morfogênese e migração dos ductos biliares ao centro dos espaços-porta através da membrana basal embrionária.
Colágeno tipo IV	TERADA e NAKANUMA, 1994	Sua deposição acompanha o desenvolvimento dos ductos biliares.
Proteínas relacionadas à apoptose	TERADA e NAKANUMA, 1995 FUNAKI <i>et al.</i> , 1998	Participam do equilíbrio entre proliferação celular e apoptose no desenvolvimento dos ductos biliares.
Enzimas proteolíticas (proteínases da matriz)	TERADA <i>et al.</i> , 1995 TERADA e NAKANUMA, 1994	Facilitam a migração dos ductos biliares ao degradar a matriz extracelular.
Enzimas pancreáticas	TERADA e NAKANUMA, 1995 I	Atuam na matriz extracelular de forma semelhante às proteínases da matriz.
TGF β -1	TAN <i>et al.</i> , 1995	Atua na remodelagem da placa ductal: estimula proliferação mesenquimatosa e inibe crescimento tecidual.
Mucinas e apomucinas	SASAKI <i>et al.</i> , 1995	A expressão de mucinas e apomucinas amadurece durante o desenvolvimento fetal.
Marcadores de células-fonte hematopoiéticas	BLAKOLMER, 1995	A placa ductal e seus remanescentes podem expandir-se em resposta a agressão externa ou carcinogênese.
Marcadores de processos imunológicos		
Molécula de adesão celular-1	DILLON <i>et al.</i> , 1994	Mecanismo imunológico associado à atresia biliar.
Marcadores de citotoxicidade	AHMED <i>et al.</i> , 2001 I	Ausência de ação citotóxica pelos linfócitos B infiltrados nos ductos biliares.
CD14 em monócitos no fígado	TRACY <i>et al.</i> , 1996 AHMED <i>et al.</i> , 2001	Hiper-reatividade hepática a toxinas exógenas na atresia biliar.
Marcadores de estruturas nervosas	IWAMI <i>et al.</i> , 1997	Padrão alterado das terminações nervosas na atresia biliar.

1.4 - **Atresia Biliar**

A AB é uma doença exclusiva da infância, que consiste na obliteração completa de parte ou da totalidade das vias biliares extra-hepáticas e engloba a maioria dos casos de colestase neonatal (BALISTRERI, 1996; LEFKOWITCH, 1998). A frequência da AB é de 1:8000 a 1:15000 nascidos vivos. Sua incidência varia de acordo com as regiões geográficas, desde 5:100000 na Holanda a 32:100000 na Polinésia Francesa (CHARDOT, 2001). Segundo DELLERT e BALISTRERI (1996), nos Estados Unidos, um terço dos casos de colestase neonatal deve-se a ela. Outras causas compreendem hepatite neonatal idiopática, a qual resulta de inflamação hepática crônica de etiologia não determinada e inclui cerca de 30% a 35% dos casos de colestase neonatal (CRAIG e LANDING, 1952), doenças infecciosas e metabólicas. Entre as causas metabólicas destaca-se a deficiência de α_1 -antitripsina, desordem autossômica recessiva que produz quadro histopatológico semelhante ao da AB (PERLMUTTER, 1996). SILVEIRA (1995), em um estudo prospectivo realizado em lactentes com icterícia colestática acompanhados em Porto Alegre em 1992, observou que 26% dos casos de colestase neonatal foram de causa obstrutiva extra-hepática, representando a AB cerca de 84% desses casos.

Em 1957, Morio Kasai descreveu a técnica da portoenterostomia destinada a proporcionar drenagem biliar nos casos de AB denominados previamente de “não-corrigíveis”. Sucesso tem sido desde então obtido com a técnica, contanto que a cirurgia seja realizada nas primeiras oito semanas de vida (MIELI-VERGANI *et al.*, 1989; OHYA *et al.*, 1990). Porém, independentemente do alívio da obstrução ao fluxo biliar, a maioria das crianças com AB apresenta doença hepática progressiva (LILLY e ALTMAN, 1975). Parece evidente que uma desordem das estruturas intra-hepáticas, de ordem ainda não bem esclarecida, permanece atuante mesmo nos pacientes adequadamente operados em tempo hábil. Na realidade, a hipertensão porta parece ser evento precoce nos pacientes com AB (OHI *et al.*, 1996). Em estágios iniciais da doença já são observadas alterações patológicas nos ductos biliares dos pacientes, envolvendo desde os dúctulos até os grandes ductos do hilo hepático. O epitélio ductal demonstra alterações degenerativas progressivas (ITO *et al.*, 1983). Portanto, apesar dos aprimoramentos técnicos na realização da portoenterostomia, o conhecimento da etiopatogenia da AB torna-se indispensável, visando o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para essa desordem, com conseqüente melhoria do prognóstico.

1.4.1 - Etiopatogenia

Sob o ponto da etiologia, vários agentes têm sido associados à etiopatogenia da AB (SILVEIRA, 1988; SILVEIRA *et al.*, 1992), conforme demonstra o quadro 3.

Quadro 3 - Condições descritas como associadas à atresia biliar

A - Fatores genéticos
Alterações gênicas Anormalidades cromossômicas numéricas: trissomia do 18 e do 21, síndrome de Turner Anormalidades cromossômicas estruturais: duplicação do cromossoma 10
B - Fatores ambientais
Tóxicos na agricultura Drogas usadas durante a gravidez: anfetamina e álcool Infecções maternas: listeriose, citomegalovirose, hepatite viral, varicela Infecções neonatais por: reovírus tipo 3, adenovírus, citomegalovírus, papilomavírus
C - Causas primárias não bem determinadas
Anomalias estruturais: síndrome polisplênica, anormalidades da junção coledocopancreática e da placa ductal Anormalidades metabólicas: ácidos biliares, L-prolina Anormalidades imunológicas: deposição de imunoglobulinas nos ductos biliares e outras Alterações imunogenéticas: presença de HLA-B12 e de certos haplótipos

Postula-se que haja duas modalidades para a aquisição da AB: numa os fatores determinantes agiriam durante a vida intra-uterina (forma congênita) e na outra, durante o período pós-natal (forma adquirida). A forma congênita relaciona-se com casos de AB em que, concomitantemente, ocorrem anomalias congênitas extra-hepáticas. Cerca de 12% a 37% dos casos de AB associam-se com essas anomalias em outros sistemas, principalmente cardiovasculares, digestivas e esplênicas (MAKSEM, 1980; HENRIKSEN *et al.*, 1981; KARRER *et al.*, 1991; SILVEIRA *et al.*, 1991; TANANO *et al.*, 1999). Esse grupo, segundo BALISTRE-RI (1996), apresenta características clínicas específicas: a colestase neonatal tem início mais precoce, não ocorre período livre de icterícia após a icterícia fisiológica e remanescentes de

ductos biliares não são observados no ligamento hepatoduodenal. Recentemente, diversos estudos (BEZERRA *et al.*, 2001; FURUYA E ZHANG, 2001; PEREIRA e HOSKINS, 2001) relataram a identificação de programas transcricionais genéticos alterados característicos da AB, especificamente relacionados à imunidade, às respostas a inflamação e estresse, à proliferação e à diferenciação celulares.

1.4.2 - Anomalias Congênitas Extra-Hepáticas Associadas

Um exame mais minucioso dos casos com anomalias congênitas extra-hepática associadas à AB (AEH) aponta para a existência de diferentes grupos, um deles associado à anomalia da seqüência de lateralidade, que inclui a síndrome malformativa esplênica da AB, anteriormente restrita à síndrome polisplênica. Outro grupo, mais numeroso, inclui pacientes com anomalias não relacionada à síndrome malformativa esplênica da AB, ao qual CARMÍ *et al.* (1993) denominaram grupo não-sindrômico. Polisplenia, ou seja, a presença de mais de cinco nódulos esplênicos ou de um baço multilobulado, é característica encontrada em 10% das autópsias de pacientes pediátricos ou adultos. A síndrome polisplênica compõe-se, além de polisplenia, de anomalias posicionais e cardiovasculares (RODIN *et al.*, 1972; ABRAMSON *et al.*, 1987; ICARDO e SANCHEZ DE VEJA, 1991). CHANDRA, em 1974, descrevendo os achados de autópsia em 10 crianças com polisplenia, cinco das quais tinham AB e anomalias congênitas extra-hepáticas associadas, incluiu a AB na síndrome polisplênica. DIMMICK (1975) observou síndrome polisplênica em 17% de uma amostra de AB. Desde então, diversos estudos têm reforçado essa associação (NAKADA *et al.*, 1997; TANANO *et al.*, 1999; OHI, 2000). Na Espanha, VAZQUEZ *et al.*, em 1995, encontraram AEH em cerca 13% de seus casos. DEVECI e DEVECI (2000) observaram em um caso a presença concomitante de polisplenia, múltiplas anomalias sistêmicas e ausência de trato biliar extra-hepático, além de malformação de placa ductal (MPD) no estudo histopatológico hepático. CHANDRA (1974) postulou que a associação entre AB e síndrome polisplênica não seria casual, devido à freqüente coincidência dessas duas raras desordens e pelo fato de a formação do primórdio esplênico e dos ductos biliares extra-hepáticos coincidir, no desenvolvimento embriônico, com a septação do tronco arterioso e com o desenvolvimento dos Coxins endocárdicos, da árvore pulmonar, do septo cardíaco e da árvore brônquica. Sugeriu a existência de uma causa comum, por exemplo, um insulto ambiental, que atuaria em torno da 5ª semana gestacional. Pos-

teriormente, asplenia foi encontrada em casos de AB (MAKSEM, 1980; SILVEIRA *et al.*, 1991; DAVENPORT *et al.*, 1993), passando-se a denominar a associação de AB com anomalias esplênicas com a expressão síndrome malformativa esplênica da AB, mais ampla. Polisplenia e asplenia, quando associadas à AB, são manifestações de um defeito morfogenético primário de determinação de simetria ou lateralização. Contudo, nem sempre anomalia esplênica é identificada na síndrome malformativa esplênica da AB, e o termo mais abrangente para a descrição dessa associação talvez seja anomalia da seqüência de lateralidade associada à AB. Estudos de genética em animais têm contribuído para a compreensão da anomalia da seqüência de lateralidade. YOKOYAMA *et al.* (1993) descreveram um rato transgênico no qual mutação recessiva de inserção no locus *inv* do cromossoma 4 resultou em *situs inversus* e heterotaxia nos mutantes homozigotos. Os animais tornaram-se progressivamente ictericos após o nascimento e apresentaram alterações císticas renais, déficit de crescimento e óbito precoce. Ocorreu *situs* anormal de vísceras abdominais e, em um deles, polisplenia. MORISHIMA *et al.* (1998) avaliaram a variação de *situs* nos ratos homozigotos *inv*, observando heterotaxia viscerotaxial e propensão a levoisomerismo. O fígado desses homozigotos apresentou *situs inversus* e levoisomerismo; ocorreu dextrocardia em todos os animais, além de má-rotação intestinal e alterações esplênicas, tais como hipoplasia ou displasia. MAZZIOTTI *et al.* (1999) estudaram o fígado e as estruturas biliares desse tipo de rato mutante, observando colestase precoce, ausência de ductos biliares interlobulares nos espaços-porta e persistência de placa ductal acompanhada de intensa proliferação ductular. Não foram detectadas isquemia ou inflamação parenquimatosas. Diversas anormalidades foram encontradas na árvore biliar extra-hepática, tais como lesões císticas. Os autores esclareceram que, entre diversos tipos de mutação por inserção estudadas, apenas nos ratos *inv* ocorrem colestase e morfogênese alterada do trato hepatobiliar, sugerindo o envolvimento do gene *Inversina*, que tem o fígado como importante sítio de ação gênica desde o desenvolvimento embrionário precoce (MORGAN *et al.*, 1998). Se ocorrem semelhanças entre os ratos *inv* e lactentes com atresia biliar, por outro lado há diferenças: pacientes com AB, ao contrário dos ratos *inv*, não apresentam, como padrão, cistos renais, e a morfologia do trato biliar extra-hepático dos ratos *inv* é diferente da encontrada nos lactentes com atresia biliar, não ocorrendo inflamação, necrose ou obliteração do sistema biliar nos animais mutantes. Os autores, recordando a teoria da colangiopatia destrutiva infantil de Landin (1974), que relacionou a etiopatogenia da AB com a da hepatite neonatal idiopática e cisto coledociano, propuseram que as alterações encontradas no trato biliar dos ratos poderiam ser os eventos morfológicos antecedentes ao desenvolvimento das alterações em

idiopática, e não AB, que apresentou síndrome polisplênica concomitante (SANTOS *et al.*, 1998 II).

Finalmente, CARMÍ *et al.* (1993) relacionam um terceiro grupo de anomalias congênitas extra-hepáticas associadas à AB: casos que apresentam má-rotação intestinal isolada, acompanhada ou não de veia porta pré-duodenal.

1.4.3 - Etiopatogenia Pós-Organogênese

Há evidências de que a AB representaria uma lesão da via biliar adquirida durante o período perinatal ou pós-natal. A maioria dos casos de AB apresenta-se como um distúrbio isolado, ou seja, sem anomalias em outros órgãos. Dentre os argumentos favoráveis à teoria de que a ela se constitui em processo adquirido no período perinatal, destaca-se a raridade da AB em prematuros, em fetos mortos ou em abortamentos. Outros elementos a considerar são, segundo SILVEIRA (1988 e 1991 I) e OHI (2000):

- a) raros casos de evidências clínicas de AB somente após a primeira semana de vida extra-uterina;
- b) mecônio normalmente corado em pacientes com AB após o nascimento;
- c) pacientes com AB que tiveram comprovadamente a via biliar inicialmente permeável;
- d) discordância do aparecimento da AB tanto em gêmeos homocigóticos quanto em heterocigóticos;
- e) presença de alterações patológicas semelhantes às descritas em hepatite neonatal;
- f) progressão das lesões hepáticas para cirrose biliar, mesmo após a correção cirúrgica da obstrução extra-hepática.

Tais achados evidenciam que fatores ainda não identificados poderiam estar agindo na organogênese já estabelecida. Esse processo poderia ser decorrente da destruição da árvore biliar após o nascimento. Nessas circunstâncias, a AB seria resultado de lesões destrutivas e/ou esclerosantes na rede biliar, adquiridas tardiamente na gravidez, por ocasião do nascimento ou, ainda, no período neonatal precoce. Nem todos os casos de AB, portanto, limitam-se simplesmente ao esquema malformativo, de problema intrínseco à diferenciação embriológica. Há um padrão perfeitamente adaptável ao esquema disruptivo vascular, no qual as

anomalias da artéria hepática desempenhariam papel decisivo (SILVEIRA *et al.*, 1991). Essa forma, que se apóia na aquisição de um agente externo por um indivíduo geneticamente predisposto, contemplaria também o desenvolvimento tardio na maioria dos casos de AB. A frequência aumentada do antígeno HLA-B12 nos pacientes estudados indica uma suscetibilidade genética determinada, e a identificação desse antígeno, principalmente naqueles casos sem AEH, sugere que a lesão teve início tardio na gestação (SILVEIRA *et al.*, 1993). A AB parece decorrer de múltiplos fatores, e a constituição imunogenética do hospedeiro atuar como moduladora do dano hepatobiliar a um fator exógeno de etiologia a ser determinada. A AB, portanto, configura um distúrbio complexo, originado de uma intrincada interação que pode advir de alteração tanto durante a organogênese, como após a conclusão dessa fase.

Há pesquisas que reforçam o conceito de heterogeneidade etiológica da AB, investigando uma possível causa viral. PETERSEN *et al.* (1997), seguindo o estudo de RIEPENHOFF-TALTY *et al.* (1993 e 1996), desenvolveram um modelo de AB em ratos pela infecção com rotavírus *rhesus* do grupo A. Entre os animais recém-nascidos inoculados com o vírus, 67% desenvolveram colestase neonatal e retardo no crescimento. Aos 10 dias, observou-se infiltração concêntrica nos ductos biliares extra-hepáticos, levando à sua obstrução completa. As alterações intra-hepáticas foram necrose reacional e proliferação ductular. Em um dos animais ocorreu dilatação cística das vias biliares extra-hepáticas, semelhante ao cisto coledociano. Infecção materna não desencadeou o mesmo quadro e, com inoculação após a segunda semana de vida, o distúrbio mostrou-se menos intenso. Os autores sugeriram que a heterogeneidade apresentada entre membros do grupo inoculado quanto à morbidade dever-se-ia a diferenças inter-individuais na maturação do sistema imunológico quanto à suscetibilidade para a infecção. Em outro estudo, PETERSEN *et al.* (1997 I) observaram que o tratamento de uma semana com interferon- α promoveu bons resultados quanto à prevenção da oclusão das vias biliares extra-hepáticas em ratos, sendo tal proteção transmitida aos descendentes. Os autores sugeriram que a AB poderia ser prevenida pela presença de anticorpos anti-rotavírus *rhesus* do grupo A no organismo materno. Porém, em estudo recente, FURUYA e ZHANG (2001) não observaram alterações na expressão de genes induzidos por vírus, tais como os relacionados à *interferon-inducible protein*, em casos de AB e sugeriram que esta doença não resulta de infecção viral.

1.5 - Atresia Biliar e Alterações da Artéria Hepática

O sistema biliar extra-hepático recebe seu suprimento sanguíneo arterial da artéria hepática e seus ramos. NORTHOVER (1980) sugeriu que a estenose dos ductos biliares extra-hepáticos pós-transplante de fígado fosse determinada pelo efeito fibrogênico da bile em terreno predisposto pela isquemia. Poder-se-ia especular que evento similar poderia ocorrer na AB em estágio precoce. Vários modelos animais investigaram o possível papel do sistema arterial no desenvolvimento da obstrução extra-hepática (CAMERON e HOU, 1962; MORGAN *et al.*, 1966; PICKETT e BRIGGS, 1969; OKAMOTO *et al.*, 1980). HASHIMOTO *et al.* (1983) demonstraram graus diferentes de atresia do colédoco em fetos de ovelhas, sugerindo que a uma desvascularização mais severa corresponderia um grau mais intenso de infarto do ducto biliar extra-hepático. Na opinião de OKAMOTO (1980), *embora a real etiologia da AB não seja a isquemia, a rede vascular do ducto biliar extra-hepático pode influenciar o tipo de atresia da espécie humana*. Segundo APPLEBY (1959), a bile apenas determinaria necrose de ductos biliares extra-hepáticos previamente isquêmicos. KLIPPEL, em 1972, sugeriu a possibilidade de a AB estar vinculada às modificações circulatórias do fígado e das vias biliares extra-hepáticas que ocorrem após o nascimento. Segundo esse autor, devido ao desvio da corrente sanguínea pelo ducto venoso permeável, haveria diminuição significativa de sangue arterial da árvore biliar extra-hepática, determinando, em indivíduos vulneráveis, necrose segmentar dos ductos.

Anomalias da vasculatura podem ocorrer em 25% dos casos de AB, relacionadas à associação dessa condição com heterotaxia e isomerismo esquerdo. Elas podem incluir ausência do segmento hepático da veia cava inferior com continuação da ázigos, veia porta pré-duodenal, *situs inversus* abdominal ou *situs ambiguus* com arborização anormal das artérias hepáticas e veias porta, drenagem separada das veias hepáticas para o átrio direito, tronco arterial comum de artérias celiaca e mesentérica superior e anatomia anômala da veia cava superior. A angiografia geralmente demonstra vascularização anormal na região do *porta hepatis* (BURROWS, 1996). Alterações histopatológicas dos ramos arteriais hepáticos têm sido observadas em pacientes com AB. STOWENS (1959, 1963) descreveu a ocorrência de hiperplasia e hipertrofia em ramos da artéria hepática nos espaços-porta em pacientes com AB. Hipertrofia desses ramos foi também observada por BROUGH e BERNSTEIN (1969). HO *et al.* (1993) avaliaram as alterações da artéria hepática em pacientes com AB por ultra-sonografia, e de seus ramos por histopatologia. Observaram dilatação da artéria hepática e de seus

grandes ramos, número excessivo dos ramos arteriais nos espaços-porta e na região da árvore biliar extra-hepática, com a ocorrência de dilatação luminal e espessamento de parede vascular. KOBAYASHI *et al.* (1999) estudaram os níveis séricos da *interferon inducible protein-10* em pacientes com AB, divididos em grupos de acordo com a evolução pós-portoenterostomia. A *interferon inducible protein-10* é uma quimiocina, induzida pelo interferon gama em monócitos, fibroblastos e células endoteliais, que parece estar envolvida na resposta imunológica como quimioatratador para monócitos e células T ativadas. Seus níveis séricos relacionam-se positivamente com o grau de atividade necroinflamatória hepática de pacientes com hepatite crônica, sendo expressada na hibridização *in situ* em torno de áreas de necrose (NARUMI *et al.*, 1997). Pode ser produzida nas células da musculatura lisa vascular e atuar na proliferação e migração das mesmas. A *interferon inducible protein-10* produzida pela musculatura lisa vascular pode servir como mediadora parácrina, amplificando o recrutamento de monócitos nas lesões vasculares e, ainda, ser produzida por monócitos, endoteliócitos e fibroblastos nessas lesões, auxiliando a quimiotaxia das células musculares lisas e leucócitos (WANG *et al.*, 1996). No estudo de pacientes com AB pós-enteroanastomose, KOBAYASHI *et al.* (1999) observaram relação direta dos níveis séricos de *interferon inducible protein-10* e pior evolução pós-cirúrgica. No grupo de pior prognóstico foram encontrados, em avaliação qualitativa, fibrose porta severa com extensão em septos interlobulares, infiltrados portal e lobular por monócitos, além de hiperplasia muscular da túnica média dos ramos da artéria hepática e edema no endotélio da túnica íntima. Os autores sugeriram que as alterações hiperplásticas e hipertróficas dos ramos arteriais nos espaços-porta de pacientes com AB poderiam ser causadas pela produção de *interferon inducible protein-10* secundária à expansão fibrogênica.

Artérias e ductos biliares parecem interagir de forma complexa. Por um lado, deficiência de fluxo arterial desencadeia um padrão histológico de colestase progressiva (ZHAO *et al.*, 1993 e 1995), enquanto a ligadura do ducto biliar comum produz proliferação de um plexo peribiliar para os ductos neoformados (NAKANO *et al.*, 1995).

1.6 - Atresia Biliar e Malformação da Placa Ductal

A AB parece não corresponder à agenesia dos ductos biliares extra-hepáticos, mas sim à destruição necroinflamatória dos condutos biliares previamente formados (DESMET, 1992) num processo de “colangite destrutiva” que afeta tanto os segmentos extra-hepáticos

dos ductos biliares quanto os intra-hepáticos. DESMET (1992) dividiu a AB, do ponto de vista anatomopatológico, nas formas “clássica” e “precoce grave”. No primeiro grupo, a colangiopatia destrutiva atinge ductos biliares com forma tubular normal. Porém, em 20% a 25% dos casos, os ductos biliares interlobulares apresentam-se em sua forma embrionária, assumindo a feição de placas cilíndricas ou de seus segmentos, ou seja, de placa ductal. Nestes casos, o processo patogênico teria iniciado precocemente no desenvolvimento biliar, havendo, do ponto de vista anatomopatológico, um número variável de ductos interlobulares em estágio de placa ductal, fibrose hepática avançada nas primeiras semanas de vida e ausência de proliferação de células gigantocelulares e de hematopoiese extramedular. As placas ductais e seus remanescentes apresentam sinais de atrofia progressiva e desaparecimento. Eventualmente, encontram-se anéis concêntricos de duas ou três placas ductais, interpretados por aquele autor como um “padrão fetal de reação ductular”. Nos casos com MPD, os ramos venosos apresentam-se hipoplásticos, em número excessivo, mantendo-se exageradamente agregados, como “ramos de salgueiro”, o que determina a fusão de espaços-porta vizinhos. Esse padrão vascular venoso alterado, segundo DESMET (1992), explicaria a hipertensão porta precoce que ocorre na AB.

TAN *et al.* (1994 I) demonstraram, em embriões humanos, que a AB não decorre de um defeito de recanalização do ducto biliar comum, já que inexistente uma “fase sólida” no desenvolvimento dessa estrutura e o ducto biliar extra-hepático mantém continuidade luminal com a árvore biliar intra-hepática durante toda a gestação. Sugeriram, porém, que o sistema biliar no *porta hepatis* apresenta um estágio vulnerável entre 11 e 13 semanas gestacionais. Falhas no processo de remodelagem da placa ductal a partir de distúrbios no mecanismo de seleção/deleção e na formação da camada de tecido conjuntivo em torno dos ductos biliares produziriam estruturas incapazes de se manter íntegras com o início do fluxo de bile. A bile extravasada no tecido periductal desencadearia reação inflamatória e fibrogênese, levando à obliteração secundária do sistema biliar extra-hepático. A proliferação de estruturas biliares na região do *porta hepatis* nesse período gestacional ocorreria por mecanismo compensatório à obstrução. A abordagem fisiopatogênica da AB proposta por TAN *et al.* (1994 I) e VIJAYAN e TAN (2000) difere daquela sugerida por DESMET (1992 I) ao incluir todos os casos de AB dentro de uma mesma explicação causal. DESMET (1992 II) observa que apenas cerca de 1/4 dos casos de AB podem ser relacionados com MPD. Outros mecanismos agiriam, durante a vida fetal ou extra-uterina, para causar a forma “clássica”, na qual os achados histopatológicos são distintos.

2 - MODELO TEÓRICO

2 - MODELO TEÓRICO

A compreensão sobre a etiopatogenia da AB, ainda obscura, pode constituir um passo importante no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. A AB tem sido associada a diversas condições que podem ser divididas em: 1) fatores genéticos, 2) fatores ambientais e 3) causas primárias não bem determinadas. Postula-se a existência de duas modalidades de aquisição da AB: em uma os fatores determinantes agiram durante a vida intra-uterina (forma congênita) e, na outra, durante o período perinatal (forma adquirida). Assim, 12% a 37% dos casos apresentam anomalias congênitas extra-hepáticas associadas. O antígeno HLA-B12 é mais comumente expresso nos casos sem anomalias congênitas extra-hepáticas (SILVEIRA *et al.*, 1993). Esses dados substanciam a hipótese de haver heterogeneidade etiopatogênica entre as formas congênita e adquirida de AB. Um agente agressor externo, infeccioso ou não, poderia atuar desde os primórdios da organogênese como indutor de anormalidades até as fases mais tardias, quando produziria disrupção em estruturas biliares e/ou vasculares que foram normais no período de morfogênese prévio. O estudo da embriologia dos ductos biliares pelo método imunoistoquímico tem sido útil ao demonstrar que num grupo de pacientes com AB ocorre, à maneira das doenças císticas hepáticas e renais (JORGENSEN, 1977; D'AGATA *et al.*, 1994), malformação da placa ductal (DESMET, 1992). A existência de MPD parece indicar que o agente patogênico atua sobre o ducto biliar em sua forma imatura, interrompendo-lhe o desenvolvimento. Pelo menos 25% dos casos de AB mostram MPD (DESMET, 1992). Serão eles os mesmos que apresentam anomalias congênitas extra-hepáticas associadas? Segundo um grupo de autores, contudo, esse tipo de malformação seria detectável na totalidade dos casos de AB (TAN *et al.*, 1994 I, II e III). Tal controvérsia necessita ser elucidada a partir da avaliação da prevalência de MPD em diferentes amostras.

Por outro lado, as alterações dos ramos da artéria hepática em pacientes com AB, vinculadas à expressão da *interferon inducible protein-10*, podem relacionar-se a processo imunológico, incluindo a resposta a uma agressão viral. Será correta a afirmativa de KOBAYASHI *et al.* (1999) de que as alterações vasculares são secundárias à expansão fibro-

gênica, já que os autores não realizaram avaliação quantitativa nem das alterações vasculares nem da fibrose? É discutível, com base nos estudos citados, se as alterações estariam presentes em todos os casos de AB ou apenas naqueles com pior evolução pós-cirurgia de Kasai. Essas alterações atingem igualmente todo o sistema arterial hepático, ou restringem-se a vasos de certo calibre? Não foi avaliada sua progressão ao longo do período que se segue à portoenterostomia, tal como ocorre com a “muscularização” dos ramos venosos hepáticos (NIO *et al.*, 1986). No caso de serem progressivas, não estariam elas relacionadas ao desaparecimento dos ductos biliares interlobulares que ocorre na AB com o passar do tempo, já que são nutridos por sangue arterial? Sendo fenômeno precoce, essas alterações relacionam-se à MPD descrita nos casos de AB? Outro ponto ainda não avaliado é a relação dessas alterações vasculares arteriais com as formas congênita e adquirida da doença. E ainda, tais alterações são características da AB ou ocorrem em outras hepatopatias associadas à hipertensão porta, nas quais desenvolve-se proliferação do plexo vascular peribiliar?

A primeira hipótese deste estudo é que há maior frequência de MPD nos pacientes com AB que apresentam anomalias congênitas extra-hepáticas associadas. Outra hipótese é que ocorrem alterações vasculares arteriais na AB mensuráveis por método morfométrico e que tais alterações progridem ao longo do tempo, influenciando o processo de desaparecimento dos ductos biliares interlobulares. Uma terceira hipótese é a eventual arteriopatia constituiu-se em evento primário na gênese da AB e não secundário à expansão fibrogênica.

3 - JUSTIFICATIVA

3 - JUSTIFICATIVA

Considerando que: 1) a AB tem sua etiopatogenia ainda obscura; 2) é postulada a existência de pelo menos duas formas de aquisição da AB (congenita e adquirida); 3) a AB associa-se em, 25% dos casos, à MPD, 3) há dados conflitantes quanto à frequência de MPD nos casos de AB e 4) nenhum estudo até o momento avaliou por análise computadorizada de imagens as prováveis alterações vasculares dos ramos da artéria hepática nos espaços-porta em pacientes com AB, nem avaliou a progressão dessa eventual arteriopatía, julgou-se oportuno avaliar a presença de MPD e de alterações vasculares arteriais hepáticas em pacientes com AB.

4 - OBJETIVOS

4 - OBJETIVOS

4.1 - Objetivo Geral

Avaliar a presença de malformação de placa ductal em pacientes com atresia biliar e as características de artérias e arteríolas em pacientes com e sem atresia biliar.

4.2 - Objetivos Específicos

- 1) Comparar a presença de malformação de placa ductal em pacientes com atresia biliar entre os grupos com e sem anomalias congênitas extra-hepáticas associadas.
- 2) Comparar a presença de alterações vasculares arteriais em pacientes com atresia biliar entre os grupos com e sem anomalias congênitas extra-hepáticas associadas.
- 3) Identificar a presença de alterações vasculares arteriais nos espaços-porta de pacientes com atresia biliar.
- 4) Avaliar a eventual progressão das alterações vasculares arteriais nos casos de AB desde a cirurgia de Kasai até o transplante hepático.
- 5) Comparar as alterações vasculares arteriais de crianças com atresia biliar submetidos a transplante hepático com as de pacientes transplantados por outras causas.
- 6) Avaliar a relação da densidade superficial de colágeno com os demais achados histológicos.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 - Amostra

Este estudo avaliou 47 pacientes com AB, de ambos os sexos, submetidos ao protocolo de investigação de colestase neonatal no Setor de Gastroenterologia Pediátrica do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre 1987 e 1997. Todos foram acompanhados desde a internação hospitalar até sua alta pela mesma equipe. Parte da amostra foi, posteriormente, atendida em ambulatório. O diagnóstico foi firmado através de colangiografia transoperatória durante a laparotomia exploradora, associada à cirurgia de Kasai. Para cada caso de AB foi preenchido o protocolo clínico (Anexo I).

O delineamento do estudo foi de corte transversal, constando de uma avaliação retrospectiva e de outra prospectiva do material de biópsia hepática em cunha, fixado com formalina, incluído em parafina e obtido durante o procedimento cirúrgico, segundo o protocolo histológico (Anexo II). O material de biópsia foi fixado e processado no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. No estudo retrospectivo incluíram-se pacientes que já haviam sido submetidos à biópsia. No estudo prospectivo foram avaliadas amostras de tecido com as mesmas características, segundo o mesmo protocolo (Anexo II), de pacientes selecionados segundo os mesmos parâmetros e que foram prospectivamente atendidos a partir do início do trabalho.

Quanto à pesquisa de anomalias congênitas extra-hepáticas, nos pacientes em estudo retrospectivo foram coletadas informações nos prontuários, já que essa pesquisa é rotineiramente realizada na investigação diagnóstica da colestase neonatal. Avaliaram-se dados do exame físico e radiológicos, incluindo radiografia de tórax, ecografia abdominal e de sistemas específicos, além da descrição de achados clínicos, cirúrgicos e de autópsia quando possível. No estudo prospectivo houve a pesquisa de anomalias congênitas extra-hepáticas em cada paciente investigado, segundo o mesmo protocolo. Foram levadas em consideração apenas anormalidades congênitas maiores, ou seja, aquelas que afetam a viabilidade ou a fertilidade de seus portadores (SILVEIRA, 1988).

Foram incluídos como controles fetos e lactentes sem hepatopatia e portadores de colestase intra-hepática, além de pacientes transplantados por causas distintas de AB. Quanto à avaliação histológica, a pesquisa constou de três etapas, cada qual com distintos grupos de controles.

1) **Primeira etapa**: constou de duas avaliações histológicas: a) das estruturas biliares, incluindo a presença de MPD, de distribuição de proliferação ductular e de DBM e b) das estruturas arteriais, por método morfométrico. Nessa etapa, utilizaram-se controles fetos e lactentes sem hepatopatia e casos de colestase intra-hepática, com idade semelhante à dos casos de AB, que foram submetidos à biópsia em cunha.

2) **Segunda etapa**: constou apenas da avaliação das estruturas vasculares nos pacientes com AB que foram submetidos a transplante hepático, sendo seus dados, por ocasião do transplante, comparados com os obtidos no momento da portoenterostomia.

3) **Terceira etapa**: constou da comparação dos dados destes últimos casos (pacientes com AB transplantados) com os de um grupo de pacientes, com idade semelhante, que se submeteram ao transplante hepático por outras causas que não AB.

O material histológico de fetos e lactentes sem hepatopatia foi obtido por autópsia, e o dos pacientes transplantados foi oriundo do fígado retirado por ocasião do transplante hepático. Para cada paciente, com colestase de causa intra-hepática e sem hepatopatia, foi preenchido um protocolo (Anexos I e IV, respectivamente). Para os transplantados preencheu-se protocolo clínico específico (Anexo V).

5.2 - Variáveis em Estudo

As variáveis consideradas no estudo compreenderam:

- Presença de anomalias congênitas extra-hepáticas associadas a AB (variável classificatória)
- Presença da MPD
- Estruturas biliares dos espaços-porta
- Medidas dos elementos estruturais dos ramos da artéria hepática
- Densidade de colágeno
- Prognóstico

- **Presença de anomalias congênitas extra-hepáticas associadas à AB** - constatou do achado de anomalias maiores cardiovasculares, digestivas, esplênicas, genitourinárias, musculoesqueléticas e oftalmológicas caracterizadas durante a investigação dos pacientes com AB, segundo a descrição de SILVEIRA *et al.* (1991). As AEH foram divididas em três grupos, a partir do estudo de CARMI *et al.* (1993): 1) anomalia de lateralidade completa, no qual se encontraram alterações da seqüência de lateralidade, com ou sem polisplenia; 2) anomalia de lateralidade incompleta, em que houve má-rotação intestinal isolada, mesmo na ausência de veia porta pré-duodenal e 3) “não-sindrômico”, que constou de casos com AEH sem um padrão evidente relacionado à anomalia da seqüência de lateralidade.

- **Presença de MPD** - a MPD foi caracterizada pela presença de estruturas biliares marcadas com anticorpo anticitoqueratina 19 ou CAM 5.2, com morfologia irregular, dilatada, formando anel circundante a tecido mesenquimatoso com ou sem ramo de veia porta no centro (DESMET, 1992).

- **Estruturas biliares dos espaços-porta:**

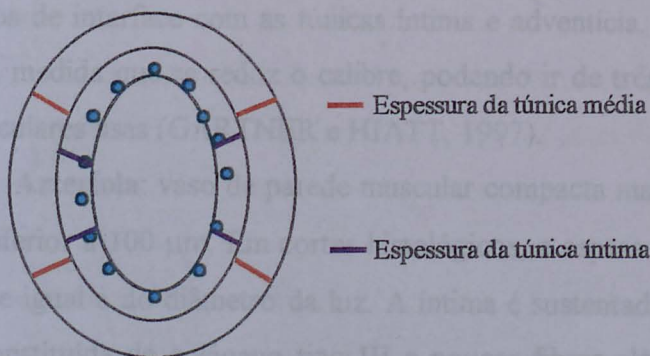
- *Ductos biliares maduros* - estruturas em forma tubular, circulares em corte transversal, ou alongadas em corte longitudinal, com morfologia regular, marcadas por citoqueratina 19 ou com CAM 5.2, localizadas no interior dos espaços-porta. Considerou-se focal sua presença em até apenas três espaços-porta.

- *Proliferação ductular* - considerou-se proliferação ductular em espaço-porta a presença de ductos biliares em número aumentado, localizados ao longo da placa limitante ou na intimidade do mesênquima. Considerou-se focal sua presença em, no máximo, três espaços-porta.

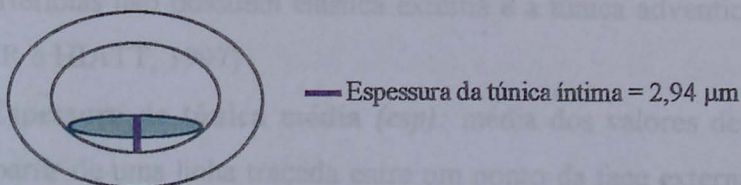
- **Medidas dos elementos estruturais dos ramos da artéria hepática** - foram avaliadas artérias musculares e arteríolas presentes no tecido hepático quanto à espessura das túnicas média e íntima e quanto ao diâmetro luminal evitando-se a utilização dos vasos subcapsulares. A figura 5 representa esquematicamente o método de mensuração morfométrica utilizado no presente estudo.

Mensuração dos elementos estruturais vasculares

Espessura das túnica média e íntima



Espessura da túnica íntima com célula única



Medidas do diâmetro luminal

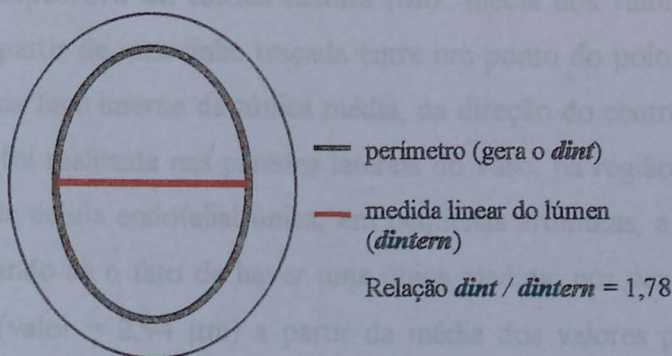


Fig. 5 - Representação esquemática do método de mensuração morfométrica dos elementos vasculares arteriais

- **Artéria muscular**: vaso de parede muscular espessa e compacta marcada por HHF-35, de diâmetro externo igual ou superior a 100 μm . A túnica íntima possui poucas células musculares lisas. A lâmina elástica interna é proeminente e tem uma superfície ondulada à qual o endotélio se molda. Eventualmente, a elástica interna é duplicada. A túnica média apresenta células musculares lisas orientadas, em geral, circularmente, ou longitudinalmente nos pontos de interface com as túnicas íntima e adventícia. O número de camadas celulares diminui à medida que se reduz o calibre, podendo ir de três a quatro até, pelo menos, 40 camadas musculares lisas (GARTNER e HIATT, 1997).

- **Arteriola**: vaso de parede muscular compacta marcada por HHF-35, de diâmetro externo inferior a 100 μm . Em cortes histológicos, a espessura da parede da arteriola é aproximadamente igual à do diâmetro da luz. A íntima é sustentada por uma delgada camada subendotelial, constituída de colágeno tipo III e poucas fibras elásticas embebidas em substância amorfa. A lâmina elástica interna está ausente em arteríolas de menor calibre. Em arteríolas de pequeno calibre a túnica média compõe-se de uma única camada de células musculares lisas. Essas arteríolas não possuem elástica externa e a túnica adventícia é pouco desenvolvida (GARTNER e HIATT, 1997)

- **Espessura de túnica média (*esp*)**: média dos valores de 4 medidas de espessura obtidas a partir de uma linha traçada entre um ponto da face externa da parede da túnica média a outro da face interna na direção do centróide; em cortes longitudinais tal aferição foi realizada nas paredes laterais do vaso, na região de menor diâmetro luminal.

- **Espessura da túnica íntima (*int*)**: média dos valores de 4 medidas de espessura obtidas a partir de uma linha traçada entre um ponto do pólo apical do endoteliócito da íntima a outro na face interna da túnica média, na direção do centróide; em cortes longitudinais tal aferição foi realizada nas paredes laterais do vaso, na região de menor diâmetro luminal. Em casos de célula endotelial única, em pequenas arteríolas, a mesma técnica foi empregada, especificando-se o fato de haver uma única medida; por vezes, utilizou-se um valor padrão calculado (valor = 2,94 μm) a partir da média dos valores previamente obtidos em controles e casos (n = 138).

- **Diâmetro do lúmen (*dint*)**: em vasos de corte transversal, circulares ou elípticos, foi obtido pela mensuração de perímetro (*perim*) mediante técnica morfométrica, segundo a fórmula $perim = (0,98 \times N_e) + (1,406 \times N_o) - (0,091 \times N_e)$, onde N_e é o número de valores Freeman exatos, N_o é o número de valores Freeman ímpares e N_e , o número de ângulos, evitando-se as distorções de medida decorrentes de colapamento e vasoconstrição (WEIBEL,

1979). A partir da mensuração do perímetro calculou-se o diâmetro luminal (*dint*), com base na fórmula da fórmula: $dint = \text{perim}/\pi$. Em vasos de corte longitudinal, o lúmen foi quantificado através de uma linha traçada entre dois pontos da parede interna lateral da túnica média, na região de menor diâmetro luminal, a qual se chamou *dintern*. A relação entre *dint* e *dintern* foi calculada com base nos valores obtidos em 535 vasos em que *dint* e *dintern* foram ambos medidos, gerando o *fator de correção de dintern* (valor = 1,78), de forma a que os valores medidos em cortes longitudinais e transversais, circulares ou elípticos, se equivalessem.

A partir das medidas de *esp*, *int*, *dint* (incluindo *dintern corrigido*), foram geradas relações entre os elementos da estrutura vascular. Elementos da estrutura vascular e suas relações são conceituados a seguir:

ESP: espessura da túnica média

INT: espessura da túnica íntima

DTOT: diâmetro externo do vaso, obtido pelo cálculo $DTOT = (2 \times esp) + dint$
(ou *dintern corrigido*)

REMD: (relação espessura da média/diâmetro externo) x 10

RETD: (relação espessura total/diâmetro externo) x 10, onde espessura total =
(*esp* + *int*)

RID: (relação espessura da íntima/diâmetro externo) x 10

RDIDE: (relação diâmetro luminal/diâmetro externo) x 10

RDIEM: (relação diâmetro luminal/espessura da média) x 10

RDIET: (relação diâmetro luminal/espessura total) x 10

RINTESP: (relação espessura da íntima/espessura da média) x 10

Outra variável, relacionada aos ramos da artéria hepática, foi o **número de vasos (N)** avaliados em cada caso.

- **Densidade de colágeno** - conceituada como a média dos valores da porcentagem de colágeno, quantificados por método morfométrico, presentes em 10 imagens obtidas do material histológico corado com picrossírius.

- **Prognóstico** - caracterizado a partir da evolução dos casos de AB que mantiveram acompanhamento ambulatorial após a realização da portoenterostomia. O critério de avaliação prognóstica foi baseado na ocorrência ou não de óbito e na realização ou não de transplante hepático no seguimento destes casos. Dois grupos foram então criados: 1) vivos e não transplantados e 2) mortos ou transplantados. Como a biópsia hepática se realizou durante o procedimento cirúrgico, os termos que a definem (portoenterostomia, portoenteroanastomose, cirurgia de Kasai) foram utilizados no decorrer do texto como equivalentes à biópsia hepática.

5.3 - Método Computacional da Análise de Imagens

Duas avaliações foram realizadas: 1) quantificação morfométrica de elementos estruturais dos ramos artéria hepática dos espaços-porta e 2) quantificação da densidade superficial de colágeno.

5.3.1 - Captação de Imagens

Para ambas as atividades, 10 imagens foram captadas aleatoriamente de cada lâmina histológica marcada com HHF-35 ou corada com picrossírius e gravadas em dispositivo físico, no formato TIFF (*tag image format*), para posterior mensuração. Para a avaliação dos ramos da artéria hepática, procurou-se utilizar apenas vasos inseridos em espaços-porta, pontes fibrosas e, eventualmente, parênquima, evitando-se os da região subcapsular. O aumento das imagens no microscópio para a avaliação de artéria hepática foi de 200x, e para a avaliação de densidade superficial de colágeno, de 40x. A voltagem da lâmpada foi mantida estável durante o processo de captura de imagens, permitindo a iluminação homogênea dos campos microscópicos.

5.3.2 - Avaliação Morfométrica

A leitura do material processado por técnica de imunistoquímica foi realizada por método quantitativo com assistência por análise de imagem (VAN DIEST, 1991), realizado em microscópio adequado à técnica proposta por CHALKLEY (1943) e utilizada por FOX *et al.* (1995). Em todos os casos foi aplicado o protocolo morfométrico (Anexo III).

5.3.3 - *Quantificação Morfométrica dos Elementos Estruturais dos Ramos da Artéria Hepática*

Os perfis dos vasos arteriais foram identificados pela parede da túnica média marcada pelo HHF-35, cercada por colágeno, envolvendo a túnica íntima. A túnica adventícia que reveste a superfície externa dos vasos, constituída de fibroblastos, fibras colágenas tipo I e fibras elásticas, não foi identificada pelo método imunoistoquímico e, portanto, não foi considerada nas mensurações realizadas. Na avaliação das estruturas arteriais, tomou-se o cuidado de evitar confundir vasos venosos, espessados ou não, com vasos arteriais. As veias hepáticas terminais caracterizam-se pela presença de estrutura vascular com lúmen endotelial, cercada por lâmina delicada e descontínua de tecido conetivo, com lúmen em continuidade com múltiplos sinusóides, podendo apresentar sangue em sua luz. Suas fibras musculares arranjam-se de forma dispersa, com a ocorrência de abundantes fibras colágenas e elásticas entre elas (NIO *et al.*, 1986), o que as diferencia morfológicamente dos ramos arteriais, cujas paredes constituem-se de uma camada compacta de células musculares. As pequenas vênulas apresentam parede muscular menos espessa que a das arteríolas. Por outro lado, em cortes transversais, as artérias têm forma redonda e não apresentam células sanguíneas em sua luz (GARTNER e HIATT, 1999). Vasos difíceis de serem caracterizados como arteríolas ou vênulas foram descartados. Vasos em corte oblíquo e longitudinal com múltiplas irregularidades na parede não foram utilizados no estudo. A túnica íntima, visualizável pela contracoloração com hematoxilina, apresentou-se como camada de células endoteliais, eventualmente circundando a totalidade do interior dos ramos arteriais; em outras artérias, as células endoteliais agruparam-se apenas em certas áreas da parede interna, ou ainda, em pequenas arteríolas, foram visualizados apenas núcleos de endoteliócitos isolados, aderidos a essa parede. Entre as células das túnicas íntima e média, em diversos casos, foi possível identificar a lâmina elástica interna, com leve expressão do marcador HHF-35. Quanto à mensuração da túnica íntima, em artérias e arteríolas em corte longitudinal, evitou-se medir as células endoteliais das extremidades, optando-se pelas células endoteliais das áreas laterais do vaso, visando evitar distorções originadas do corte.

A mensuração morfométrica foi realizada pelo *software Scion-Image (Scion Corporation)*, em cada vaso arterial de cada imagem previamente captada; utilizaram-se as imagens em cores para melhor distinguir as estruturas a serem avaliadas. Os valores obtidos em cada medida foram registrados, calculando-se, a seguir, as médias de cada vaso. Para a

mensuração do perímetro utilizou-se imagem em preto e branco, visando destacar a túnica média em relação ao fundo. A imagem apresentada no monitor, após calibragem, foi submetida a métodos de edição e correção, para corrigir defeitos decorrentes de erros artefatuais da preparação histológica e eliminar as células endoteliais, utilizando-se apenas a face interna da parede da túnica média para a mensuração.

5.3.4 - Quantificação da Densidade de Colágeno

Foi realizada segundo a técnica utilizada por CHEVALLIER *et al.* (1994), a partir do material histológico corado com picrossírius. O método provê a quantificação automática da área de fibrose presente em um campo de superfície (MASSEROLI *et al.*, 2000). Para a aquisição de cada uma das 10 imagens utilizou-se filtro de interferência verde de 550 nm no raio incidente, visando incrementar o contraste e possibilitar uma determinação mais acurada dos níveis de cor cinza. A voltagem da lâmpada halogenada do microscópio foi mantida em 7,0 volts ($\pm 0,1\%$) em todas as imagens, graças à utilização de estabilização de voltagem e monitorização por multímetro digital (*Digital Multimeter*, DT 830B, CE). A densidade superficial de colágeno foi realizada automaticamente em um sistema de análise computadorizada de imagens. Essa estação incluiu um fotomicroscópio (Olympus BX60) com captadores de posição, uma câmera CCD (Sony) com adaptador de câmera CNA-D2 (Sony), um computador Intel Pentium MMX 166 MHz, com monitor em cores e *mouse*. A análise de imagem foi feita com o *software Image-Pro® Plus*, versão 4.1, da *Media Cybernetics*. A densidade superficial de colágeno foi medida com magnificação de 40x, em imagens captadas aleatoriamente a partir do material histológico corado com picrossírius. Produziu-se um macro no programa *Image-Pro® Plus*, uniformizando-se o procedimento. Os padrões de sensibilidade e índice de cor da ferramenta de contagem do programa foram mantidos homogêneos em todos os casos. A expressão da porcentagem de área de colágeno correspondeu à razão entre superfície de colágeno e campo de superfície analisado em cada imagem.

5.4 - Preparação Histológica e Imunoistoquímica

De cada amostra de tecido de casos com AB obtidos por ocasião da portoenterostomia e dos controles fetos e lactentes, foram utilizados cinco secções de 5 μm de espessura, três das quais para reação com os seguintes anticorpos primários: anticorpo monoclonal CAM 5.2 (Becton-Dickinson), anticorpo monoclonal anti-citoqueratina 19 humana (DAKO), ambas para o estudo das estruturas biliares e anticorpo monoclonal de camundongo específico para actina muscular humana, clone HHF-35 (DAKO), o qual marcou a musculatura lisa dos ramos vasculares, visando facilitar o estudo morfométrico nas artérias. O anticorpo secundário utilizado foi anticorpo anticamundongo, biotilado. Além da marcação com os 3 anticorpos primários, duas outras colorações foram empregadas, hematoxilina-eosina e picrossírius, esta última para identificação do colágeno. Nos controles transplantados, apenas marcação com HHF-35 foi realizada, além da coloração por hematoxilina-eosina. Na técnica imunoistoquímica, cada secção foi submetida ao seguinte protocolo de reações:

A) Primeira desparafinização (a quente) - cortes em lâminas de cola em estufa a 50° C por 12 a 24 horas.

B) Segunda desparafinização (a frio) - com a seguinte ordem: xilol, 10 minutos; xilol, 5 minutos; xilol, 5 minutos.

C) Hidratação dos cortes: em álcool absoluto (4x).

Lavagens em água corrente e destilada.

D) **No caso de CAM 5.2:** pré-tratamento por digestão enzimática com tripsina a 0,1% em CaCl 0,1% por 30 minutos a 37° C em câmara úmida. Nos casos da citoqueratina 19 e HHF-35: microondas com tampão citrato pH 6,0. O manejo do microondas seguiu a rotina: 8 minutos ligado, 2 minutos em descanso, 8 minutos ligado, 2 minutos de descanso, 8 minutos ligado, 20 minutos de descanso no microondas, além de 15 minutos de descanso em ar ambiente.

Em todos seguiram-se lavagens em água corrente e destilada e em tampão PBS (*phosphate buffered saline*) por 5 minutos.

E) Bloqueio da peroxidase endógena: com água oxigenada a 0,5% em água destilada, duas vezes por 20 minutos.

Lavagem com água corrente e destilada seguida de nova exposição ao PBS por 5 minutos.

F) Exposição a leite desnatado a 5% em PBS.

Lavagem com águas corrente e destilada; após, com PBS por 5 minutos.

G) Incubação com anticorpo primário, seguida de repouso por 1 a 2 horas em câmara úmida e escura.

Lavagem de cada lâmina com PBS, isoladamente.

Seguiram-se três lavagens com PBS, com 5 minutos de duração.

H) Incubação com anticorpo secundário em câmara úmida por 30 minutos a 37°

C. Após, foram realizadas lavagens (3x) em tampão PBS.

I) Incubação com complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC): Incubação com *kit large volume LSAB* ® +, *peroxidase*, em câmara úmida por 30 minutos a 37° C.

J) Revelação com substrato cromogênico *Liquid DAB large volume substrate-chromogen system* (DAKO), 20 microlitros/1 ml de diluente. Quando surgiu leve coloração marrom, colocou-se em água destilada. Após, imergiu-se em PBS por 5 minutos.

A seguir, foram realizadas lavagens em água corrente e destilada.

K) Contracoloração (leve) em hematoxilina (de Harrys ou Mayer). Lavagens em água corrente e destilada.

L) Desidratação dos cortes consecutivamente em álcool a 50%, 80%, 95%, álcool absoluto (3 vezes), xilol (3 vezes) e montagem de Entellan.

As diluições dos marcadores primários foram: CAM 5.2 - 1:10; citoqueratina 19 - 1:200; HHF 35 - 1:400. Foram feitos controles positivos e negativos de cada marcador toda vez que se produziu material imunoistoquímico. Os controles positivos foram: CAM 5.2- fígado; citoqueratina 19 - pele; HHF-35- controle interno. Os controles negativos foram efetuados com a mesma técnica imunoistoquímica, porém sem o emprego de anticorpo primário. Apenas lâminas com boa qualidade de fixação e marcação imunoistoquímica foram empregadas no estudo.

5.5 - Estudo Histológico das Estruturas dos Espaços-Porta

Constou da avaliação das variáveis do protocolo histológico (Anexo II) no material de biópsia e autópsia marcado com citoqueratina 19 e CAM 5.2, visando a identificação da MPD e de outras estruturas biliares em espaços-porta nos pacientes com AB, fetos e lactentes sem hepatopatia e pacientes com colestase intra-hepática. Foi realizado por dois patolo-

gistas e pelo autor do presente estudo, “cegos” quanto ao diagnóstico clínico e à presença ou não de AEH nos pacientes.

5.6 - Análise Estatística

Inicialmente, todos os dados foram descritos como média e desvio padrão nas variáveis quantitativas, e frequências e percentual nas variáveis qualitativas. A avaliação das diferenças entre variáveis quantitativas foi realizada a partir do teste t de Student e, nas situações que envolveram três ou mais grupos, utilizou-se a análise de variância de um critério de classificação (*ANOVA one-way*). Para a localização de diferenças pós-*ANOVA* foi adotado o procedimento de comparações múltiplas de Duncan. Nas situações de assimetria foram utilizados os testes não-paramétricos U de Mann-Whitney e *ANOVA* de Kruskal-Wallis. A localização de diferenças a partir da *ANOVA* de Kruskal-Wallis foi realizada pelo procedimento de comparações múltiplas proposto por Dunn. Nos casos de variáveis qualitativas, foi utilizado o teste Qui-quadrado e, quando necessário, o teste exato de Fisher (ALTMAN, 1991; ZAR, 1996). Na avaliação de associações entre variáveis ordinais e contínuas empregou-se o coeficiente de correlação não-paramétrico de Spearman. Adicionalmente, para avaliar a magnitude das diferenças encontradas entre as médias das variáveis quantitativas, calculou-se a estatística tamanho do efeito padronizado (TEP), o *effect size* proposto por COHEN (1969). Por esse método obteve-se a dimensão do efeito da diferença entre médias, o que é apropriado para estudos nos quais diferenças ou alterações das médias são de suma importância (GOODMAN, 1999). O TEP foi calculado pela fórmula:

$$TEP = \frac{|\overline{X_A} - \overline{X_B}|}{dp_o}$$

onde X_A e X_B foram as médias comparadas e

$$dp_o = \sqrt{\frac{(dp_a^2 \times gl_a) + (dp_b^2 \times gl_b)}{n_a + n_b - 2}}$$

A interpretação dos valores obtidos para a estatística TEP seguiu a classificação proposta por HOPKINS (1997), descrita no quadro 4:

Quadro 4 - Interpretação da estatística TEP segundo HOPKINS (1997)

Magnitude de associação	TEP
Trivial	0,001 —
Pequena	0,2 —
Moderada	0,6 —
Grande	1,2 —
Muito grande	2,0 —
Quase perfeita	4,0 —
Perfeita	∞

O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$, sendo considerados de significância limítrofe os testes estatísticos que atingiram valores de $0,05 < P < 0,1$.

Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas Excel versão 97 e SPSS versão 10.0.

5.7 - Considerações Éticas

Este estudo utilizou material histopatológico obtido durante a investigação de pacientes com colestase neonatal rotineiramente realizada no Setor de Gastroenterologia Pediátrica do Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Não redundou em aumento da permanência hospitalar dos pacientes, não teve implicações terapêuticas, não produziu aumento de desconforto aos pacientes, nem os colocou em risco de maior morbimortalidade. Portanto, não foi necessária a solicitação aos pais ou responsáveis de um termo de consentimento informado. Contudo, como foram utilizados os prontuários dos pacientes, o autor preencheu o Termo de Compromisso para Utilização de Dados.

6 - RESULTADOS

6 - RESULTADOS

6.1 - Caracterização da Amostra

6.1.1 – Pacientes com Atresia Biliar

Foram avaliados 47 portadores de AB, com idade, por ocasião da portoenterostomia, variando entre 24 e 251 dias de vida, com média de $90,9 \pm 44,8$ dias. As características gerais desse grupo de pacientes se encontram indicadas na tabela 1.

Tabela 1 - Características dos grupos de pacientes com atresia biliar quanto a idade, peso de nascimento, peso e comprimento por ocasião do estudo

Característica	Atresia biliar		Diferença	IC 95%	TEP	P
	Sem AEH (n = 38)	Com AEH (n = 9)				
Idade (dias de vida)	$88,1 \pm 47,4$	$102,6 \pm 31,1$	- 14,5	- 47,1 a 19,1	0,32	0,390
Peso de nascimento (quilogramas)*	$3,1 \pm 0,6$	$3,0 \pm 0,5$	0,1	- 0,4 a 0,5	0,17	0,761
Peso data do estudo (quilogramas)	$4,7 \pm 1,2$	$4,6 \pm 1,3$	0,1	- 0,8 a 1,1	0,08	0,801
Comprimento (centímetros)	$56,2 \pm 5,3$	$58,1 \pm 5,5$	- 1,9	- 6,5 a 2,5	0,36	0,382

AEH - anomalia congênita extra-hepática associada à atresia biliar. TEP – tamanho do efeito padronizado.

* 35 casos sem anomalia congênita extra-hepática foram comparados. Método estatístico: teste t de Student.

Entre os pacientes com AB, 38 não apresentaram AEHs, enquanto em 9 casos (19%) essas anomalias foram encontradas. Não houve diferença entre os dois grupos, do ponto de vista estatístico, quanto à idade por ocasião da portoenterostomia. O mesmo ocorreu em relação às outras características: o peso de nascimento entre os dois grupos foi semelhante, assim como o peso e o comprimento dos pacientes de ambos os grupos por ocasião da por-

toenteroanastomose. A tabela 2 apresenta a classificação por faixas etárias na data da portoenterostomia dos grupos de AB.

Tabela 2 - Classificação por faixas etárias por ocasião da portoenterostomia dos grupos de pacientes com atresia biliar

Faixa etária	Atresia biliar		Total
	Sem AEH	Com AEH	
≤ 60 dias	10	1	11 (23)
61 a 90 dias	15	1	16 (34)
> 90 dias	13	7	20 (43)

Porcentagem entre parênteses. AEH - anomalia congênita extra-hepática associada à atresia biliar.

A portoenterostomia foi realizada antes de 60 dias de vida em 23% dos pacientes; nos restantes 77%, após essa idade, sendo que em 34% deles foi efetuada entre 61 e 90 dias de vida e em 43%, somente após 90 dias.

A tabela 3 caracteriza os grupos de pacientes com e sem AEH quanto à idade gestacional e ao sexo.

Tabela 3 - Características dos grupos de pacientes com atresia biliar quanto à idade gestacional e ao sexo

Idade gestacional	Atresia biliar		P
	Sem AEH (n = 38)	Com AEH (n = 9)	
Idade gestacional*			
Pré-termo	4 (12)	1 (11)	1,000
A termo	30 (88)	8 (89)	
Sexo			
Masculino	17 (45)	5 (56)	0,715
Feminino	21 (55)	4 (44)	

AEH - anomalia congênita extra-hepática associada à atresia biliar. Porcentagem entre parênteses.

* 34 pacientes sem anomalia congênita extra-hepática associada foram comparados.

Método estatístico: teste exato de Fisher.

A maioria (81%) dos casos de AB, com ou sem AEH, nasceu a termo. Não ocorreu pós-datismo na amostra. Em quatro pacientes sem AEH a idade gestacional foi desconhecida.

Entre todos os casos de AB, 25 pacientes (53%) eram do sexo feminino e 22 (47%), do sexo masculino. A distribuição quanto ao sexo foi muito semelhante entre os grupos com e sem AEH. Especificamente, entre os casos com AEH, no grupo de anomalia de lateralidade completa, dois eram do sexo masculino e um, do sexo feminino.

A tabela 4 apresenta as anomalias congênitas encontradas nos pacientes com AB, discriminando os casos da amostra em grupos de anomalias, de acordo com a classificação proposta por CARMÍ *et al.* (1993).

Tabela 4 - Características dos pacientes com atresia biliar e anomalia congênita extra-hepática quanto à classificação de CARMÍ *et al.* (1993)

Paciente	Anomalias congênitas	Porcentagem
Grupo de anomalia de lateralidade completa		33
201	<i>Situs inversus</i> abdominal	
202	Persistência do canal arterial Isomerismo atrial esquerdo Estenose mitral Comunicação interventricular Arco aórtico à esquerda Anomalias em extremidades Veia porta pré-duodenal Fígado mediano	
207	Dextrocardia Múltiplas atresias de delgado	
Grupo "não-sindrômico"		56
203	Fístula arteriovenosa pulmonar Ectasia do sistema coletor renal	
204	Duplicação renal Ectasia de pelve renal	
205	Comunicação interatrial (<i>ostium secundum</i>)	
206	Anomalia da origem da artéria coronária esquerda Displasia renal segmentar Divertículo ureteral	
209	Rins policísticos	
Grupo de anomalia de lateralidade incompleta		11
208	Má-rotação intestinal com válvula ileocecal presa por bandas de Ladd junto ao fígado	
Total		100

Nove pacientes com AB (19% do total de casos com AB) apresentaram anomalias congênitas extra-hepáticas associadas. Em três casos com AEH (33%) ocorreu anomalia de lateralidade completa, sem polisplenia. Em dois deles identificou-se baço acessório. O primeiro caso incluiu-se neste grupo devido à presença de *situs inversus* abdominal. O segundo foi incluído em razão da ocorrência de fígado mediano e veia porta pré-duodenal. O terceiro, por apresentar dextrocardia. A maioria dos casos de AEH (n = 5, ou seja, 56% dos casos com AEH) incluiu-se no grupo denominado não-sindrômico. O terceiro grupo compreendeu um único paciente com má-rotação intestinal como achado isolado.

A tabela 5 apresenta a caracterização das AEHs entre os casos estudados, de acordo com os sistemas orgânicos.

Tabela 5 - Características das anomalias congênitas extra-hepáticas encontradas nos pacientes com atresia biliar de acordo com sistemas orgânicos

Anomalias congênitas	Casos (n = 9)		Anomalias (n = 21)	
	n	%	n	%
Cardiovasculares	5	56	10	48
Persistência do canal arterial			1	10
Isomerismo atrial esquerdo			1	10
Estenose mitral			1	10
Comunicação interventricular			1	10
Arco aórtico à esquerda			1	10
Comunicação interatrial			1	10
Anomalia de origem da artéria coronária esquerda			1	10
Dextrocardia			1	10
Veia porta pré-duodenal			1	10
Fístula artério-venosa pulmonar			1	10
Digestivas	4	44	4	19
<i>Situs inversus</i> abdominal			1	25
Fígado mediano			1	25
Atresia de intestino delgado			1	25
Má-rotação intestinal			1	25
Genitourinárias	4	44	6	28
Ectasia do sistema coletor renal			1	17
Ectasia de pelve renal			1	17
Duplicação renal			1	17
Displasia renal segmentar			1	17
Divertículo ureteral			1	17
Rins policísticos			1	17
Musculoesqueléticas	1	11	1	5
Anomalias em extremidades			1	100

A pesquisa de anomalias congênitas neste estudo não considerou os resultados de autópsia, tendo sido realizada por exames clínico e de imagens, além de avaliação transoperatória. Em 56% dos casos com AEH foram identificadas anomalias no sistema cardiovascular, 44% nos sistemas digestivo e genitourinário, enquanto anomalias musculoesqueléticas ocorreram em apenas um paciente (11%). A maioria das anomalias congênitas envolveu o sistema cardiovascular (48% das anomalias) e, a seguir, o sistema genitourinário (28%) e digestivo (19%). Anomalias musculoesqueléticas somaram 5% das AEHs. Baço acessório foi a única anormalidade esplênica observada.

6.1.2 - Pacientes sem Hepatopatia

Os pacientes sem hepatopatia estão caracterizados no Anexo VI.

A metade deles ($n = 7$) era constituída de fetos, com idade gestacional variando entre 22 e 35 semanas gestacionais, em média $28,86 \pm 5,73$ semanas. A idade da realização da autópsia variou entre 1 e 17 dias, com média de $5,57 \pm 5,97$ dias após o nascimento. O peso por ocasião da autópsia teve média de $1225,71 \pm 424,15$ g, com valor mínimo de 560 g e valor máximo de 2.350 g. Apenas um paciente (paciente 305) teve morte intra-uterina, havendo os demais falecido logo após o nascimento. O óbito intra-uterino teve como causa básica isquemia fetal intra-uterina decorrente de ruptura prematura de membranas por trauma abdominal materno. Cinco outros pacientes morreram em função de doença da membrana hialina secundária à prematuridade. Outro paciente (paciente 307), além da prematuridade e da doença da membrana hialina, apresentou anomalias múltiplas. Dois dos sete fetos (29%) eram portadores de anomalias congênitas maiores. Nenhum dos pacientes deste grupo mostrou alterações histopatológicas hepáticas, segundo a avaliação feita durante a autópsia; em três deles descreveu-se o achado de hematopoiese extramedular. Os sete lactentes sem hepatopatia nasceram a termo. A idade do óbito nestes pacientes variou entre um e 150 dias de vida, com média de $54,59 \pm 59,55$ dias de vida. Dois deles (29%) apresentaram anomalias congênitas maiores. Em quatro pacientes foi identificada congestão sinusoidal hepática entre os achados de autópsia e em 1 caso, focos de eritropoiese extramedular.

6.1.3 - Pacientes com Colestase Intra-Hepática

Os dados dos pacientes com colestase intra-hepática podem ser vistos na tabela geral (Anexo XIV, grupo 6). Apenas três pacientes com colestase intra-hepática puderam ser incluídos no estudo. Nenhum apresentou anomalias congênitas extra-hepáticas associadas. O paciente de número 601 teve pan-hipopituitarismo como causa da colestase neonatal. Os outros dois (pacientes 602 e 603) apresentaram hepatite neonatal idiopática.

A tabela 6 caracteriza os casos de AB, os controles sem hepatopatia e os pacientes com colestase intra-hepática quanto à idade por ocasião do estudo.

Tabela 6 - Características quanto à idade dos pacientes por ocasião do estudo idade segundo os grupos com atresia biliar, lactentes sem hepatopatia e pacientes com colestase intra-hepática

Grupo	Idade (dias de vida)	IC 95%	P
Atresia biliar (n = 47)	90,9 ± 44,8	77,7 a 104,0	0,116
Lactentes sem hepatopatia (n = 7)	54,3 ± 59,6	- 0,8 a 109,4	
Colestase intra-hepática (n = 3)	114,3 ± 77,5	- 78,2 a 306,9	

Método estatístico: ANOVA de Kruskal-Wallis

Como se observa na tabela 6, houve variação quanto à idade avaliada em dias de vida nos três grupos. Ocorreu diferença de magnitude moderada (TEP = 0,78) entre os grupos com AB e lactentes sem hepatopatia, sendo superior a média de idade dos pacientes com AB. Entre os pacientes com AB e com colestase intra-hepática a diferença foi pequena (TEP = 0,50). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos quanto à idade por ocasião do estudo (P = 0,116).

6.1.4 - Pacientes Transplantados com Atresia Biliar e com Outras Hepatopatias

Foram sete os casos de AB submetidos a transplante hepático. Eles estão caracterizados no Anexo VII quanto à idade por ocasião do transplante e doenças associadas ocorridas após a portoenterostomia.

Pacientes sem AEH somaram 57% do total de pacientes com AB transplantados até a realização do presente estudo. Entre os casos com AEH, dois foram operados mais tardiamente (pacientes 206 e 209). A idade por ocasião do transplante hepático foi $59,43 \pm 37,52$ meses entre os casos de AB, com amplitude de 28 a 120 meses. Os pacientes sem AEH foram submetidos ao transplante hepático com idade de $40,75 \pm 10,31$ meses de vida, enquanto os pacientes com AEH submeteram-se ao procedimento com $84,34 \pm 49,36$ meses. Todos os portadores de AB que foram submetidos a transplante tiveram colangite no pós-operatório da cirurgia de Kasai. Dois (29%) apresentaram infecção do trato urinário e outros três (43%), hipertensão arterial sistêmica pós-portoenterostomia. Entre os últimos, dois apresentaram anomalias do sistema genitourinário: ectasia do sistema coletor renal (paciente 203) e rins policísticos (paciente 209). Foi possível obter material histológico do fígado retirado por ocasião do transplante hepático em apenas quatro pacientes pediátricos sem AB, cujas características também são descritas no Anexo VII. Em todos os pacientes transplantados sem AB houve cirrose. A causa da hepatopatia em dois pacientes foi colangite esclerosante primária. O paciente 504, além desta doença, apresentou histiocitose das células de Langerhans e citomegalovirose. Em nenhum dos pacientes deste grupo ocorreu hipertensão arterial sistêmica. Outras doenças causadoras de hepatopatia neste grupo foram deficiência de α -1 antitripsina e hepatite autoimune. A idade por ocasião do transplante hepático no grupo de transplantados sem AB foi $80,25 \pm 40,20$ meses de vida, com amplitude de 36 a 120 meses. Os dois pacientes com colangite esclerosante foram os mais jovens (36 e 57 meses) por ocasião do transplante.

A tabela 7 caracteriza, quanto à idade na data do transplante hepático, os casos de AB transplantados e os pacientes transplantados por outras hepatopatias.

Tabela 7 - Características quanto à idade dos pacientes transplantados segundo os grupos com atresia biliar e com outras hepatopatias

Grupo	Idade (meses)	Diferença	IC 95%	TEP	P
Atresia biliar (n = 7)	59,4 ± 37,5	- 20,8	- 75,3 a 33,7	0,54	0,410
Outras hepatopatias (n = 4)	80,3 ± 40,2				

Método estatístico: teste t de Student.

Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à idade dos pacientes transplantados segundo os grupos com AB e com outras hepatopatias (P = 0,410), e a magnitude de diferença entre as médias dos grupos foi pequena (TEP = 0,54).

6.2 - Evolução dos Pacientes com Atresia Biliar

Os fatores prognósticos envolvidos na evolução da AB considerados neste estudo foram: 1) a idade do paciente por ocasião da portoenterostomia, apresentada como valores numéricos independentes e em classificação por faixa etária e 2) a densidade de colágeno. Como critérios avaliadores de prognóstico selecionaram-se duas variáveis: 1) ocorrência de óbito e 2) realização de transplante hepático. A seguir são apresentadas as tabelas que descrevem o comportamento dos casos quanto a estas variáveis.

Tabela 8 - Evolução pós-operatória dos pacientes com atresia biliar segundo os grupos com e sem anomalias congênicas extra-hepáticas associadas

Característica	Atresia biliar		P
	Sem anomalia extra-hepática (n = 27)	Com anomalia extra-hepática (n = 7)	
Mortos ou transplantados	13 (48)	6 (86)	0.103
Vivos e não transplantados	14 (52)	1 (14)	

Porcentagem entre parênteses.

Método estatístico: teste exato de Fisher.

Entre os casos em que a evolução pôde ser acompanhada no pós-operatório da cirurgia de Kasai ($n = 34$, ou seja, 72% da totalidade dos casos de AB), não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos para $P = 0,05$. Porém apenas 1 caso com AEH mantém-se vivo e não foi transplantado, ao passo que entre os sem AEH a distribuição foi homogênea: cerca da metade dos casos permanece vivo e não foi submetido ao transplante hepático. Este caso com AEH, que se mantém vivo e não foi transplantado, apresentou apenas comunicação interatrial (paciente 205).

A tabela 9 relaciona idade por ocasião da portoenterostomia e prognóstico.

Tabela 9 - Relação entre prognóstico e idade por ocasião da portoenterostomia

Prognóstico	N	Idade (dias de vida)	Diferença	IC95%	TEP	P
Morto ou transplantado	19	97,3 ± 35,9	27,3	5,3 a 49,2	0,88	0,016
Vivo não transplantado	15	70,00 ± 23,7				

Método estatístico: teste t de Student.

Entre os casos cuja evolução pôde ser acompanhada, 19 deles (40% do total de casos de AB, 56% dos pacientes em acompanhamento) faleceram ou submeteram-se a transplante hepático, enquanto 15 (32% do total de casos, 44% dos pacientes em acompanhamento) continuam vivos e não foram transplantados. A idade dos casos por ocasião da portoenterostomia afetou o prognóstico de forma estatisticamente significativa ($P = 0,016$). O pior prognóstico ocorreu com crianças que tinham entre 60 e 90 dias de vida, ou mais de 90 dias, por ocasião da cirurgia de Kasai. A magnitude da diferença foi moderada ($TEP = 0,88$) na comparação das médias.

A tabela 10 apresenta a relação entre idade, classificada em faixas etárias, e densidade de colágeno do material de biópsia.

Tabela 10 - Relação entre faixas etárias por ocasião da portoenterostomia e densidade de colágeno

Faixa etária (dias de vida)	n	Densidade de colágeno (%)	IC 95%	P
≤ 60	11	4,3 ± 1,3 ^a	3,5 a 5,2 ^a	0,023
61 - 90	16	6,1 ± 3,1	4,4 a 7,8	
> 90	20	8,1 ± 4,7 ^b	5,9 a 10,3 ^b	
Total	47	6,6 ± 3,9	5,4 a 7,7	

Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativas.
Método estatístico: ANOVA.

A densidade de colágeno nos casos de AB, independentemente da faixa etária, envolveu $6,6\% \pm 3,9\%$ da superfície do campo histológico. Houve relação positiva entre faixas etárias ascendentes e níveis crescentes de densidade de colágeno nos pacientes com AB, com diferença estatisticamente significativa ($P = 0,023$) entre os grupos de idade inferior ou igual a 60 dias de vida e superior a 90 dias de vida. A magnitude da diferença entre as médias destes grupos foi moderada ($TEP = 0,98$). A comparação dos valores de pacientes com menos de 60 dias e aqueles com idade variando entre 61 e 90 dias teve magnitude de diferença também moderada ($TEP = 0,71$), enquanto a comparação entre os com mais de 90 dias e os de 61 a 90 dias mostrou pequena magnitude de diferença ($TEP = 0,49$). O valor máximo de densidade de colágeno na classe de menos de 60 dias foi de 6,3%, e na classe de mais de 90 dias chegou a cerca de 23% do total de superfície da lâmina. O menor valor da densidade de colágeno ocorreu em um caso da classe de 61 a 90 dias de vida (1,7%). Neste último grupo o valor máximo da densidade de colágeno foi de 14%.

A tabela 11 relaciona prognóstico e densidade de colágeno naqueles pacientes que puderam ser acompanhados em ambulatório após a portoenterostomia.

Tabela 11 - Relação entre prognóstico e densidade de colágeno nos pacientes com atresia biliar

Evolução	Densidade de colágeno (%)	Diferença	IC95%	TEP	P
Morto ou transplantado (n = 19)	7,6 ± 4,5	1,87	- 0,8 a 4,6	0,50	0,166
Vivo não transplantado (n = 15)	5,7 ± 2,7				

Método estatístico: teste t de Student.

Não ocorreu relação estatisticamente significativa entre a densidade de colágeno e o prognóstico dos casos ($P = 0,166$). Observou-se grande variação da densidade de colágeno nas 10 imagens aleatoriamente captadas em cada caso, o que se reflete em amplos desvios padrão, apesar de um número razoável de pacientes envolvidos na comparação. O efeito da diferença das médias foi de magnitude pequena ($TEP = 0,50$).

6.3 - Achados Histológicos de Pacientes com Atresia Biliar e Controles

6.3.1 - Estruturas Biliares

A seguir é apresentada a tabela que compara a frequência dos achados histológicos das estruturas biliares segundo os grupos de AB com e sem AEH, pacientes sem hepatopatia e com colestase intra-hepática. Nos fetos observaram-se placas ductais e “remanescentes de placa ductal” (figura 6). Estes últimos foram vistos também nos lactentes sem hepatopatia (figura 7). A tabela 12 caracteriza os achados histológicos das estruturas biliares.

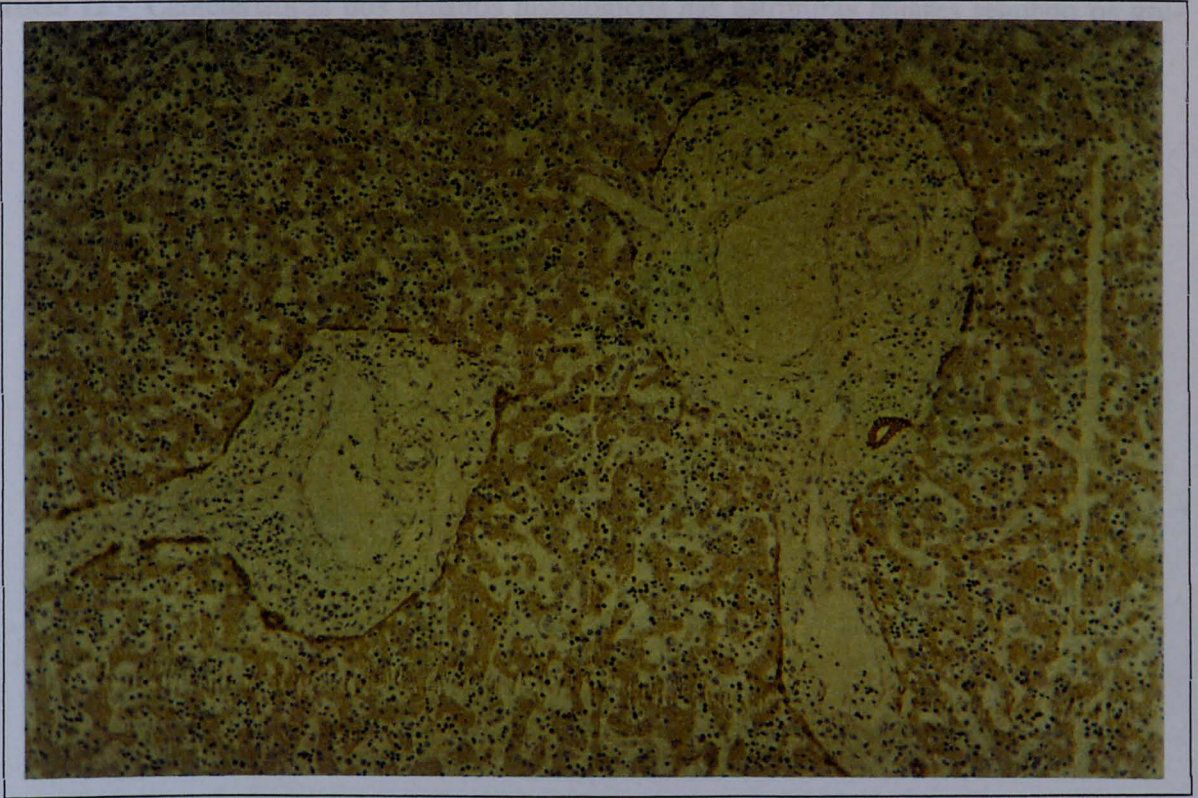


Fig. 6 - Placa ductal em feto com idade gestacional de 22 semanas. Observa-se a presença de ductos biliares em migração. (Aumento de 100x. Imunoistoquímica com CAM 5.2)

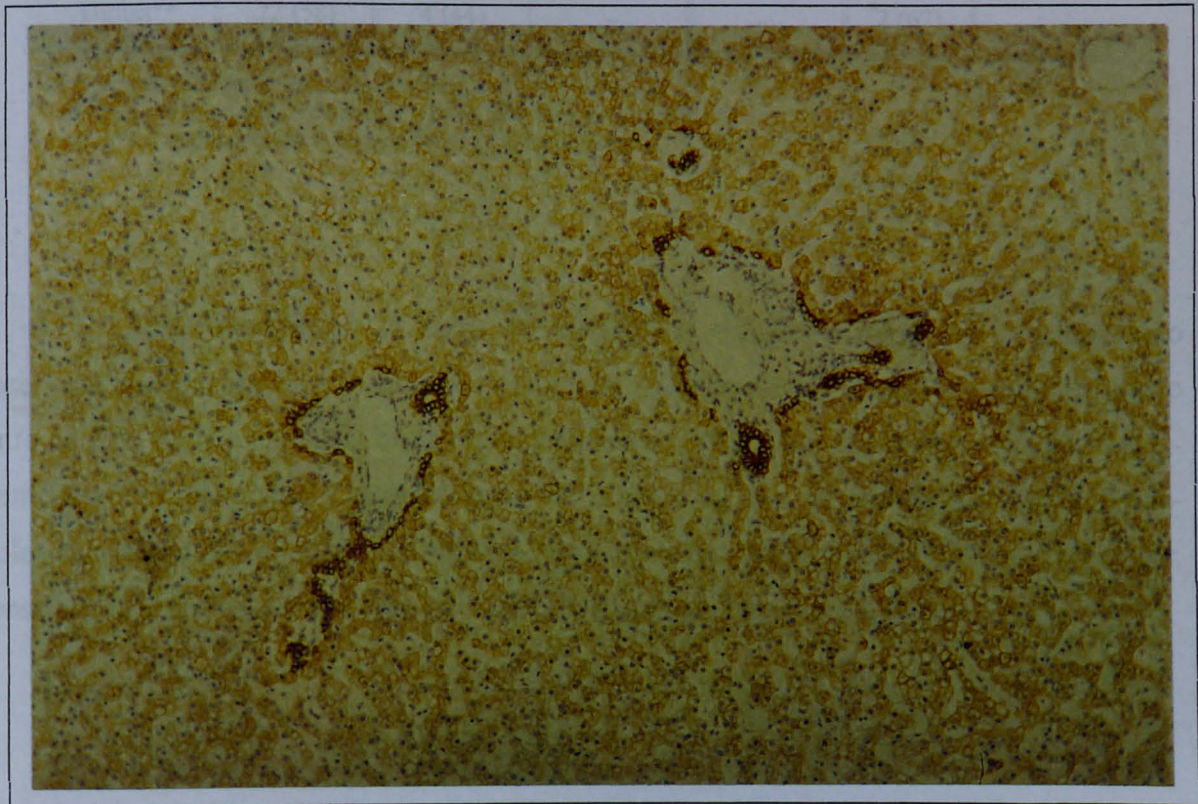


Fig. 7 - Espaço-porta em lactente de 36 dias de vida sem hepatopatia. Observam-se remanescentes da placa ductal. (Aumento de 100x. Imunoistoquímica com CAM 5.2)

Tabela 12 - Características dos achados histológicos nas estruturas biliares segundo os grupos com atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles

Variável	Atresia biliar		Controles			P
	Sem AEH (n = 38)	Com AEH (n = 9)	Fetos (n = 7)	Lactentes (n = 7)	CIH (n = 3)	
Malformação de placa ductal						
Presente*	20 (53)	6 (67)	-	-	-	0,446
Ducto biliar maduro						
Presente	36 (95)	8 (89)	7 (100)	7 (100)	3 (100)	0,791
Focal	9 (25)	1 (12)	0	0	0	0,251
Difusa	27 (75)	7 (88)	7 (100)	7 (100)	3 (100)	
Proliferação ductular						
Presente	38 (100)	9 (100)	0	0	3 (100)	<0,001
Focal**	16 (42)	5 (56)	-	-	1 (33)	0,711
Difusa**	22 (58)	4 (44)	-	-	2 (67)	

* comparação entre grupos de atresia biliar;

** comparação entre grupos de atresia biliar e colestase intra- hepática.
Porcentagem entre parênteses. Método estatístico: Qui-quadrado.

MPD ocorreu em 26 casos de AB (55%). A figura 8 apresenta a malformação observada em um caso de AB. Entre os casos sem AEH houve MPD em 53% deles, enquanto entre os com AEH a anomalia biliar foi encontrada em 67%. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à ocorrência de MPD entre os dois grupos de AB. Nenhum controle, sem hepatopatia ou com colestase intra-hepática, apresentou MPD. Eventualmente, constatou-se a presença simultânea de MPD e DBM nos espaços-porta (figura 8).

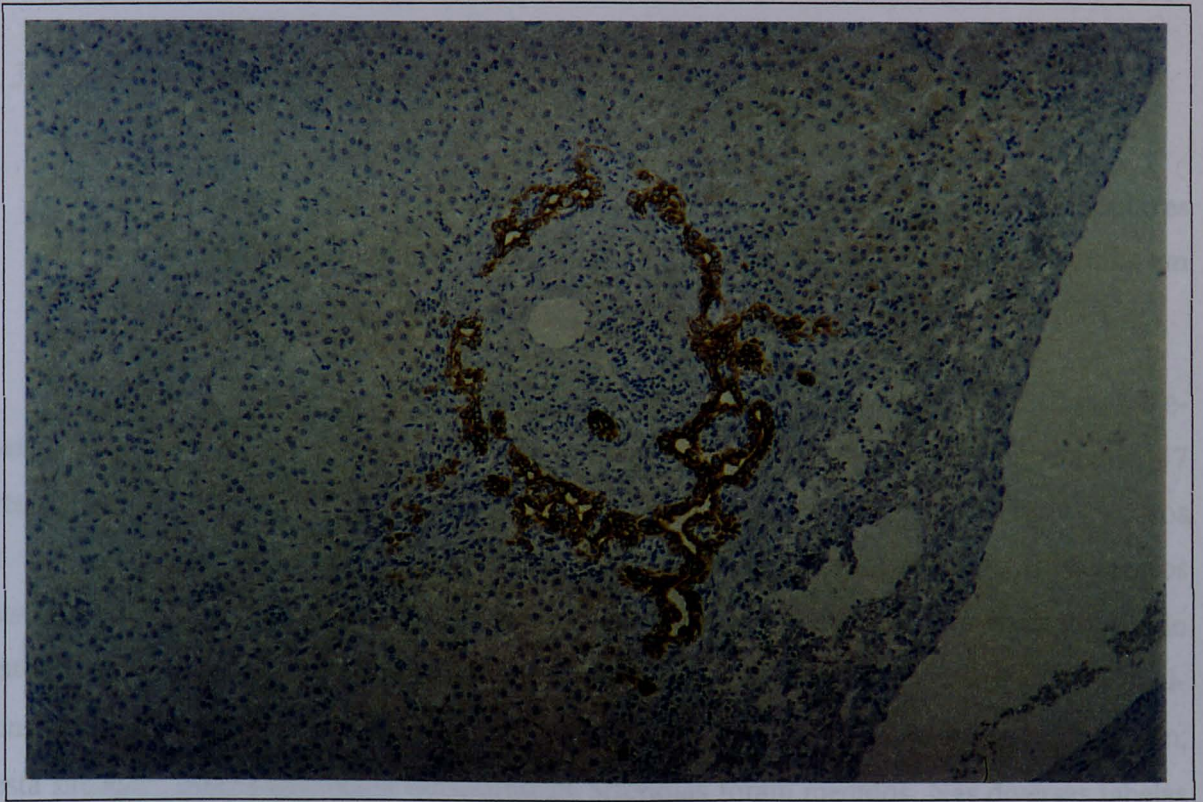


Fig. 8 - Malformação de placa ductal em paciente com atresia biliar aos 92 dias de vida. Observa-se a presença concomitante de ducto biliar maduro. (Aumento de 100x. Imunoistoquímica com citoqueratina 19)

DBM foi encontrado nos espaços-porta de todos os controles sem hepatopatia e com colestase intra-hepática. Entre os casos de AB, apenas três (6%) não apresentaram DBM. Sua presença nos grupos de AB foi semelhante: ocorreu em 95% dos casos sem AEH e em 89% dos com AEH. Em todos os controles sem hepatopatia e com colestase intra-hepática, os DBMs foram encontrados em distribuição difusa. Na AB, porém, em 25% dos casos sem AEH e em 12% dos com anomalia, os DBMs apresentaram-se de forma focal. A distribuição difusa dos DBMs foi semelhante entre os dois grupos de AB.

Todos os casos de AB e de pacientes com colestase intra-hepática apresentaram proliferação ductular, enquanto em nenhum dos controles sem hepatopatia esta alteração histopatológica foi observada ($P < 0,001$). A proliferação ductular ocorreu de forma difusa na maioria dos casos de AB (55% do total de casos). A distribuição da proliferação ductular foi semelhante nos grupos de AB com e sem AEH, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles quanto a esta variável. Não houve diferença estatisticamente significativa no tocante à distribuição de PD entre os grupos de AB com e sem AEH e pacientes com colestase intra-hepática ($P = 0,711$).

6.3.2 - Ramos Arteriais Hepáticos

- **Primeira etapa – Caracterização morfométrica de alterações vasculares arteriais em casos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia em relação a controles**

Foram consideradas adequadas para quantificação e, portanto, tiveram seus elementos estruturais medidos, 172 arteríolas e 20 artérias entre os controles sem hepatopatia, 47 arteríolas e 9 artérias entre os pacientes com colestase de causa-intra-hepática e, entre os casos de AB cuja biópsia foi realizada durante a portoenterostomia, foram medidos os elementos estruturais em 695 arteríolas e 98 artérias. No total de casos e controles nesta etapa do estudo histológico foram avaliados, portanto, 1041 vasos, sendo 914 arteríolas e 127 artérias. Em alguns pacientes não foram encontrados vasos com diâmetro externo igual ou superior a 100 μm ; nesta situação, apenas elementos estruturais de arteríolas foram medidos. Nas diversas tabelas a seguir descreve-se o número de casos com artérias presentes.

Em todos os pacientes com AB, por ocasião da portoenterostomia, observou-se proliferação de ramos arteriais de distintos calibres, concentrados em espaços-porta e pontes fibróticas (figura 9); houve ampla variação dos elementos estruturais destes vasos de caso para caso e, num mesmo paciente, de área para área e, ainda, de vaso para vaso. Deste modo, num determinado paciente, alguns espaços-porta apresentavam vasos com aparência alterada, enquanto outros possuíam vasos com aparência semelhante à dos controles. Como foram medidos aleatoriamente os elementos de vasos de diversas áreas, sem seleção daqueles com aparência alterada, houve grande variação dos resultados em cada caso de AB. Também em controles sem hepatopatia ocorreu variação dos elementos estruturais, porém com menor intensidade. Na região subcapsular hepática houve intensa proliferação de vasos (figura 10), mas os ramos arteriais dessa região não foram incluídos no estudo, que se centrou na avaliação das estruturas vasculares dos espaços-porta, pontes fibróticas e, eventualmente, parênquima.

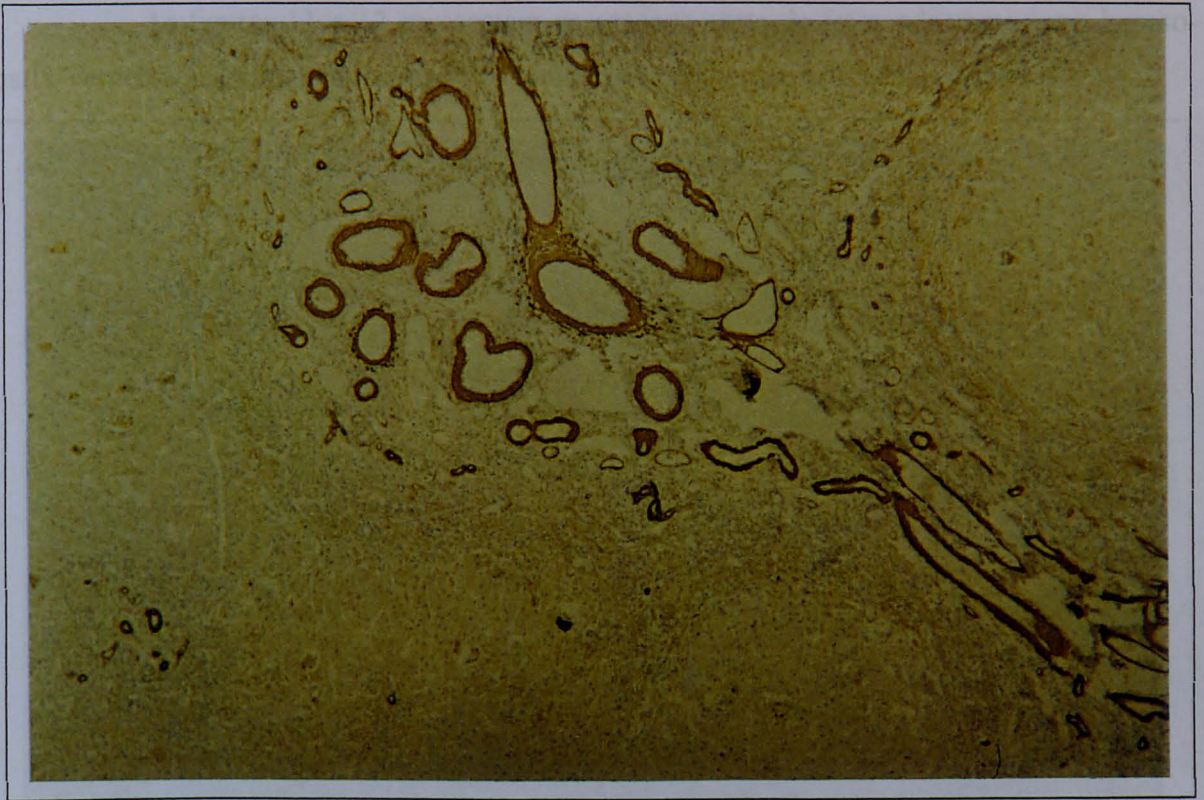


Fig. 9 - Agrupamento de vasos em espaços-porta alargado de paciente com atresia biliar por ocasião da portointerostomia aos 127 dias de vida. (Aumento de 40x. Imunoistoquímica com HHF-35)

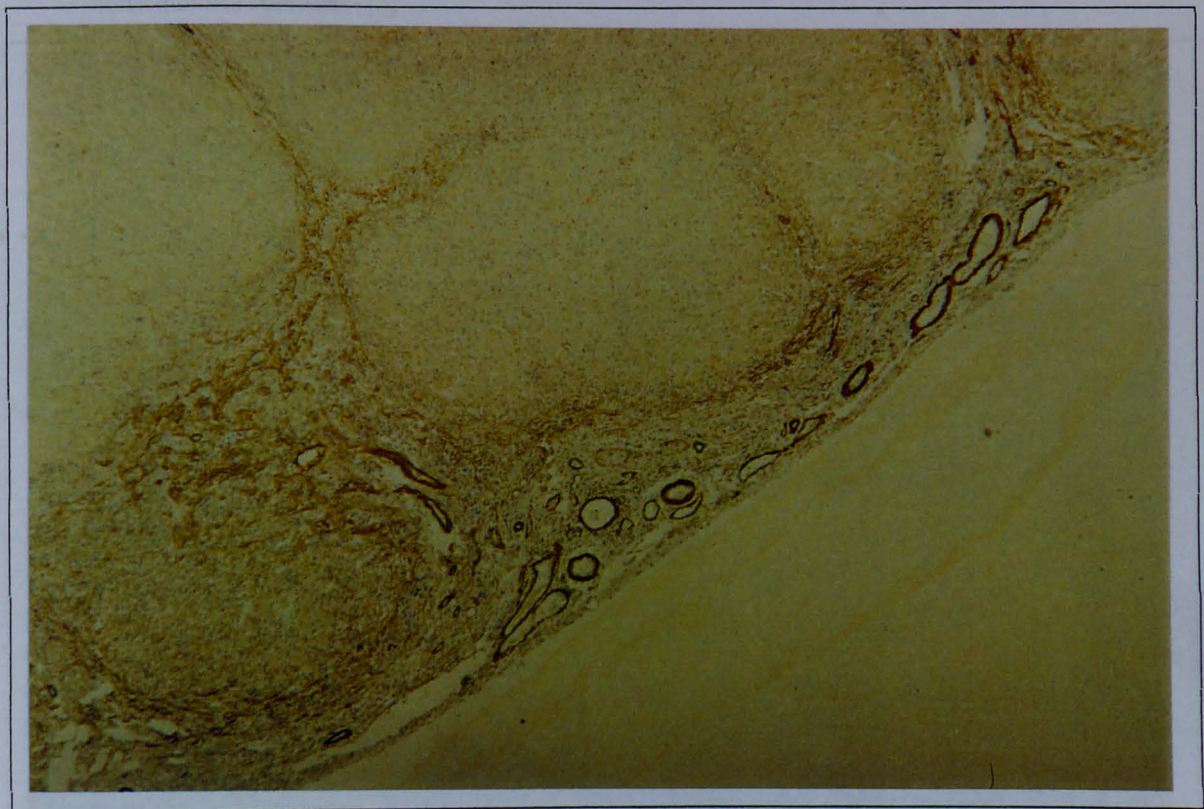


Fig. 10 - Agrupamento de vasos em região subcapsular em paciente com atresia biliar por ocasião da portointerostomia aos 127 dias de vida. (Aumento de 40x. Imunoistoquímica com HHF-35)

As figuras 11 e 12 apresentam os espaços-porta de fetos e lactentes sem hepatopatia, respectivamente, demonstrando os ramos arteriais hepáticos e vênulas porta.

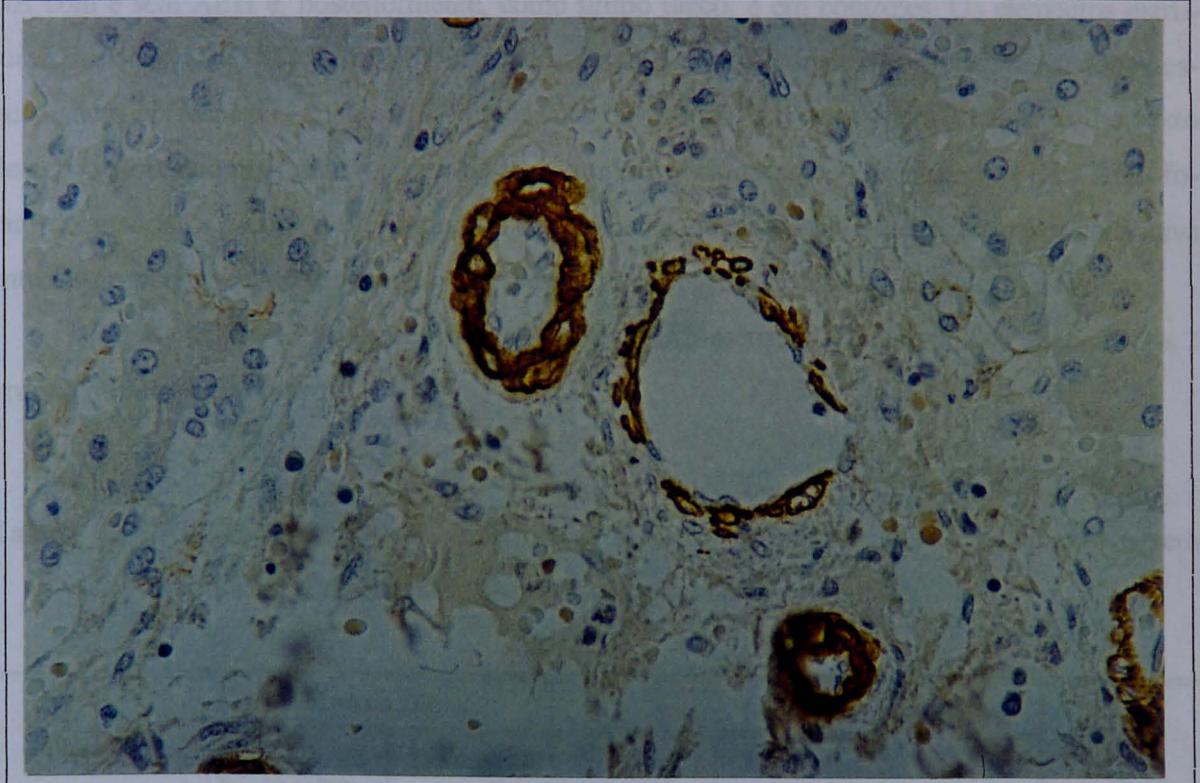


Fig. 11 -Espaço-porta de feto sem hepatopatia com idade gestacional de 30 semanas. (Aumento 200x. Imunoistoquímica com HHF-35)

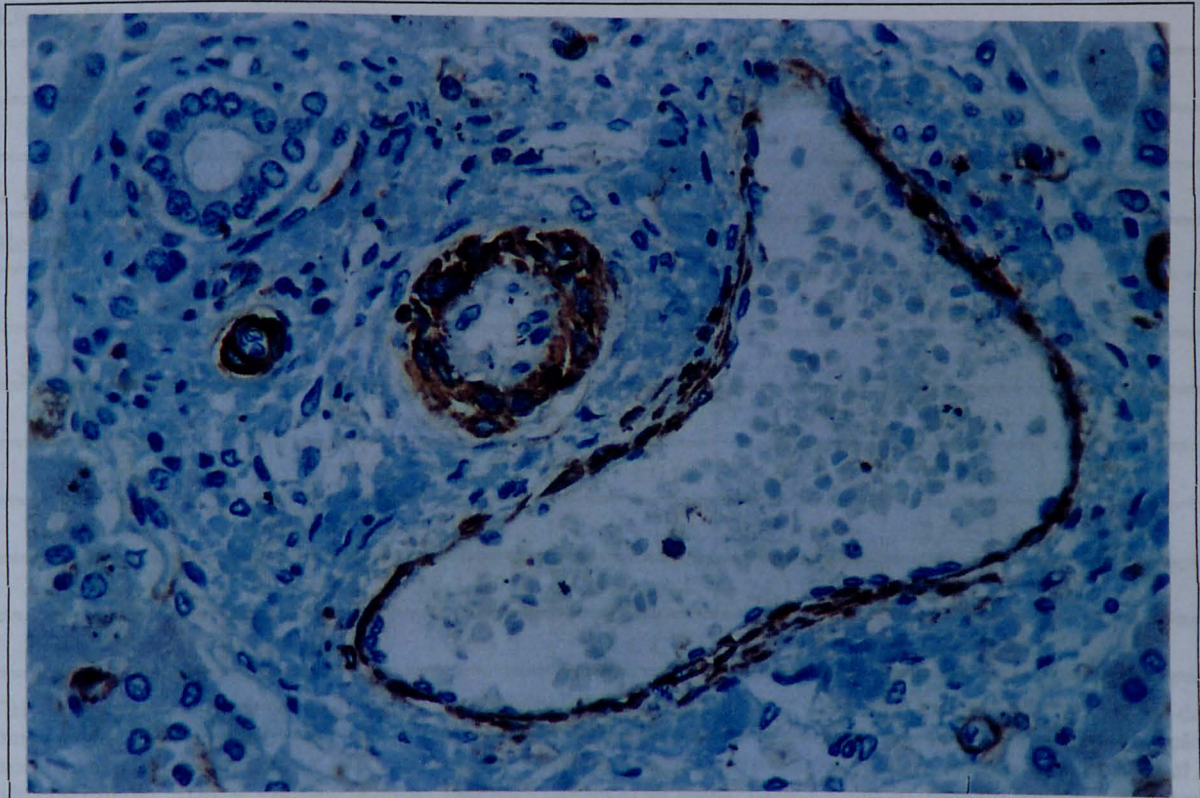


Fig. 12 -Espaço-porta em lactente com 36 dias de vida sem hepatopatia. (Aumento de 200x. Imunoistoquímica com HHF-35)

As tabelas a seguir descrevem o comportamento das estruturas vasculares arteriais e arteriolas nos casos de AB por ocasião da portoenterostomia divididos, inicialmente, nos grupos com e sem AEH e, posteriormente, como grupo único, e em controles. Os elementos estruturais isolados (**DTOT, INT, ESP**) foram utilizados para a construção de representações esquemáticas aproximadas quanto à média de suas dimensões, não sendo feita a descrição no texto de seus valores comparados. Nessas figuras, que são mostradas nos Anexos de VIII a XIII, foram apontados os elementos estruturais que apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, marcados por duas cores (vermelho para grupo 1, azul para grupo 2) e negrito.

Na tabela 13 estão descritos os dados morfométricos das arteriolas hepáticas dos 2 grupos de AB e dos controles.

Tabela 13 - Alterações vasculares arteriolas segundo grupos de atresia biliar com e sem anomalias congênitas extra-hepáticas associadas e controles

Característica	Atresia Biliar		Controles			P
	Sem AEH (n = 38)	Com AEH (n = 9)	Fetos (n = 7)	Lactentes (n = 7)	CIH (n = 7)	
Número de vasos	17,0 ± 6,4	15,9 ± 5,4	12,1 ± 3,4	12,4 ± 3,8	15,7 ± 3,1	0,161
Elementos						
DTOT	42,2 ± 7,3	42,8 ± 6,2	46,5 ± 5,4	44,6 ± 13,1	49,3 ± 9,9	0,432
ESP	6,7 ± 1,2	6,4 ± 1,1	6,9 ± 0,9	6,6 ± 1,3	6,2 ± 1,1	0,863
INT	4,1 ± 0,8 ^a	4,2 ± 0,6	3,9 ± 0,9 ^a	4,9 ± 0,9 ^b	4,7 ± 0,4	0,091
Relações						
REMD	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,6 ± 0,4	1,4 ± 0,0	0,287
RETD	2,7 ± 0,3	2,7 ± 0,3	2,5 ± 0,4	2,8 ± 0,6	2,5 ± 0,1	0,295
RID	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2 ^a	1,2 ± 0,3 ^b	1,1 ± 0,2	0,116
RDIDE	6,7 ± 0,5	6,8 ± 0,6	6,7 ± 0,8	6,5 ± 0,9	7,2 ± 0,0	0,423
RDIEM	44,0 ± 10,9	47,6 ± 12,3	48,8 ± 17,4	42,9 ± 16,8	58,6 ± 1,8	0,308
RDIET	26,8 ± 5,6	28,3 ± 7,0	29,7 ± 8,4	24,1 ± 7,2	33,1 ± 2,4	0,223
RINTESP	6,4 ± 1,4	7,0 ± 1,5	5,8 ± 1,7 ^a	7,6 ± 1,9 ^b	7,9 ± 0,7	0,093

CIH - colestase intra-hepática; AEH - anomalia extra-hepática associada; DTOT - diâmetro externo; ESP - espessura da túnica média; INT - espessura da túnica íntima; REMD - relação espessura da média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total / diâmetro externo; RID - relação espessura da íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total; RINTESP - relação espessura da íntima / espessura da média. Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativas. Método estatístico: ANOVA

O Anexo VIII representa esquematicamente as arteríolas dos grupos de AB e controles avaliados nas tabelas 13 e 15, a partir dos valores médios dos elementos estruturais vasculares.

Entre estes cinco grupos, em relação às arteríolas, não houve diferença estatisticamente significativa, quanto às relações dos elementos estruturais vasculares para $P = 0,05$. Contudo, ocorreram discrepâncias entre os valores destas relações, sendo apontadas pelo método estatístico com valores de P limítrofes. Os lactentes sem hepatopatia apresentaram valores da **RID** superiores aos valores dos fetos ($P = 0,116$) e a magnitude da diferença foi moderada a grande ($TEP = 1,18$). Se comparada, ainda, a média dos casos de AB sem AEH com a dos lactentes sem hepatopatia quanto a esta relação, a magnitude da diferença foi moderada ($TEP = 0,92$), sendo superiores os valores dos lactentes sem hepatopatia. A comparação das médias entre os casos de AB com AEH e lactentes sem hepatopatia produziu diferença de magnitude pequena ($TEP = 0,40$), assim como a comparação entre lactentes sem hepatopatia e pacientes com colestase intra-hepática ($TEP = 0,36$). A **RINTESP**, que relaciona a espessura da túnica íntima com a espessura da túnica média, apresentou valores superiores nos lactentes sem hepatopatia em relação aos dos fetos, embora com valor de P limítrofe ($P = 0,093$). A magnitude da diferença da **RINTESP** entre casos sem AEH e lactentes sem hepatopatia foi moderada ($TEP = 0,81$) e entre fetos e estes lactentes, de moderada a grande ($TEP = 1,00$), sendo superiores os valores dos lactentes sem hepatopatia.

Na tabela 14 avalia-se a ocorrência de alterações vasculares arteriais nos casos de AB por ocasião da portoenterostomia, divididos em grupos com e sem AEH, em relação aos controles.

Tabela 14 - Alterações vasculares arteriais segundo os grupos de atresia biliar com e sem anomalias congênitas associadas e controles

Característica	Atresia biliar		Controles			P
	Sem AEH (n = 27)	Com AEH (n = 5)	Fetos (n = 6)	Lactentes (n = 4)	CIH (n = 3)	
Número de vasos	2,3 ± 2,1	3,0 ± 1,4	2,7 ± 1,9	1,0 ± 0,0	3,0 ± 1,0	0,535
Elementos						
DTOT	150,2 ± 33,1	137,9 ± 19,6	170,7 ± 81,9	200,4 ± 69,5	134,7 ± 46,9	0,198
ESP	15,0 ± 4,8	13,8 ± 3,5	12,9 ± 5,4	11,8 ± 4,1	9,6 ± 2,7	0,287
INT	5,6 ± 1,2 ^a	5,8 ± 0,5	5,9 ± 2,0	7,3 ± 1,1 ^b	6,4 ± 1,6	0,195
Relações						
REMD	1,0 ± 0,3 ^a	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,3 ^b	0,8 ± 0,1	0,067
RETD	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,5	1,3 ± 0,2	0,239
RID	0,4 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1 ^b	0,219
RDIDE*	8,1 ± 0,5	8,0 ± 0,4	8,4 ± 0,4	8,5 ± 0,7	8,4 ± 0,2	0,233
RDIEM*	92,8 ± 28,7 ^a	83,1 ± 19,9 ^a	118,4 ± 41,0	149,3 ± 106,4 ^b	115,5 ± 12,9	0,099
RDIET*	64,4 ± 15,5 ^a	57,8 ± 11,3 ^a	76,1 ± 18,8	95,9 ± 68,0 ^b	70,2 ± 11,6	0,153
RINTESP	4,1 ± 1,3 ^a	4,4 ± 1,1 ^a	5,2 ± 1,9 ^a	6,7 ± 2,5 ^b	6,8 ± 0,9 ^b	0,004

AEH - anomalia congênita extra-hepática associada; CIH - colestase intra-hepática; DTOT - diâmetro externo; ESP - espessura da túnica média; INT - espessura da túnica íntima; REMD - relação espessura da média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total / diâmetro externo; RID - relação espessura da íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total; RINTESP - relação espessura da íntima / espessura da média.

* Número de casos com atresia biliar sem anomalia = 22; Número de lactentes sem hepatopatia = 3

Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativas. Método estatístico: ANOVA

O Anexo IX representa esquematicamente as artérias construídas a partir dos valores médios dos elementos vasculares observados nas tabelas 14 e 16.

A comparação dos cinco grupos quanto às relações dos elementos estruturais das artérias demonstrou diferença estatisticamente significativa quanto à **RINTESP** de lactentes sem hepatopatia e pacientes com colestase intra-hepática em relação a fetos e aos grupos de AB (P = 0,004). A diferença das médias desta relação entre lactentes sem hepatopatia e casos de AB sem AEH foi de magnitude grande a muito grande (TEP = 1,83), sendo superiores os valores dos lactentes sem hepatopatia. Na comparação dos casos com AEH e lactentes sem hepatopatia, a magnitude da diferença foi grande (TEP = 1,35) e entre fetos e lactentes sem hepatopatia, moderada (TEP = 0,72). Outras diferenças foram apontadas como estatisticamente significativas, mas com valores de P limítrofes. Quanto à **REMD**, as magnitudes das diferenças dos casos de AB sem e com AEH em relação aos lactentes sem hepatopatia foram mode-

radas a grandes (TEP = 1,00 e TEP = 1,21 respectivamente), sendo superiores os valores dos grupos de AB. O valor de P foi limítrofe (P = 0,067) quanto à diferença desta relação entre o grupo de AB sem AEH e lactentes sem hepatopatia. Não houve diferença detectável pela estatística TEP entre os grupos de AB com e sem AEH. O teste estatístico apontou diferença estatisticamente significativa quanto à **RID** entre pacientes com AB sem AEH e pacientes com colestase intra-hepática, embora com valor de P = 0,219. A magnitude da diferença foi moderada a grande (TEP = 1,00), sendo superiores os valores nos pacientes com colestase intra-hepática. Os valores de **RDIEM** foram maiores nos lactentes sem hepatopatia do que nos casos de AB com e sem AEH (P = 0,099). A magnitude da diferença entre o grupo de AB sem AEH e estes controles foi grande (TEP = 1,29) e entre casos de AB com AEH e os mesmos controles, moderada (TEP = 0,93).

A tabela 15 apresenta as alterações vasculares arteriolares segundo os grupos de AB por ocasião da portoenterostomia e controles.

Tabela 15 - Alterações vasculares arteriolares segundo os grupos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles

Característica	Atresia biliar (n = 47)	Controles			P
		Fetos (n = 7)	Lactentes (n = 7)	CIH (n = 3)	
Número de vasos	16,8 ± 4,3	12,1 ± 3,4	12,4 ± 3,8	15,7 ± 3,1	0,096
Elementos					
DTOT	42,3 ± 7,1	46,5 ± 2,0	44,6 ± 13,1	49,3 ± 9,9	0,284
ESP	6,7 ± 1,2	6,9 ± 1,0	6,6 ± 1,3	6,2 ± 1,1	0,849
INT	4,1 ± 0,8 ^a	3,9 ± 1,0 ^a	4,9 ± 0,9 ^b	4,7 ± 0,4	0,048
Relações					
REMD	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,7 ± 0,4	1,4 ± 0,0	0,305
RETD	2,7 ± 0,3	2,5 ± 0,4	2,8 ± 0,6	2,5 ± 0,1	0,204
RID	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,3 ^a	1,2 ± 0,3 ^b	1,1 ± 0,1	0,065
RDIDE	6,7 ± 0,53	6,7 ± 0,8	6,5 ± 0,9	7,2 ± 0,0	0,370
RDIEM	44,7 ± 11,2	48,8 ± 17,4	42,9 ± 16,8	58,6 ± 1,8	0,238
RDIET	27,1 ± 5,8	29,7 ± 8,4	24,1 ± 7,2	33,1 ± 2,4	0,149
RINTESP	6,6 ± 1,5	5,8 ± 1,7 ^a	7,7 ± 2,0 ^b	7,9 ± 0,7	0,073

CIH - colestase intra-hepática; DTOT - diâmetro externo; ESP - espessura da túnica média; INT - espessura da túnica íntima; REMD - relação espessura da média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total / diâmetro externo; RID - relação espessura da íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total; RINTESP - relação espessura da íntima / espessura da média.

Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativas. Método estatístico: ANOVA

O Anexo VIII representa esquematicamente as arteríolas construídas a partir dos valores médios dos elementos estruturais vasculares observados nas tabelas 13 e 15.

O número de arteríolas por paciente foi maior entre os pacientes com AB do que entre os controles sem hepatopatia, sendo a magnitude da diferença moderada a grande (TEP = 1,04). Também foi mais elevado o seu número nos pacientes com colestase intra-hepática do que nos lactentes sem hepatopatia (TEP = 0,91), sendo moderada a magnitude da diferença. Não houve, porém, diferença estatisticamente significativa quanto a esta variável para $P = 0,05$.

O método estatístico apontou diferença significativa quanto a duas relações entre os elementos estruturais arteriolares, ambas associadas à espessura da túnica íntima (**RID** e **RINTESP**), embora com valor limítrofe de P . A **RID** foi diferente ($P = 0,065$) em fetos e lactentes sem hepatopatia, com magnitude da diferença entre moderada e grande (TEP = 1,01), sendo superiores os valores nos lactentes sem hepatopatia. A **RINTESP** apresentou diferença de magnitude moderada a grande (TEP = 1,01) também entre fetos e lactentes sem hepatopatia ($P = 0,073$), sendo superiores os valores do segundo grupo. A comparação entre a **RINTESP** dos casos de AB e lactentes sem hepatopatia mostrou diferença de magnitude moderada (TEP = 0,70), sendo superior a média deste último grupo. Entre casos de AB e pacientes com colestase intra-hepática a magnitude da diferença da **RINTESP** foi moderada (TEP = 0,88), sendo superior o valor da média dos pacientes com colestase intra-hepática.

A seguir são apresentadas na figura 13 as distribuições dos valores de média e desvio padrão da **REMD** das arteríolas nos casos de AB por ocasião da portoenterostomia e controles.

Tabela 16 - Alterações vasculares arteriais segundo os grupos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles

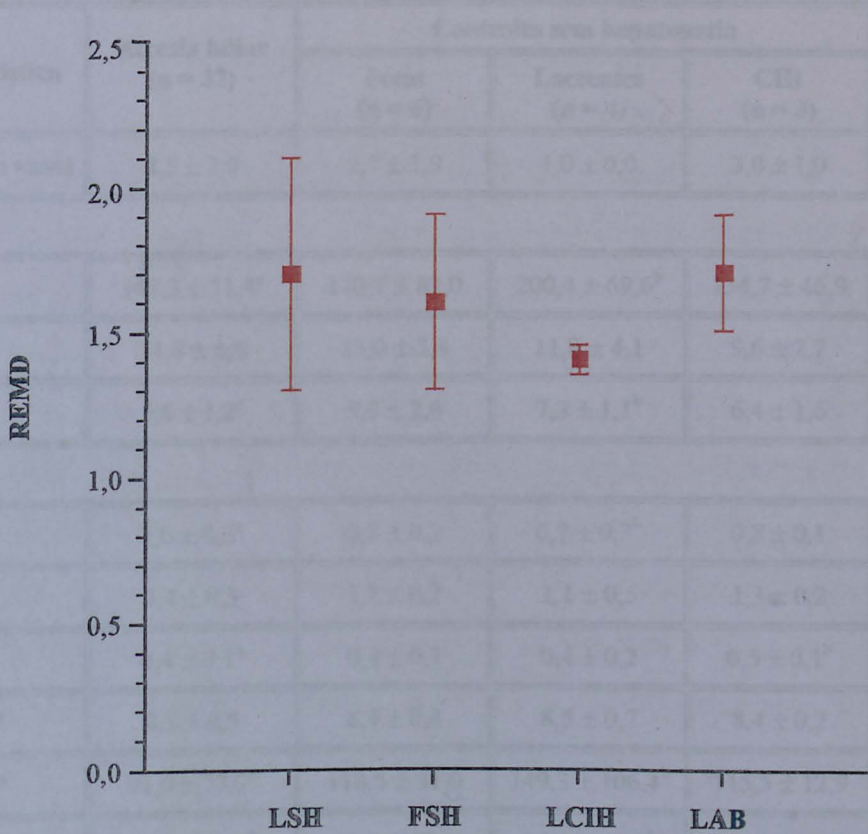


Fig 13 - Representação gráfica das distribuições de média e desvio padrão da relação espessura da túnica média/diâmetro externo em arteríolas segundo os grupos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles

REMD - relação espessura da túnica média/diâmetro externo; LSH - lactentes sem hepatopatia; FSH - fetos sem hepatopatia; LCIH - lactentes com colestase intra-hepática; LAB - lactentes com atresia biliar.

A figura 13 demonstra distribuições semelhantes dos valores de média e desvio padrão da **REMD** nas arteríolas segundo os quatro grupos avaliados.

Tabela 16 - Alterações vasculares arteriais segundo os grupos de atresia biliar por ocasião da portonterostomia e controles

Característica	Atresia biliar (n = 32)	Controles sem hepatopatia			P
		Fetos (n = 6)	Lactentes (n = 4)	CIH (n = 3)	
Número de vasos	2,5 ± 2,0	2,7 ± 1,9	1,0 ± 0,0	3,0 ± 1,0	0,452
Elementos					
DTOT	148,3 ± 31,4 ^a	170,7 ± 82,0	200,4 ± 69,6 ^b	134,7 ± 46,9	0,123
ESP	14,8 ± 4,6	13,0 ± 5,4	11,8 ± 4,1	9,6 ± 2,7	0,190
INT	5,6 ± 1,2 ^a	5,9 ± 2,0	7,3 ± 1,1 ^b	6,4 ± 1,6	0,112
Relações					
REMD	1,0 ± 0,3 ^a	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,3 ^b	0,8 ± 0,1	0,031
RETD	1,4 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,5	1,3 ± 0,2	0,141
RID	0,4 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1 ^b	0,171
RDIDE*	8,1 ± 0,5	8,4 ± 0,4	8,5 ± 0,7	8,4 ± 0,2	0,151
RDIEM*	91,0 ± 27,2 ^a	118,5 ± 41,0	149,3 ± 106,4 ^b	115,5 ± 12,9	0,054
RDIET*	63,2 ± 14,9 ^a	76,1 ± 18,8	95,9 ± 68,0 ^b	70,2 ± 11,6	0,093
RINTESP	4,2 ± 1,3 ^a	5,2 ± 1,9	6,7 ± 2,5 ^b	6,8 ± 0,9 ^b	0,002

CIH - colestase intra-hepática; DTOT - diâmetro externo; ESP - espessura da túnica média; INT - espessura da túnica íntima; REMD - relação espessura da média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total / diâmetro externo; RID - relação espessura da íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total; RINTESP - relação espessura da íntima / espessura da média.

* Número de atresia biliar = 27; Número de controles fetos = 6; Número de controles lactentes = 3.

Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativas.

Método estatístico: ANOVA

O Anexo IX representa esquematicamente as artérias construídas a partir dos valores médios dos elementos estruturais vasculares observados nas tabelas 14 e 16.

Obtiveram-se, na comparação quanto às relações dos elementos estruturais arteriais entre os quatro grupos, diferenças estatisticamente significativas para $P = 0,05$ em duas delas: **REMD** e **RINTESP**. Em três outras relações (**RID**, **RDIEM** e **RDIET**) foram apontadas diferenças pelo teste estatístico, mas com $P = 0,171$, $P = 0,054$ e $P = 0,093$ respectivamente. O valor da **REMD** foi mais elevado no grupo de AB do que nos lactentes sem

hepatopatia ($P = 0,031$), com magnitude de diferença entre moderada e grande ($TEP = 1,00$). Na comparação do grupo de AB com os pacientes com colestase intra-hepática, o valor da **REMD** foi superior no primeiro, sendo moderada a magnitude da diferença ($TEP = 0,69$). O valor da **RETD**, embora sem diferença estatisticamente significativa para $P = 0,05$, também foi maior nos casos de AB do que nos lactentes sem hepatopatia, com magnitude de diferença entre moderada e grande ($TEP = 0,93$). A **RINTESP**, relacionando os valores da espessura das duas túnicas da parede vascular, mostrou diferenças entre o grupo de AB e os lactentes sem hepatopatia e pacientes com colestase intra-hepática ($P = 0,002$). As diferenças entre casos e lactentes sem hepatopatia e entre casos e pacientes com colestase intra-hepática foram de magnitudes grandes a muito grandes ($TEP = 1,73$ e $TEP = 1,56$ respectivamente), sendo superiores os valores dos grupos de pacientes sem AB. Ainda, na comparação com pacientes com colestase intra-hepática, o valor da **RINTESP** do grupo de AB foi inferior, sendo grande a muito grande a magnitude da diferença ($TEP = 1,56$). Os fetos apresentaram valores da **RINTESP** intermediários entre os outros grupos. O valor da **RID**, variável que integra a espessura da íntima e o diâmetro externo, foi maior nos pacientes com colestase intra-hepática do que no grupo de AB, sendo a magnitude da diferença moderada a grande ($TEP = 1,00$) e $P = 0,171$. Duas relações associadas ao diâmetro luminal e à espessura da parede, **RDIEM** e **RDIET** ($P = 0,054$ e $P = 0,093$ respectivamente), apresentaram valores inferiores no grupo de AB em relação aos lactentes sem hepatopatia. Nas duas situações a magnitude da diferença foi grande ($TEP = 1,51$ e $TEP = 1,41$ respectivamente). Os fetos e os pacientes com colestase intra-hepática apresentaram para estas relações valores intermediários entre os grupos anteriormente citados. Finalmente, o valor da **RDIDE** dos lactentes sem hepatopatia e dos pacientes com colestase intra-hepática foi superior ao do grupo de AB, embora sem diferença estatisticamente significativa para $P = 0,05$, apresentando a diferença magnitude moderada ($TEP = 0,77$ e $TEP = 0,62$ respectivamente).

A seguir é apresentada a figura 14, que compara as distribuições dos valores de média e desvio padrão da **REMD** das artérias no grupo de AB por ocasião da portoenterostomia e controles.

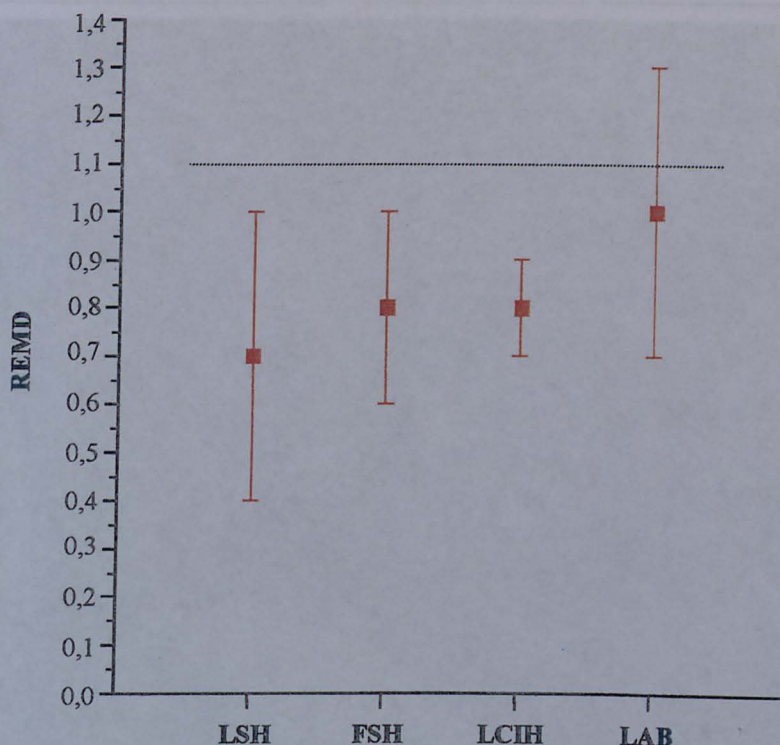


Fig. 14 - Representação gráfica das distribuições de média e desvio padrão da relação espessura da túnica média/diâmetro externo em artérias de casos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles

REMD - relação espessura da túnica média/diâmetro externo; LSH - lactentes sem hepatopatia; FSH - fetos sem hepatopatia; LCIH - lactentes com colestase intra-hepática; LAB - lactentes com atresia biliar.

A figura 14 permite visualizar que o grupo de AB apresentou distribuição de valores de média da **REMD** superior em relação aos controles. Levando-se em conta o valor máximo da **REMD** entre os lactentes sem hepatopatia (**REMD** = 1,1), representado na figura pela linha pontilhada, observou-se que 13 pacientes com AB (28% dos casos) apresentaram vasos com valores superiores a esse; 10 deles foram casos sem AEH (21% do total do grupo sem AEH) e três com AEH (33% do grupo com AEH). Nenhum paciente com colestase intra-hepática apresentou **REMD** de valor igual ou superior a esse, enquanto apenas um controle feto atingiu esse valor (**REMD** = 1,2).

• **Segunda etapa: Progressão das alterações dos ramos arteriais hepáticos desde a portoenterostomia até o transplante hepático**

Nos 7 controles com AB transplantados, mediram-se 150 vasos, entre os quais 22 artérias e 128 arteríolas. As figuras 15 e 16 apresentam ramos arteriulares e arteriais hepáticos observados no fígado retirado de um caso de AB durante o transplante hepático. As tabelas seguintes comparam os elementos dos ramos da artéria hepática e suas relações nos materiais histológicos obtidos por ocasião da portoenterostomia e do transplante hepático. A tabela 17 compara esses dados em relação às arteríolas.

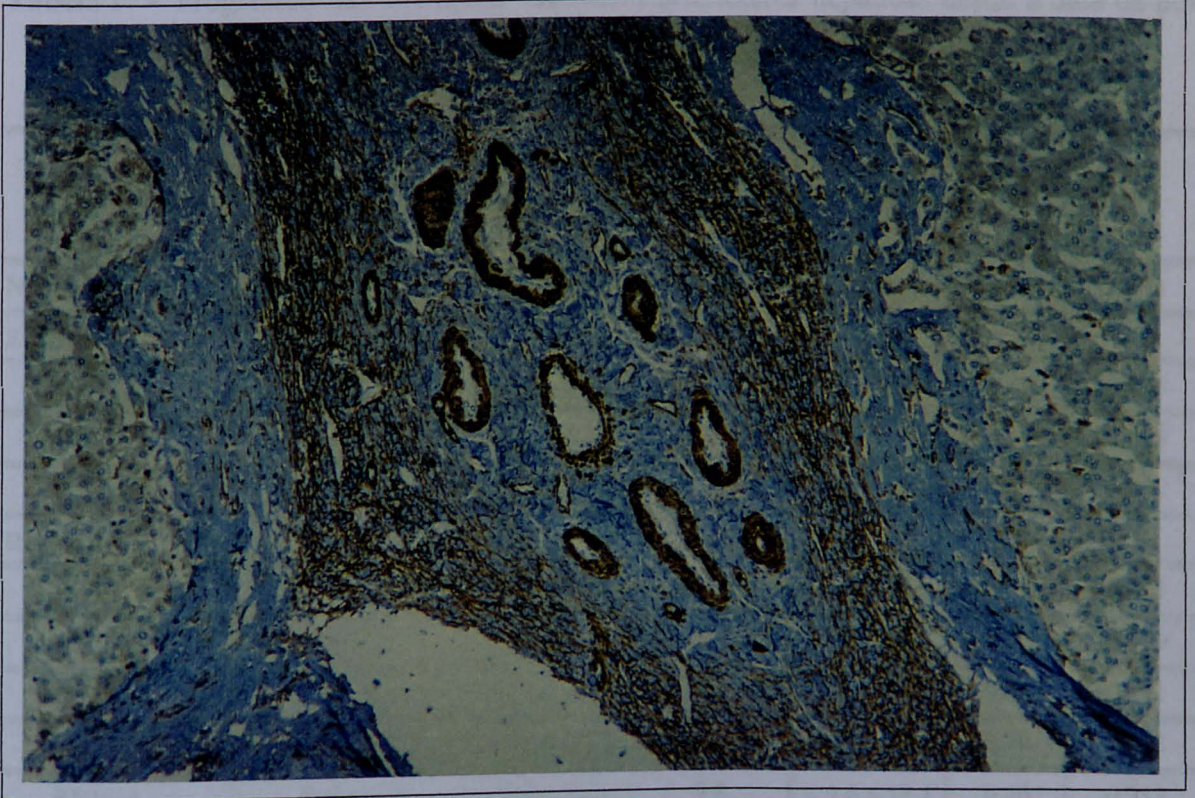


Fig. 15 - Agrupamento vascular em ponte fibrosa de paciente com atresia biliar por ocasião do transplante hepático aos 38 meses de idade. Observa-se espessamento da túnica média. (Aumento de 100x. Imunoistoquímica com HHF-35)

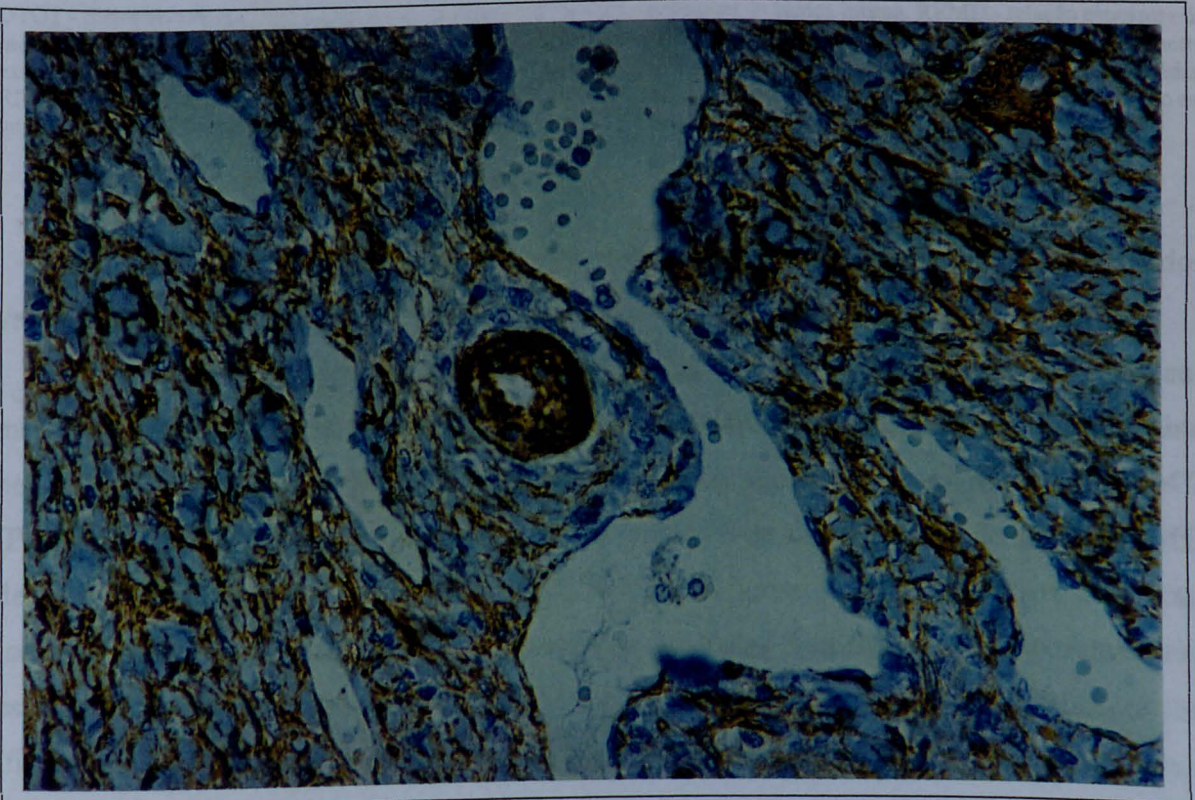


Fig. 16 -Arteriola extremamente espessada em paciente com atresia biliar por ocasião do transplante hepático aos 38 meses de idade. (Aumento 200x. Imunoistoquímica com HHF-35)

Tabela 17 - Progressão das alterações vasculares arteriolares hepáticas desde a data da portoenterostomia até o transplante hepático no grupo de atresia biliar

Característica	Atresia biliar		Diferença	IC 95%	TEP	P
	Portoenterostomia (n = 7)	Transplante (n = 7)				
Número de vasos	15,7 ± 7,5	18,0 ± 3,0	- 2,3	- 10,9 a 6,4	0,40	0,541
Elementos						
DTOT	41,3 ± 5,0	51,8 ± 11,1	- 10,5	- 21,8 a 0,8	1,22	0,063
ESP	6,6 ± 0,6	9,3 ± 2,7	- 2,7	- 5,3 a -0,1	1,37	0,046
INT	4,6 ± 0,3	5,3 ± 1,1	- 0,7	- 1,6 a 0,2	0,89	0,099
Relações						
REMD	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,4	- 0,2	- 0,5 a 0,1	0,69	0,191
RETD	2,9 ± 0,2	3,0 ± 0,4	- 0,1	- 0,4 a 0,2	0,32	0,619
RID	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,1	- 0,1 a 0,3	0,63	0,151
RDIDE	6,6 ± 0,4	6,2 ± 0,7	0,4	- 0,2 a 1,0	0,70	0,133
RDIEM	42,5 ± 8,0	38,8 ± 10,3	3,8	- 4,6 a 12,1	0,40	0,313
RDIET	24,8 ± 4,6	23,6 ± 5,4	1,2	- 3,3 a 5,8	0,24	0,532
RINTESP	7,2 ± 0,8	6,2 ± 1,3	1,1	- 0,3 a 2,4	0,93	0,110

DTOT - diâmetro externo; ESP - espessura da túnica média; INT - espessura da túnica íntima; REMD - relação espessura da média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total / diâmetro externo; RID - relação espessura da íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total; RINTESP - relação espessura da íntima / espessura da média. Método estatístico: teste t de Student.

O Anexo X representa esquematicamente as arteríolas construídas a partir dos valores médios dos elementos estruturais vasculares observados na tabela 17.

Todos os elementos estruturais arteriolares (**DTOT**, **ESP** e **INT**) pareceram aumentar nestes casos durante o período que transcorreu entre a cirurgia de Kasai e o transplante hepático. Não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação à **REMD** ($P = 0,191$) ou à **RETD** ($P = 0,619$), mas houve aumento de magnitude moderada da **REMD** detectável pela estatística TEP ($TEP = 0,69$). Porém, do ponto de vista qualitativo, observou-se no material obtido nestes casos a presença de arteríolas com túnica média extremamente espessada, algumas com obstrução quase completa do lúmen vascular pela musculatura lisa (figuras 15 e 16). Houve variação da espessura entre os diferentes casos e, num mesmo caso, arteríolas de distintos padrões de espessura da túnica média coexistiram. Quanto à **RID**, o efeito da diferença entre os grupos teve magnitude moderada ($TEP = 0,63$), ocorrendo valores

superiores entre os casos por ocasião da portoenterostomia, embora sem diferença estatisticamente significativa para $P = 0,05$. O mesmo ocorreu com o valor da RINTESP, o qual foi superior por ocasião da portoenterostomia ($TEP = 0,93$ e $P = 0,110$).

A tabela 18 compara os elementos estruturais das artérias hepáticas e suas relações nos materiais histológicos obtidos por ocasião do transplante hepático e durante a portoenterostomia, nos 7 pacientes com AB transplantados.

Tabela 18 - Progressão das alterações vasculares arteriais hepáticas desde a portoenterostomia até o transplante hepático no grupo de atresia biliar

Característica	Atresia biliar		Diferença	IC 95%	TEP	P
	Portoenterostomia (n = 3)	Transplante (n = 3)				
Número de vasos	2,3 ± 2,3	4,3 ± 0,6	- 2,0	- 8,6 a 4,6	1,19	0,321
Elementos						
DTOT	127,6 ± 22,8	157,7 ± 46,0	- 30,0	- 185,7 a 125,5	0,83	0,493
ESP	12,1 ± 3,9	17,2 ± 1,8	- 5,2	- 17,5 a 7,2	1,68	0,213
INT	5,5 ± 0,8	8,0 ± 1,5	- 2,5	- 6,9 a 1,8	2,08	0,130
Relações						
REMD	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,3	- 0,2	- 0,4 a 0,1	0,83	0,091
RETD	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,5	- 0,3	- 1,2 a 0,6	0,83	0,286
RID	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	- 0,1	- 0,8 a 0,6	0,73	0,518
RDIDE	8,1 ± 0,4	7,8 ± 0,5	0,3	0,0 a 0,6	0,66	0,050
RDIEM	89,5 ± 15,4	79,5 ± 20,7	10,0	- 10,0 a 30,0	0,55	0,164
RDIET	60,7 ± 4,7	52,3 ± 18,3	8,5	- 25,6 a 42,5	0,63	0,396
RINTESP	4,8 ± 1,2	5,3 ± 1,6	- 0,5	- 7,3 a 6,3	0,35	0,777

DTOT - diâmetro externo; ESP - espessura da túnica média; INT - espessura da túnica íntima; REMD - relação espessura da média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total / diâmetro externo; RID - relação espessura da íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total; RINTESP - relação espessura da íntima / espessura da média. Método estatístico: teste t de Student.

O Anexo XI representa esquematicamente as artérias construídas a partir dos valores médios dos elementos estruturais vasculares observados na tabela 18.

Observou-se aumento do número de artérias, sendo maior a sua quantidade nos pacientes por ocasião do transplante hepático. A diferença teve efeito de magnitude moderada a grande (TEP = 1,19), porém sem diferença estatisticamente significativa para $P = 0,05$. Todos os elementos estruturais das artérias hepáticas, embora sem diferenças estatisticamente significativas, mostraram valores mais altos por ocasião do transplante hepático.

Houve diferença estatisticamente significativa quanto à **RDIDE** nestes 7 casos durante o período entre a portoenterostomia e o transplante hepático ($P = 0,050$), com aparente diminuição da relação com o tempo. A magnitude da diferença foi moderada (TEP = 0,66). A **REMD** aumentou, embora sem significância estatística para $P = 0,05$, mas com efeito da diferença de magnitude moderada ($P = 0,091$ e TEP = 0,83). O mesmo ocorreu com o valor da **RETD**, superior por ocasião do transplante ($P = 0,286$ e TEP = 0,83).

- **Terceira etapa: Comparação das alterações dos ramos arteriais hepáticos em casos de atresia biliar transplantados e pacientes transplantados por outras hepatopatias**

Nos 4 outros pacientes transplantados sem AB, foram quantificados os elementos estruturais dos ramos vasculares hepáticos de 66 arteríolas e 17 artérias. A figura 15 apresenta a proliferação do plexo vascular peribiliar em paciente transplantado por causa distinta de AB. As tabelas a seguir comparam os achados destes pacientes com os dos casos transplantados por AB.

A figura 17 apresenta a proliferação do plexo vascular peribiliar em paciente transplantado por outra hepatopatia.

6 - Resultados

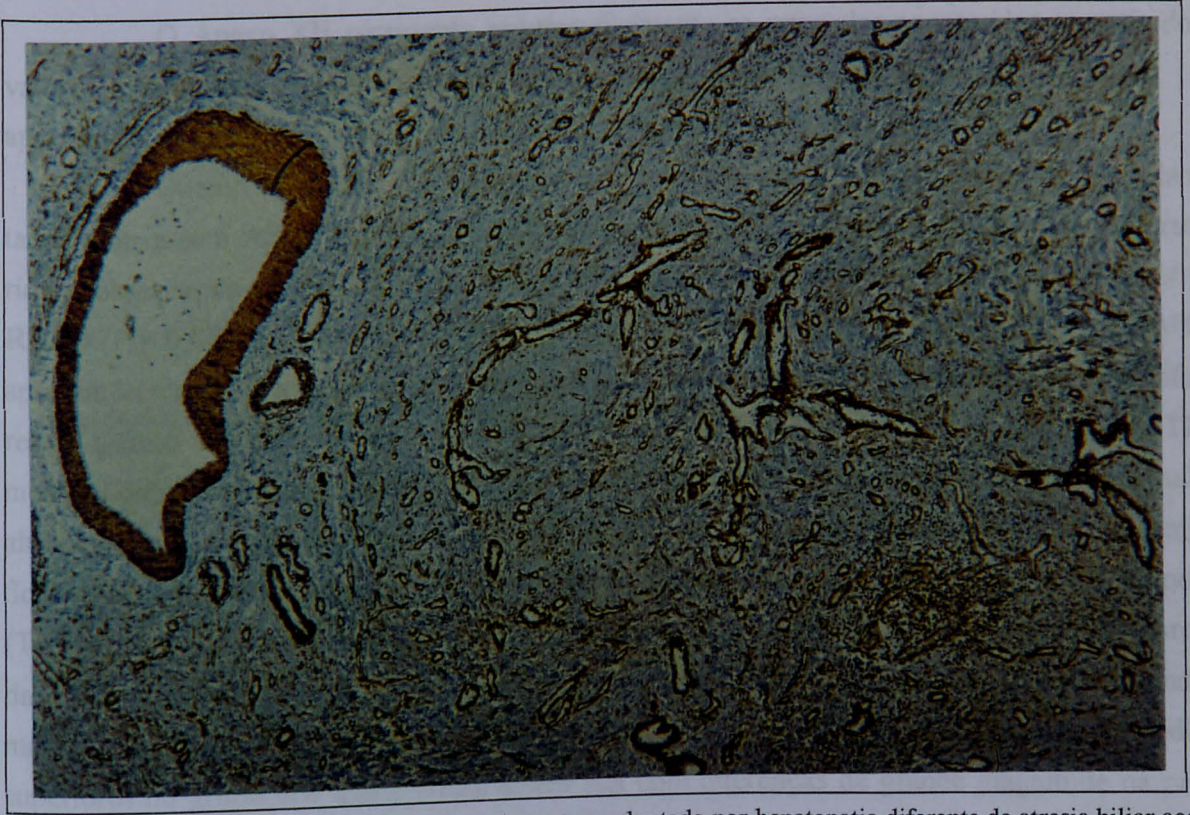


Fig. 17 -Proliferação do plexo vascular em paciente transplantado por hepatopatia diferente de atresia biliar aos 36 meses de idade. (Aumento de 40x. Imunoistoquímica com HHF-35)

Tabela 19 - Alterações vasculares arteriulares segundo os grupos de atresia biliar transplantados e pacientes transplantados por outras hepatopatias

Característica	Transplantados		Diferença	IC 95%	TEP	P
	Com atresia biliar (n = 7)	Sem atresia biliar (n = 4)				
Número de vasos	18,0 ± 3,0	16,5 ± 4,1	1,5	- 3,3 a 6,3	0,44	0,501
Elementos						
DTOT	51,8 ± 11,1	44,7 ± 8,9	7,1	- 7,6 a 21,9	0,68	0,302
ESP	9,3 ± 2,7	6,0 ± 1,8	3,4	- 0,9 a 6,8	1,35	0,055
INT	5,3 ± 1,1	3,4 ± 0,3	1,9	0,9 a 2,9	2,08	0,003
Relações						
REMD	1,9 ± 0,4	1,5 ± 0,2	0,4	0,0 a 0,9	1,15	0,050
RETD	3,0 ± 0,4	2,4 ± 0,1	0,6	0,3 a 1,0	1,81	0,003
RID	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,2	< 0,1 a 0,4	1,15	0,069
RDIDE	6,2 ± 0,7	7,1 ± 0,4	- 0,9	- 1,8 a 0,0	1,46	0,050
RDIEM	38,8 ± 10,3	56,7 ± 10,7	- 17,9	- 32,7 a - 3,1	1,72	0,023
RDIET	23,6 ± 5,4	34,7 ± 3,1	- 11,1	- 17,9 a - 4,3	2,33	0,005
RINTESP	6,2 ± 1,3	6,5 ± 1,9	- 0,3	- 2,4 a 1,9	0,20	0,770

DTOT - diâmetro externo; ESP - espessura da túnica média; INT - espessura da túnica íntima; REMD - relação espessura da média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total / diâmetro externo; RID - relação espessura da íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total; RINTESP - relação espessura da íntima / espessura da média. Método estatístico: teste t de Student.

O Anexo XII representa esquematicamente as arteríolas construídas a partir dos valores médios dos elementos estruturais vasculares observados na tabela 19. A figura 17 apresenta a proliferação vascular em paciente transplantado por outra hepatopatia.

Quanto ao número de arteríolas por paciente, os grupos de pacientes transplantados com e sem AB não diferiram. Quanto às relações entre elementos estruturais de arteríolas, observaram-se diferenças estatisticamente significativas quanto a **REMD** ($P = 0,050$), **RETD** ($P = 0,003$), **RDIDE** ($P = 0,05$), **RDIEM** ($P = 0,02$) e **RDIET** ($P = 0,005$). A **REMD** apresentou valores mais elevados entre os transplantados com AB, sendo a magnitude da diferença, quanto aos transplantados sem AB, entre moderada e grande ($TEP = 1,15$). A **RETD** mostrou diferença entre os dois grupos de magnitude grande ($TEP = 1,81$), com valores mais altos entre os transplantados com AB. A **RID**, embora sem diferença estatisticamente significativa para $P = 0,05$, apresentou diferença de magnitude moderada a grande entre os grupos ($TEP = 1,15$), sendo superior a média dos transplantados com AB. Por outro lado, os valores da **RDIDE** foram maiores entre os transplantados sem AB, e essa diferença foi de grande magnitude ($TEP = 1,46$). Também quanto a **RDIEM** e **RDIET** ocorreram valores de média superiores no grupo dos transplantados sem AB com diferenças de grande magnitude na primeira ($TEP = 1,72$) e muito grande na segunda ($TEP = 2,33$). A **RINTESP**, porém, não apresentou diferença entre os dois grupos ($P = 0,770$; $TEP = 0,20$).

Tabela 20 - Alterações vasculares arteriais segundo os grupos de atresia biliar transplantados e pacientes transplantados por outras hepatopatias

Característica	Transplantados		Diferença	IC 95%	TEP	P
	Com atresia biliar (n = 6)	Sem atresia biliar (n = 4)				
Número de vasos	3,8 ± 1,5	4,3 ± 1,5	-0,4	-2,6 a 1,8	0,33	0,675
Elementos						
DTOT	152,6 ± 37,6	243,5 ± 39,7	-90,8	-148,0 a -33,6	2,37	0,006
ESP	16,1 ± 4,2	14,1 ± 4,9	2,0	-4,7 a 8,7	0,45	0,517
INT	7,6 ± 1,4	5,1 ± 1,0	2,5	0,6 a 4,3	1,98	0,015
Relações						
REMD	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,4	0,1 a 0,8	2,50	0,016
RETD	1,6 ± 0,4	0,8 ± 0,3	0,8	0,3 a 1,2	2,19	0,006
RID	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,3	0,1 a 0,5	1,77	0,005
RDIDE	7,9 ± 0,4	8,8 ± 0,5	-0,9	-1,6 a -0,2	2,04	0,016
RDIEM	82,2 ± 19,1	184,1 ± 122,3	-101,9	-298,0 a 94,2	1,33	0,194
RDIET	53,9 ± 13,0	121,1 ± 56,4	-67,2	-158,5 a 24,1	1,86	0,095
RINTESP	5,3 ± 1,3	4,4 ± 2,2	0,9	-1,7 a 3,4	0,53	0,459

DTOT - diâmetro externo; ESP - espessura da túnica média; INT - espessura da túnica íntima; REMD - relação espessura da média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total / diâmetro externo; RID - relação espessura da íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total; RINTESP - relação espessura da íntima / espessura da média. Método estatístico: teste t de Student.

O Anexo XIII representa esquematicamente as artérias construídas a partir dos valores médios dos elementos estruturais vasculares constantes da tabela 20.

Na comparação das artérias dos grupos transplantados com e sem AB, não se observou diferença estatisticamente significativa no que diz respeito ao número de artérias por paciente. No tocante às relações entre elementos estruturais das artérias hepáticas, constataram-se diferenças estatisticamente significativas quanto à **REMD** ($P = 0,016$), **RETD** ($P = 0,006$), **RID** ($P = 0,005$) e **RDIDE** ($P = 0,016$). A **REMD** apresentou valor superior nos pacientes com AB transplantados, sendo muito grande ($TEP = 2,50$) a magnitude da diferença. A **RETD** demonstrou diferença de magnitude muito grande ($TEP = 2,19$) entre os dois grupos, sendo mais elevados os valores dos pacientes com AB. O valor da **RID** mostrou diferença de magnitude entre grande e muito grande ($TEP = 1,77$) entre as médias dos grupos, sendo maior nos pacientes transplantados por AB. Por outro lado, o valor da **RDIDE** foi superior nos transplantados sem AB, apresentando magnitude muito grande ($TEP = 2,04$) a diferença entre os dois grupos. A **RDIEM** e a **RDIET** também mostraram valores superiores nos pacientes sem AB, sendo, em ambas as situações, grande a magnitude das diferenças entre os grupos ($TEP = 1,33$ e $TEP = 1,86$ respectivamente).

6.4 - Relações entre as Variáveis

A seguir são apresentadas as tabelas que relacionam as diversas variáveis estudadas. A tabela 21 relaciona a presença de MPD e a classificação por faixas etárias dos casos.

Tabela 21 - Relações entre achados histológicos nas estruturas biliares e faixas etárias no grupo de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia

Variável	Dias de vida			P
	< 60 (n = 11)	61 - 90 (n = 16)	> 90 (n = 20)	
Malformação de placa ductal				
Presente	5 (46)	8 (50)	13 (65)	0,503
Ducto biliar maduro				
Presente	11 (100)	16 (100)	17 (85)	0,115
Focal	1 (9)	7 (44)	2 (12)	0,042
Difusa	10 (91)	9 (56)	15 (88)	
Proliferação ductular				
Focal	3 (27)	6 (37)	12 (60)	0,167
Difusa	8 (73)	10 (63)	8 (40)	

Método estatístico: Qui-quadrado

A distribuição da MPD nos 26 casos de AB pareceu apresentar uma distribuição crescente com o aumento das faixas etárias, mas não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre as três faixas etárias ($P = 0,503$).

Não houve relação entre a presença de DBMs e a classificação etária ($P = 0,115$). Houve diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias quanto à distribuição de DBMs ($P = 0,042$). A distribuição focal destacou-se nos casos com idade entre 61 e 90 dias de vida, enquanto a distribuição difusa foi mais intensa nos pacientes com menos de 60 dias de vida e nos com mais de 90 dias. Esta relação pareceu ser espúria, do ponto de vista estatístico.

A distribuição focal da proliferação ductular pareceu crescer de acordo com o aumento das faixas etárias dos casos, enquanto a forma difusa manteve-se homogênea em relação a esta classificação. Não houve, porém, relação estatisticamente significativa entre a distribuição da proliferação ductular e a classificação etária por ocasião da portoenterostomia ($P = 0,167$).

A tabela 22 indica as relações dos achados histológicos nas estruturas biliares e o prognóstico nos casos cuja evolução pôde ser acompanhada no pós-operatório da cirurgia de Kasai.

Tabela 22 - Relações entre achados histológicos nas estruturas biliares e prognóstico nos casos de atresia biliar acompanhados em ambulatório

Variável	Prognóstico		P
	Morto ou transplantado (n = 19)	Vivo não transplantado (n = 15)	
Malformação de placa ductal			
Presente	12 (60)	8 (40)	0,563
Ducto biliar maduro			
Presente	17 (90)	14 (93)	0,693
Focal	4 (23)	4 (29)	0,750
Difusa	13 (77)	10 (71)	
Proliferação ductular			
Focal	11 (58)	5 (33)	0,154
Difusa	8 (42)	10 (67)	

Método estatístico: Qui-quadrado

Não foi possível identificar diferença estatisticamente significativa quanto ao prognóstico entre casos com e sem MPD ($P = 0,563$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre casos com e sem DBM no tocante ao prognóstico ($P = 0,693$). Apenas três pacientes com AB sem DBM nos espaços-porta puderam ser comparados. Não houve relação estatisticamente significativa entre a distribuição dos DBMs em espaços-porta e o prognóstico dos casos acompanhados em ambulatório ($P = 0,750$) nem entre a distribuição da proliferação ductular e o prognóstico dos casos acompanhados em ambulatório ($P = 0,154$).

A tabela 23 caracteriza a densidade de colágeno segundo os grupos de AB por ocasião da portoenterostomia e controles.

Tabela 23 - Características da densidade de colágeno segundo os grupos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles

Característica	Atresia biliar		Controles			P
	Sem AEH (n = 38)	Com AEH (n = 9)	Fetos (n = 7)	Lactentes (n = 7)	CIH (n = 3)	
Densidade de colágeno (Porcentagem da superfície)	6,56 ± 4,12 ^a	6,47 ± 2,65 ^a	0,03 ± 0,03 ^b	0,01 ± 0,01 ^b	1,29 ± 1,06 ^b	< 0,001

AEH - anomalia congênita extra-hepática associada à atresia biliar. Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativas. Método estatístico: ANOVA

A densidade de colágeno foi praticamente igual (TEP = 0,02) entre os dois grupos de AB, mas bastante distinta na comparação entre o grupo dos casos e os controles. Nos grupos de AB a média da densidade de colágeno foi de 6,55% ± 3,86% do total da superfície histológica, enquanto entre os controles sem hepatopatia a média foi de 0,02% ± 0,02%; entre os pacientes com colestase intra-hepática foi de 1,29% ± 1,06%. A magnitude da diferença entre casos e controles sem hepatopatia foi muito grande (TEP = 2,17), e entre casos e controles com colestase intra-hepática foi grande (TEP = 1,37), sendo a diferença estatisticamente significativa (P < 0,001).

A tabela 24 relaciona os achados histológicos nas estruturas biliares e a densidade de colágeno nos casos de AB.

Tabela 24 - Relação entre os achados histológicos nas estruturas biliares e a densidade de colágeno no grupo de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia

Variável	Densidade de colágeno	Diferença	IC 95%	TEP	P
Malformação de placa ductal					
Presente (n = 26)	7,1 ± 4,2	1,2	- 1,1 a 3,5	0,31	0,291
Ausente (n = 21)	5,9 ± 3,4				
Ducto biliar maduro					
Ausente (n = 3)	11,0 ± 10,6	- 4,8	- 31,1 a 21,5	1,30	0,514
Presente (n = 44)	6,2 ± 3,0				
Focal (n = 10)	7,1 ± 4,5	1,1	- 1,2 a 3,3	0,36	0,345
Difusa (n = 34)	6,0 ± 2,5				
Proliferação ductular					
Focal (n = 21)	6,7 ± 4,6	0,4	- 1,9 a 2,7	0,08	0,735
Difusa (n = 26)	6,4 ± 3,3				

Método estatístico: teste t de Student.

A comparação dos casos com e sem MPD quanto à densidade de colágeno no material de biópsia não mostrou diferença estatisticamente significativa entre eles ($P = 0,291$).

Apenas três casos sem DBM em espaços-porta puderam ser comparados. A média destes casos foi superior à dos casos com DBM, mas houve ampla variação dos valores da densidade de colágeno, especialmente dos casos sem ductos maduros. A magnitude da diferença entre os dois grupos foi grande ($TEP = 1,30$), sendo superior o valor da densidade de colágeno nos casos de AB sem DBM. Não houve relação estatisticamente significativa entre estas variáveis ($P = 0,514$). A diferença na densidade de colágeno não foi estatisticamente significativa também quanto à distribuição focal ou difusa de DBM em espaços-porta ($P = 0,345$), tampouco em relação à distribuição da proliferação ductular ($P = 0,735$).

• **Correlação entre idade por ocasião da portoenterostomia, densidade de colágeno, número de vasos e elementos estruturais dos ramos arteriais hepáticos e suas relações nos casos de atresia biliar**

A tabela 25 apresenta a correlação entre idade por ocasião da portoenterostomia, densidade de colágeno e elementos estruturais das arteríolas hepáticas e suas relações entre os casos da AB.

Tabela 25 - Correlação entre idade por ocasião da portoenterostomia, densidade de colágeno, número de vasos e elementos estruturais das arteríolas e suas relações no grupo de atresia biliar

Variável	Idade	Densidade de colágeno	Número de vasos
Densidade de colágeno	0,37 (0,011)		
Número de vasos	- 0,06 (0,667)	- 0,00 (0,983)	
Diâmetro externo	0,12 (0,437)	0,28 (0,059)	- 0,36 (0,014)
Espessura da média	- 0,19 (0,192)	0,14 (0,349)	- 0,25 (0,089)
Espessura da íntima	- 0,10 (0,507)	- 0,05 (0,718)	- 0,21 (0,159)
REMD	- 0,33 (0,024)	- 0,11 (0,470)	0,11 (0,446)
RETD	- 0,37 (0,010)	- 0,25 (0,086)	0,16 (0,291)
RID	- 0,18 (0,223)	- 0,29 (0,052)	0,11 (0,454)
RDIDE	0,31 (0,035)	0,23 (0,120)	- 0,07 (0,624)
RDIEM	0,34 (0,018)	0,23 (0,119)	- 0,04 (0,814)
RDIET	0,38 (0,009)	0,35 (0,017)	- 0,09 (0,553)
RINTESP	0,07 (0,649)	- 0,16 (0,289)	0,09 (0,546)

REMD - relação espessura da túnica média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total da parede / diâmetro externo; RID - relação espessura da túnica íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da túnica média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total da parede; RINTESP - relação espessura da túnica íntima / espessura da túnica média.

P- entre parênteses. Método estatístico: coeficiente de correlação de Spearman.

A idade por ocasião da portoenterostomia correlacionou positiva e moderadamente com a densidade de colágeno ($r = 37\%$). Houve correlação negativa moderada entre a idade e a **REMD** ($r = -33\%$) e a **RETD** ($r = -37\%$). Houve correlação positiva moderada entre idade e a **RDIEM** ($r = 34\%$) e a **RID** ($r = 31\%$), bem como a **RDIET** ($r = 38\%$). Quanto à densidade de colágeno, a única correlação existente foi positiva moderada e ocorreu com **RDIET** ($r = 35\%$). O número de arteríolas por paciente apresentou correlação negativa moderada com o diâmetro externo dos vasos ($r = -36\%$).

A tabela 26 apresenta as correlações entre idade por ocasião da portoenterostomia, densidade de colágeno, número de vasos e elementos estruturais das artérias hepáticas e suas relações no grupo de AB.

Tabela 26 - Correlação entre idade por ocasião da portoenterostomia, densidade de colágeno, número de vasos e elementos estruturais das artérias hepáticas e suas relações no grupo de atresia biliar

Variável	Idade	Densidade de colágeno	Número de vasos
Densidade de colágeno	0,37 (0,011)		
Número de vasos	- 0,03 (0,866)	0,28 (0,126)	
Diâmetro externo	- 0,29 (0,108)	0,07 (0,686)	0,26 (0,157)
Espessura da média	- 0,29 (0,108)	- 0,01 (0,958)	0,31 (0,083)
Espessura da íntima	- 0,06 (0,749)	0,16 (0,373)	0,06 (0,746)
REMD	- 0,20 (0,279)	- 0,06 (0,752)	0,20 (0,281)
RETD	- 0,12 (0,503)	- 0,03 (0,860)	0,13 (0,466)
RID	0,12 (0,528)	0,05 (0,799)	- 0,08 (0,666)
RDIDE	- 0,06 (0,752)	0,02 (0,916)	- 0,29 (0,149)
RDIEM	0,10 (0,636)	0,09 (0,655)	- 0,24 (0,224)
RDIET	- 0,11 (0,576)	0,06 (0,772)	- 0,18 (0,370)
RINTESP	0,41 (0,021)	0,12 (0,519)	- 0,23 (0,205)

REMD - relação espessura da túnica média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total da parede / diâmetro externo; RID - relação espessura da túnica íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da túnica média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total da parede; RINTESP - relação espessura da túnica íntima / espessura da túnica média.

P- entre parênteses. Método estatístico: coeficiente de correlação de Spearman.

A idade por ocasião da portoenterostomia correlacionou apenas, de modo positivo e moderado, com a **RINTESP** ($r = 41\%$) e com a densidade de colágeno conforme previamente descrito. Esta última variável, por sua vez, não se correlacionou com qualquer outro elemento ou relação das estruturas arteriais. O número de artérias por paciente e a espessura da túnica média correlacionaram-se de modo positivo e moderado ($r = 31\%$), porém com valor de P limítrofe ($P = 0,083$).

• **Relação das características vasculares arteriais hepáticas e prognóstico nos casos de atresia biliar**

A seguir são apresentadas tabelas que avaliam a correspondência entre as características vasculares arteriais e arteriolares e o prognóstico dos casos.

A tabela 27 avalia a correspondência entre as alterações vasculares arteriolares hepáticas e o prognóstico.

Tabela 27 – Relação das alterações vasculares arteriolares hepáticas no grupo de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e o prognóstico

Característica	Prognóstico		Diferença	IC 95%	TEP	P
	Morto ou transplantado (n= 19)	Vivo não transplantado (n= 15)				
Número de vasos	17,2 ± 8,7	16,9 ± 4,3	0,3	- 4,7 a 5,4	0,04	0,890
Elementos						
DTOT	43,5 ± 7,0	42,0 ± 8,1	1,5	- 3,7 a 6,8	0,20	0,558
ESP	6,6 ± 0,9	6,7 ± 1,6	- 0,1	- 1,1 a 0,9	0,08	0,843
INT	4,3 ± 0,8	4,1 ± 0,8	0,2	- 0,4 a 0,7	0,25	0,571
Relações						
REMD	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,3	- 0,1	- 0,2 a 0,1	0,40	0,714
RETD	2,7 ± 0,3	2,7 ± 0,3	- 0,1	- 0,2 a 0,2	0,03	0,895
RID	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1	< 0,1	- 0,1 a 0,1	0,05	0,777
RDIDE	6,8 ± 0,5	6,7 ± 0,6	0,1	- 0,3 a 0,4	0,18	0,727
RDIEM	46,1 ± 11,9	44,9 ± 11,4	1,3	- 7,0 a 9,5	0,10	0,755
RDIET	27,7 ± 6,8	26,7 ± 5,2	1,0	- 3,3 a 5,3	0,16	0,646
RINTESP	6,8 ± 1,6	6,7 ± 1,6	0,2	- 1,0 a 1,3	0,06	0,770

DTOT - diâmetro externo; ESP - espessura da túnica média; INT - espessura da túnica íntima; REMD - relação espessura da média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total / diâmetro externo; RID - relação espessura da íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total; RINTESP - relação espessura da íntima / espessura da média. Método estatístico: teste t de Student.

Não houve correspondência entre as alterações vasculares arteriolares hepáticas e o prognóstico dos casos de AB.

A tabela 28 avalia correspondência entre as alterações vasculares arteriais hepáticas e o prognóstico.

Tabela 28 - Relação das alterações arteriais hepáticas no grupo de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e o prognóstico

Característica	Prognóstico		Diferença	IC 95%	TEP	P
	Morto ou transplantado (n = 13)	Vivo não transplantado (n = 10)				
Número de vasos	2,6 ± 2,1	2,5 ± 2,5	0,1	- 1,9 a 2,1	0,04	0,906
Elementos						
DTOT	148,2 ± 26,9	161,9 ± 42,0	- 13,7	- 43,7 a 16,2	0,40	0,351
ESP	13,8 ± 4,5	16,3 ± 3,8	- 2,5	- 6,2 a 1,2	0,59	0,173
INT	5,7 ± 0,8	5,7 ± 1,2	- 0,1	- 0,9 a 0,9	0,01	0,987
Relações						
REMD	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2	- 0,1	- 0,3 a 0,1	0,50	0,258
RETD	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,3	- 0,1	- 0,3 a 0,1	0,40	0,436
RID	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	< 0,1	- 0,1 a 0,1	0,00	0,748
RDIDE *	8,2 ± 0,4	8,2 ± 0,4	- 0,1	- 0,5 a 0,3	0,00	0,616
RDIEM *	94,9 ± 26,0	100,5 ± 27,8	- 5,6	- 31,8 a 20,6	0,21	0,658
RDIET *	64,5 ± 12,3	69,3 ± 14,5	- 4,8	- 17,7 a 8,1	0,36	0,443
RINTESP *	4,6 ± 1,5	4,0 ± 1,3	0,6	- 0,6 a 1,9	0,42	0,282

DTOT - diâmetro externo; ESP - espessura da túnica média; INT - espessura da túnica íntima; REMD - relação espessura da média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total / diâmetro externo; RID - relação espessura da íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total; RINTESP - relação espessura da íntima / espessura da média.

* N de vivos e não transplantados = 7. Método estatístico: teste t de Student.

Não houve correspondência entre as alterações vasculares arteriais hepáticas e o prognóstico dos casos de AB.

• **Relação das características vasculares arteriais e arteriolas hepáticas e as variáveis do estudo histológico das estruturas biliares**

O único achado histológico observado por ocasião da portoenterostomia a relacionar-se com as alterações vasculares, especificamente arteriais, foi a distribuição dos DBMs em espaços-porta. Tal associação não ocorreu em relação às arteriolas. Proliferação ductular ocorreu em todos os casos de AB e, portanto, não foi possível a comparação entre grupos. MPD, distribuição de proliferação ductular e a presença de DBMs não se relacionaram com alterações vasculares em ramos da artéria hepática.

A tabela 29 apresenta a relação entre distribuição de DBMs em espaços-porta e alterações vasculares arteriais no grupo de AB por ocasião da portoenterostomia.

Tabela 29 - Relação entre alterações vasculares arteriais hepáticas e distribuição de ducto biliar maduro em espaços-porta no grupo de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia

Característica	Ducto biliar maduro		TEP	P
	Focal (n = 5)	Difuso (n = 25)		
Número de vasos	3,4 ± 2,2	2,1 ± 1,9	0,67	0,171
Elementos				
DTOT	148,0 ± 10,8	147,2 ± 35,2	0,02	0,962
ESP	18,3 ± 4,5	14,0 ± 4,5	0,96	0,062
INT	6,6 ± 1,3	5,4 ± 1,1	1,06	0,037
Relações				
REMD	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,2	0,84	0,022
RETD	1,7 ± 0,5	1,3 ± 0,3	1,19	0,022
RID	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,00	0,202
RDIDE *	7,8 ± 0,8	8,1 ± 0,4	0,61	0,234
RDIEM *	83,9 ± 37,6	93,1 ± 25,6	0,33	0,517
RDIET *	57,3 ± 19,2	64,8 ± 14,1	0,50	0,329
RINTESP	4,1 ± 1,1	4,2 ± 1,4	0,07	0,830

DTOT - diâmetro externo; ESP - espessura da túnica média; INT - espessura da túnica íntima; REMD - relação espessura da média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total / diâmetro externo; RID - relação espessura da íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total; RINTESP - relação espessura da íntima / espessura da média.

* Número de casos com ducto biliar maduro difuso = 20. Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativas. Método estatístico: ANOVA.

A **REMD** apresentou média superior no grupo com distribuição focal de DBM, de forma estatisticamente significativa ($P = 0,022$) e com magnitude de diferença moderada ($TEP = 0,84$). A média da **RETD** também foi superior nos casos com distribuição focal de DBM, com diferença estatisticamente significativa ($P = 0,022$) e magnitude de diferença de moderada à grande ($TEP = 1,19$). Ainda, o valor da **RDIDE** foi superior nos casos com distribuição difusa de DBM ($TEP = 0,61$), embora com $P = 0,234$.

As tabelas 30 e 31 avaliam a influência da hipertensão arterial sistêmica sobre as alterações vasculares dos ramos da artéria hepática no grupo de AB por ocasião do transplante hepático.

Tabela 30 - Influência da hipertensão arterial sistêmica sobre as alterações vasculares arteriais hepáticas no grupo de atresia biliar por ocasião do transplante hepático

Característica	Transplantados com atresia biliar		Diferença	IC 95%	TEP	P
	Com hipertensão (n = 3)	Sem hipertensão (n = 4)				
Número de vasos	17,0 ± 3,6	18,8 ± 2,8	- 1,8	- 7,9 a 4,4	0,57	0,496
Elementos						
DTOT	58,8 ± 12,3	46,5 ± 7,7	12,3	- 7,0 a 31,5	1,25	0,163
ESP	10,0 ± 1,8	8,8 ± 3,4	1,2	- 4,5 a 6,8	0,42	0,612
INT	5,8 ± 1,6	5,0 ± 0,6	0,8	- 1,4 a 2,9	0,72	0,409
Relações						
REMD	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,5	- 0,2	- 0,9 a 0,6	0,49	0,588
RETD	2,8 ± 0,3	3,1 ± 0,4	- 0,3	- 1,0 a 0,5	0,83	0,407
RID	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2	- 0,1	- 0,4 a 0,2	0,50	0,496
RDIDE	6,4 ± 0,4	6,1 ± 0,9	0,3	- 1,1 a 1,8	0,40	0,588
RDIEM	40,3 ± 7,9	37,6 ± 12,8	2,7	- 19,2 a 24,5	0,24	0,766
RDIET	25,2 ± 5,0	22,4 ± 6,1	2,9	- 8,3 a 14,1	0,49	0,537
RINTESP	5,9 ± 0,6	6,4 ± 1,7	- 0,4	- 3,2 a 2,3	0,36	0,696

DTOT - diâmetro externo; ESP - espessura da túnica média; INT - espessura da túnica íntima; REMD - relação espessura da média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total / diâmetro externo; RID - relação espessura da íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total; RINTESP - relação espessura da íntima / espessura da média. Método estatístico: teste t de Student.

As alterações vasculares arteriolares hepáticas não foram influenciadas pela hipertensão arterial sistêmica de forma estatisticamente significativa para $P < 0,05$, embora o valor da média da **RETD** tenha sido superior nos casos sem hipertensão arterial, com magnitude de diferença moderada (TEP = 0,83).

Tabela 31 - Influência da hipertensão arterial sistêmica sobre as alterações vasculares arteriais hepáticas no grupo de atresia biliar por ocasião do transplante hepático

Característica	Transplantados atresia biliar		Diferença	IC 95%	TEP	P
	Com hipertensão (n = 3)	Sem hipertensão (n = 3)				
Número de vasos	4,3 ± 0,6	3,3 ± 2,1	1,0	- 2,5 a 4,5	0,65	0,468
Elementos						
DTOT	157,7 ± 46,0	147,5 ± 36,7	10,2	- 84,2 a 104,5	0,25	0,779
ESP	17,2 ± 1,8	14,9 ± 6,1	2,4	- 7,9 a 12,6	0,51	0,556
INT	8,0 ± 1,5	7,1 ± 1,4	0,9	- 2,3 a 4,2	0,62	0,467
Relações						
REMD	1,1 ± 0,3	1,0 ± 0,2	0,1	- 0,4 a 0,7	0,39	0,583
RETD	1,7 ± 0,5	1,5 ± 0,2	0,2	- 0,67 a 1,0	0,53	0,591
RID	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,0	0,1	- 0,3 a 0,5	0,71	0,674
RDIDE	7,8 ± 0,5	8,0 ± 0,4	- 0,2	- 1,3 a 0,8	0,44	0,583
RDIEM	79,5 ± 20,7	84,9 ± 21,5	- 5,4	- 53,3 a 42,4	0,26	0,768
RDIET	52,3 ± 18,3	55,5 ± 9,0	- 3,2	- 36,0 a 29,5	0,22	0,797
RINTESP	5,3 ± 1,6	5,2 ± 1,4	0,1	- 3,2 a 3,5	0,07	0,918

DTOT - diâmetro externo; ESP - espessura da túnica média; INT - espessura da túnica íntima; REMD - relação espessura da média / diâmetro externo; RETD - relação espessura total / diâmetro externo; RID - relação espessura da íntima / diâmetro externo; RDIDE - relação diâmetro luminal / diâmetro externo; RDIEM - relação diâmetro luminal / espessura da média; RDIET - relação diâmetro luminal / espessura total; RINTESP - relação espessura da íntima / espessura da média. Método estatístico: teste t de Student.

As alterações vasculares arteriais hepáticas não foram influenciadas pela hipertensão arterial sistêmica de forma estatisticamente significativa para $P < 0,05$, embora a **RID** tenha apresentado média inferior nos casos sem hipertensão arterial, com magnitude de diferença moderada (TEP = 0,71).

7 - DISCUSSÃO

7 - DISCUSSÃO

7.1 - Caracterização da Amostra

7.1.1 - Pacientes com Atresia Biliar

Os dados da tabela 1 demonstraram que a média de idade situou-se acima de 60 dias de vida, em ambos os grupos de AB, sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Não houve também diferença quanto ao peso de nascimento entre os grupos, nem de peso ou de comprimento por ocasião do estudo. SILVEIRA *et al.* (1992) observaram que o peso de nascimento dos pacientes com AB foi similar ao da população em geral.

A idade dos pacientes em faixas etárias por ocasião da portoenterostomia (tabela 2) demonstrou uma distribuição crescente. A maioria dos pacientes com AB (77%) foi operada após 60 dias de vida e 43% dos casos submeteram-se à cirurgia com mais de 3 meses. Estes achados são semelhantes aos anteriormente relatados por nós (SANTOS, 1997) em relação a pacientes com colestase neonatal. Naquele estudo, cerca de 13% de 49 pacientes, incluindo casos de AB ($n = 24$) e com colestase intra-hepática ($n = 25$), realizaram biópsia hepática com menos de 8 semanas de vida, enquanto cerca de 47% deles foram submetidos ao procedimento entre 8 e 12 semanas, e o restante (40%), somente após 12 semanas. A média de idade do presente trabalho ($90,9 + 44,8$ dias de vida) é quase igual à observada entre os casos de AB por ocasião da biópsia hepática ($91,0 \pm 51,0$ dias de vida) no estudo anterior. Tais dados demonstram que se mantém o atraso no encaminhamento à investigação de pacientes com colestase neonatal ao centro especializado em nossa comunidade. Para que a correção cirúrgica da AB tenha sucesso torna-se necessário obedecer a alguns quesitos (HOWARD, 1992). São fatores considerados universalmente de maior importância a experiência do cirurgião e a idade da criança por ocasião do procedimento. Quando a criança for operada após 60 dias de vida, a possibilidade de sucesso cai dramaticamente, o que foi demonstrado em diversas séries (BUJANOVER, 1987; GROSFELD *et al.*, 1989; MIELI-VERGANI *et al.*, 1989; OHI *et al.*, 1990; QUESTA *et al.*, 1993; CHARDOT *et al.*, 2001). O atraso no encaminhamento dos pa-

cientes com colestase neonatal à investigação em centro especializado tem ocorrido mesmo em locais com sabida competência em cirurgia pediátrica, como no Japão, onde, em 1987, Matsui observou que 2/3 dos médicos que avaliaram casos de AB em crianças com cerca de 30 dias de vida não reconheceram a icterícia colestática. Ele acredita que a intensidade da icterícia da AB, sendo, freqüentemente, menos óbvia do que aquela relacionada, por exemplo, ao leite materno, seria a causa do retardo na identificação da AB. MATSUI e DODORICKI (1985) utilizaram cartões com uma escala cromática relativa à cor das fezes de recém-nascido, visando alertar pais e profissionais quanto à ocorrência da acolia característica da AB. O método mostrou-se eficaz na detecção de AB naquela comunidade. No Reino Unido, TRIVEDI *et al.* constataram, em 1992, que a detecção tardia da colestase neonatal continuava sendo comum, em acima de 50% dos casos. Pesquisa anteriormente desenvolvida no *King's College Hospital*, em Londres, havia demonstrado que, dos 50 pacientes com AB consecutivamente operados entre 1985 e 1987, cerca de 40% foram referidos àquele centro após a oitava semana de vida. Entre as causas que motivaram esse retardo foram apontadas como as mais importantes: a) manejo incorreto pelos pediatras que, observando o bom estado nutricional dos pacientes, julgaram pouco significativa a icterícia; b) repetidas consultas pediátricas para avaliar “icterícia fisiológica” e “icterícia por leite materno” e c) apreciação errônea dos níveis de bilirrubinas séricas. Após esse trabalho, os autores recomendaram triagem de bilirrubinúria e dosagem de bilirrubina de reação direta no sangue periférico em neonatos ictericos com mais de 14 dias de vida, visando detectar precocemente colestase neonatal. Sugeriram, então, uma mudança na rotina de encaminhamento das crianças, devendo a revisão médica, feita habitualmente na sexta semana de vida, passar para a quarta, o que já tinha sido provado útil no Japão (HAYS e KIMURA, 1980). Recentemente, McKIERNAN *et al.* (2000) avaliaram a evolução dos pacientes com AB no Reino Unido e Irlanda, observando que a implementação das mudanças de rotina acima descritas redundaram em redução da idade por ocasião da cirurgia de Kasai naqueles países, de 63 para 54 dias de vida, mantendo-se em apenas 5% a porcentagem de casos operados após 12 semanas de idade. Melhorou a evolução pós-portoenterostomia, com aumento da porcentagem de pacientes anictéricos no pós-operatório, desde os 33% observados em estudos anteriores a 55% na última pesquisa. Os autores identificaram como fator prognóstico principal na evolução da cirurgia de Kasai a experiência com esse tipo de cirurgia nos distintos centros cirúrgicos, sendo melhor o prognóstico dos casos operados em serviços que a realizam 5 ou mais vezes por ano.

Quanto ao gênero, o fato de não havermos encontrado diferença na ocorrência de AB entre meninos e meninas (tabela 3) concorda com amplos estudos populacionais (CHARDOT *et al.*, 1999; McKIERNAN *et al.*, 2000). Considerando-se, ainda, os subgrupos de AB com e sem AEH, também não houve diferenças entre eles quanto a esta variável (tabela 3). DIMMICK (1975) relatou maior incidência da síndrome malformativa esplênica associada à AB em meninas. Na presente amostra, 2 dos 3 casos com anomalia da seqüência de lateralidade completa foram meninos, bem como o paciente com má-rotação intestinal isolada. SILVEIRA *et al.* (1992) observaram uma razão de 0,93 entre 237 meninos e meninas com AB avaliados no *King's College Hospital* de Londres, não havendo diferenças entre os casos com e sem AEH em relação ao gênero.

Também é importante frisar que não houve diferença estatisticamente significativa quanto à idade entre os casos de AB, controles sem hepatopatia e com colestase intra-hepática (tabela 6), o que demonstrou a semelhança dos casos e controles quanto a esta variável.

7.1.2 - Controles

A avaliação histológica constou de três etapas, cada qual com distintos grupos de controles. A primeira (tabelas 12 a 16) visou caracterizar as estruturas biliares e arteriais em pacientes com AB por ocasião da portoenterostomia, comparando-as com as de pacientes sem hepatopatia e com colestase intra-hepática com idade semelhante. Em relação aos lactentes sem hepatopatia, o presente estudo confirmou a afirmação de CRAWFORD *et al.* (1998) que, estudando as estruturas hepáticas de adultos normais por método morfométrico, observaram que a presença de artérias com diâmetro externo igual ou superior a 100 μm foi evento raro. No material histológico dos 7 lactentes sem hepatopatia que avaliamos, obtivemos apenas 4 artérias (tabelas 14 e 16). A escassez de artérias no material histológico da periferia hepática nestes controles, porém, não prejudicou as comparações, já que foi possível caracterizar diferenças entre os grupos de casos e estes controles de forma adequada (tabelas 14 e 16). Por certo, novos estudos estão indicados para melhorar a caracterização das medidas dos elementos vasculares tanto em casos de AB quanto em lactentes sem hepatopatia.

Como a patogenia da AB tem sido relacionada a condições mórbidas incidentes no estágio fetal, foram utilizados controles fetos nesta primeira etapa, visando observar o de-

envolvimento normal das estruturas biliares e arteriais, e compará-los com casos de AB e lactentes sem hepatopatia.

Por outro lado, como os achados histológicos de AB e colestase intra-hepática são superponíveis (DAHMS, 1991; ZERBINI *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 1998), especialmente em relação à hepatite neonatal idiopática, sendo inclusive sugerida uma etiopatogenia comum para ambas as desordens (LANDING, 1974), considerou-se adequado realizar comparação do material histológico de pacientes com colestase intra-hepática e de casos de AB em relação às estruturas vasculares. A necessidade de ampla amostra de tecido hepático para a realização do estudo histológico, porém, fez com que apenas pacientes com colestase intra-hepática submetidos a biópsia em cunha fossem incluídos. Devido à raridade da realização desse tipo de biópsia neste grupo de pacientes, o seu número foi reduzido ($n = 3$).

Na segunda etapa (tabelas 17 e 18), que constou da avaliação apenas das estruturas vasculares nos pacientes com AB submetidos a transplante hepático, foram utilizados os dados morfométricos por ocasião do procedimento na comparação com os obtidos quando da portoenterostomia, tentando assim evidenciar a progressão das alterações vasculares ao longo dos meses que antecederam o transplante.

A terceira etapa (tabelas 19 e 20), em que foi feita a comparação dos dados destes últimos sete casos com os de um grupo de pacientes com idade semelhante (tabela 7), submetidos ao transplante por causas diversas de AB, objetivou esclarecer se as alterações vasculares que procuramos detectar seriam características da AB ou relacionadas à hipertensão porta presente em ambos os grupos.

Em relação aos fetos e lactentes sem hepatopatia, observou-se que, em cada um dos grupos, ocorreram anomalias congênicas maiores em cerca de 30% deles (Anexo VI). Entre os fetos identificaram-se 1 paciente com comunicação interatrial e outro com múltiplas anomalias. Entre os lactentes sem hepatopatia, havia 1 paciente com comunicação interventricular e outro com genitália ambígua e hipospádia. A prevalência de anomalias congênicas foi elevada nos pacientes sem hepatopatia e mesmo superior à encontrada na amostra com AB, o que é compreensível já que eles faleceram durante a vida fetal ou nos primeiros dias/semanas de vida, não representando a frequência de anomalias congênicas da população de crianças híginas, que é de cerca de 3% segundo KALTER e WARKANY (1983 e 1983 I).

7.1.3 - Anomalias Congênitas em Pacientes com Atresia Biliar

A frequência de casos com anomalias congênitas em nossa amostra de AB (tabela 1), com valor de 19%, é concordante com as registradas por diversos autores (SILVEIRA, 1988). A distribuição dos casos de AB com anomalias congênitas, segundo a classificação proposta por CARMÍ *et al.* (1993) (tabela 4) foi semelhante à descrita por eles: a maioria dos casos com anomalias congênitas associadas à AB incluiu-se no grupo “não-sindrômico” (56% destes casos e cerca de 11% do total de pacientes com AB); para eles as frequências foram 59% e 12% respectivamente. Integraram o grupo de anomalia de lateralidade completa 33% dos casos com AEH (6,4 % do total de casos com AB); no estudo de CARMÍ *et al.* (1993) este padrão envolveu 29% dos casos com anomalias congênitas e 6% dos pacientes com AB. Manifestações parciais da anomalia de lateralidade podem explicar a inexistência de polisplenia em nossa amostra. Outras anormalidades, como *situs inversus* abdominal, fígado mediano, isomerismo atrial, anormalidade de posição da aorta e da veia porta, além de dextrocardia, foram indicativas da existência da anomalia de lateralidade nos casos do presente estudo. Segundo CARMÍ *et al.* (1993) *situs inversus* óbvio ou sugerido por fígado mediano, anomalias vasculares tais como veia cava inferior ausente, anomalias da artéria hepática e veia porta pré-duodenal, bem como lobação pulmonar anormal devem ser consideradas dentro do espectro das anomalias da seqüência de lateralidade mesmo na ausência de polisplenia, razão pela qual, conforme já referido, aqueles autores sugeriram a denominação “anomalia da seqüência de lateralidade associada à AB”, ao invés de “síndrome malformativa esplênica associada à AB”, até então empregada. Estudos em animais (YOKOYAMA *et al.*, 1993; MORISHIMA *et al.*, 1998; MAZZIOTTI *et al.* 1999) têm propiciado uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos nos casos de AB com alteração da seqüência de lateralidade, que no presente estudo envolveu cerca de 9% do total amostra de AB, ao incluirmos o paciente com a forma incompleta. Segundo CHANDRA (1974) e SILVEIRA (1988), o grupo com característica de síndrome malformativa esplênica da AB estaria associado a distúrbios na organogênese, por ação de fator ambiental, em torno da 5ª semana gestacional. Nesse período ocorre o desenvolvimento mais ou menos concomitante dos folhetos endocárdicos, da árvore brônquica, do sistema biliar extra-hepático e de algumas conexões vasculares abdominais; as alterações presentes na síndrome malformativa esplênica da AB envolvem justamente essas estruturas (SILVEIRA, 1988).

A caracterização da amostra de anomalias congênitas maiores de acordo com os sistemas orgânicos (tabela 5) demonstrou comprometimento cardiovascular (48% do total de anomalias), envolvendo o coração e vasos maiores intra-abdominais, genitourinário (29% das anomalias) e digestivo (19% das anomalias). No estudo de SILVEIRA *et al.* (1991), que incluiu 47 casos de AB com AEH, essas frequências foram, respectivamente, 60%, 13% e 47%. Além desses sistemas orgânicos, os autores registraram uma frequência de 40% de anomalias esplênicas, incluindo polisplenia, asplenia e baço acessório. Baço acessório em 2 casos de anomalia de lateralidade completa foi a única anormalidade esplênica encontrada em nossa amostra.

Um dos pacientes do grupo de anomalia de lateralidade completa (paciente 207) apresentou, além de dextrocardia, múltiplas atresias de delgado. A atresia de intestino delgado parece associar-se a um “acidente vascular fetal” nos estágios finais da gestação (SEASHORE, 1987). Má-rotação intestinal poderia levar ao comprometimento vascular (CARMI *et al.*, 1993). PADDOCK e ARENSMAN (1982) identificaram atresias múltiplas de delgado e jejuno em pacientes com má-rotação intestinal e anomalias da seqüência de lateralidade entre seus casos de AB. Segundo GUTTMAN *et al.* (1973), múltiplas atresias de alças intestinais, com ou sem má-rotação intestinal associada, contituem uma desordem hereditária, provavelmente de padrão autossômico recessivo. SEASHORE *et al.* (1987), avaliando pacientes com atresia jejunal familiar, observaram um caso de AB, o qual apresentou má-rotação intestinal associada.

Quanto ao grupo “não-sindrômico”, foram verificadas 9 anomalias congênitas, envolvendo apenas os sistemas genitourinário (67%) e cardiovascular (33%). No estudo de CARMI *et al.* (1993), no grupo “não-sindrômico” as anomalias cardiovasculares, renais e gastrointestinais somaram cada uma 28% do total das anomalias, destacando-se entre as últimas ocorrências do divertículo de Meckel.

Finalmente, a má-rotação intestinal tem sido encontrada em diversos casos de AB (VAZQUEZ *et al.*, 1995; NAKADA *et al.*, 1997; TANANO *et al.*, 1999). Sua presença isolada com ou sem anomalia da veia porta constitui, segundo CARMI *et al.* (1993), um grupo distinto, no qual ocorreria uma *forma frustra* da anomalia da seqüência de lateralidade. No presente estudo não foi vista anomalia de veia porta no caso com má-rotação intestinal isolada.

As discrepâncias entre as frequências de anomalias congênitas observadas no presente estudo, bem como de suas porcentagens na amostra de casos com AEH, e aquelas identificadas por outros autores devem-se provavelmente ao reduzido número de casos da presente

série. É importante considerar, ainda, que a detecção de anomalias congênitas aumenta com o maior detalhamento do estudo; por exemplo, a execução de autópsias nos casos investigados eleva o percentual de achados de 20% para 24% (SILVEIRA *et al.*, 1991). O presente estudo utilizou apenas investigações pré-operatórias clínica e de imagem, além da exploração cirúrgica, sem investigação *post mortem*. É provável, portanto, que tenha sido subestimada a frequência de anomalias congênitas maiores associadas aos casos de AB.

7.2 - Evolução dos Pacientes com Atresia Biliar

Os dados apresentados na tabela 8, embora não tenham demonstrado diferença estatisticamente significativa entre os grupos de AB com e sem AEH quanto à evolução pós-operatória em termos de mortalidade e realização de transplante, permitiram constatar que a distribuição dos pacientes quanto a estes critérios de prognóstico foi homogênea no grupo sem AEH (48% mortos ou transplantados, 52% vivos e não transplantados), ao passo que, entre os casos com AEH, 86% morreram ou submeteram-se a transplante (4 faleceram e 3 foram transplantados). A idade dos pacientes nos dois grupos não foi diferente do ponto de vista estatístico, não influenciando, portanto, tal discrepância (tabela 1). Entre os 3 casos com anomalia de lateralidade completa, 2 faleceram e 1 não manteve acompanhamento ambulatorial após a portoenterostomia. Segundo DAVENPORT *et al.* (1993), os pacientes com síndrome malformativa esplênica representariam um subgrupo de pior prognóstico entre os casos de AB, o que não foi confirmado por VAZQUEZ (1995). Para SILVEIRA *et al.* (1991), o fator prognóstico de maior relevância é a idade dos pacientes por ocasião da portoenterostomia. A tabela 9 demonstra que entre 34 casos acompanhados em ambulatório, 56% deles foram ao óbito ou submeteram-se a transplante até a conclusão deste estudo, tendo a maioria destes pacientes com pior prognóstico sido submetida à cirurgia com mais idade que os outros. Diversos outros estudos corroboram este achado (quadro 5).

Quadro 5 - Condições clínico-cirúrgicas e laboratoriais relacionadas com a evolução dos casos submetidos à cirurgia de Kasai

Condições	Autores	
	Desfavorece	Indiferente
Clínico-Cirúrgicas		
Realização tardia da cirurgia de Kasai	MCCLEMENT <i>et al.</i> , 1985 MIELI-VERGANI <i>et al.</i> , 1989 OHYA <i>et al.</i> , 1990 QUESTA <i>et al.</i> , 1993 GROSFELD, 1994 MAKSOUUD <i>et al.</i> , 1998 OHI, 2000 SUBRAMANIAM <i>et al.</i> , 2000 CHARDOT <i>et al.</i> , 2001 DHAWAN <i>et al.</i> , 2001 ESTE ESTUDO	TAN <i>et al.</i> , 1994 CARCELLER <i>et al.</i> , 2000 SCHOEN <i>et al.</i> , 2001
- Após uma idade-limite	DAVENPORT <i>et al.</i> , 1993 MAKSOUUD <i>et al.</i> , 1998 MCKIERNAN <i>et al.</i> , 2000	
Menor experiência do cirurgião	MCCLEMENT <i>et al.</i> , 1985	
Menor número de cirurgias realizadas no centro hospitalar	MCKIERNAN <i>et al.</i> , 2000	
Presença de anomalia congênita extra-hepática associada	DAVENPORT <i>et al.</i> , 1993 TANANO <i>et al.</i> , 1999	ESTE ESTUDO SILVEIRA <i>et al.</i> , 1992
Hipertensão porta precoce	OHI <i>et al.</i> , 1986 KARDORFF <i>et al.</i> , 1999	
Presença de colangite pós-cirúrgica	LILLY e ALTMAN, 1975 OHUCHI <i>et al.</i> , 1986 AZAROW <i>et al.</i> , 1997 OHI, 2000 SUBRAMANIAM, 2000	
Dosagens Laboratoriais Elevadas		
Ácido hialurônico sérico	DHAWAN <i>et al.</i> , 2001	
Provas de função hepática no pós-operatório	TRIVEDI <i>et al.</i> , 1995 KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1998 SUBRAMANIAM <i>et al.</i> , 2000	
Alfa-glutation-s-transferase sérica	KOBAYASHI <i>et al.</i> , 2000	
Pró-colágeno III e colágeno IV séricos	KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1998	
Proteína-10 induzida por interferon (IP- 10)	KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1999	
ICAM-1 solúvel		MINNIC <i>et al.</i> , 1998
Relação cobre/zinco	ENDO <i>et al.</i> , 1995	

Além das condições anteriormente vistas, outras, indicadas no quadro 6, afetam o prognóstico.

Quadro 6 - Condições histopatológicas, hemodinâmicas e imuno-histoquímicas descritas como relacionadas à evolução dos casos submetidos à cirurgia de Kasai

Condições	Autores		
	Favorece	Desfavorece	Indiferente
Histopatológicas			
Diâmetro luminal dos ductos no <i>porta hepatis</i> <ul style="list-style-type: none"> • menor diâmetro • maior diâmetro 	MAKSOUDE <i>et al.</i> , 1998	GAUTHIER <i>et al.</i> , 1976 TAN <i>et al.</i> , 1994	LANGENBURG <i>et al.</i> , 2000
Padrões morfológicos alterados dos ductos biliares no <i>porta hepatis</i>		SCHWEIZER <i>et al.</i> , 2000	
Alterações de vias biliares intra-hepáticas <ul style="list-style-type: none"> • Malformação de placa ductal • Fibrose na periferia do fígado 		DESMET, 1992 SCHWEIZER e LUNZMANN, 1998	ESTE ESTUDO TAN <i>et al.</i> , 1994 ESTE ESTUDO
Alterações parenquimatosas <ul style="list-style-type: none"> • Periferia do órgão <ul style="list-style-type: none"> - características inflamatórias - bile na zona I acinar • No <i>porta hepatis</i> <ul style="list-style-type: none"> - ausência de inflamação 	AZAROW <i>et al.</i> , 1997	AZAROW <i>et al.</i> , 1997 TAN <i>et al.</i> , 1994	TAN <i>et al.</i> , 1994
Espessamento de túnica média vascular <ul style="list-style-type: none"> • veias • artérias 		NIO <i>et al.</i> , 1986 KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1999	ESTE ESTUDO
Hemodinâmicas			
<ul style="list-style-type: none"> • venosas <ul style="list-style-type: none"> - curva de fluxo da veia hepática plana - fluxo porta diminuído • arteriais <ul style="list-style-type: none"> - maior índice de resistência da artéria hepática 		KARDORFF <i>et al.</i> , 1999 KARDORFF <i>et al.</i> , 1999 BROIDE <i>et al.</i> , 1997 KARDORFF <i>et al.</i> , 1999	
Imunoistoquímicas			
Expressão aumentada de CD68		KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1997	
Antígeno HLA classe II (DR)		KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1997	
Depósito periductular aumentado de actina e miosina		SEGAWA <i>et al.</i> , 1993	
Células T CD8 ⁺	AHMED <i>et al.</i> , 2001 I		
Células CD14 ⁺	AHMED <i>et al.</i> , 2001	KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1997	

Na Argentina, QUESTA *et al.* (1993), analisando 64 casos atendidos no *Hospital Garrahan* de Buenos Aires com diagnóstico confirmado de AB, entre 1987 e 1993, observaram obtenção de fluxo biliar permanente no pós-operatório da cirurgia de Kasai progressivamente inferior com o aumento das faixas etárias: 75% dos operados antes de 60 dias tiveram fluxo biliar permanente, enquanto 57,6% e 15,7% dos operados, respectivamente, entre 69 e 90 dias e após 90 dias de vida apresentaram esse fator de bom prognóstico. Outros autores encontraram resultados semelhantes (EMBLEM *et al.*, 1993; MOWAT e DAVIDSON, 1995; RUDOLPH e BALISTRERI, 1999; SUBRAMANIAM *et al.*, 2000). Entretanto, deve-se ressaltar que, entre os pacientes que evoluíram de maneira satisfatória em nossa amostra, houve casos com mais de 60 dias de vida, e até mesmo com mais de 90 dias (média = 70,0; DP = 23,7), o que parece justificar a manutenção da portoenterostomia como procedimento inicial nos casos de AB. CHARDOT *et al.* (2001), em amplo estudo populacional que incluiu todos os casos de AB operados na França entre 1986 e 1996, confirmaram a melhor sobrevida em 5 e 10 anos pós-Kasai nos submetidos à cirurgia mais precocemente. Demonstraram, contudo, que cerca de 25% dos pacientes operados após 90 dias de vida sobreviveram com seu próprio fígado por 5 anos e cerca de 22%, por 10 anos, o que justificaria, segundo eles, a manutenção desse método cirúrgico mesmo em pacientes com mais de 3 meses de idade, desde que apresentem condições clínicas, nutricionais e cirúrgicas adequadas. Em nosso estudo, cerca de 32% dos pacientes submetidos à cirurgia de Kasai, independentemente da idade em que foram submetidos ao procedimento, permanecem vivos e não foram transplantados até agora. Na literatura internacional, a frequência de sucesso da cirurgia de Kasai permitindo evitar o transplante chega a 42% em 5 anos (RUDOLPH e BALISTRERI, 1999). GROSFELD *et al.* (1994), avaliando os resultados pós-operatórios de 102 casos de atresia operados, constataram influência das variáveis idade por ocasião da portoenterostomia e obtenção de fluxo biliar no pós-operatório, em relação à sobrevida dos pacientes. Os autores identificaram diminuição da idade por ocasião da portoenterostomia nos pacientes com AB de sua comunidade no decorrer de 5 anos e observaram entre os seus casos uma taxa de sobrevida em torno de 72%. Reforçaram a noção de que a portoenterostomia, com taxas de sucesso em torno de 40% em diversos estudos deva ser mantida como tratamento inicial da AB, evitando-se a morbidade e as seqüelas da imunossupressão associadas ao transplante. OHYA *et al.* (1990), avaliando o prognóstico de pacientes submetidos à cirurgia de Kasai, constataram que a sobrevivência em 10 anos após a portoenterostomia relacionou-se ao desaparecimento da icterícia no pós-operatório, à idade do paciente por ocasião da cirurgia, ao grau de fibrose e ao tamanho dos ductos biliares presentes no *porta hepatis*. Todavia, TAN *et al.* (1994), analisando espécimes do *porta hepatis*

de 205 casos de AB, não encontraram relação entre a idade dos pacientes por ocasião da portoenterostomia e a presença de ductos biliares pérvios nessa região. Os autores argumentaram que outros fatores, tais como o início do processo de esclerose, a intensidade de sua progressão e sua gravidade, variando de caso para caso, seriam mais importantes que a variável isolada idade por ocasião do procedimento. A patência dos ductos biliares foi variável importante quanto ao prognóstico, avaliado em relação à sobrevida em 5 anos no grupo de pacientes sem ductos pérvios no *porta hepatis*. Nos demais grupos, não ocorreu relação entre diâmetro luminal do ducto e diferenças na sobrevida. Os autores identificaram, ainda, relação entre a ausência de processo inflamatório no *porta hepatis* e pior prognóstico, sugerindo que a ausência de inflamação representaria o estágio final do processo de esclerose das estruturas biliares. Afirmaram que a idade por ocasião da portoenterostomia é importante apenas no que se relaciona aos casos operados com menos de 60 dias de vida, obtendo-se entre estes os melhores resultados cirúrgicos. Outros autores (CARCELLER *et al.*, 2000; SCHOEN *et al.*, 2001) não encontraram relação entre idade e prognóstico pós-cirurgia de Kasai. Deve ser levado em conta que a relação entre idade por ocasião da portoenterostomia e prognóstico pós-operatório não é linear e que o efeito do atraso por ocasião da cirurgia só torna-se óbvio após um limiar de tempo. Grupos de pacientes com idade abaixo desse limiar não apresentarão relação entre faixa etária e evolução (DAVENPORT *et al.*, 1993; McKIERNAN *et al.*, 2000). MAKSOUD *et al.* (1998), da Universidade de São Paulo, avaliaram o prognóstico de 103 pacientes com AB, observando a presença de drenagem biliar em cerca de 73% das crianças no pós-operatório da cirurgia de Kasai e ausência de icterícia em 27% dos pacientes aproximadamente. Até 16 semanas de vida, não houve relação entre idade por ocasião da portoenterostomia e fluxo biliar pós-operatório; após esse limite, o fluxo biliar decaiu, apesar de permanecer presente em quase metade dos pacientes. À semelhança de TAN *et al.* (1994), não encontraram relação entre os padrões do *porta hepatis* e a idade por ocasião da portoenterostomia. LANGENBURG *et al.* (2000) também discordaram da influência do diâmetro luminal dos ductos biliares no *porta hepatis* no sucesso pós-cirurgia de Kasai. Para eles, o fator que produziu maior sobrevida sem transplante foi a presença de drenagem biliar no pós-operatório precoce. SCHWEIZER *et al.* (2000) constataram diferenças no prognóstico, de acordo com padrões morfológicos dos ductos biliares no *porta hepatis*, independentemente do diâmetro de seus lúmens.

Quanto à extensão da fibrose, quantificada no presente estudo pela densidade de colágeno, pôde-se observar, conforme demonstrado na tabela 10, seu aumento progressivo em relação às faixas etárias, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos de até 60 dias e o de mais de 90 dias de vida. A faixa etária de mais de 90 dias pareceu relacio-

nar-se nesta amostra a um patamar de gravidade relativo à intensidade da fibrose. O fato de não termos encontrado relação entre prognóstico e densidade superficial de colágeno (tabela 11) concorda com os achados de TAN *et al.* (1994), os quais observaram fibrose no *porta hepatitis* de todos os casos por eles estudados, com envolvimento variável dos espaços-porta da periferia hepática, não tendo havido correlação entre a morfologia da árvore biliar periférica, incluindo fibrose, e o prognóstico. SCHWEIZER *et al.* (2000), empregando um escore por eles desenvolvido, apesar de terem encontrado relação positiva entre extensão da fibrose e pior evolução dos casos com AB, consideraram-na como um critério secundário na determinação do prognóstico na doença, já que baixos níveis de fibrose na periferia hepática coexistiram com número insuficiente de ductos biliares pèrvios no *porta hepatitis*. A ausência de relação entre fibrose e prognóstico em nosso estudo pode-se relacionar ainda ao fato de não termos utilizado luz polarizada para a quantificação da densidade de colágeno (JUNQUEIRA *et al.*, 1979).

A noção de que a AB relaciona-se à progressiva destruição de ductos biliares interlobulares após os 2 meses de vida remonta às considerações iniciais de Kasai sobre a doença (DESMET, 1999). LILLY e ALTMAN afirmaram, já em 1975, que, na maioria das crianças com AB, a doença hepática progride independentemente da desobstrução do fluxo biliar. Comentaram a provável importância dos episódios de colangite, que agravariam a fibrogênese hepática, mas concordaram com LANDING (1974) quanto à possível existência de um processo mórbido continuado, o qual manteria a degradação funcional e histológica do fígado após a portoenterostomia. Citaram como evidência o padrão anômalo da árvore biliar na AB observado na colangiografia trans-hepática. Tal padrão pôde ser melhor compreendido após as considerações de DESMET (1992 I) em torno da ocorrência de MPD na AB. Outro dado relevante na evolução dos pacientes após a cirurgia de Kasai é a ocorrência precoce de hipertensão porta. OHI *et al.*, em 1986, detectaram hipertensão porta por ocasião da portoenterostomia em cerca de 96% dos 91 pacientes por eles avaliados; pacientes mais velhos por ocasião do procedimento apresentaram níveis de pressão sanguínea na veia porta ainda mais elevados. Em estudo anterior, KASAI *et al.* (1981) não encontraram correlação entre a hipertensão porta e a extensão da fibrose tecidual, mas, sim, com o comprimento total das veias porta segundo avaliação histométrica. BROIDE *et al.* (1997) observaram pior evolução, em termos de risco de transplante ou morte, em pacientes com aumento do “índice de resistência da artéria hepática”. Esse dado foi confirmado, posteriormente, por KARDORFF *et al.*, em 1999, os quais consideraram relevantes, em termos de pior evolução dos casos de AB, o aumento do “índice de

resistência da artéria hepática”, a diminuição da pressão venosa porta e uma curva de fluxo plana na veia hepática.

A maioria dos pacientes após a cirurgia de Kasai desenvolve fibrose hepática progressiva. Em cerca de 1/3 dos casos ocorre insuficiência hepática, levando a transplante em 12 a 14 meses de pós-operatório e, em outro 1/3, durante a adolescência. Os restantes sobrevivem com algum grau de hepatopatia, incluindo elevação continuada das transaminases, colangite recorrente ou cirrose inativa com hipertensão porta (RAMM *et al.*, 1998). Hipertensão porta precoce e continuada, anormalidade congênita das estruturas biliares intra-hepáticas e destruição progressiva de ductos biliares funcionantes parecem interagir de modo complementar no agravamento da condição hepática de muitos pacientes após a portoenterostomia, sem que se tenha reconhecido até o momento a existência de um processo causal que relacione esse complexo de anormalidades histológicas e funcionais.

7.3 - Achados Histológicos

7.3.1 - Estruturas Biliares

Em estudo anterior (SANTOS *et al.*, 1998) observamos que, entre as variáveis histopatológicas que diferenciaram AB das causas intra-hepáticas de colestase neonatal, destacaram-se, entre outras, a presença de proliferação ductular, especialmente em localização periportal, além de proliferação ductular portal, expansão portal, que ocorre devido a edema, infiltrado inflamatório e fibrose, colestase em neodúctulos, colestase portal e pontes porta-porta. Para a maioria dos autores, a proliferação ductular precoce e difusa é o achado histopatológico mais freqüente na AB, pelo menos em seus estágios iniciais (KASAI *et al.*, 1962; BENNET, 1964; BROUGH e BERNSTEIN, 1969; ALAGILLE, 1995; HADCHOUEL e FABRE, 1995; PEREZ-ATAYDE, 1996; ZERBINI *et al.*, 1997). No presente estudo, conforme demonstrado na tabela 12, observou-se proliferação ductular em todos os casos de AB. Contudo, todos os controles com colestase intra-hepática também apresentaram essa alteração, demonstrando a correção das afirmações de DAHMS (1991) quanto às semelhanças, do ponto de vista histopatológico, entre colestase neonatal de causas extra e intra-hepática. Por outro lado, a proliferação ductular distribuiu-se igualmente entre os casos de AB com e sem AEH, demonstrando

que, embora seja postulada uma heterogeneidade etiopatogênica entre estes grupos, a proliferação ductular parece representar um padrão geral de resposta ante os insultos ao fígado.

Em 55% dos casos de AB avaliados no presente estudo (tabela 12), as estruturas biliares localizadas na zona periportal apresentaram características de MPD (figura 8), ou seja, estruturas biliares dilatadas, alongadas, tortuosas, geralmente circundando veias, artérias e ilhotas de tecido conjuntivo, de localização periférica nos espaços-porta, ocorrendo em grandes e pequenos ductos, segundo a descrição de DESMET (1992). A frequência de MPD encontrada no presente estudo, todavia, excede a descrita por aquele autor. RAWELLY *et al.* (1990) encontraram MPD em cerca de 22% dos 37 pacientes com AB. Talvez a maior frequência de MPD em nossa amostra decorra de características demográficas ou ambientais específicas.

A proliferação ductular variou de intensidade tanto em relação ao número de espaços-porta envolvidos (na AB foi difusa em cerca da metade dos casos e, na colestase intra-hepática, em 2 dos 3 pacientes) quanto na intensidade de sua apresentação. Em nenhum dos pacientes com colestase intra-hepática avaliados no presente estudo havia MPD. A presença dessa estrutura parece indicar, portanto, o diagnóstico de AB. Em sua ausência, todavia, permanece a dificuldade de utilizar a variável proliferação ductular como indicador de um ou outro tipo de colestase neonatal.

Por outro lado, não ocorreu diferença quanto à MPD entre os grupos de AB com e sem AEH (tabela 12), dado que sugere não haver correspondência entre a heterogeneidade etiopatogênica da AB em sua forma congênita e padrões morfológicos distintos de alteração das estruturas biliares.

A expressão reação ductular biliar foi criada por POPPER (1990) para descrever o aparecimento de células epiteliais biliares nas zonas marginais dos espaços-porta de fígados doentes. Constitui-se em padrão importante de resposta hepática a fatores lesivos e, frequentemente, precede o aparecimento da cirrose. Porém, o que se convencionou chamar de “proliferação” ou “reação ductular” engloba diversos padrões estruturais. SIRICA (1995), em artigo de revisão, propõe a existência de 4 tipos histológicos de proliferação ductular, incluindo proliferação ductular típica, atípica (NAKANUMA e OHTA, 1986; VAN EYKEN e DESMET, 1989), proliferação de uma hipotética população de “células-fonte” hepáticas (SELL, 1990; BRILL *et al.*, 1993; HOUSSET 2000) e proliferação neocolangiolar ou de “hepatócitos ductulares” (THUNG, 1990; RUBIN *et al.*, 1995; DEMETRIS *et al.*, 1996). A proliferação ductular típica tem como protótipo a obstrução biliar extra-hepática aguda. Pode, no entanto, estar presente nos estágios iniciais dos quadros de obstrução biliar incompleta crônica (NAKANUMA

e OHTA, 1996). Caracteriza-se por aumento de estruturas ductulares de morfologia normal, com lúmen bem definido, sendo o mecanismo da proliferação das estruturas biliares quase inteiramente relacionado à multiplicação de ductos pré-existentes (SLOTT *et al.*, 1990).

A origem dos dúctulos proliferados nas distintas hepatopatias é motivo de debate. Na AB, a fonte de proliferação ductular parece ser metaplasia ductular e proliferação de ductos maduros previamente formados (COJIN *et al.*, 1996), embora XIAO *et al.* (1999) tenham observado a presença concomitante de células compatíveis com células ovais, semelhantes às encontradas no hepatoblastoma, na vizinhança dos espaços-porta e entre os hepatócitos e as células epiteliais dos ductos em proliferação em pacientes com a doença. THUNG (1990), por outro lado, propôs que, na AB a proliferação ductular atípica seria o padrão mais proeminente. Atualmente, pesquisas de cultura celular vêm sendo realizadas visando caracterizar as alterações das células biliares na AB (FLYNN *et al.*, 2001). No presente estudo, houve casos de AB exclusivamente com proliferação ductular típica localizada no interior dos espaços-porta ou em sua periferia. Observou-se que MPD e proliferação ductular coexistiram na intimidade do mesênquima portal. Não foi possível diferenciarmos os distintos padrões da proliferação ductular nos casos de AB, já que marcadores imunoistoquímicos específicos são necessários para sua tipificação.

Se, nos estágios iniciais da AB, observa-se aumento da quantidade das estruturas biliares nos espaços-porta, a agressão continuada aos ductos biliares interlobulares, relacionada à apoptose mediada por mecanismos imunológicos (GORES, 2000), leva-a, em estágios tardios, a assemelhar-se às doenças de “rarefação de ductos biliares” (SHERLOCK, 1987; PICCOLI e WITZLEBEN, 1996). A ausência de DBMs nos espaços-porta e sua distribuição focal (tabela 12), que ocorreram no presente estudo em 6% e 21% dos casos de AB, respectivamente, poderiam ser o reflexo da destruição das estruturas biliares maduras. A ausência de DBMs, porém, não se relacionou com o incremento da idade por ocasião da portoenterostomia (tabela 21), e a distribuição focal dessas estruturas apresentou uma relação espúria, do ponto de vista estatístico, com o aumento da idade. Talvez a faixa etária da amostra ($90,9 \pm 44,8$ dias) tenha impossibilitado a detecção do fenômeno de rarefação biliar, que é mais tardio. Por outro lado, o comprometimento da formação de DBMs em espaços-porta devido à MPD pode ser responsável pela ausência de ductos biliares interlobulares, ou por sua distribuição focal, em estágios precoces da doença. Cabe observar, entretanto, que mesmo em pacientes com MPD concomitante a esta anomalia biliar, encontraram-se ductos biliares interlobulares em alguns casos (figura 8). Assim, a MPD não impediu, necessariamente, a formação de estruturas biliares maduras.

7.3.2 - Densidade de Colágeno

De acordo com RAMM *et al.* (1998), o desenvolvimento da fibrose hepática na AB é mais rápido e agressivo que em outras hepatopatias, mas os mecanismos responsáveis por esta intensa e precoce fibrogênese permanecem obscuros. Esses autores comprovaram que as células de Ito são a fonte da fibrogênese hepática na AB e que, apesar da cirurgia de Kasai, elas se mantêm em estado ativo em torno dos ductos biliares hiperplásticos e nos septos fibrosos, expressando, juntamente com as células epiteliais dos neodúctulos e hepatócitos adjacentes às áreas de fibrose, a citocina TGF- β 1, estimuladora de fibrogênese (ABBAS *et al.*, 2000). AHMED *et al.* (2000) confirmaram a atuação dessa citocina, bem como do “fator de crescimento derivado de plaquetas” na fibrogênese dos casos de AB, observando, porém, decréscimo de sua atividade com a evolução da doença. TAN *et al.* (1995) já haviam demonstrado aumento da imuno-reatividade de TGF β -1 nas estruturas do *porta hepatitis* e nos espaços-porta na AB, relacionando alterações de sua localização intracelular com distúrbios na relação entre epitélio e mesênquima. Outros autores relacionaram a manutenção da fibrogênese à ação de ácidos biliares hidrofóbicos e à redução das concentrações de antioxidantes hepáticos e mitocondriais no fígado após oclusão das vias biliares (BALISTRERI, 1996). Por outro lado, proliferação ductular pode ser, por si mesma, o “marca-passos” da fibrogênese na AB (LAMI-REAU *et al.*, 1999), desencadeando-se cirrose posteriormente (MÜLLER *et al.*, 1996), já que os ductos biliares produzem membrana basal, a qual contém laminina e colágeno tipo IV e são cercados por células de Ito ativadas, produtoras de TGF β -1. Outras substâncias expressas pelas células biliares, tais como o “fator de crescimento-BB derivado de plaquetas” e a endotelina-1, não só ativam os fibroblastos como também são mediadores de interações entre células biliares e células de Ito (HOUSSET, 2000). Com o desenvolvimento da proliferação ductular ocorre na placa limitante separação progressiva dos ductos neoformados e dos hepatócitos devido à proliferação das células de Ito que cercam as estruturas biliares e, conseqüentemente, mais fibrogênese (COCJIN *et al.*, 1996).

A quantificação morfométrica da densidade de colágeno no presente estudo confirmou diferença de grande magnitude (TEP = 1,37) entre casos de AB e colestase intra-hepática quanto a esta variável (tabela 23), espelhando a intensa fibrogênese presente na AB. O valor mínimo da densidade de colágeno nesta doença (1,7%) foi maior que a média dos pacientes com colestase intra-hepática (1,29% \pm 1,06%). Novos estudos devem ser realizados com

maior número de pacientes para esclarecer, por exemplo, a possível utilidade desse método quantitativo no diagnóstico diferencial da colestase neonatal.

7.3.3 - Estruturas Vasculares Arteriais

7.3.3.1 - Valores Normais dos Elementos Vasculares

Em relação à avaliação morfométrica dos ramos arteriais da primeira etapa do estudo histológico, foi impossível a comparação dos valores obtidos com os de outros autores, pois utilizamos a medida de perímetro para calcular de forma mais exata o diâmetro luminal. Como na AB deve ocorrer colabamento vascular secundário à fibrose, o uso do perímetro para tal cálculo foi considerado indispensável. Porém, nos trabalhos com os quais comparamos nossos dados, os autores não utilizaram este método. HO *et al.* (1993) realizaram mensuração linear simples e consideraram espessadas artérias em que a medida da espessura da parede foi, pelo menos, duas vezes superior à do diâmetro luminal; dilatadas foram artérias em que o diâmetro luminal foi duas vezes superior à medida da espessura da parede. Esse grupo de autores também não distinguiu arteríolas de artérias. HEATH e EDWARDS (1958) utilizaram relações semelhantes às empregadas no presente estudo sem, contudo, calcular o perímetro. Segundo eles, normalmente a relação espessura de túnica média/diâmetro externo nas artérias pulmonares é 2,8% a 3,1%, podendo atingir 5,5% a 6,8% em certas regiões do órgão. Conceituaram espessamento de parede arteriolar como espessura de túnica média igual ou superior a 25% do diâmetro externo (em nosso caso, valor de **REMD** igual ou superior a 2,5), chegando a 30% nos grandes espessamentos (no presente estudo, **REMD** igual a 3,0). YAMAKI *et al.* (1998), sem haver utilizado a medida de perímetro, consideraram extremamente espessadas as paredes de artérias pulmonares com espessura da túnica média superior a 33% do diâmetro externo. Como utilizamos o perímetro, os valores de diâmetro luminal (*dint*) não são compatíveis, em princípio, com os encontrados pelos autores citados. Devido ao pequeno número de lactentes sem hepatopatia e de artérias nestes pacientes, não dispomos de dados para conceituar espessamento ou dilatação arterial em ramos da artéria hepática. Nesta situação, apenas identificamos os casos em que a **REMD** apresentou valores superiores ao valor máximo dessa relação entre os lactentes sem hepatopatia (figura 14). Novas mensurações são necessárias neste último grupo e em casos de AB para caracterizar adequadamente a curva normal da **REMD** em lactentes sem hepatopatia e, a partir daí, conceituar espessamento. Observa-se, po-

rém, que nenhuma artéria de pacientes com colestase intra-hepática apresentou valor de **REMD** superior ao valor máximo dessa relação detectado nos lactentes sem hepatopatia (figura 14).

7.3.3.2 - Etapas do Estudo Histológico Vascular

- **Primeira etapa: Caracterização morfométrica das estruturas vasculares em casos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e em controles**

Em casos de pacientes com AB e com colestase intra-hepática ocorreu proliferação do PVP, detectada pelo maior número de arteríolas na tabela 15 pela estatística TEP (COHEN, 1969; HOPKINS, 1997), embora com valor de P limítrofe.

Nas amostras histológicas da AB, observou-se grande quantidade de pequenos vasos, com paredes musculares finas. Porém, de caso para caso, e ainda em diferentes áreas de um mesmo corte histológico, houve variação no aspecto e no número desses vasos. Parte dessas arteríolas integra a camada externa do PVP. KOBAYASHI *et al.* (1994) estudaram o comportamento do PVP em fígados de adultos sem hepatopatia e em pacientes com cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, obstrução extra-hepática, de curta e longa duração, e cirrose hepática. Três padrões de alteração do PVP foram por eles observados. No padrão inflamatório, que acompanha inflamação de ductos biliares, as camadas interna e intermediária apresentaram aumento numérico dos vasos. A quantidade de vasos da camada externa aumentou pouco ou foi comparável à do tipo normal. No padrão vasopênico, associado a alterações escleróticas dos ductos biliares, ocorreu importante redução numérica dos vasos da camada interna, sem aumento, ou mesmo com diminuição de sua quantidade nas camadas intermediária e externa. No padrão cirrótico houve elevação numérica considerável e dilatação dos vasos das camadas externa e interna. Na camada intermediária ocorreu esse mesmo padrão, ou semelhante ao tipo normal. As alterações foram mais evidentes em vasos associados a grandes ductos biliares, e sua intensidade variou entre ductos biliares individuais e pacientes. Os autores relacionaram o aumento numérico e a dilatação dos vasos do PVP nos casos de cirrose à regurgitação sanguínea da veia porta e sinusóides para o plexo, através das “raízes internas”, devido ao bloqueio pós-sinusoidal existente. No presente estudo, a elevação numérica, pelo menos da camada externa do PVP, pode relacionar-se com padrões inflamatório ou cirrótico. Por outro lado, não foi possível caracterizar quantitativamente o incremento numérico das artérias (tabelas 14 e 16), óbvio na avaliação subjetiva (figura 9), já que empregamos grande au-

mento no microscópio para o estudo morfométrico das estruturas arteriais. A avaliação do número de artérias maiores agrupadas em espaços-porta e pontes fibróticas exigiria, contudo, aumentos menores.

O outro fenômeno observado em relação aos vasos arteriais hepáticos foi a ocorrência de maior espessura da túnica média em relação aos lactentes sem hepatopatia em, pelo menos, 28% casos de AB, sendo 21% sem AEH e 33% com AEH (figura 14). Nessa etapa, tal fato restringiu-se às artérias e não ocorreu nos pacientes com colestase intra-hepática, expressando-se por aumento da **REMD** (tabela 16), dado que parece exprimir de forma quantitativa as afirmações, baseadas em análises subjetivas, de alguns autores (STOWENS, 1959 e 1962; BROUGH e BERNSTEIN, 1969; HO *et al.*, 1993) quanto à presença de hipertrofia dos ramos arteriais hepáticos. Nenhum autor, até o momento, especulou sobre o mecanismo de espessamento dos ramos arteriais hepáticos. Contudo, considera-se o espessamento da túnica média arterial em sistemas orgânicos distintos do fígado como o produto de diversas formas de agressão sofridas pelo endotélio vascular, sendo, em algumas situações, a primeira etapa da degeneração posterior da túnica íntima. A proliferação de células musculares lisas da parede arterial é, por exemplo, o passo inicial no desenvolvimento de lesões arteroscleróticas, decorrendo da exposição desse tecido a fatores como hipertensão e diabete melito (SCHMIDT *et al.*, 1982; DOBRIN, 1995; ARMENTANO *et al.*, 1998). Os eventos que desencadeiam tal proliferação são complexos, incluindo a atuação de fatores mecânicos, entre os quais a “força de estresse cortante” (*shear stress*), além de alterações do endotélio da túnica íntima (DOBRIN, 1995; COOL *et al.* 1997). A exposição a aumentos do fluxo pulsátil e das forças hemodinâmicas alteram o endotélio da túnica íntima e as células musculares da túnica média quanto às suas características funcionais. Esse fenômeno parece ser regulado ao nível gênico, a partir de uma região que codifica a ação de vários moduladores vasculares, incluindo o fator de crescimento do endotélio vascular e o TGF β -1 (MALEK *et al.*, 1993; CARMELIET *et al.*, 1999; IIDA, 1999; GEIGER *et al.*, 2000; YANCOPOPOULOS *et al.*, 2000; TSUZUKI *et al.*, 2000; KADAMBI, 2001). A célula muscular lisa da túnica média é capaz de transformar-se, a partir de seu perfil de célula contrátil, em célula sintetizadora, em resposta a lesões da lâmina elástica interna, processo pelo qual se desenvolvem divisão celular e síntese de colágeno, elastina e proteoglicanos (CAMPBELL *et al.* 1988). Essa modulação fenotípica relaciona-se à alteração dos padrões das organelas, e, em estado sintetizador, as células musculares lisas assemelham-se a células musculares fetais (ESTERLY *et al.*, 1968). A idade do organismo afeta o momento de início do processo proliferativo, sendo este mais precoce em animais jovens e imaturos. Pode ser reversível ou irreversível, dependendo da permanência ou não das alte-

rações do meio. O fenômeno tem sido bem estudado em relação aos vasos da circulação pulmonar (HEATH e EDWARDS, 1958; PIETRA *et al.* 1989). Nesse órgão, o espessamento da túnica média associa-se, do ponto de vista clínico, à hipertensão pulmonar, desordem geralmente fatal, descrita como primária, ou seja, sem causa ainda definida, ou secundária ao aumento do fluxo pulmonar por cardiopatia congênita com *shunt* esquerda-direita. Vasos expostos a fluxo pulsátil aumentado apresentam alterações das células endoteliais e das células musculares lisas da túnica média, que iniciam em torno de dois meses após o estabelecimento da hipertensão pulmonar (ESTERLY *et al.*, 1968). Também obstrução isolada do fluxo venoso pulmonar induz o surgimento de hipertensão pulmonar e de alterações vasculares, ocorrendo, concomitantemente nesse caso, “muscularização” das veias (ENDO *et al.*, 2000). Do ponto de vista fisiopatológico, a hipertensão pulmonar caracteriza-se por aumento da resistência à vasodilatação pulmonar, que piora progressivamente em função da remodelagem vascular (MASON *et al.*, 1998). Por outro lado, tem sido relatada sua presença em colagenoses, hepatite crônica ativa, cirrose hepática com hipertensão porta e num crescente número de casos de imunodeficiência adquirida pelo vírus HIV (SPEICH *et al.*, 1991). Clinicamente, ocorrem na doença aumento sustentado da pressão pulmonar e insuficiência cardíaca direita progressiva. A expectativa de vida média após o diagnóstico é de até 3 anos, com óbito geralmente secundário à insuficiência cardíaca (LEE *et al.*, 1998). Em pacientes pediátricos pode apresentar-se como hipertensão pulmonar persistente idiopática do neonato, que consiste na “muscularização” anormal das pequenas artérias pulmonares causada por fatores desconhecidos operando no período intra-uterino (HAWORTH e REID, 1976). Nesse caso, é evidente o espessamento generalizado da túnica média das pequenas artérias pulmonares do neonato. A causa desse espessamento talvez se relacione a hipóxia intra-uterina e vasoconstrição pulmonar fetal crônicas (YAMACKI *et al.*, 1998). Nos pulmões fetais, as artérias musculares pulmonares têm paredes espessas; no neonato sadio, a inflação pulmonar as dilata, adelgaçando suas paredes, e as arteríolas não se “muscularizam”. Nos neonatos com hipertensão pulmonar aumenta o espessamento da árvore arterial, ocorrendo hipertrofia muscular nas pequenas artérias e “muscularização” nas arteríolas (ESTERLY, 1968), chegando a medida da espessura da túnica média a apresentar valor igual ou superior ao do diâmetro luminal (YAMAKI *et al.*, 1998). No caso de hipertensão pulmonar primária associada à cirrose implica-se a ação contínua de substâncias vasoconstritoras, normalmente metabolizadas pelo fígado, sobre a vasculatura pulmonar (LEBREC *et al.*, 1979; SAUNDERS *et al.*, 1979; CHUN *et al.*, 1980; McDONNELL *et al.*, 1983; ROBALINO e MOODIE, 1991; SILVER *et al.*, 1992; LOSAY *et al.*, 1998; MARTINEZ-PALLI *et al.*, 1999). Postula-se explicação semelhante para a hiper-

tensão pulmonar causada por inibidores do apetite: mediadores químicos circulantes por tempo prolongado causariam reação crônica dos vasos pulmonares (JAMISON e MICHEL, 1995). Células inflamatórias perivasculares podem produzir distúrbio vascular através de seus mediadores inflamatórios e fatores de crescimento (COOL *et al.*, 1997; MEHTA *et al.* 2000). Diversas substâncias têm sido associadas à arteriopatia da hipertensão pulmonar, entre elas a endotelina-1, polipeptídeo com potente efeito vasoconstritor e atividade estimuladora de proliferação de fibroblastos e de células musculares lisas (JAMISON e MICHEL, 1995), a enzima conversora de angiotensina I em angiotensina II, que estimula o crescimento das células musculares (MORRELL *et al.*, 1995; ORTE *et al.*, 2000) e o óxido nítrico, que atua no endotélio da íntima e está envolvido na manutenção do tônus vascular (MASON *et al.*, 1998; MACEDO e LAUTT, 1998; LEMBO *et al.*, 2000). Ainda, o fator de necrose tumoral (COOL, 1997), a proteína tat do vírus HIV e a interleucina-6 (HOFMAN *et al.*, 1993) podem atuar sobre o endotélio, produzindo o estímulo inicial à proliferação muscular.

A manutenção a longo prazo da hipertensão pulmonar produz remodelagem dos ramos da artéria pulmonar, desenvolvendo-se a arteriopatia plexogênica pulmonar (PIETRA *et al.*, 1989; WAGENVOORT e WAGENVOORT, 1970). Essa arteriopatia envolve aumento da massa de células musculares lisas, que resulta em hipertrofia da túnica média isolada ou associada à proliferação de células endoteliais, com conseqüente obliteração luminal concêntrica, e no surgimento de estruturas vasculares complexas denominadas lesões plexiformes. Ocorre em 28% a 80% dos casos de hipertensão pulmonar (COOL *et al.*, 1997). É um processo dinâmico no qual as lesões vasculares progressivamente amadurecem (COOL *et al.*, 1999) e pode incluir a migração de células musculares lisas para a lâmina elástica interna e sua transformação em miofibroblastos no lúmen (HEATH e EDWARDS, 1958; ESTERLY *et al.*, 1968; SMITH *et al.*, 1990).

Na esclerodermia, segundo COOL *et al.* (1997), a lesão vascular relaciona-se à disfunção da imunorregulação, já que linfócitos T ativados aderem facilmente ao endotélio, tendo um fator citotóxico para células endoteliais vasculares e fibroblastos sido identificado na doença. Interações complexas de citocinas produzidas por linfócitos ativados poderiam atuar sobre o endotélio da túnica íntima. A arteriopatia plexogênica pulmonar associa-se também ao lúpus eritematoso sistêmico, sem que o mecanismo da associação esteja esclarecido (SIVARAKRISHNAN *et al.*, 1980; SCHWARTZBERG *et al.*, 1984; YOKOI *et al.*, 1998).

Essa arteriopatia tem sido associada também à síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) em um número cada vez maior de casos (SPEICH *et al.*, 1991; JACQUES *et al.*, 1992; MESA *et al.* 1998; MEHTA *et al.*, 2000). Têm sido implicadas nessa associação as

citocinas inflamatórias, tais como TNF-alfa, secretadas por macrófagos infectados pelo vírus HIV, que podem ativar as células endoteliais. A proteína tat, produto genético extracelular do HIV, ativa diretamente as células endoteliais, produz aumento da permeabilidade do endotélio (HOFMAN *et al.*, 1993) e induz a liberação de citocinas, entre elas TGF β -1, as quais estimulam a sintase do óxido nítrico, desencadeando aumento do tônus vascular e proliferação endotelial (VOELKEL e TUDER, 1995). Ainda, a glicoproteína-120, do envoltório viral estimula a produção de citocinas atuantes sobre o endotélio (MEHTA *et al.*, 2000). A ativação crônica do sistema imunológico na doença pode perpetuar a proliferação dos endoteliócitos e a hipertrofia da túnica média (COOL *et al.*, 1997), e o infiltrado inflamatório perivascular pode atuar através de mediadores inflamatórios. Predisposição genética associada ao sistema de antígenos leucocitários humanos, parece ser fator importante no desenvolvimento da hipertensão pulmonar relacionada à AIDS, pois ocorre aumento da prevalência de HLA-DR6 e HLA-DR52 em pacientes com AIDS que apresentam hipertensão pulmonar (MORSE *et al.*, 1996).

Por outro lado, SMITH *et al.* (1998) descreveram um caso de hipertensão pulmonar secundária em paciente com AIDS decorrente de citomagalovirose no qual ocorreu extensa infecção das células endoteliais da microvasculatura pulmonar, hipertrofia da túnica média, hiperplasticidade concêntrica e fibrose na íntima, resultando em estenose luminal.

Como se observa, diversos estudos têm focalizado os mecanismos reguladores do complexo “lesão endotelial-hipertrofia da túnica média-desarranjo da íntima” no pulmão associado a distintas etiologias que englobam alterações hemodinâmicas, atuação viral de forma direta ou indireta e distúrbios da imunorregulação. No fígado, foi postulada a existência de espessamento da túnica média em casos de AB sem embasamento quantitativo para tal hipótese, ou tentativa de determinar as suas causas. O presente estudo demonstrou quantitativamente, por método morfométrico, em uma primeira etapa, a existência de espessamento arterial em alguns pacientes com AB por ocasião da portoenterostomia. Podemos especular que tal fenômeno ocorra por mecanismos semelhantes ao do espessamento da túnica média em outros órgãos, tais como o pulmão. Entre os possíveis mecanismos associados a essa alteração vascular poder-se-iam propor aqueles apresentados no quadro 7.

Quadro 7- Possíveis mecanismos envolvidos na eventual arteriopatia observada no presente estudo

1. Fatores hemodinâmicos
2. Mediadores inflamatórios
3. Lesão endotelial direta
4. Hipóxia hepática crônica
5. Fatores genéticos

• **Fatores hemodinâmicos relacionados à hipertensão porta.** Nesta situação, poderiam contribuir para o desenvolvimento da arteriopatia na AB a hiper-reatividade da musculatura da túnica média em indivíduos jovens e o aumento das substâncias vasoconstritoras presentes no sangue na vigência de hipertensão porta (CAHILL, 1999). Através da “resposta tampão hepática” normal, o aumento do fluxo sanguíneo portal produz contração das artérias terminais, evitando-se que o fluxo excessivo transborde nos sinusóides (SCHREIBER, 1996). É possível que esse aumento pressórico se distribua pelo PVP, pois ocorrem bifurcações e anastomoses entre ele e as artérias terminais (TAKASAKI e HANO, 2001). O espessamento da túnica média arterial poderia ser, neste caso, resultado de vasoconstrição arterial prolongada secundária à hipertensão porta. Nesta situação, porém, seria esperado que a hipertrofia da musculatura lisa ocorresse em outras doenças associadas ao aumento da pressão venosa portal. Uma possível explicação para o comportamento distinto na AB poderia ser a existência de hipertensão porta mais precocemente, conforme já descrito (OHI *et al.*, 1986). NIO *et al.* (1986), ao detectarem a “muscularização” dos ramos venosos hepáticos secundária ao aumento pressórico portal, observaram que “na AB a camada muscular média iniciou a apresentar hipertrofia nos segmentos proximais do sistema porta, estendendo-se à periferia com a persistência da hipertensão porta”. Em seu estudo, porém, esse fenômeno surgiu tardiamente: a “muscularização” das veias só veio a ocorrer após cerca de 10 meses de evolução pós-portoenterostomia. A idade da amostra de AB em nossa pesquisa, contudo, é de $90,9 \pm 44,8$ dias de vida (tabela 1), sugerindo que nas artérias de alguns casos com AB o espessamento da túnica média precede a “muscularização” das veias associada à hipertensão porta, sendo, portanto, precoce e, provavelmente primário. Além disto, sendo secundário ao aumento pressórico venoso distribuído pelo PVP, esperar-se-ia que o espessamento da túnica

média iniciasse nas arteríolas, ou fosse concomitante em pequenos e grandes ramos arteriais, o que parece não ter ocorrido. STOWENS (1959, 1963) já havia observado que a hipertrofia e a hiperplasia dos ramos arteriais hepáticos representam fenômenos precoces, encontrados em espaços-porta de recém-nascidos prematuros e neonatos com AB e sugeriu que, portanto, seria uma anomalia essencial no desenvolvimento da doença. Os dados do presente estudo parecem expressar de forma quantitativa as considerações desse autor.

- **Mediadores inflamatórios.** Mediadores como as citocinas induzidas pela ação de vírus de forma indireta como na maioria dos casos de arteriopatia associada à AIDS, ou pela ação das células do infiltrado inflamatório, as quais liberam inúmeros fatores angiogênicos nos espaços-porta que agem sobre a vasculatura (CARMELIET e JAIN, 2000). Nesta última situação, porém, a eventual arteriopatia detectada no presente estudo deveria ocorrer em outras hepatopatias com infiltrado inflamatório semelhante, tais como as causas de colestase neonatal intra-hepática. No caso de causa infecciosa viral, poderia interferir no processo a predisposição genética relacionada ao sistema de antígenos leucocitários humanos observada na AB (SILVEIRA *et al.*, 1993).

- **Lesão endotelial direta.** Como na situação de hipertensão pulmonar secundária associada à citomegalovirose (SMITH *et al.*, 1998).

- **Hipóxia hepática crônica.** Ocorreria no período fetal ou perinatal, à maneira do que talvez se verifique na hipertensão pulmonar idiopática persistente do neonato. A hipóxia é um poderoso estímulo de angiogênese, ativando fatores de transcrição que induzem a expressão de fatores angiogênicos (CARMELIET, 2000). Além disto, a hipóxia crônica pode desencadear remodelagem vascular, devido a um desequilíbrio entre vasodilatadores, como o óxido nítrico, e vasoconstritores, como a endotelina-1 (CARMELIET e JAIN, 2000). A ocorrência de anomalias arteriais no *porta hepatis* e o padrão anômalo de suas ramificações no fígado (BURROWS, 1996) permitem especular a existência de hipóxia crônica nesse órgão em alguns casos de AB e supor que as eventuais anomalias arteriais encontradas no presente estudo decorram da ação angiogênica e/ou de remodelagem vascular secundária(s) a essa situação.

- **Fatores genéticos.** Envolveriam anormalidades associadas a malformações vasculares, tais como mutações em genes envolvidos na inter-relação entre endotélio e musculatura da túnica média, entre os quais o relacionado ao receptor “Notch3” e a sinalização alterada do TGF- β 1, envolvida com um tipo de mutação produtora de malformações arteriovenosas (CARMELIET e JAIN, 2000). O TGF- β 1 está envolvido na maturação vascular, inibindo a proliferação e a migração endoteliais e induzindo a diferenciação das células musculares da túnica média (CARMELIET, 2000). Como já foi descrito, a ação desse fator de crescimento

encontra-se desregulada no desenvolvimento dos pacientes com AB (TAN *et al.*, 1995). Por outro lado, a família das angiopoietinas atua como estabilizadora das paredes vasculares, e a ausência de angiopoietina em ratos transgênicos produz, além de anomalias cardíacas, defeitos na remodelagem da vasculatura durante o desenvolvimento, tais como hipervascularização e aumento do calibre vascular (YANCOPOPOULOS *et al.*, 2000).

O fato de que apenas artérias (DTOT maior ou igual a 100 μm) tenham sido afetadas por ocasião da portoeterostomia (tabelas 14 e 16) pode ser explicado pelo desenvolvimento embriológico das estruturas arteriais, já que na periferia hepática, de onde foi coletado o material histológico em estudo, as arteríolas são vasos mais jovens, talvez ainda não afetados pelo processo mórbido responsável pela arteriopatia, ao contrário das artérias, presentes nessa área do fígado desde, pelo menos, a 21^a semana gestacional (TERADA e NAKANUMA, 1993). Por outro lado, o fato de haver grande alteração vascular (proliferação e aparente distorção dos elementos estruturais vasculares) (figura 10) na área subcapsular, não quantificada neste estudo, mas detectada qualitativamente, pode ser explicada pela presença de estruturas arteriais e arteríolares nessa região mais precocemente em relação ao restante da periferia hepática (TERADA e NAKANUMA, 1993).

É possível que as alterações detectadas na túnica íntima (aparente diminuição de espessura) no presente estudo (tabelas 13 a 16) reflitam algum tipo de desarranjo estrutural e funcional do endotélio (CARMELIET, 2000) que esteja estimulando a proliferação das células musculares lisas, ou ainda, a manutenção de um padrão fetal de túnica íntima (HEATH e EDWARDS, 1958). Desarranjos de células endoteliais vasculares sabidamente reduzem a habilidade de defesa dessa estrutura a aumentos do estresse cortante, agravando-se assim a disfunção endotelial (MACEDO e LAUTT, 1998). Como, porém, não foi feita marcação específica para a túnica íntima, evitamos tirar conclusões sobre esses dados. Sugerimos novos estudos, morfológicos e com marcadores específicos, para caracterizar alterações da túnica íntima em pacientes com AB.

- **Segunda etapa: Progressão das alterações vasculares arteriais desde a cirurgia de Kasai até o transplante hepático**

A segunda etapa do estudo histológico das estruturas vasculares arteriais demonstrou que, com o passar do tempo, entre 2 e 10 anos após a portoenterostomia (idades no Anexo VII) até a realização do transplante em casos de AB, pareceu ocorrer crescimento dos vasos, caracterizado por aumento de todos os elementos estruturais em artérias e arteríolas de-

monstrado pela estatística TEP. Além disto, observou-se aumento da espessura da túnica média das artérias (tabela 18) e, nesta etapa, também das arteríolas (na tabela 17), assinalados por aumentos da **REMD**. Os valores da **RID** também aumentaram em artérias e arteríolas. Ocorreram pequenos vasos arteriais, com paredes musculares extremamente espessadas e lúmens bastante reduzidos, eventualmente quase obstruídos (figuras 15 e 16). Tais dados possibilitam especular que a arteriopatia da AB possa assemelhar-se ao modelo de maturação de lesões vasculares da hipertensão pulmonar (COOL *et al.*, 1999), restrito talvez à hipertrofia da túnica média. O aumento da espessura da túnica íntima por ocasião do transplante pode representar fenômeno normal ou associar-se à progressão de uma arteriopatia.

O fenômeno de espessamento da túnica média que, por ocasião da cirurgia de Kasai, limitou-se a vasos de maior calibre, com o passar do tempo (2 a 10 anos de pós-operatório) pareceu irradiar-se por toda a árvore arterial hepática, chegando a produzir obstrução luminal de pequenos vasos, aparentemente num processo de remodelagem das estruturas vasculares arteriais.

- **Terceira etapa: Comparação das alterações vasculares arteriais entre casos de atresia biliar transplantados e pacientes transplantados por outras hepatopatias**

A terceira etapa do estudo histológico demonstrou, que na AB, além da proliferação do PVP também detectada por outros autores (TERADA *et al.*, 1989; HARATAKE *et al.*, 1991 I; KOBAYASHI *et al.*, 1994) em situações de hipertensão porta, ocorreu espessamento da túnica média de artérias e arteríolas (tabelas 19 e 20). As figuras 15 e 17 apresentam as alterações vasculares em um caso de AB transplantado e em um paciente transplantado devido a outra hepatopatia, respectivamente. Os dados sugerem que a possível arteriopatia associada a aumento de espessura da túnica média seja característica da AB, não apresentando correspondência com as alterações vasculares notadas em pacientes da mesma faixa etária com as demais doenças que se relacionam à hipertensão porta.

7.4 - Relações entre as Variáveis

7.4.1 - Relações entre Variáveis Histológicas e Fatores Prognósticos

A forma “precoce grave” de AB proposta por DESMET (1992 I) caracterizar-se-ia por fibrose em graus avançados mesmo em lactentes com 30 dias de vida. O autor, até onde temos conhecimento, não realizou estudos quantitativos e baseou-se em avaliação histológica qualitativa. No presente estudo, não se confirmaram tais hipóteses, pois não houve relação entre prognóstico (tabela 22) ou densidade de colágeno (tabela 24) e a presença de MPD. DESMET *et al.* (1999) sugeriram, ainda, que a rarefação tardia dos ductos biliares interlobulares na AB decorreria de: 1) agressão às estruturas biliares em localização mais distal, 2) estrangulamento pela fibrose progressiva, 3) isquemia decorrente da compressão do PVP pela fibrose e 4) progressão da “colangite esclerosante” característica da doença. Embora não tenha sido encontrada relação estatisticamente significativa para $P = 0,05$ entre a densidade de colágeno e a ausência de DBMs, constatou-se pela estatística TEP que, nesta última situação, a área de fibrose do material histológico foi maior, havendo diferença de magnitude de moderada a grande em relação aos casos com DBM (tabela 24). Este dado sugere que o desaparecimento dos ductos interlobulares possa associar-se à extensão da fibrose, porém maior número de casos seria necessário para validar a relação. Observou-se no presente estudo, ainda, correlação positiva e moderada da densidade de colágeno com a idade por ocasião da portoenterostomia ($r = 37\%$, $P = 0,011$) (tabela 25), assim como relação estatisticamente significativa entre densidade de colágeno e faixa etária ($P = 0,023$) (tabela 10). Estes achados sugerem que o agravamento da fibrogênese relaciona-se com o aumento da idade dos pacientes e não com presença de MPD (tabela 24), podendo levar à ausência de DBMs nos espaços-porta (tabela 24).

7.4.2 - Correlações entre Idade por Ocasião da Portoenterostomia, Densidade de Colágeno, Número de Vasos e Elementos Estruturais dos Ramos Arteriais Hepáticos e suas Relações

A idade dos pacientes por ocasião da portoenterostomia pareceu influenciar o comportamento das estruturas arteriolares, ocorrendo proliferação de pequenos vasos dilata-

dos com o decorrer do tempo (valores de **REMD** e **RETD** inferiores e de **RDIDE**, **RDIEM**, **RDIET** superiores) (tabela 25). Tal achado concorda com os encontrados por KOBAYASHI *et al.* (1994) em relação ao comportamento do PVP na cirrose e na inflamação biliar. A correlação moderada e positiva entre a densidade de fibrose e a **RDIET** ($r = 35\%$, $P = 0,017$) sugeriu que a dilatação arteriolar no PVP associou-se à progressão da fibrogênese.

A inexistência de correlação entre densidade de colágeno e alterações arteriais (tabela 26) sugere que tais alterações não sejam secundárias à expansão da fibrogênese, conforme proposto por KOBAYASHI *et al.* (1999), sendo um evento primário no desarranjo morfológico e funcional da AB. HO *et al.* (1993) observaram que hipertrofia e hiperplasia dos ramos arteriais hepáticos ocorreram mesmo em casos de AB com mínimas fibrose e inflamação e, a partir daí, deduziram que o distúrbio vascular seria evento precoce no desenvolvimento da doença. Os dados quantitativos do presente estudo parecem comprovar a impressão desses últimos autores.

7.4.3 - Relação entre Alterações Vasculares e Prognóstico

Não observamos associação entre características arteriais e prognóstico da AB (tabela 28). Esperaríamos, a partir da leitura de estudos da hemodinâmica arterial (BROIDE *et al.*, 1997; KARDORFF *et al.*, 1999), contudo, que os casos com espessamento da túnica média, apresentassem pior evolução pós-portoenterostomia, o que não foi confirmado.

7.4.4 - Relação entre Achados Histológicos nas Estruturas Biliares e Alterações Vasculares Arteriais Hepáticas

Em relação aos ductos biliares interlobulares, constatamos que, nos casos com distribuição focal, ocorreram artérias mais espessas (valores superiores de **REMD** e **RETD**) (tabela 29). A média da **REMD** foi, nestes casos, superior ao valor máximo desta variável nos lactentes sem hepatopatia (**REMD** = 1,1) (figura 14). Estes dados sugerem que o fenômeno de desaparecimento progressivo dos ductos biliares interlobulares associa-se à alteração vascular que pareceu ser detectada no presente estudo. Os ductos biliares, nutridos por vasos arteriais, são sujeitos a fenômenos degenerativos à medida em que sua irrigação sanguínea torna-se

comprometida (EKATAKSIN e KANEDA, 1999). Sugerimos, a partir deste achado, que o desaparecimento dos DBMs, além de relacionar-se à expansão da fibrogênese, conforme sugerido por DESMET *et al.* (1999), associa-se à arteriopatia observada.

A presença de hipertensão arterial sistêmica relaciona-se à hipertrofia da túnica média (SCHMIDT *et al.*, 1982; DOBRIN, 1995; ARMENTANO *et al.*, 1998). Como 3 dos 7 casos com AB transplantados apresentaram hipertensão arterial sistêmica na evolução pós-Kasai, procurou-se avaliar a influência dessa anormalidade sobre as alterações vasculares observadas na terceira etapa do estudo histológico. A hipertensão arterial sistêmica não influenciou o comportamento da túnica média em artérias e arteríolas (tabelas 30 e 31).

7.5 - Considerações sobre as Possíveis Repercussões do Espessamento da Parede Vascular Arterial em Casos de Atresia Biliar

O fluxo sanguíneo e a resistência vascular a esse fluxo são marcadamente influenciados por mínimas alterações do calibre dos vasos. Vasos de paredes espessadas necessitam de maior pressão para manter o fluxo a uma velocidade acelerada (KARDORFF *et al.*, 1999). Segundo GANONG (2001), o fluxo sanguíneo tecidual é efetivamente regulado por pequenas alterações no calibre das arteríolas. As alterações da espessura da parede vascular arterial em casos de AB detectadas no presente estudo provavelmente produzem repercussões importantes nas diversas estruturas hepatobiliares.

Em primeiro lugar, é provável que o espessamento da parede muscular das artérias hepáticas produza desarranjo na “resposta tampão da artéria hepática”, já que os vasos arteriais encontram-se morfológica e funcionalmente comprometidos, sendo incapazes de responder adequadamente às variações pressóricas do sistema porta. Neste caso, a distribuição do aumento pressórico que, normalmente, realiza-se pelos PVPs e artérias terminais (TAKASAKI e HANO, 2001), ficaria desregulada.

Por outro lado, pequenos vasos arteriais, os *vasa vasorum*, colaboram na irrigação sanguínea das paredes das grandes veias, já que o endotélio destes últimos nem sempre recebe oxigenação suficiente a partir do sangue venoso luminal. O comprometimento da vascularização arterial das paredes venosas produz, em poucas horas, descamação das células endoteliais das veias e tromboflebite (EKATAKSIN e KANEDA, 1999). A eventual perfusão diminuída de sangue arterial que as alterações detectadas no presente estudo parecem sugerir poderia determinar isquemia das paredes venosas e comprometimento do endotélio venoso. Analoga-

mente ao que ocorre na hipertensão pulmonar, as alterações endoteliais poderiam contribuir para o aumento da pressão dos vasos venosos do sistema porta intra-hepático.

Em relação à integridade morfológica hepática, ZHAO *et al.* (1993, 1995) fizeram observações em ratos sobre o significado do adequado suprimento sanguíneo arterial. Os ratos foram submetidos a transplante hepático com ou sem rearterialização. Os ratos que sofreram transplante sem rearterialização apresentaram um padrão histopatológico semelhante ao da doença colestática crônica: proliferação ductal portal atípica, fibrose e, posteriormente, cirrose. As alterações foram relacionadas ao tempo de evolução. Portanto, a perda do suprimento arterial resultou em lesão suficiente nos ductos biliares para produzir alteração ao fluxo biliar. Essa alteração do fluxo da bile talvez se associe à descamação do epitélio lesado e edema da parede ductal, segundo a opinião dos autores, além de aumento na pressão intraluminal que, de acordo com eles, desencadearia proliferação de ductos. Os ductos biliares, supridos por um frágil plexo de arteríolas, são particularmente suscetíveis a desarterialização (TAKEMURA *et al.*, 1991). Assim, é possível que as anomalias arteriais encontradas na AB condicionem ou, pelo menos, contribuam para os desarranjos morfológicos presentes nesta doença.

Ainda, o PVP, além de nutrir os ductos biliares, pode atuar nas trocas entre sangue e bile, assim como no fluxo de substâncias em relação ao endotélio biliar. Segundo TAKASAKI e HANO (2001), os ramos da artéria hepática atuam como “mediadores dinâmicos” entre o fluxo portal e a excreção biliar, pela operação do esfíncter da artéria terminal, sensor das variações pressóricas na veia porta. Parte da bile intraductal poderia ser reabsorvida pelo PVP e recircularia. O PVP parece estar envolvido no processo de absorção de bile estagnada, pelo menos em casos de colestase por obstrução extra-hepática (KONO e NAKANUMA, 1992; KOBAYASHI *et al.*, 1994). Esses processos, que estabelecem relações entre o fluxo biliar e os ramos da artéria hepática, na presença da arteriopatia encontrada neste estudo, poderiam estar comprometidos, desencadeando talvez o agravamento do processo colestático.

Por último, sendo o parênquima hepático também nutrido por sangue arterial, a possível arteriopatia expressa pelos dados do presente estudo poderia relacionar-se às alterações parenquimatosas inflamatórias observadas na AB, indicativas, segundo alguns autores, de pior evolução pós-cirurgia de Kasai. Os achados de BROIDE *et al.* (1997) e KARDORFF *et al.* (1999) indicaram que aumentos da resistência vascular arterial são responsáveis por pior evolução pós-operatória.

Novos estudos são necessários para esclarecer as relações dessa possível arteriopatia com os desequilíbrios nos diferentes elementos do sistema hepatobiliar. Como todos os elementos hepatobiliares, incluindo ductos biliares, veias porta e centro-lobulares, parênquima

e mesmo ramos nervosos, têm sua integridade vinculada à irrigação sanguínea arterial, uma arteriopatia teria efeito lesivo sobre o sistema como um todo. Os dados do presente estudo sugerem que uma arteriopatia em alguns casos de AB, desajustando os diversos elementos do sistema hepatobiliar, talvez contribua para a manutenção e o desenvolvimento da “colangiopatia destrutiva” continuada proposta por LANDING (1974) após a portoenterostomia.

Os achados do estudo suscitam diversas questões a serem esclarecidas no futuro. É necessário desenvolver adequadamente o conhecimento de histometria e morfologia dos elementos estruturais vasculares hepáticos em indivíduos sem hepatopatia; caracterizar as alterações morfológicas nas túnicas da parede vascular arterial, especialmente as endoteliais; ampliar o estudo da vasculatura, incluindo o sistema venoso porta, em torno do qual tanto ductos biliares quanto artérias se desenvolvem; esclarecer a relação entre alterações arteriais e desarranjo imunológico e avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na interrelação entre túnica média e endotélio, provavelmente comprometidos nos casos de AB com alteração arterial. Estas questões serão objetos da continuação de nosso trabalho.

8 - CONCLUSÕES

8 - CONCLUSÕES

- **Os dados relativos ao estudo histológico das estruturas biliares no presente estudo permitem que se estabeleçam as conclusões abaixo.**
 - Malformação de placa ductal foi observada em 55% dos casos de atresia biliar, não ocorrendo diferença quanto à sua presença entre casos com e sem anomalias congênicas extra-hepáticas associadas.
 - Proliferação ductular ocorreu em todos os casos de atresia biliar assim como em todos os pacientes com colestase intra-hepática. A distribuição da proliferação ductular foi difusa em 55% do total dos casos.
 - Ductos biliares maduros não foram encontrados nos espaços-porta de 6% dos casos de atresia biliar; em 25% dos casos sem anomalia congênita extra-hepática associada e em 12% dos casos com anomalias sua distribuição foi focal. Em todos os controles os ductos biliares maduros apresentaram distribuição difusa.

- **As conclusões a seguir dizem respeito ao estudo histológico dos ramos arteriais hepáticos.**
 - Não houve diferença entre os grupos de casos com e sem anomalias congênicas extra-hepáticas associadas em relação às características arteriais e arteriolares.
 - O número de arteríolas por paciente foi mais elevado nos portadores de atresia biliar e com colestase intra-hepática em relação aos controles sem hepatopatia.
 - O valor da relação espessura da túnica íntima/espessura da túnica média das arteríolas foi inferior nos fetos sem hepatopatia e nos casos de atresia biliar quando comparado com o dos controles sem hepatopatia.
 - O valor da relação espessura da túnica média/diâmetro externo das artérias por ocasião da portoenterostomia foi superior em 28% dos casos de atresia biliar quando comparado ao dos controles sem hepatopatia.

- O valor da relação espessura da túnica íntima/espessura da túnica média das artérias foi inferior nos casos de atresia biliar em comparação com o de lactentes sem hepatopatia e ao dos pacientes com colestase intra-hepática.
 - As dimensões dos elementos estruturais arteriolares e arteriais aumentaram desde a portoenterostomia até o transplante hepático.
 - O valor da relação espessura da túnica média/diâmetro externo das arteríolas aumentou no decorrer do período entre a portoenterostomia e o transplante hepático.
 - Os valores das relações espessura da túnica média/diâmetro externo e espessura total da parede/diâmetro externo das artérias aumentaram, enquanto o da relação diâmetro luminal/diâmetro externo diminuiu no decorrer do período entre a portoenterostomia e o transplante hepático.
 - Não ocorreu diferença no número de arteríolas por paciente entre os casos com atresia biliar transplantados e os pacientes transplantados por outras causas.
 - Os valores das relações da espessura da túnica média/diâmetro externo e espessura total de parede/diâmetro externo das arteríolas e artérias foram superiores nos transplantados por atresia biliar em comparação com os dos transplantados por outras hepatopatias.
 - O valor da relação espessura da túnica íntima/diâmetro externo de artérias e arteríolas foi superior nos pacientes transplantados por atresia biliar em comparação com o dos transplantados por outras hepatopatias.
 - Os valores das relações diâmetro luminal/espessura da túnica média, diâmetro luminal/espessura total de parede e diâmetro luminal/diâmetro externo de artérias e arteríolas foram inferiores nos casos transplantados na comparação com os de transplantados por outras hepatopatias.
- **Quanto às relações entre as variáveis avaliadas no presente estudo, as conclusões são as que seguem.**
- Não houve relação entre os achados histológicos com a classificação por faixas etárias dos pacientes com atresia biliar, com o prognóstico dos casos pós-portoenterostomia ou com a densidade de colágeno.
 - Os valores da densidade de colágeno dos casos de atresia biliar, com e sem anomalias congênita extra-hepática associadas, foram superiores aos dos controles. Ocorreram correlações positivas entre densidade de colágeno e idade por ocasião da portoenterostomia

e, ainda, com a relação diâmetro luminal/espessura total de parede das arteríolas. Não ocorreu correlação entre densidade de colágeno e as características arteriais.

- Correlacionaram-se positivamente com a idade por ocasião da portoenterostomia as relações diâmetro luminal/espessura da túnica média e diâmetro luminal/diâmetro externo das arteríolas. Correlacionaram negativamente com esta variável as relações espessura da túnica média/diâmetro externo e espessura total da parede/diâmetro externo das arteríolas.
- O número de arteríolas por paciente apresentou correlação negativa com o diâmetro externo destes vasos.
- A idade por ocasião da portoenterostomia correlacionou-se positivamente apenas com a relação espessura da túnica íntima/espessura da túnica média nas artérias.
- Não houve relação entre as características arteriolas e arteriais e o prognóstico dos casos.
- Nos casos com distribuição focal de ductos biliares maduros, os valores das relações espessura da túnica média/diâmetro externo e espessura total de parede/diâmetro externo foram superiores aos dos casos com distribuição difusa destas estruturas.

Em resumo, não houve diferença entre os grupos com e sem anomalias congênitas extra-hepáticas associadas em relação à presença de malformação de placa ductal e às características vasculares arteriais. Em 28% dos casos de atresia biliar, por ocasião da portoenterostomia, além de proliferação arteriolar, detectaram-se artérias com paredes musculares mais espessas que as dos lactentes sem hepatopatia. Por sua vez, a túnica íntima foi mais delgada nos casos que nestes controles. As características da túnica média arterial, por ocasião da portoenterostomia, pareceram ser independentes da densidade de colágeno e da presença de malformação de placa ductal e influenciar a distribuição dos ductos biliares maduros. No período entre a portoenterostomia e o transplante hepático, o espessamento da túnica média progrediu, passando a incluir também as arteríolas. Esta alteração não foi encontrada nos transplantados por outras hepatopatias. A túnica íntima dos casos, por seu turno, também passou a espessar-se com o decorrer do tempo.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas A, Lichtman A, Pober J. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 2000.
2. Abramson S, Berdon W, Altman R, Amodio J, Levy J. Biliary atresia and noncardiac polysplenic syndrome: US and surgical considerations. *Radiology* 1987; 163: 377–379.
3. Ahmed A, Nio M, Ohtani H, Nagura H, Ohi R. In situ CD14 expression in biliary atresia: comparison between early and late stages. *Journal of Pediatric Surgery* 2001; 36: 240–243.
4. Ahmed A, Ohtani H, Nio M, Funaki N, Iwami D, Kumagai S, *et al.* In situ expression of fibrogenic growth factors and their receptors in biliary atresia: comparison between early and late stages. *Journal of Pathology* 2000; 192: 73–80.
5. Ahmed A, Ohtani H, Nio M, Funaki N, Shimaoka S, Nagura H, *et al.* CD8⁺ T cells infiltrating into bile ducts in biliary atresia do not appear to function as cytotoxic T cells: a clinicopathological analysis. *Journal of Pathology* 2001 I; 193: 383–389.
6. Alagille D. Prolonged obstructive jaundice including calculous and noncalculous gallbladder conditions. In: Roy C, Silverman A, Alagille D, editors. *Pediatric Clinical Gastroenterology*. 4th ed. St. Louis: Mosby-Year Book Inc.; 1995.
7. Altman D. *Practical Statistics for Medical Research*. 1st ed. London: Chapman e Hall; 1991.
8. Appleby J. Indwelling common duct tubes. *Journal of the International College of Surgeons* 1959; 31: 631–643.
9. Armentano R, Graf S, Barra J, Velikovskiy G, Baglivo H, Sánchez R, *et al.* Carotid wall viscosity increase is related to intima-media thickening in hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31: 534–539.
10. Azarow K, Phillips M, Sandler A, Hagerstrand I, Superina R. Biliary atresia: should all patients undergo portoenterostomy? *Journal of Pediatric Surgery* 1997; 32: 168–174.

11. Balistreri W, Grand R, Hoofnagle J, Suchy F, Ryckman F, Perlmutter D, *et al.* Biliary atresia: current concepts and research directions – summary of a symposium. *Hepatology* 1996; 23: 1682–1692.
12. Bates M, Bucuvalas J, Alonso M, Ryckman F. Biliary atresia: pathogenesis and treatment. *Seminars in Liver Disease* 1998; 18: 281–293.
13. Battifora H. Clinical applications of the immunohistochemistry of filamentous proteins. *Am J Surg Pathol* 1988; 12 (suppl. 1): 24–28.
14. Battifora H. *Immunohistochemistry in Tumor Diagnosis*. Duarte (Califórnia). United States and Canadian Academy of Pathology; 1990.
15. Bennet D. Problems in neonatal obstructive jaundice. *Pediatrics* 1964; 33: 735–748.
16. Bezerra J. Liver development: a paradigm for hepatobiliary disease in later life. *Seminars in Liver Disease* 1998; 18: 203–216.
17. Bezerra J, Ryckman F, Alonso M, Sabla G. Functional genomics identifies a unique transcriptional program and a suppressed immune response in infants with biliary atresia. *Hepatology* 2001; 34 (4 Pt 2): 240A.
18. Blakolmer K, Jaskiewicz K, Dusnsford H, Robson S. Hematopoietic stem cell markers are expressed by ductal plate and bile duct cells in developing human liver. *Hepatology* 1995; 21: 1510–1516.
19. Brill S, Holst P, Sigal S, Zvibel I, Fiorino A, Ochs A, *et al.* Hepatic progenitor populations in embryonic, neonatal and adult liver. *P.S.E.B.M.* 1993; 204: 261–269.
20. Broide E, Farrant P, Reid F. Hepatic artery resistance index can predict early death in children with biliary atresia. *Liver Transpl Surg* 1997; 3: 604–610.
21. Brough A, Bernstein J. Liver biopsy in the diagnosis of infantile obstructive jaundice. *Pediatrics* 1969; 43: 519–526.
22. Bujanover Y. Prognosis of neonatal cholestatic jaundice. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1987; 6: 163–166.
23. Burrows P. Angiography. In: Walker W, Durie P, Hamilton J, Walker-Smith J, Watkins J, editors. *Pediatric Gastrointestinal Disease*. 2nd ed. St. Louis: Mosby-Year Book Inc.; 1996. p. 1761–1774.
24. Cahill P. Vasoconstrictor responsiveness of portal hypertensive vessels. *Clinical Science* 1999; 96: 3–4.
25. Cameron G, Hou C. An experimental study of stricture of the common bile duct in the Guinea pig. *Journal of Pathology and Bacteriology* 1962; 83: 265–274.

26. Campbell G, Campbell J, Manderson J, Horrigan S, Rennick R. Arterial smooth muscle. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 977–986.
27. Carceller A, Blanchard H, Alvarez F, Dickens S, Bensoussan A, Di Lorenzo M. Past and future of biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 2000; 35: 717–720.
28. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 2000; 6: 389–395.
29. Carmeliet P, Jain R. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249–257.
30. Carmeliet P, Ng Y, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I *et al.* Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF₁₆₄ and VEGF₁₈₈. *Nature Medicine* 1999; 5: 495–502.
31. Carmi R, Magee C, Neill C, Karrer F. Extrahepatic biliary atresia and associated anomalies: etiologic heterogeneity suggested by distinctive patterns of associations. *American Journal of Medical Genetics* 1993; 45: 683–693.
32. Chalkley H. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *Journal of National Cancer Institute* 1943; 4: 47–53.
33. Chandra R. Biliary atresia and other structural anomalies in the congenital polysplenia syndrome. *The Journal of Pediatrics* 1974; 85: 649–655.
34. Chardot C. Biliary atresia. *Pediatric Hepatology* [serial online] 2001 Nov [cited 2001 Sept 2]. Available from: URL: //www.pedihepa.org/BILIARYATRESIA.html.
35. Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, Le Pommelet C, Golmard J, Auvert B. Epidemiology of biliary atresia in France: a national study 1986 – 96. *Journal of Hepatology* 1999; 31: 1006–1013.
36. Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, Le Pommelet C, Golmard J, Reding R, *et al.* Is the Kasai operation still indicated in children of more than 3 months diagnosed with biliary atresia? *The Journal of Pediatrics* 2001; 138: 224–228.
37. Chevallier M, Guerret S, Chossegros P, Gerard F, Grimaud J. A Histological semiquantitative scoring for evaluation of hepatic fibrosis in liver needle biopsy specimens: comparison with morphometric studies. *Hepatology* 1994; 20: 349–355.
38. Cho K, Lunderquist A. The peribiliary vascular plexus: the microvascular architecture of the bile duct in the rabbit and in clinical cases. *Radiology* 1983; 147: 357–364.
39. Chun P, San Antonio R, Davia J. Laennec's cirrhosis and primary pulmonary hypertension. *American Heart Journal* 1980; 99: 779–782.

40. Cocjin J, Rosenthal P, Buslon V, Luk L, Barajas L, Geller S, *et al.* Bile ductule formation in fetal, neonatal, and infant livers compared with extrahepatic biliary atresia. *Hepatology* 1996; 24: 568–574.
41. Cohen, J. The t Test for means. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. London: Academic Press; 1969.
42. Cool C, Kennedy D, Voelkel N, Tudor R. Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Human Pathology* 1997; 28: 434–442.
43. Cool C, Stewart J, Werahera P, Miller G, Williams R, Voelkel N, Tudor R. Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. *American Journal of Pathology* 1999; 155: 411–419.
44. Couvelard A, Bringuier A, Dauge M, Nejari M, Darai E, Benifla J, *et al.* Expression of integrins during liver organogenesis in humans. *Hepatology* 1998; 26: 839–847.
45. Craig J, Landing B. Form of hepatitis in neonatal period simulating biliary atresia. *American Medical Association Archives of Pathology* 1952; 54: 321–333.
46. Crawford A, Lin X, Crawford J. The normal adult human liver biopsy: a quantitative reference standard. *Hepatology* 1998; 28: 323–331.
47. D'agata I, Jonas M, Perez-Atayde A, Guay-Woodford L. Combined cystic disease of the liver and kidney. *Seminars in Liver Disease* 1994; 14: 215–227.
48. Dahms B. The pathology of biliary atresia and neonatal hepatitis. In: Hoofnagle J, Goodman Z, editors. *Liver Biopsy – interpretation for the 1990's. Clinicopathologic Correlations in Liver Diseases*. American Association for the Study of Liver Diseases. Postgraduate Course; 1991. Library of Congress catalog card number ISBN: 1 – 55642-209-1.
49. Davenport M, Savage M, Mowat A, Howard E. Biliary atresia splenic malformation syndrome: an etiologic and prognostic subgroup. *Surgery* 1993; 113: 662–668.
50. Dellert S, Balistreri W. Neonatal cholestasis. In: Walker W, Durie P, Hamilton R, Walker-Smith J, Watkins J, editors. *Pediatric Gastrointestinal Disease*. 2nd ed. St. Louis: Mosby-Year Book, 1996. p.999–1016.
51. Demetris A, Seaberg E, Wennenberg A, Ionelie J, Michalopoulos G. Ductular reaction after submassive necrosis in humans. Special emphasis on analysis of ductular hepatocytes. *American Journal of Pathology* 1996; 149: 439–448.
52. Denke H. The intermediate filament cytoskeleton in neoplastic and non-neoplastic liver disorders. *J Submicrosc Cytol* 1984; 16: 141–145.

53. Desmet V. Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: variations on the theme "Ductal Plate Malformation". *Hepatology* 1992; 16: 1069–1083.
54. Desmet V. Pathology of paediatric cholestasis. In: Falk Symposium 63. Paediatric Cholestasis. Novel Approaches to Treatment. London: Kluwer Academic Publishers; 1992 I. p.49–54.
55. Desmet V. What is congenital hepatic fibrosis? *Histopathology* 1992 II; 20: 465–477.
56. Desmet V, Van Eyken P, Roskanes T. Embriology of the liver and intrahepatic biliary tract, an overview of malformations of the bile duct. In: Bircher J, Banhamon J, McIntyre N, Rizzetto M, Rodés J, editors. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. Oxford: Oxford University Press. 2nd ed. 1999. p.51–61.
57. Deveci M, Deveci G. Biliary atresia splenic malformation syndrome- is it a result of embryonically midline rotational defects? A case report. *Journal of Pediatric Surgery* 2000; 35: 1377–1380.
58. Dhawan A, Trivedi P, Cheeseman P, Baker A, Howard E, Mieli-Vergani G. Serum hyaluronic acid as an early prognostic marker in biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 2001; 36: 443–446.
59. Dillon P, Belchis D, Tracy T, Cilley R, Hafer L, Krummel T. Increased expression of intercellular adhesion molecules in biliary atresia. *American Journal of Pathology* 1994; 145: 263–267.
60. Dimmick J. Extrahepatic biliary atresia and the polysplenia syndrome. *The Journal of Pediatrics* 1975; 86: 644–645.
61. Dobrin P. Mechanical factor associated with the development of intimal and medial thickening in vein grafts subjected to arterial pressure. *Hypertension* 1995; 26: 38–43.
62. Ekataksin W, Kaneda K. Liver microvascular architecture: an insight into the pathophysiology of portal hypertension. *Seminars in Liver Disease*, 1999; 19: 359–382.
63. Ekataksin W. The isolated artery: an intrahepatic arterial pathway that can bypass the lobular parenchyma in mammalian livers. *Hepatology* 2000; 31: 269–279.
64. Emblem R, Stake G, Monclair T. Progress in the treatment of biliary atresia: a plea for surgical intervention within the first two months of life in infants with persistent cholestasis. *Acta Paediatrica* 1993; 82: 971–974.
65. Endo M, Masuyama H, Watanabe K, Hagane K, Ikawa H, Yokoyama J, *et al.* Calculation of biliary atresia prognostic index using a multivariate linear model. *Journal of Pediatric Surgery* 1995; 30: 1575–1579.

66. Endo M, Yamaki S, Ohmi M, Tabayashi K. Pulmonary vascular changes induced by congenital obstruction of pulmonary venous return. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 193–197.
67. Esterly J, Glacov S, Ferguson D. Morphogenesis of intimal obliterative hyperplasia of small arteries in experimental pulmonary hypertension. An ultrastructural study of the role of smooth-muscle cells. *American Journal of Pathology* 1968; 52: 325–347.
68. Flynn D, De Ville J, Nijaar S, Kelly D, Strain A, Crosby H. Isolation and characterization of biliary epithelial cells from diagnostic and staging biopsies in extrahepatic biliary atresia. *Hepatology* 2001; 34 (4 Pt 2): 1275.
69. Fox S, Leek R, Weekes M, Whitehouse R, Gatter R, Harris A. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *Journal of Pathology* 1995; 177: 275–283.
70. Fukuda-Taira S. Hepatic induction in the avian embryo: specificity of reactive endoderm and inductive mesoderm. *J Embryol Exp Morph* 1981; 63: 111–125.
71. Funaki N, Sasano H, Shizawa S, Nio M, Iwami D, Ohi R, *et al.* Apoptosis and cell proliferation in biliary atresia. *Journal of Pathology* 1998; 186: 429–433.
72. Furuya K, Zhang H. Identification of differentially expressed genes in extrahepatic biliary atresia using CDNA microarray analysis. *Hepatology* 2001; 34 (4 Pt 2): 241A.
73. Ganong W. *Review of Medical Physiology*. 20th ed. New York: Lange Medical Books; 2001.
74. Gartner L, Hiatt J. *Color Textbook of Histology*. 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1997.
75. Gauthier M, Jehan P, Odièvre M. Histologic study of biliary fibrous remnants in 48 cases of extrahepatic biliary atresia: correlation with postoperative bile flow restoration. *Journal of Pediatrics* 1976; 89: 704–709.
76. Geiger R, Berger R, Hess J, Bogers J, Sharma H, Mooi J. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease. *Journal of Pathology* 2000; 191: 202–207.
77. Goodman S. Toward evidence-based medical statistics. 1: The *P* value fallacy. *Annals of Internal Medicine* 1999; 130: 995–1004.
78. Gores G. Mechanisms of cell injury and death in cholestasis and hepatoprotection by ursodeoxycholic acid. *Journal of Hepatology* 2000; 32 suppl. 2: 11–13.
79. Green D. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998; 94: 695–698.

80. Grosfeld J, Rescorla F, Skinner M, West K, Scherer III L. The spectrum of biliary tract disorders in infants and children. *Arch Surg* 1994; 129: 513–520.
81. Guttman F, Braun P, Garance P, Blanchard H, Collin P, Dallaire L, *et al.* Multiple atresias and a new syndrome of hereditary multiple atresias involving the gastrointestinal tract from stomach to rectum. *Journal of Pediatric Surgery* 1973; 8: 633–640.
82. Hádchouel M, Fabre M. Diagnostic histologique d'une cholestase néonatale. *Ann Pathol* 1995; 15: 357–364.
83. Haratake J, Hisaoka M, Furuta A, Horie A, Yamamoto O. A scanning electron microscopic study of postnatal development of rat peribiliary plexus. *Hepatology* 1991; 14: 1196–1200.
84. Haratake J, Hisaoka M, Yamamoto O, Horie A. Morphological changes of hepatic microcirculation in experimental rat cirrhosis: a scanning electron microscopic study. *Hepatology* 1991 I; 13: 952–956.
85. Haruna Y, Saito K, Spaulding S, Nalesnik M, Gerber M. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology* 1996; 23: 476–481.
86. Hashimoto T, Yura J, Mahour G, Warburton D, Landing B, Stanley P, *et al.* Recent topics of experimental production of biliary atresia and an experimental model using devascularization of the extra-hepatic bile duct in fetal sheep. In: Kasai M, editor. *Biliary Atresia and its Related Disorders- Proceedings of an International Symposium, Sendai, Japan.* Amsterdam: Excerpta Medica, 1983. p.38–45.
87. Haworth S, Reid L. Persistent fetal circulation: newly recognized structural features. *The Journal of Pediatrics* 1976; 88: 614–620.
88. Hays D, Kimura K. *Biliary atresia. The Japanese experience.* Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press; 1980.
89. Heath D, Edwards J. The pathology of pulmonary vascular disease. A description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation* 1958; 18: 533–547.
90. Henriksen N, DrablØs P, Aagaenæs O. Cholestatic jaundice in infancy: the importance of familial and genetic factors in aetiology and prognosis. *Archives of Disease in Childhood*, 1981; 56: 622–627.
91. Ho C, Shioda K, Shirasaki K, Takahashi S, Tokimatsu S, Maeda K. The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the hepatobiliary system and the hepatic artery. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1993; 16: 53–60.

92. Hofman F, Wright A, Dohadwala M, Wong-Staal F, Walker S. Exogenous tat protein activates human endothelial cells. *Blood* 1993; 82: 2774–2780.
93. Hopkins W. A scale of magnitudes for effect statistics. A new view of statistics [serial online] 1997 [cited 1997 Jun 9]. Available from: URL: <http://www.Sportsci.org/resource/statis/effectmag.html>.
94. Housset C. Biliary epithelial cell response to cholestasis. *Journal of Hepatology* 2000; 32 suppl. 2: 14–15.
95. Howard E. Biliary atresia- complications and results of non-transplant surgery. In: Falk Symposium 63. Paediatric Cholestasis. Novel Approaches to Treatment. London: Kluwer Academic Publishers; 1992. p.273–284.
96. Icardo J, Sanchez de Veja M. Spectrum of heart malformations in mice with *situs solitus*, *situs inversus*, and associated visceral heterotaxy. *Circulation* 1991; 84: 2547–2558.
97. Iida N. Nitric oxide mediates sympathetic vasoconstriction at supraspinal, spinal and synaptic levels. *Am J Physiol* 1999; 276: H918–H925.
98. Ito T, Horisawa M, Ando H. Intrahepatic bile ducts in biliary atresia – a possible factor determining the prognosis. *Journal of Pediatric Surgery* 1983; 18: 124–130.
99. Iwami D, Ohi R, Nio M, Shimaoka S, Sano N, Nagura H. Abnormal distribution of nerve fibers in the liver of biliary atresia. *Tohoku J Exp Med* 1997; 181: 57–65.
100. Jacques C, Richmond G, Tierney L, Curtis J, McKerrow J, Warnock M. Primary pulmonary hypertension and human immunodeficiency virus infection in a non-hemophiliac man. *Human Pathology* 1992; 23: 191–194.
101. Jamison B, Michel R. Different distribution of plexiform lesions in primary and secondary pulmonary hypertension. *Human Pathology* 1995; 26: 987–993.
102. Jorgensen M. The ductal plate malformation. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 1977; 257 suppl: 1–87.
103. Junqueira L, Bignolas G, Brentani R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemical Journal* 1979; 11: 447–451.
104. Kadambi A, Carreira C, Yun C, Padera T, Dolmans D, Carmeliet P *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C differentially affects tumor vascular function and leucocyte recruitment: role of VEGF-receptor 2 and host VEGF-A¹. *Cancer Research* 2001; 61: 2404–2408.

105. Kardorff R, Klotz M, Melter M, Rodeck B, Hoyer P. Prediction of survival in extrahepatic biliary atresia by hepatic duplex sonography. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1999; 28: 411–417.
106. Karrer F, Hall R, Lilly J. Biliary atresia and the polysplenia syndrome. *Journal of Pediatric Surgery* 1991; 26: 524–527.
107. Kalter H, Warkany J. Congenital malformations. *New England Journal of Medicine* 1983; 308: 424–431.
108. Kalter H, Warkany J. Congenital malformations. *New England Journal of Medicine* 1983 I; 308: 491–499.
109. Kasai M, Okamoto A, Ohi R. Changes of portal veins pressure and intrahepatic blood vessels after surgery for biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1981; 16: 152–159.
110. Kasai M, Yakovac W, Koop C. Liver in congenital biliary atresia and neonatal hepatitis – a histopathologic study. *Archives of Pathology* 1962; 74: 152–162.
111. Klippel C. A new theory of biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1972; 7: 651–654.
112. Kobayashi H, Horikoshi K, Yamataka A, Lane G, Watanabe S, Futagawa S, *et al.* α -glutathione-s-transferase as a new sensitive marker of hepatocellular damage in biliary atresia. *Pediatr Surg Int* 2000; 16: 302–305.
113. Kobayashi H, Miyano T, Horikoshi K, Tokita A. Prognostic value of serum procollagen III peptide and type IV collagen in patients with biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1998; 33: 112–114.
114. Kobayashi H, Narumi S, Tamatani T, Lane G, Miyano T. Serum IFN-inducible protein-10: a new clinical prognostic predictor of hepatocyte death in biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1999; 34: 308–311.
115. Kobayashi H, Puri P, O'Briain S, Surana R, Miyano T. Hepatic overexpression of MHC Class II antigens and macrophage-associated antigens (CD 68) in patients with biliary atresia of poor prognosis. *Journal of Pediatric Surgery* 1997; 32: 590–593.
116. Kobayashi S, Nakanuma Y, Matsui O. Intrahepatic peribiliary vascular plexus in various hepatobiliary diseases: a histological survey. *Human Pathology* 1994; 25: 940–946.
117. Kono N, Nakanuma Y. Ultrastructural and immunohistochemical studies of the intrahepatic peribiliary capillary plexus in normal livers and extrahepatic biliary obstruction in human beings. *Hepatology* 1992; 15: 411–418.

118. Lamireau T, Le Bail B, Boussarie L, Fabre M, Vergnes P, Bernard O, *et al.* Expression of collagens type I and IV, osteonectin and transforming growth factor beta-1 (TGF β 1) in biliary atresia and paucity of intrahepatic bile ducts during infancy. *Journal of Hepatology* 1999; 31: 248–255.
119. Landing B. Considerations of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst – the concept of infantile obstructive cholangiopathy. *Prog Pediatr Surg* 1974; 6: 113–139.
120. Lane E. Monoclonal antibodies provide specific intramolecular marker for the study of epithelial tonofilament organization. *J Cell Biol* 1982; 92: 665–673.
121. Langenburg S, Poulick J, Goretsky M, Klein A, Klein M. Bile duct size does not predict success of portoenterostomy for biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 2000; 35: 1006–1007.
122. Lauth W, Greenway C. Conceptual review of the the hepatic vascular bed. *Hepatology* 1987; 7: 952–963.
123. Lebrec D, Capron J, Dhumeaux D, Benhamou J. Pulmonary hypertension complicating portal hypertension. *American Review of Respiratory Diseases* 1979; 120: 849–856.
124. Lee S, Shroyer K, Markham N, Cool C, Voelkel N, Tudor R. Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101: 927–934.
125. Lefkowitz J. Biliary atresia. *Mayo Clinic Proceedings* 1998; 73: 90–95.
126. Lembo G, Vecchione C, Izzo R, Fratta L, Fontana D, Marino G, *et al.* Noradrenergic vascular hyper-responsiveness in human hypertension is dependent of oxygen free radical impairment of nitric oxide activity. *Circulation* 2000; 102: 552–557.
127. Lilly J, Altman R. Hepatic portoenterostomy (the Kasai operation) for biliary atresia. *Surgery* 1975; 78: 76–86.
128. Losay J, Piot D, Bougaran J, Ozier Y, Devictor D, Houssin D, *et al.* Early liver transplantation is crucial in children with liver disease and pulmonary artery hypertension. *Journal of Hepatology* 1998; 28: 337–342.
129. Macedo M, Lauth W. Shear-induced modulation of vasoconstriction in the hepatic artery and portal vein by nitric oxide. *American Journal of Physiology* 1998; 274 2 Pt 1: G253–G260.
130. Maksem J. Polysplenia syndrome and splenic hypoplasia associated with extrahepatic biliary atresia. *Arch Pathol Lab Med* 1980; 104: 212–214.

131. Maksoud J, Fauza D, Silva M, Porta G, Miura I, Zerbini M. Management of biliary atresia in the liver transplantation era: a 15-year, single-center experience. *Journal of Pediatric Surgery* 1998; 33: 115–118.
132. Malek A, Gibbons G, Dzau V, Izumo S. Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 92: 2013–2021.
133. Martinez-Palli G, Barberà J, Taurà P, Cirera P, Visa J, Rodriguez-Roisin R. Severe portopulmonary hypertension after liver transplantation in a patient with preexisting hepatopulmonary syndrome. *Journal of Hepatology* 1999; 31: 1075–1079.
134. Mason N, Springall D, Burke M, Pollock J, Mikhail G, Yacoub M, *et al.* High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Journal of Pathology* 1998; 185: 313–318.
135. Masseroli M, Caballero T, O'valle F, Del Moral R, Pérez-Milena A, Del Moral R. Automatic quantification of liver fibrosis: design and validation of a new image analysis method: comparison with semi-quantitative indexes of fibrosis. *Journal of Hepatology* 2000; 32: 453–464.
136. Matsui A. Mass screening for neonatal cholestasis. In: Biliary atresia. Proceedings of the 4th International Symposium of Biliary Atresia. Japan: Professional Postgraduate Services 1987. p.98–101.
137. Matsui A, Dodoriki M. Screening of biliary atresia. *Lancet* 1985; 34: 1181.
138. Mazziotti M, Willis L, Heuckeroth R, Laregina M, Swanson P, Overbeek P, *et al.* Anomalous development of hepatobiliary system in the *Inv* mouse. *Hepatology* 1999; 30: 372–378.
139. McClement J, Howard E, Mowat A. Results of surgical treatment for extrahepatic biliary atresia in United Kingdom 1980–82. *British Medical Journal* 1985; 290: 345–347.
140. McCuskey R. The hepatic microvascular system. In: Arias I, Boyer J, Fausto N, Jakoby W, Schachter D, Shafritz D, editors. *The Liver Biology and Pathobiology*. 3rd ed. New York: Raven Press Ltd.;1994. p.1089–1106.
141. McDonnell P, Toye P, Hutchins G. Primary pulmonary hypertension and cirrhosis: are they related? *Am Rev Respir Dis* 1983; 127: 437–441.
142. McKiernan P, Baker A, Kelly D. The frequency and outcome of biliary atresia in the UK and Ireland. *Lancet* 2000; 355: 25–29.

143. Mehta N, Khan I, Mehta R, Sepkowitz D. HIV-related pulmonary hypertension. Analytic review of 131 cases. *Chest* 2000; 118: 1133–1141.
144. Mesa R, Edell E, Dunn W, Edwards W. Human immunodeficiency virus infection and pulmonary hypertension: two new cases and a review of 86 reported cases. *Mayo Clinic Proceedings* 1998; 73: 37–45.
145. Mieli-Vergani G.; Portmann B, Howard E, Mowat A. Late referral for biliary atresia—Missed opportunities for effective surgery. *Lancet* 1989; 25: 421–423.
146. Minnick K, Kreisberg R, Dillon P. Soluble ICAM-1 (sICAM-1) in biliary atresia and its relationship to disease activity. *Journal of Surgical Research* 1998; 76: 53–56.
147. Moll R, Franke W, Schiller D, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratin polypeptides: patterns of expression of specific cytokeratins in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31: 11–24.
148. Moore K, Persaud T. *The Developing Human: Clinically Oriented Embriology*. 6th ed. Philidelphia: W.B. Saunders Company; 1998.
149. Morgan D, Turnpenny L, Goodship J, Dai W, Majunder K, Matthews L, *et al*. Inversin, a novel gene in the vertebrate left-right axis pathway, is partially deleted in the inv mouse. *Nature Genetics* 1998; 20: 149–156.
150. Morgan W, Rosenkrantz J, Hill R. Hepatic arterial interruption in the fetus: an attempt to simulate biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1966; 1: 342–346.
151. Morishima M, Yasui H, Nakasawa M, Ando M, Ishibashi M, Takao A. *Situs* variation and cardiovascular anomalies in the transgenic mouse insertional mutation, *inv*. *Teratology* 1998; 57: 302–309.
152. Morrell N, Atochina E, Morris K, Danilov S, Stenmark K. Angiotensin converting enzyme expression in small pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 96: 1823–1833.
153. Morse J, Barst R, Itescu S. Primary pulmonary hypertension in HIV infection: an outcome determined by particular HLA class 2 alleles. *Am J Resp Crit Care Med* 1996; 153: 1299–1301.
154. Mowat A, Davidson L, Dick M. Earlier identification of biliary atresia and hepatobiliary disease: selective screening in the third week of life. *Archives of Disease in Childhood* 1995; 72: 90–92.
155. Müller D, Enderle G, Löw O, Dietze E, Krell H. Bile ductular proliferation and altered leukotriene elimination in thiocetamide-induced fibrosis of rat liver. *Journal of Hepatology* 1996; 25: 547–553.

156. Nakada K, Kawaguchi F, Wakisaka M, Nakada M, Enami T, Yamate N. Digestive tract disorders associated with asplenia/polysplenia syndrome. *Journal of Pediatric Surgery* 1997; 32: 91–94.
157. Nakano S, Haratake J, Hashimoto H. Alterations in bile ducts and peribiliary microcirculation in rats after common bile duct ligation. *Hepatology* 1995; 21: 1380–1386.
158. Nakanuma Y, Ohta G. Immunohistochemical study on bile ductular proliferation in various hepatobiliary diseases. *Liver* 1979; 6: 205–211.
159. Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, *et al.* Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *The Journal of Immunology* 1997; 158: 5536–5544.
160. Nio M, Takahashi T, Ohi R. Changes of intrahepatic portal veins in biliary atresia: formation and development of medial smooth muscle correlated with portal hypertension. In: Ohi R, editor. *Biliary Atresia*. Sendai, Japan: Professional Postgraduate Services. Proceedings of the 4th International Symposium on Biliary Atresia; 1986. p.243–50.
161. Northover J. *The anatomy of bile duct arterial supply and its surgical implications*. London: University of London; 1980.
162. Ohi R. Biliary atresia. A surgical perspective. *Pediatric Liver: helping adults by treating children*. *Clinics In Liver Disease* 2000; 4: 779–804.
163. Ohi R, Chiba T, Endo N, Goto M. Long-term follow up after surgery for patients with biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1990; 25: 442–445.
164. Ohi R, Mochizuki I, Komatsu K, Kasai M. Portal hypertension after successful hepatic portoenterostomy in biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1986; 21: 271–274.
165. Ohuchi N, Ohi R, Takahashi T, Kasai M. Postoperative changes of intrahepatic portal veins in biliary atresia– a 3–D reconstruction study. *Journal of Pediatric Surgery* 1986; 21: 10–14.
166. Ohya T, Miyano T, Kimura K. Indication for portoenterostomy based on 103 patients with Suruga II modification. *Journal of Pediatric Surgery* 1990; 25: 801–804.
167. Okamoto E, Okasara T, Toyosaka A. An experimental study of the etiology of congenital biliary atresia. In: Kasai M., editor. *Cholestasis in Infancy*. Tokio: Universtity of Tokyo Press; 1980. p.217–234.

168. Orte C, Polak J, Haworth S, Yacoub M, Morrell N. Expression of pulmonary vascular angiotensin-converting enzyme in primary and secondary plexiform pulmonary hypertension. *Journal of Pathology* 2000; 192: 379–384.
169. Osborn M. Intermediate filaments as histological markers: an overview. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 104–109.
170. Paddock R, Arensman R. Polysplenia syndrome: spectrum of gastrointestinal congenital anomalies. *Journal of Pediatric Surgery* 1982; 17: 563–566.
171. Park Y, Yang C, Fernandez G, Cubucku O, Thung S, Theise N. Neoangiogenesis and sinusoidal “capillarization” in dysplastic nodules of the liver. *The American Journal of Surgical Pathology* 1998; 22: 656–662.
172. Pereira T, Hoskins A. Identification of differentially expressed genes by CDNA array analysis in liver disease associated with cystic fibrosis. *Hepatology* 2001; 34 (4 Pt 2): 375A.
173. Perez-Atayde A. Liver biopsy interpretation. In: Walker W, Durie P, Hamilton J, Walker-Smith J, Watkins J, editors. *Pediatric Gastrointestinal Disease*. 2nd ed. St. Louis: Mosby-Year Book; 1996. p.1543–1577.
174. Perlmutter D. α 1- antitrypsin deficiency. In: Walker W, Durie P, Hamilton J, Walker-Smith J, Watkins J, editors. *Pediatric Gastrointestinal Disease*. 2nd ed. St. Louis: Mosby-Year Book; 1996. p.1181–1204.
175. Petersen C, Biermans D, Kuske M, Schäckel K, Meyer-Junghaller L, Mildemberger H. New aspects in a murine model for extrahepatic biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1997; 32: 1190–1195.
176. Petersen C, Bruns E, Kuske M, Von Wussow P. Treatment of extrahepatic biliary atresia with interferon- α in a murine infectious model. *Pediatric Research* 1997 I; 42: 623–628.
177. Piccoli D, Witzleben C. Disorders of the intrahepatic bile ducts. In: Walker W, Durie P, Hamilton J, Walker-Smith J, Watkins J. *Pediatric Gastrointestinal Disease*. 2nd ed. St. Louis: Mosby-Year Book; 1996. p.1362–1384.
178. Pickett L, Briggs H. Biliary obstruction secondary to hepatic vascular ligation in fetal sheep. *Journal of Pediatric Surgery* 1969; 4: 95–101.
179. Pietra G, Edwards W, Kay M, Rich S, Kernis J, Schloo B, *et al.* Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation* 1989; 80: 1198–1206.

180. Popper H. The relation of mesenchymal cell products to hepatic epithelial systems. *Prog Liver Dis* 1990; 9: 27–38.
181. Questa H, Valone P, Wacholder V. Atresia de vias biliares. Seguimos operando tarde? *Revista de Cirurgia Infantil* 1993; 3: 118–151.
182. Ramm G, Nair V, Bridle K, Shepherd R, Crawford D. Contribution of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells to hepatic fibrogenesis in biliary atresia. *American Journal of Pathology* 1998; 153: 527–535.
183. Raweily E, Gibson A, Burt A. Abnormalities of intrahepatic bile ducts in extrahepatic biliary atresia. *Histopathology* 1990; 17: 521–527.
184. Riepenhoff-Talty M, Gouvea V, Evans M, Svensson L, Hoffenberg E, Sokol R, *et al.* Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *The Journal of Infectious Diseases* 1996; 174: 8–15.
185. Riepenhoff-Talty M, Schaeckel K, Clark F, Mueller W, Uhnnoo I, Rossi T, *et al.* Group A rotaviruses produce extrahepatic biliary obstruction in orally inoculated newborn mice. *Pediatric Research* 1993; 33: 394–398.
186. Robalino B, Moodie D. Association between primary pulmonary hypertension and portal hypertension: analysis of its pathophysiology and clinical, laboratory and hemodynamic manifestations. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17: 492–498.
187. Rodin A, Sloane J, Nghiem Q. Polysplenia and severe congenital heart disease and Howell-Jolly bodies. *American Journal of Clinical Pathology* 1972; 58: 127–134.
188. Roncalli M, Roz E, Coggi G, Di Rocco M, Bossi P, Minola E, *et al.* The vascular prolife of regenerative and dysplastic nodules of the cirrhotic liver: implications for diagnosis and classification. *Hepatology* 1999; 30: 1174–1178.
189. Rubin E, Martin A, Thung S, Gerber M. Morphometric and immunohistochemical characterization of human liver regeneration. *American Journal of Pathology* 1995; 147: 397–404.
190. Rudolph J, Balistreri W. Optimal treatment of biliary atresia – “halfway” there! *Hepatology* 1999; 30: 808–810.
191. Santos J. Comparação dos resultados da cintilografia de vias biliares seqüencial de 24 horas, do Índice Hepático e do estudo de variáveis histopatológicas hepáticas no diagnóstico diferencial da colestase neonatal [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1993.

192. Santos J, Silveira T, Almeida H, Carvalho P, Cerski C. Colestase neonatal – atraso no encaminhamento de crianças para diagnóstico diferencial. *Jornal de Pediatria* 1997; 73: 32–36.
193. Santos J, Almeida H, Cerski C, Silveira T. Histopathological diagnosis of intra- and extrahepatic neonatal cholestasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1998; 31: 911–919.
194. Santos J, Pires A, Silveira T. A placa ductal e a organização do sistema biliar intra-hepático. *Revista HCPA* 1998 I; 18: 302–310.
195. Santos J, Silveira T, Cerski T, Almeida H. Síndrome de polisplenia associada à hepatite neonatal idiopática. *Jornal de Pediatria* 1998 II; 74: 59–61.
196. Sasaki M, Nakanuma Y, Terada T, Kim Y. Biliary epithelial expression of MUC 1, MUC 2, MUC 3 and MUC 5/6 apomucins during intrahepatic bile duct development and maturation- an immunohistochemical study. *American Journal of Pathology* 1995; 147: 574–579.
197. Saunders J, Constabile T, Heath D, Smith P, Paton A. Pulmonary hypertension complicating portal vein thrombosis. *Thorax* 1979; 34: 281–283.
198. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiessche W, Sharpe M, *et al.* Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; 373: 699–702.
199. Schmidt A, Grünwald J, Buddecke E. [³⁵ S]Proteoglycan metabolism of arterial smooth muscle cells cultured from normotensive and hypertensive rats. *Atherosclerosis* 1982; 45: 299–310.
200. Schoen B, Lee H, Sullivan K, Ricketts R. The Kasai portoenterostomy: when is it too late? *Journal of Pediatric Surgery* 2001; 36: 97–99.
201. Schreiber R. Hepatobiliary system structure and function. In: Walker W, Durie P, Hamilton J, Walker-Smith J, Watkins J, editors. *Pediatric Gastrointestinal Disease*. 2nd ed. St. Louis: Mosby-Year Book; 1996. p.127–141.
202. Schwartzberg M, Lieberman D, Getzoff B, Ehrlich G. Systemic lupus erythematosus and pulmonary vascular hypertension. *Arch Intern Med* 1984; 144: 605–607.
203. Schweizer P, Lunzmann K. Extrahepatic biliary atresia: how efficient is hepatoportoenterostomy? *European Journal of Pediatric Surgery* 1998; 8: 150.
204. Schweizer P, Schweizer M, Schellinger K, Kirschner H, Schittenhelm C. Prognosis of extrahepatic bile-duct atresia after hepatoportoenterostomy. *Pediatr Surg Int* 2000; 16: 351–355.

205. Seashore J, Collins F, Markowitz R, Seashore M. Familial apple peel jejunal atresia: surgical, genetic and radiographic aspects. *Pediatrics* 1987; 80: 540–544.
206. Segawa O, Miyano T, Fujimoto T, Watanabe S, Hirose M.; Fujiwara T. Actin and myosin deposition around bile canaliculi: a predictor of clinical outcome in biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1993; 28: 851–856.
207. Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Research* 1990; 50: 3811–3815.
208. Shah K, Gerber M. Development of intrahepatic bile ducts in humans. Immunohistochemical study using monoclonal cytokeratin antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 1135–1138.
209. Shah K, Gerber M. Development of intrahepatic bile ducts in humans. Possible role of laminin. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 597–600.
210. Sherlock S. The syndrome of disappearing intrahepatic bile ducts. *Lancet* 1987; 2: 493–495.
211. Shiraki K, Okada T, Tanimoto K. Evaluation of various diagnostic methods in biliary atresia. In: Ohi R, editor. *Biliary Atresia. Proceedings of the 4th International Symposium on Biliary Atresia*. Tokyo: Professional Postgraduate Services; 1987.
212. Silveira T. *Atresia de vias biliares extra-hepática: epidemiologia, história clínica e associação com fatores genéticos [tese de doutorado]*. Porto Alegre: Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1988.
213. Silveira T. *Icterícia na infância*. In: Matos A, Dantas W, editores. *Compêndio de Hepatologia*. São Paulo: BYK; 1995. p.110–125.
214. Silveira T, Salzano F, Donalson P, Mieli-Vergani G, Howard E, Mowat A. Association between HLA and extrahepatic biliary atresia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1993; 16: 114–117.
215. Silveira T, Salzano F, Howard E, Mowat A. Congenital structural abnormalities in biliary atresia: evidence for etiopathogenic heterogeneity and therapeutic implications. *Acta Paediatrica Scandinavica* 1991; 80: 1192–1199.
216. Silveira T, Salzano F, Howard E, Mowat A. Extrahepatic biliary atresia and twinning. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1991 I; 24: 67–71.
217. Silveira T, Salzano F, Howard E, Mowat A. The relative importance of familial, reproductive and environmental factors in biliary atresia: etiological implications and effect on patient survival. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1992; 25: 673–681.

218. Silver M, Bohn D, Shawn D, Shuckett B, Eich G, Rabinovitch M. Association of pulmonary hypertension with congenital portal hypertension in a child. *The Journal of Pediatrics* 1992; 120: 321–329.
219. Sirica A. Ductular hepatocytes. *Histol Histopathol* 1995; 10: 433–456.
220. Sivaramkrishnan N, Askari A, Popelka C, Kleinerman J. Pulmonary hypertension and systemic lupus erythematosus. *Arch Intern Med* 1980; 140: 109–111.
221. Slott P, Liu M, Tavoloni N. Origin, pattern and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* 1990; 99: 466–477.
222. Smith F, Arias J, Elmquist T, Mazzara J. Microvascular cytomegalovirus endothelialitis of the lung. A possible cause of secondary pulmonary hypertension in a patient with AIDS. *Chest* 1998; 114: 337–340.
223. Smith P, Heath D, Yacoub M, Caslin A, Gosney J. The ultrastructure of plexogenic pulmonary arteriopathy. *Journal of Pathology* 1990; 160: 11–121.
224. Speich R, Jenni R, Opravil M, Pfab M, Russi E. Primary pulmonary hypertension in HIV infection. *Chest* 1991; 100: 1268–1271.
225. Subramaniam R, Bowen D, Bruce J. Initial response to portoenterostomy determines long-term outcome in patients with biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 2000; 35: 593–597.
226. Stowens D. Congenital biliary atresia. *Am J Gastroenterol* 1959; 32: 577–590.
227. Stowens D. Congenital biliary atresia. *Ann NY Acad Sci* 1963; 111: 337–351.
228. Takahashi A, Tsushida Y, Hatakeyama S, Suzuki N, Kuroiwa M, Hitoshi I, *et al.* A peculiar form of multiple cystic dilatation of intrahepatic biliary system found in a patient with biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 1997; 32: 1776–1779.
229. Takasaki S, Hano H. Three-dimensional observations of the human hepatic artery (arterial system in the liver). *Journal of Hepatology* 2001; 34: 455–466.
230. Takemura M, Oguma S, Mori S, Ishii M, Starzl T, Demetris A, *et al.* Peribiliary vascular diseases in rejected livers; computed-aided three dimensional reconstruction and morphometry. *Transplantation Proceedings* 1991; 23: 1409–1412.
231. Tan C, Chan V, Yong R, Vijayan V, Tan W, Fook Jong S, *et al.* Distortion in TGF beta-1 peptide immunolocalization in biliary atresia: comparison with the normal pattern in the developing human intrahepatic bile duct system. *Pathology International* 1995; 45: 815–824.

232. Tan C, Davenport M, Driver M, Howard E. Does the morphology of the extrahepatic biliary remnants in biliary atresia influence survival? A review of 205 cases. *Journal of Pediatric Surgery* 1994; 29: 1459–1464.
233. Tan C, Driver M, Howard E, Moscoso G. Extrahepatic biliary atresia: a first-trimester event? Clues from light microscopy and immunohistochemistry. *Journal of Pediatric Surgery* 1994 I; 29: 808–814.
234. Tan C, Moscoso G. The developing human biliary system at the porta hepatis level between 29 days and 8 weeks of gestation: a way to understanding biliary atresia. *Pathology International* 1994; 4: 587–599.
235. Tan C, Moscoso G. The developing biliary system at the porta hepatis level between 11 and 25 weeks of gestation: a way to understanding biliary atresia. Part 2. *Pathology International* 1994 I; 4: 600–610.
236. Tanano H, Hasegawa T, Kawahara H, Sasaki T, Okada A. Biliary atresia associated with congenital structural anomalies. *Journal of Pediatric Surgery* 1999; 34:1687–1690.
237. Terada T, Ishida F, Nakanuma Y. Vascular plexus around intrahepatic bile ducts in normal livers and portal hypertension. *Journal of Hepatology* 1989; 8: 139–149.
238. Terada T, Nakanuma Y. Development of human peribiliary capillary plexus: a lectin-histochemical and immunohistochemical study. *Hepatology* 1993; 18: 529-536.
239. Terada T, Nakanuma Y. Development of intrahepatic peribiliary glands. Histological, keratin immunohistochemical, and mucus histochemical analyses. *Laboratory Investigation* 1993 I; 68: 261–269.
240. Terada T, Nakanuma Y. Expression of tenascin, type IV collagen and laminin during human intrahepatic bile duct development and in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology* 1994; 25: 143–150.
241. Terada T, Nakanuma Y. Profiles of expression of carbohydrate chain structures during human intrahepatic bile duct development and maturation: a lectin-histochemical and immunohistochemical study. *Hepatology* 1994 I; 20: 388–397.
242. Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *American Journal of Pathology* 1995; 146: 67–74.
243. Terada T, Nakanuma Y. Expression of pancreatic enzymes (alfa- amylase, trypsinogen and lipase) during human liver development and maturation. *Gastroenterology* 1995 I; 108: 1236–1245.

244. Terada T, Okada Y, Nakanuma Y. Expression of matrix proteinases during human intrahepatic bile duct development. A possible role in biliary cell migration. *American Journal of Pathology* 1995; 147: 1207–1213.
245. Teruya-Feldstein J, Jaffe E, Burd E, Kanegane H, Kingma D, Wilson W, *et al.* The role of Mig, the monokine induced by interferon- γ , and IP-10, the interferon- γ -inducible protein-10, in tissue necrosis and vascular damage associated with Epstein-Barr virus-positive lymphoproliferative disease. *Blood* 1997; 90: 4099–4105.
246. Thung S. The development of proliferating ductular structures in liver disease. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 407–411.
247. Tracy T, Dillon P, Fox E, Minnick K, Vogler C. The inflammatory response in pediatric biliary disease: macrophage phenotype and distribution. *Journal of Pediatric Surgery* 1996; 31: 121–126.
248. Trivedi P, Dhawan A, Risteli J. Prognostic value of serum hyaluronic acid and type I and III procollagen propeptides in extrahepatic biliary atresia. *Pediatric Research* 1995; 48: 568–573.
249. Trivedi P, Mieli-Vergani G, Mowat A. Cholestasis in infancy and childhood: an overview. In: Falk Symposium 63. Pediatric cholestasis. Novel Approaches to Treatment. London: Kluwer Publishers; 1992. p.208–214.
250. Tsukada T, Tippens D, Gordon D, Ross R, Gown A. HHF35, a muscle-actin specific monoclonal antibody. Immunohistochemical and biochemical characterization. *American Journal of Pathology* 1987; 126:51.
251. Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuysen B, Koike C, Carmeliet P, Jain R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1 α →hypoxia response element→VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Research* 2000; 60: 6248–6252.
252. Vandersteenhoven A, Burchette J, Michalopoulos G. Characterization of ductular hepatocytes in end-stage cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 403–406.
253. Van Diest P, Baak J. Morphometry. In: Baak J, editor. Quantitated Pathology in Cancer Diagnosis. Berlin: Springer-Verlag; 1991. p.946–964.
254. Van Eyken P, Sciot R, Callea F, Van Der Steen K, Moerman P, Desmet V. The development of intrahepatic bile ducts in man: a keratin-immunohistochemical study. *Hepatology* 1988; 8: 1586–1595.
255. Van Eyken P, Sciot R, Desmet V. Intrahepatic bile duct development in the rat: a cytokeratin-immunohistochemical study. *Laboratory Investigation* 1988 I; 1: 52–59.

256. Van Eyken P, Sciot R, Desmet V. A cytokeratin immunohistochemical study of cholestatic liver disease: evidence that hepatocytes can express "bile duct-type" cytokeratins. *Histopathology* 1989; 15: 125–135.
257. Van Eyken P, Sciot R, Van Damme B, Wolf-Peters C, Desmet V. Keratin immunohistochemistry in normal human liver. Cytokeratin pattern of hepatocytes, bile ducts and acinar gradient. *Virchows Archiv* 1987; 412: 63–72.
258. Vassy J, Beil M, Irinopoulou T, Rigaut J. Quantitative image analysis of cytokeratin filament distribution during fetal rat liver development. *Hepatology* 1996; 23: 630–638.
259. Vazquez J, López Gutierrez J, Gámez M, López-Santamaria M, Murcia J, Larrauri J, *et al.* Biliary atresia and the polysplenia syndrome: its impact on final outcome. *Journal of Pediatric Surgery* 1995; 30: 485–487.
260. Vijayan V, Tan C. Developing human biliary system in three dimensions. *The Anatomical Record* 1997; 249: 389–398.
261. Vijayan V, Tan C. Computer-generated three-dimensional morphology of the hepatic hilar bile ducts in biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery* 2000; 35: 1230–1235.
262. Voelkel N, Tudor R. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 1995; 8: 2129–2138.
263. Wanless I. Physionatomic considerations. In: Schiff E, Sorrel M, Maddrey W, editors. *Schiff's Disease of the Liver*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott, Raven. 1999. p. 3-37.
264. Wagenvoort C, Wagenvoort N. Primary pulmonary hypertension. A pathologic study of the lung vessels in 156 clinically diagnosed cases. *Circulation* 1970; 42: 1163–1184.
265. Wang X, Yue T, Ohlstein E, Sung C, Feustein G. Interferon-inducible Protein-10 involves vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and inflammatory response. *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 24286–24293.
266. Washington K, Clavien P, Killenberg P. Peribiliary vascular plexus in primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis. *Human Pathology* 1997; 28: 791–795.
267. Weibel E. Stereological methods. In: *Practical methods for biological morphometry*. London: Academic Press; 1979. p.380-396.
268. Xiao J, Ruck P, Kaiserling E. Small epithelial cells in extrahepatic biliary atresia: electron microscopic and immunoelectron microscopic findings suggest a close relationship to liver progenitor cells. *Histopathology* 1999; 35: 454–460.

269. Yamaki S, Abe A, Endo M, Tanaka T, Tabayashi K, Takahashi T. Surgical indication for congenital heart disease with extremely thickened media of small pulmonary arteries. *Annals of Thoracic Surgery* 1998; 66: 1560–1564.
270. Yamamoto K, Sherman I, Phillips M, Fisher M. Three-dimensional observations of the hepatic arterial terminations in rat, hamster and human liver by scanning electron microscopy of microvascular casts. *Hepatology* 1985; 5: 452–456.
271. Yancopoulos G, Davis S, Gale N, Rudge J, Wiegand S, Holash J. Vascular-specific growth factor and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242–248.
272. Yokoi T, Tomita Y, Fukaia M, Ichichara S, Kakudo K, Takashi Y. Pulmonary hypertension associated with systemic lupus erythematosus. Predominantly thrombotic arteriopathy accompanied by plexiform lesions. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 467–470.
273. Yokoyama T, Copeland N, Jenkins N, Montgomery C, Elder F, Overbeek P. Reversal of Left-Right Asimmetry: a *situs inversus* mutation. *Science* 1993; 260: 679–682.
274. Zerbini M, Gallucci S, Ueno C, Porta G, Maksoud J, Gayotto L. Liver biopsy in neonatal cholestasis: a review on statistical grounds. *Mod Pathol* 1997; 10: 793–799.
275. Zar J. *Biostatistical analysis*. 3rd edition. New Jersey: Prentice Hall; 1996.
276. Zhao D, Zimmermann A, Kuznetsova L, Wheatley A. Regression of bile duct damage and bile duct proliferation in the non-rearterialized transplanted rat liver is associated with spontaneous graft rearterialization. *Hepatology* 1995; 21: 1353–1360.
277. Zhao D, Zimmermann A, Wheatley A. Morphometry of the liver after liver transplantation in the rat. Significance of an intact arterial supply. *Hepatology* 1993; 17: 310–317.

ANEXOS

ANEXO I

Protocolo clínico da colestase neonatal

Identificação

Nome: _____ Registro _____
Data de nascimento: _____ Sexo: M () F ()
Idade: por ocasião da cintilografia _____ dias; por ocasião da biópsia _____ dias
Procedência: _____ Naturalidade _____
Etnia: _____
Data da 1ª avaliação no HCPA: _____

Diagnóstico final: _____

I - Antecedentes familiares:

- a) *Hepatopatia*: presente () ausente ()
b) colestase neonatal em familiares: () ausente () nr presente () (especifique parentesco e diagnóstico) _____

c) Outras doenças
especifique _____

II - Antecedentes obstétricos: _____

III - Antecedentes perinatais:

- a) *Idade gestacional* (especifique): _____ semanas.
b) *Peso de nascimento* (especifique): _____ gramas.
c) *Intercorrências perinatais* (especifique): _____

IV - Quadro clínico/exame físico (na 1ª consulta):

- a) *História clínica*:
Idade de início da icterícia: _____
Quem percebeu a icterícia: _____
Quem diagnosticou colestase: _____
Motivo do encaminhamento: _____
Resumo de história clínica (outros dados importantes)

V - Dados antropométricos (na 1ª consulta)

- a) peso: _____ gr; percentil _____
b) estatura: _____ cm; percentil _____

VI - Sinais de hepatopatia (na 1ª consulta)

- a) Icterícia: presente () ausente () nr ()
- b) Colúria: presente () ausente () nr ()
- c) Acolia persistente por mais de 10 dias: presente () ausente () nr ()
- d) Hipocolia: presente () ausente () nr ()

VIII - Anomalias congênitas extra-hepáticas associadas: presente () ausente () nr ()

- a) Sistema cardio-vascular: _____
- b) Esplênicas: _____
- c) Digestivas: _____
- d) Genitourinárias: _____
- e) Outras: _____
- f) **Exames utilizados na pesquisa de anomalias congênitas**
 - Rx de tórax ()
 - Ecografia abdominal ()
 - Exame físico ()
 - Avaliação cirúrgica ()
 - Outros (especifique): _____

IX - Doenças associadas: presente () ausente () nr ()

Especifique: _____

X - Testes laboratoriais:

- a) hepatograma
BT _____ BI _____ BD _____ ALT _____ AST _____ GGT _____
FA _____ TP _____ Albumina _____ Proteínograma (se alterado) _____
- b) SLAVE-TORCH (se alterado) _____
- c) EIM (se alterado) _____
- d) alfa-1-Antitripsina (se alterado) _____
- e) T4 _____ TSH _____
- f) Hemograma/plaquetas (se alterado) _____
- g) Outros (se alterados): _____

XI - Outros testes:

- a) Cintilografia de vias biliares: data - _____
Com excreção _____ Sem excreção _____
- b) Biópsia hepática: data _____ número da biópsia _____
- c) Outros (Especifique achados) _____
- d) Colangiografia trans-operatória (especifique resultado): _____

XII - Cirurgia de Kasai: não realizou () realizou (). Data - _____

XIII - Evolução:

- a) Resolução da icterícia: não () sim ()
Caso sim, especifique a idade em que anicterizou _____
- b) Colangite: não () sim ()

ANEXO II

Protocolo histológico das estruturas biliares

I. Identificação

Nome: _____ Diagnóstico final _____ Idade _____ dias

Número de registro: _____ Número da biópsia _____

Marcadores empregados:

CAM 5.2 () CK 19 () Outros: HE ()

I - Número de espaços-porta (EP) por lâmina: _____ ep

II - Estruturas biliares

II.a - *Malformação de placa ductal*: presente () ausente ()

II.b - *Ductos biliares maduros*: presente () focal () difusa ()
ausente ()

II.c - *Proliferação ductular*: presente () focal () difusa ()
ausente()

ANEXO III

Protocolo morfométrico dos elementos vasculares arteriais e da densidade de colágeno

Identificação

Nome (iniciais): _____ Diagnóstico final: _____
Idade: _____ Número de registro: _____ Número da biópsia/autópsia: _____
Marcadores empregados: _____

I. Ramo de artéria hepática

I.a - Espessura (média) da túnica média _____
I.b - Espessura (média) da túnica íntima _____ diâmetro de endoteliócito isolado _____
I.c - Perímetro do lúmen (corte transversal) _____
I.d - Medida do lúmen (corte longitudinal) _____

II. Colágeno

Densidade superficial de colágeno (média) _____

ANEXO IV

Protocolo clínico de pacientes controles sem hepatopatia

Nº da autópsia _____ Nome _____ Registro _____
Data da autópsia _____ Sexo _____

I. Óbito intra-uterino ()

Idade gestacional: _____ semanas gestacionais.
Causa do óbito: _____

II. Óbito extra-uterino ()

Data de nascimento: _____
Idade gestacional: _____ semanas gestacionais
Idade do óbito: _____ dias de vida.
Causa do óbito: _____

Doenças associadas: _____
Achados de autópsia (quanto ao fígado) _____

ANEXO V

Protocolo clínico de pacientes transplantados

Nº do material _____ Nome _____ Registro _____
Data do transplante _____ Sexo _____
Idade por ocasião do transplante _____ () anos () meses

I. Doença causadora do transplante: _____

II. Doenças associadas (listar e datar):

III. Anomalias associadas (listar):

IV. Medicamentos utilizados pelo paciente (listar e datar)

V. Descrição da evolução do caso antes do transplante:

ANEXO VI

Caracterização dos pacientes sem hepatopatia avaliados no presente estudo

Paciente	Idade	Causa do óbito e doenças associadas	Anomalias congênitas
Fetos*			
301	24	Prematuridade, aspiração meconial	–
302	30	Prematuridade, insuficiência ventilatória	Comunicação inter-atrial
303	35	Prematuridade, doença da membrana hialina	–
304	34	Prematuridade, hemorragia pulmonar, sepse	–
305	22	Isquemia fetal intra-uterina, ruptura prematura de membranas	–
306	23	Prematuridade, doença da membrana hialina, infecção ovular, pneumotórax	–
307	34	Doença da membrana hialina	Hérnia diafragmática, má-rotação intestinal, síndrome de Fryns, dilatação pielocalicinal bilateral, agenesia do corpo caloso, dextrocardia
Lactentes**			
401	60	Choque séptico, insuficiência respiratória	–
402	150	Broncopneumonia, insuficiência respiratória	–
403	120	Pneumonia, insuficiência respiratória, Necrose tubular aguda	Comunicação interventricular
404	3	Sepse, enterocolite necrosante	–
405	10	Broncopneumonia, insuficiência respiratória	–
406	1	Hipóxia, hipoplasia pulmonar	Genitália ambígua, hipospádia
407	36	Edema cerebral, Secreção inapropriada de hormônio antidiurético, acidose metabólica, atelectasia bilateral, necrose tubular aguda	–

*idade em semanas gestacionais;

**idade em dias de vida por ocasião do óbito

ANEXO VII

Caracterização dos controles transplantados com atresia biliar quanto à idade no transplante e outras hepatopatias

Pacientes	Idade no transplante (meses de vida)	Doença básica	Doenças associadas
Atresia biliar			
Sem anomalia congênita extra-hepática			
109	34		Colangite
110	35		Colangite
120	56		Colangite, infecção urinária
135	38		Hipertensão arterial sistêmica, colangite
Com anomalia congênita extra-hepática			
203	28		Hipertensão arterial sistêmica, colangite, insuficiência cardíaca esquerda*
206	105		Colangite, pielonefrite.
209	120		Hipertensão arterial sistêmica**, colangite
Outras hepatopatias			
501	120	Deficiência α -1 antitripsina	–
502	36	Colangite esclerosante primária	Úlcera gástrica
503	108	Hepatite auto-imune	–
504	57	Colangite esclerosante primária	Diabete insípido, histiocitose das células de Langerhans, citomegalovirose

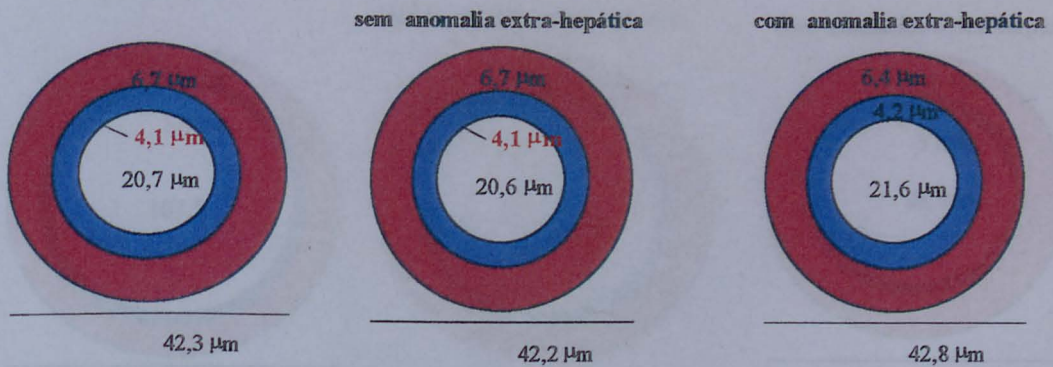
*paciente com ectasia do sistema coletor renal;

**paciente com rins policísticos.

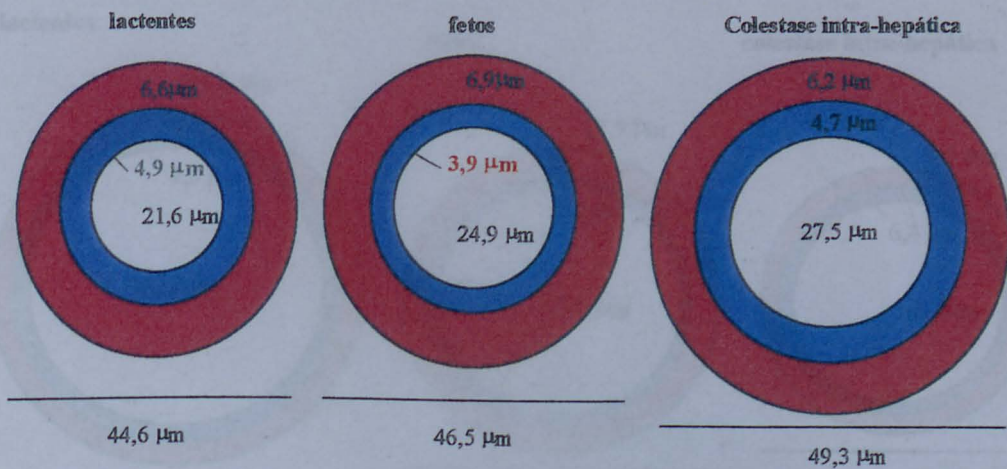
ANEXO VIII

Representação esquemática das arteríolas hepáticas em casos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles construída a partir dos valores das médias dos elementos estruturais apresentados nas tabelas 13 e 15

ATRESIA BILIAR



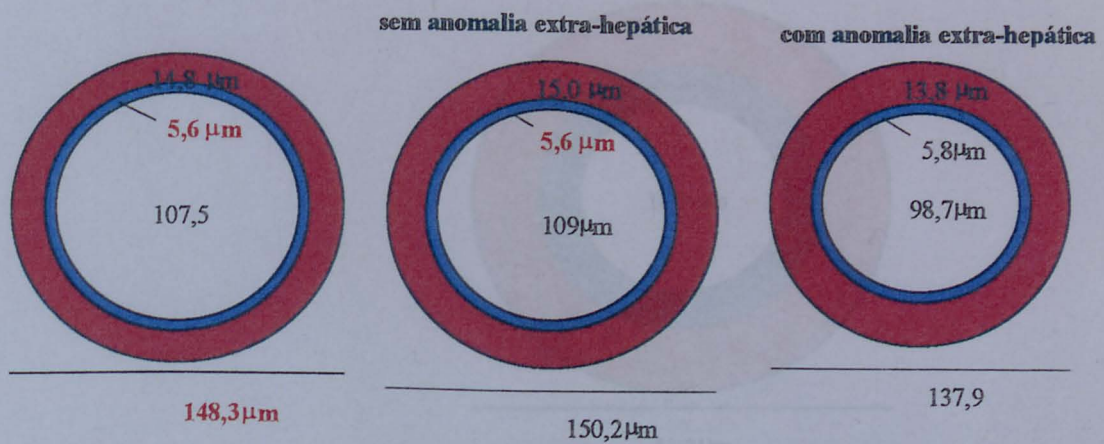
CONTROLES



ANEXO IX

Representação esquemática das artérias de casos de atresia biliar por ocasião da portoenterostomia e controles construída a partir dos valores das médias dos elementos estruturais apresentados nas tabelas 14 e 16

ATRESIA BILIAR

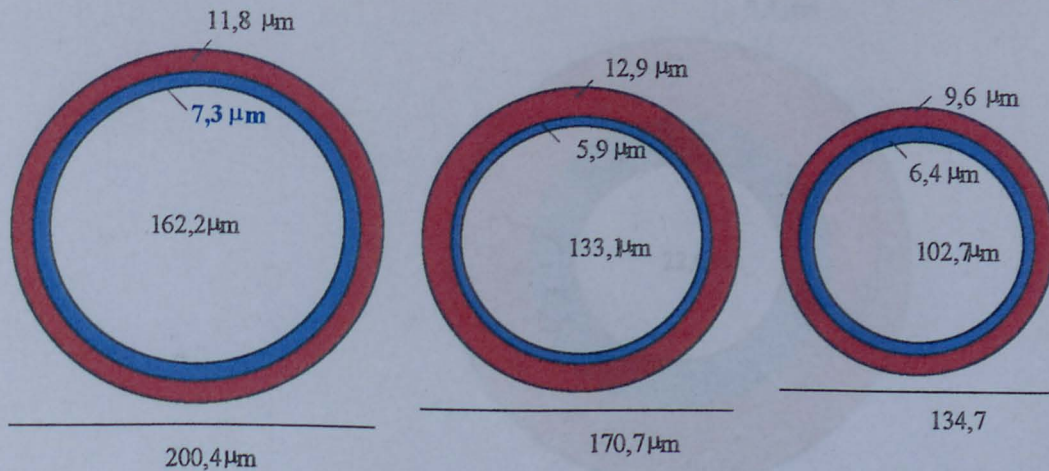


CONTROLES

lactentes

fetos

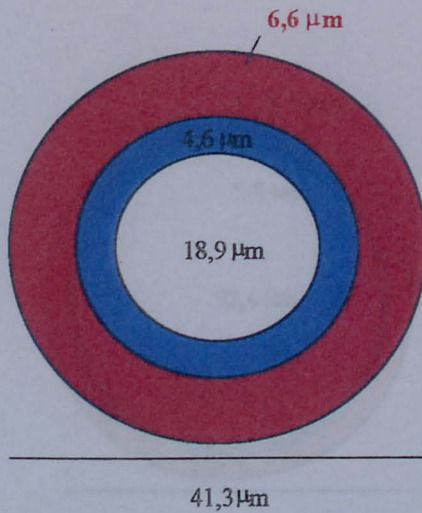
colestase intra-hepática



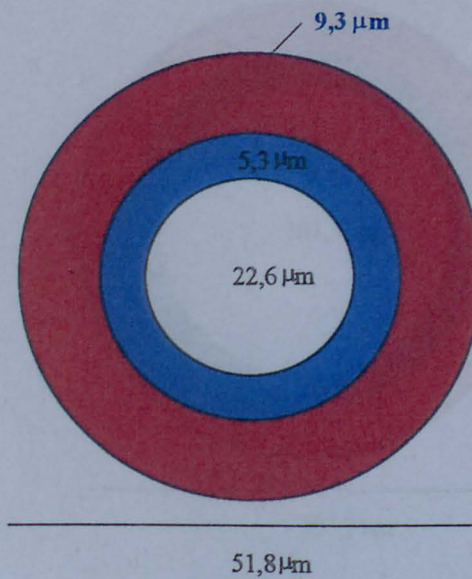
ANEXO X

Representação esquemática das arteríolas dos casos de atresia biliar transplantados, por ocasião da portoenterostomia e do transplante hepático, construída a partir dos valores das médias dos elementos estruturais apresentados na tabela 17

NA PORTOENTEROSTOMIA



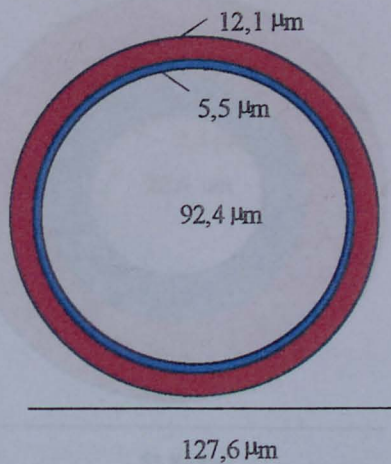
NO TRANSPLANTE HEPÁTICO



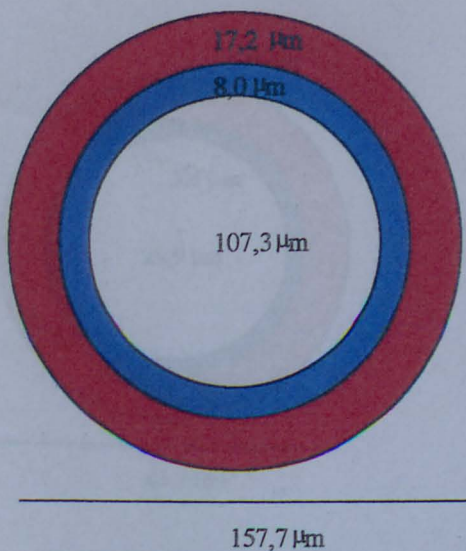
ANEXO XI

Representação esquemática das artérias hepáticas dos casos de atresia biliar transplantados, por ocasião da portoenterostomia e do transplante hepático, construída a partir dos valores das médias dos elementos estruturais apresentados na tabela 18

NA PORTOENTEROSTOMIA



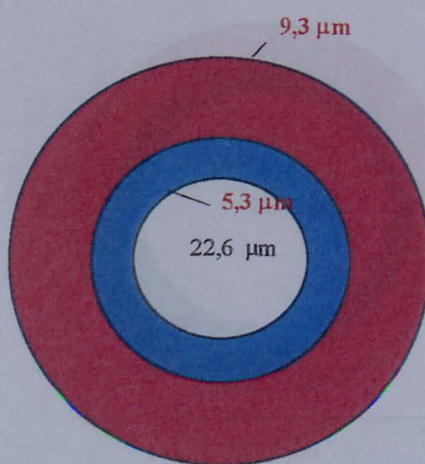
NO TRANSPLANTE HEPÁTICO



ANEXO XII

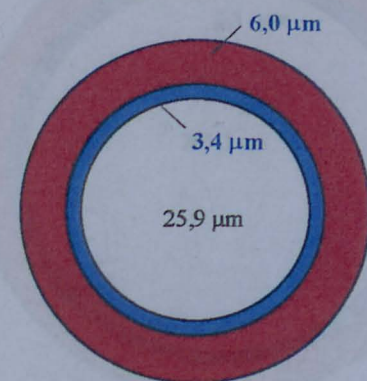
Representação esquemática das arteríolas de casos de atresia biliar e controles transplantados, por ocasião do transplante hepático, construída a partir dos valores das médias dos elementos estruturais apresentados na tabela 19

TRANSPLANTE POR ATRESIA BILIAR



51,8 μm

TRANSPLANTE POR OUTRAS CAUSAS

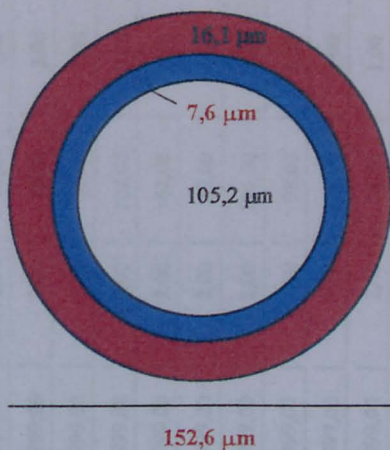


44,7 μm

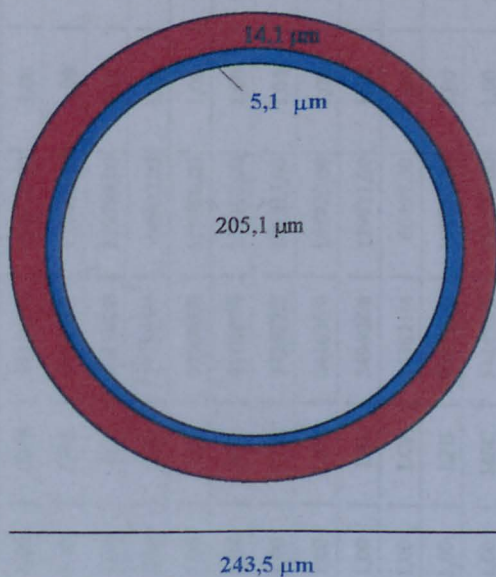
ANEXO XIII

Representação esquemática das artérias de casos de atresia biliar e controles transplantados, por ocasião do transplante hepático, construída a partir dos valores das médias dos elementos estruturais apresentados na tabela 20

TRANSPLANTE POR ATRESIA BILIAR



TRANSPLANTE POR OUTRAS CAUSAS



ANEXO XIV

NPAC	GRUPO	NOME	PRONT	CASO	TIPOBIO	SEXO	IDSEMGES	IDGEST	IDBIOD	PROCED	NATUR	ETNIA	IDPRIAVD	PN	LOCNASC
101,00	1,00	AVP	454324/5	94343,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	110,00	2,00	2,00	1,00	89,00	2800,00	2,00
102,00	1,00	CAC	459095/6	95461,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	55,00	2,00	1,00	1,00	53,00	3260,00	2,00
103,00	1,00	CTM	618846/0	158732,00	1,00	2,00	99999,00	1,00	98,00	2,00	2,00	1,00	89,00	1750,00	2,00
104,00	1,00	DK	686855/8	190337,00	1,00	2,00	99999,00	99999,00	111,00	2,00	2,00	1,00	100,00	2870,00	2,00
105,00	1,00	DB	481665/8	102372,00	1,00	1,00	99999,00	1,00	67,00	2,00	1,00	1,00	36,00	1800,00	2,00
106,00	1,00	DMM	439504/2	89394,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	55,00	1,00	1,00	1,00	51,00	3100,00	2,00
107,00	1,00	ES	366821/7	67282,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	73,00	2,00	2,00	99999,00	67,00	3950,00	2,00
108,00	1,00	OMS	691163/0	192418,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	76,00	1,00	1,00	1,00	64,00	3490,00	2,00
109,00	1,00	GPA	576345/3	139600,00	1,00	1,00	99999,00	99999,00	66,00	1,00	2,00	1,00	55,00	99999,00	2,00
110,00	1,00	JLJ	741182/0	218598,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	80,00	2,00	2,00	1,00	73,00	3250,00	2,00
111,00	1,00	KS	371275/9	68800,00	1,00	1,00	99999,00	1,00	38,00	1,00	1,00	1,00	24,00	2470,00	2,00
112,00	1,00	LD	599008/0	150786,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	104,00	2,00	2,00	1,00	94,00	3830,00	2,00
113,00	1,00	LGR	611087/8	156197,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	162,00	2,00	2,00	1,00	151,00	2200,00	2,00
114,00	1,00	LER	592537/5	147353,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	42,00	1,00	1,00	1,00	28,00	3200,00	1,00
115,00	1,00	LPM	641636/6	168979,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	196,00	2,00	2,00	1,00	173,00	4000,00	2,00
116,00	1,00	LSJ	549608/8	129911,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	98,00	1,00	1,00	2,00	78,00	3030,00	2,00
117,00	1,00	LCF	363621/4	66497,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	212,00	1,00	1,00	99999,00	204,00	3430,00	2,00
118,00	1,00	LFB	703529/8	198856,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	78,00	1,00	1,00	1,00	74,00	3450,00	2,00
119,00	1,00	MSC	548425/8	126644,00	1,00	2,00	99999,00	99999,00	251,00	2,00	2,00	3,00	241,00	99999,00	2,00
120,00	1,00	MPF	534189/6	120118,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	71,00	2,00	2,00	1,00	59,00	3350,00	2,00
121,00	1,00	OBS	499953/8	107679,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	81,00	2,00	2,00	1,00	72,00	2400,00	2,00
122,00	1,00	PGS	704474/6	200688,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	106,00	2,00	2,00	1,00	81,00	3000,00	2,00
123,00	1,00	PV	532731/7	118265,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	59,00	2,00	2,00	1,00	56,00	3480,00	2,00
124,00	1,00	PHO	705578/3	200510,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	85,00	2,00	2,00	1,00	72,00	3150,00	2,00

Cont. Anexo XIV

NPAC	GRUPO	NOME	FRONT	CASO	TIPOBIO	SEXO	IDSEMGES	IDGEST	IDBIOD	PROCED	NATUR	ETNIA	IDPRIAVD	PN	LOCNASC
125,00	1,00	PCM	434869/4	91072,00	1,00	2,00	99999,00	1,00	104,00	1,00	1,00	1,00	99999,00	1780,00	1,00
126,00	1,00	RAF	751614/9	226185,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	33,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2965,00	1,00
127,00	1,00	RMC		51732,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	24,00	1,00	1,00	1,00	99999,00	3400,00	1,00
128,00	1,00	RCS	304511/9	51850,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	46,00	2,00	2,00	1,00	10,00	3400,00	2,00
129,00	1,00	RSF	349051/3	62217,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	58,00	2,00	2,00	1,00	45,00	3410,00	2,00
130,00	1,00	TB	461614/0	97709,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	66,00	2,00	1,00	1,00	56,00	3610,00	2,00
131,00	1,00	TSV	535648/0	120344,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	89,00	2,00	2,00	99999,00	81,00	2900,00	2,00
132,00	1,00	TH	535838/7	120787,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	74,00	2,00	2,00	1,00	63,00	3300,00	2,00
133,00	1,00	TRM	528634/9	118006,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	69,00	2,00	2,00	1,00	55,00	2980,00	2,00
134,00	1,00	TCR	474383/7	100526,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	103,00	2,00	2,00	1,00	96,00	3370,00	2,00
135,00	1,00	WLG	600018/6	150471,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	95,00	2,00	2,00	1,00	81,00	3820,00	2,00
136,00	1,00	IRR	316429/5	259352,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	71,00	1,00	1,00	1,00	59,00	2620,00	2,00
137,00	1,00	KRT		275061,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	55,00	1,00	1,00	1,00	52,00	3515,00	2,00
138,00	1,00	YBJ		273146,00	1,00	2,00	99999,00	99999,00	87,00	2,00	2,00	1,00	75,00	99999,00	2,00
201,00	2,00	GMSI	716999-8	206332,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	92,00	1,00	1,00	2,00	79,00	3170,00	2,00
202,00	2,00	LNP	428780/1	87675,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	127,00	2,00	2,00	1,00	67,00	3700,00	2,00
203,00	2,00	LSR	708733/1	201779,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	95,00	2,00	2,00	1,00	90,00	2810,00	2,00
204,00	2,00	LFM		175526,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	136,00	2,00	2,00	1,00	117,00	3050,00	2,00
205,00	2,00	PMB	674653/1	184316,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	97,00	2,00	2,00	1,00	83,00	2250,00	2,00
206,00	2,00	RFL	371034/0	68479,00	1,00	2,00	99999,00	2,00	66,00	2,00	2,00	1,00	55,00	3110,00	2,00
207,00	2,00	RMR	533305/9	120002,00	1,00	1,00	99999,00	1,00	96,00	99999,00	99999,00	1,00	99999,00	2490,00	2,00
208,00	2,00	WB	534129/2	119332,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	60,00	2,00	2,00	1,00	52,00	3200,00	2,00
209,00	2,00	LBO	368778/7	68554,00	1,00	1,00	99999,00	2,00	154,00	2,00	2,00	1,00	133,00	3500,00	2,00
301,00	3,00	RAD	704450/6	7733,00	3,00	1,00	24,00	1,00	1,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	810,00	99999,00
302,00	3,00	RRD	698856/2	7710,00	3,00	1,00	30,00	1,00	9,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	755,00	99999,00
303,00	3,00	RLC	772590/7	7820,00	3,00	1,00	35,00	1,00	3,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	2190,00	99999,00
304,00	3,00	RMR	685598/5	7655,00	3,00	1,00	34,00	1,00	7,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	2350,00	99999,00

Cont. Anexo XIV

NPAC	GRUPO	NOME	PRONT	CASO	TIPOBIO	SEXO	IDSEMGES	IDGEST	IDBIOD	PROCED	NATUR	ETNIA	IDPRIAVD	PN	LOCNASC
305.00	3,00	RCB	678539/8	7621,00	3,00	2,00	22,00	1,00	1,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	560,00	99999,00
306.00	3,00	RGG	747883/7	7915,00	3,00	2,00	23,00	1,00	1,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	645,00	99999,00
307.00	3,00	RMS	743097/8	7903,00	3,00	2,00	34,00	1,00	17,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	1270,00	99999,00
401.00	4,00	RFMS	724444/5	7842,00	3,00	1,00	99999,00	2,00	60,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
402.00	4,00	ANC	692382/5	7677,00	3,00	2,00	99999,00	2,00	150,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
403.00	4,00	RA	772565/8	8012,00	3,00	1,00	99999,00	2,00	120,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
404.00	4,00	REB	182908/8	8048,00	3,00	2,00	99999,00	2,00	3,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
405.00	4,00	RDR		8060,00	3,00	2,00	99999,00	2,00	10,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
406.00	4,00	RCF	687999/3	7664,00	3,00	1,00	99999,00	2,00	1,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
407.00	4,00	JM	722618/6	7824,00	3,00	2,00	99999,00	2,00	36,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
501.00	5,00			501,00											
502.00	5,00			502,00											
503.00	5,00			503,00											
504.00	5,00			504,00											
601.00	6,00	IHR	583484/1	274592,00	1,00	1,00	99999,00	99999,00	100,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
602.00	6,00	TSR	841160/5	142572,00	1,00	1,00	40,00	2,00	198,00	99999,00	99999,00	1,00	74,00	3350,00	2,00
603.00	6,00	RMJ		280831,00	1,00	2,00	37,00	2,00	45,00	99999,00	99999,00	99999,00	1,00	2620,00	1,00

Cont. Anexo XIV

NPAC	INICICT	PESO	ESTAT	ICT	COLU	ACOL	AEH	TIPOMEH	BT	BD	ALT	AST	GGT	FA	STORCH	AIAT
101,00	1,00	4400,00	56,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	4,40	2,80	634,00	516,00	430,00	99999,00	1,00	99999,00
102,00	2,00	4000,00	54,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	8,80	6,20	172,00	166,00	473,00	99999,00	1,00	99999,00
103,00	1,00	3520,00	51,50	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	8,30	5,30	210,00	150,00	536,00	224,00	1,00	99999,00
104,00	1,00	4940,00	58,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	14,20	9,40	65,00	204,00	1041,00	1890,00	1,00	311,00
105,00	1,00	1950,00	39,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	5,10	3,00	36,00	53,00	99999,00	142,00	1,00	99999,00
106,00	1,00	4990,00	99999,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	9,10	6,20	90,00	194,00	99999,00	99999,00	2,00	99999,00
107,00	10,00	4550,00	55,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	12,30	8,30	65,00	94,00	99999,00	90,00	2,00	99999,00
108,00	3,00	5490,00	60,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	10,40	7,80	199,00	378,00	515,00	1351,00	1,00	99999,00
109,00	2,00	5120,00	99999,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	6,20	5,90	60,00	86,00	99999,00	160,00	1,00	99999,00
110,00	7,00	4640,00	57,50	1,00	1,00	3,00	2,00	99999,00	7,00	2,70	80,00	151,00	1267,00	1116,00	1,00	99999,00
111,00	1,00	2380,00	48,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	3,20	1,90	17,00	37,00	99999,00	106,00	2,00	99999,00
112,00	7,00	5300,00	62,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	12,40	14,40	72,30	38,50	99999,00	960,00	1,00	99999,00
113,00	1,00	4740,00	58,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	18,70	11,70	615,00	614,00	266,00	1039,00	1,00	881,00
114,00	2,00	3980,00	54,50	1,00	3,00	2,00	2,00	99999,00	9,80	7,10	85,00	112,00	183,00	928,00	1,00	248,00
115,00	7,00	8000,00	99999,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	12,80	9,10	158,00	221,00	99999,00	164,00	1,00	99999,00
116,00	2,00	5660,00	55,00	1,00	2,00	2,00	2,00	99999,00	12,60	5,00	179,00	170,00	370,00	99999,00	1,00	99999,00
117,00	60,00	6940,00	65,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	8,90	6,40	131,00	140,00	99999,00	240,00	1,00	99999,00
118,00	99999,00	5970,00	61,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	7,36	5,76	140,00	231,00	99999,00	99999,00	1,00	99999,00
119,00	1,00	7100,00	67,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	25,80	19,10	85,00	145,00	110,00	99999,00	2,00	99999,00
120,00	4,00	4040,00	55,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	10,80	6,70	82,00	153,00	99999,00	103,00	2,00	99999,00
121,00	3,00	4280,00	57,50	1,00	3,00	3,00	2,00	99999,00	8,60	6,00	77,00	125,00	515,00	99999,00	2,00	470,00
122,00	7,00	5000,00	49,00	1,00	1,00	2,00	2,00	99999,00	11,90	3,40	62,00	138,00	285,00	1935,00	3,00	212,00
123,00	30,00	4190,00	55,00	1,00	1,00	1,00	2,00	99999,00	11,70	6,90	119,00	117,00	99999,00	99999,00	1,00	99999,00
124,00	1,00	5740,00	60,00	1,00	1,00	3,00	2,00	99999,00	10,40	5,10	95,00	183,00	506,00	1162,00	2,00	99999,00

Cont. Anexo XIV

NPAC	INICICT	PESO	ESTAT	ICT	COLU	ACOL	AEH	TIPOMEH	BT	BD	ALT	AST	GGT	FA	STORCH	A1AT
305,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	2,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
306,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	2,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
307,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	1,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
401,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	2,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
402,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	2,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
403,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	1,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
404,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	2,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
405,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	2,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
406,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	1,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
407,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	2,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00
501,00																
502,00																
503,00																
504,00																
601,00	3,00	6120,00	59,00	2,00	2,00	1,00	2,00	99999,00	6,30	4,30	244,00	93,00	64,00	99999,00	99999,00	311,00
602,00	30,00	5000,00	57,00	1,00	99999,00	99999,00	1,00	2,00	11,00	5,10	242,00	753,00	54,00	1722,00	99999,00	99999,00
603,00	1,00	99999,00	99999,00	1,00	99999,00	2,00	2,00	99999,00	20,10	2,10	103,00	164,00	56,00	99999,00	99999,00	124,00

Cont. Anexo XIV

NPAC	RESICT	IDRESIC	DIMICT	IDDIMIC	TRANSPL	IDTX	ACOMAMB	VM	IDOBTD	CAUSOB	HAS	MPD	DBM	LOCDBM	PD	LOCPD
101,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		2,00	3,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
102,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		99999,00	2,00	592,00	1,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00
103,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		99999,00	2,00	232,00	1,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00
104,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		99999,00	2,00	133,00	1,00	2,00	1,00	2,00	99999,00	1,00	1,00
105,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		99999,00	2,00	692,00	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00
106,00	2,00	99999,00	1,00	89,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00
107,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
108,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		99999,00	2,00	422,00	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00
109,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	1,00	34,00	1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00
110,00	2,00	99999,00	1,00	156,00	1,00	35,00	1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
111,00	2,00	99999,00	1,00	99999,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00
112,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		2,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
113,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		2,00	3,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	2,00
114,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
115,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		99999,00	2,00	236,00	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00
116,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		99999,00	2,00	897,00	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00
117,00	3,00	99999,00	3,00	99999,00	3,00		2,00	3,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00
118,00	1,00	376,00	3,00	99999,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	2,00
119,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		2,00	3,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
120,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	1,00	56,00	1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	2,00
121,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		2,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	2,00
122,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		99999,00	2,00	159,00	1,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00
123,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		2,00	2,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
124,00	1,00	30,00	3,00	99999,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Cont. Anexo XIV

NPAC	RESICT	IDRESIC	DIMICT	IDDIMIC	TRANSPL	IDTX	ACOMAMB	VM	IDOBTD	CAUSOB	HAS	MPD	DBM	LOCDBM	PD	LOCPD
125,00	1,00	242,00	3,00	99999,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	2,00	99999,00	1,00	1,00
126,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00
127,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		2,00	3,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
128,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
129,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
130,00	1,00	556,00	3,00	99999,00	2,00		2,00	3,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
131,00	1,00	150,00	1,00	120,00	2,00		2,00	3,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
132,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		2,00	3,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00
133,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00
134,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		2,00	3,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00
135,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	1,00	38,00	1,00	1,00	99999,00	99999,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
136,00	3,00	99999,00	3,00	99999,00	3,00		3,00	3,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00
137,00	3,00	99999,00	3,00	99999,00	2,00		3,00	3,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
138,00	3,00	99999,00	3,00	99999,00	2,00		3,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
201,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		99999,00	2,00	302,00	1,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00
202,00	2,00	99999,00	1,00	186,00	2,00		99999,00	2,00	852,00	1,00	2,00	1,00	2,00	99999,00	1,00	1,00
203,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	1,00	28,00	99999,00	2,00	848,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
204,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		99999,00	2,00	326,00	1,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00
205,00	1,00	99999,00	3,00	99999,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
206,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	1,00	105,00	1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
207,00	2,00	99999,00	1,00	116,00	2,00		2,00	3,00	99999,00	99999,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00
208,00	2,00	99999,00	2,00	99999,00	2,00		2,00	3,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
209,00	2,00	99999,00	1,00	268,00	1,00	120,00	1,00	1,00	99999,00	99999,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00
301,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00
302,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	9,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00
303,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00
304,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	7,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00

Cont. Anexo XIV

NPAC	RESICT	IDRESIC	DIMICT	IDDIMIC	TRANSPL	IDTX	ACOMAMB	VM	IDOBTD	CAUSOB	HAS	MPD	DBM	LOCDBM	PD	LOCPD
305,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00
306,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00
307,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	16,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00
401,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	60,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00
402,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	150,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00
403,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	120,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00
404,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	3,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00
405,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	10,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00
406,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00
407,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00		99999,00	2,00	36,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	99999,00
501,00						120,00					2,00					
502,00						36,00					2,00					
503,00						108,00					2,00					
504,00						57,00					2,00					
601,00	99999,00	99999,00	99999,00	99999,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00
602,00	1,00	257,00	99999,00	99999,00	2,00		1,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00
603,00	1,00	163,00	99999,00	99999,00	2,00		99999,00	1,00	99999,00	99999,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00

							Conf. Anexo XIV									
NPAC	DCOL	NA	DTOTA	REMDA	RETDA	RIDA	RDIDEA	RDIEMA	RDIETA	RINTESPA	DTOTB	NB	REMDB	RETDB	RIDB	RDIDEB
101,00	10,5755	13,00	43,00	,17	,27	,10	,65	4,10	2,55	,62						
102,00	3,1600	14,00	40,52	,18	,25	,07	,64	3,70	2,77	,38						
103,00	7,4781	18,00	51,91	,16	,26	,10	,68	4,95	3,30	,63	135,74	1,00	,0932	,14	,0468	,81
104,00	22,9985	20,00	47,07	,16	,24	,08	,69	4,72	3,39	,51	167,00	6,00	,0948	,13	,0380	,83
105,00	11,8760	24,00	36,44	,21	,29	,08	,63	3,89	2,49	,39	183,01	1,00	,0776	,10	,0246	,84
106,00	4,7374	16,00	49,66	,17	,28	,11	,65	3,87	2,38	,65	226,74	1,00	,0650	,09	,0271	,87
107,00	3,1882	21,00	35,71	,21	,30	,09	,61	3,23	2,39	,41	101,81	1,00	,0768	,12	,0454	,85
108,00	5,4115	6,00	63,04	,14	,23	,09	,69	4,58	2,84	,65	142,40	1,00	,1061	,16	,0523	,79
109,00	6,3100	6,00	41,59	,18	,30	,12	,71	5,12	2,92	,70	155,96	7,00	,0851	,12	,0371	,82
110,00	4,7227	21,00	37,85	,19	,31	,13	,64	3,67	2,11	,72						
111,00	3,2030	17,00	35,18	,18	,29	,11	,63	3,48	2,30	,63	109,58	1,00	,1229	,19	,0623	
112,00	6,7066	15,00	41,69	,17	,28	,11	,67	4,46	2,66	,67	208,76	6,00	,0996	,13	,0344	,80
113,00	16,3603	11,00	47,05	,18	,26	,09	,69	4,67	3,13	,51	133,35	4,00	,1675	,23	,0618	,68
114,00	6,1783	21,00	34,12	,15	,24	,09	,67	4,37	2,91	,60	127,42	1,00	,1299	,18	,0480	
115,00	8,6771	12,00	46,58	,12	,20	,08	,79	7,58	4,22	,74	111,80	1,00	,0542	,10	,0459	,89
116,00	7,9375	16,00	44,47	,16	,29	,13	,67	4,46	2,52	,78	142,22	3,00	,0927	,13	,0412	,81
117,00	6,8689	15,00	37,52	,20	,31	,11	,58	2,92	1,96	,53						
118,00	5,1993	16,00	43,95	,13	,24	,10	,73	5,69	3,31	,78	140,97	2,00	,1098	,16	,0509	,87
119,00	7,3755	17,00	41,80	,13	,22	,09	,72	5,57	3,47	,67	110,70	1,00	,0638	,09	,0311	
120,00	4,0386	13,00	37,40	,18	,30	,12	,63	3,62	2,17	,70						
121,00	5,3853	10,00	31,33	,14	,25	,11	,71	4,94	2,45	,77						
122,00	4,9606	42,00	35,64	,16	,29	,13	,69	4,90	2,63	,84						
123,00	2,6604	16,00	43,95	,17	,30	,13	,63	3,45	1,99	,82	203,83	1,00	,1198	,15	,0316	,76
124,00	6,1172	27,00	41,94	,12	,25	,13	,77	7,18	3,62	1,08						

NPAC	DCOL	NA	DTOTA	REMDA	RETDA	RIDA	Cont. Anexo XIV				DTOTB	NB	REMDB	RETDB	RIDB	RDIDEB
							RDIDEA	RDIEMA	RDIETA	RINTESPA						
125.00	3,0536	14,00	37,07	,16	,28	,12	,70	4,96	2,68	,82						
126.00	4,1918	18,00	33,07	,22	,32	,11	,55	2,79	1,71	,50						
127.00	3,9243	25,00	37,50	,20	,29	,09	,65	4,41	2,89	,47	114,35	2,00	,0777	,11	,0347	,84
128.00	5,6579	17,00	49,00	,19	,31	,12	,62	3,29	2,04	,62	177,75	2,00	,1099	,14	,0257	
129.00	6,3126	10,00	56,59	,18	,27	,09	,68	4,56	2,92	,49	169,93	8,00	,1182	,15	,0298	,75
130.00	6,7444	22,00	45,12	,14	,23	,08	,75	6,05	3,59	,61	152,39	1,00	,0959	,13	,0351	,81
131.00	4,3073	16,00	33,00	,20	,30	,10	,56	2,61	1,78	,52	141,66	1,00	,0851	,11	,0248	
132.00	3,5038	17,00	44,18	,18	,28	,10	,62	3,36	2,20	,55						
133.00	14,1301	17,00	43,80	,18	,30	,11	,64	3,93	2,33	,66	159,57	2,00	,0929	,13	,0395	,81
134.00	3,2724	15,00	30,39	,18	,30	,12	,65	4,07	2,44	,66	150,10	2,00	,1610	,20	,0382	,73
135.00	7,9131	29,00	38,24	,16	,29	,13	,70	4,95	2,56	,89	109,72	1,00	,0916	,13	,0415	,82
136.00	1,7409	14,00	49,20	,17	,26	,09	,62	3,40	2,46	,56	134,78	1,00	,1192	,17	,0476	,76
137.00	4,4490	12,00	39,53	,16	,28	,11	,67	4,16	2,52	,71	148,27	4,00	,0968	,13	,0375	,83
138.00	8,0890	14,00	56,52	,15	,24	,09	,72	5,56	3,34	,64	196,64	1,00	,0929	,12	,0254	,81
201.00	5,9016	16,00	39,14	,14	,28	,14	,70	4,98	2,45	,98						
202.00	7,0566	26,00	38,59	,19	,28	,08	,61	3,33	2,26	,45	158,52	3,00	,1147	,15	,0395	,77
203.00	5,7921	11,00	47,09	,17	,29	,12	,67	4,46	2,72	,69	153,24	5,00	,1116	,15	,0421	,76
204.00	9,4816	7,00	50,60	,13	,21	,09	,79	7,35	4,35	,70	142,93	3,00	,0808	,12	,0344	,84
205.00	3,7948	20,00	40,42	,15	,24	,10	,70	4,98	3,02	,68						
206.00	6,5134	13,00	37,57	,18	,31	,12	,60	3,06	1,82	,70						
207.00	4,9191	18,00	48,74	,17	,27	,10	,69	4,60	2,77	,61	114,84	3,00	,1155	,17	,0534	,76
208.00	3,2271	15,00	33,73	,14	,26	,12	,71	5,23	2,97	,85						
209.00	11,5699	17,00	49,32	,15	,26	,10	,69	4,86	3,08	,65	119,92	1,00	,0800	,13	,0491	,84
301.00	,0109	12,00	44,43	,14	,25	,11	,74	6,50	3,52	,85	119,62	1,00	,0467	,09	,0394	,91
302.00	,0287	17,00	44,69	,17	,24	,07	,72	5,33	3,62	,41						
303.00	,0722	11,00	50,85	,12	,18	,06	,77	7,26	3,97	,57	100,51	1,00	,0861	,13	,0450	,83
304.00	,0159	7,00	56,87	,15	,25	,10	,69	5,06	3,03	,64	180,87	4,00	,0857	,13	,0457	,83

Cont. Anexo XIV

NPAC	DCOL	NA	DTOTA	REMDA	RETDA	RIDA	RDIDEA	RDIEMA	RDIETA	RINTESPA	DTOTB	NB	REMDB	RETDDB	RIDB	RDIDEB
305,00	,0006	10,00	42,81	,17	,27	,10	,65	4,51	2,91	,61	138,70	5,00	,0914	,14	,0445	,82
306,00	,0070	16,00	42,45	,18	,30	,12	,59	3,02	1,81	,66	327,96	1,00	,0633	,09	,0292	,87
307,00	,0465	12,00	43,64	,20	,26	,06	,54	2,44	1,91	,33	156,50	4,00	,1150	,14	,0278	,80
401,00	,0339	15,00	39,21	,19	,30	,11	,59	3,16	2,10	,59						
402,00	,0058	13,00	31,29	,22	,34	,12	,56	2,66	1,78	,58						
403,00	,0185	15,00	28,86	,20	,38	,18	,58	2,93	1,51	,94						
404,00	,0005	10,00	58,98	,11	,23	,12	,77	6,90	3,36	1,10	297,90	1,00	,0343	,05	,0191	,93
405,00	,0001	16,00	45,93	,18	,29	,12	,61	3,30	2,07	,72	137,89	1,00	,0821	,14	,0542	,84
406,00	,0005	5,00	43,86	,12	,21	,09	,73	5,86	3,05	,78	198,65	1,00	,0406	,08	,0414	
407,00	,0040	13,00	63,91	,14	,23	,09	,72	5,25	3,02	,63	167,33	1,00	,1054	,15	,0462	,79
501,00																
502,00																
503,00																
504,00																
601,00	2,5099	19,00	49,81	,14	,25	,11	,72	5,97	3,38	,80	103,66	3,00	,0831	,15	,0650	,83
602,00	,5781	13,00	39,15	,14	,25	,11	,72	5,66	3,04	,85	111,87	2,00	,0679	,11	,0414	,86
603,00	,7752	15,00	58,85	,14	,24	,10	,73	5,96	3,50	,71	188,61	4,00	,0816	,14	,0555	,84

ANEXO XV

Instruções para a decodificação do banco de dados

Identificação

Número do paciente (NPAC): # # #

Grupo: (1) atresia biliar sem anomalia extra-hepática (2) com anomalia extra-hepática (3) fetos sem hepatopatia (4) lactentes sem hepatopatia (5) transplantados sem atresia biliar (6) pacientes com colestase intra-hepática.

Nome: # # # (iniciais do nome) Prontuário (PRONT): # # # # # #

Número da biópsia (CASO) : # # #

Tipo de biópsia/autopsia: (1) em cunha (2) percutânea (3) autópsia

Sexo: (1) M (2) F

Idade gestacional (IDGEST): (1) prematuro (2) a termo (3) pós-termo

Idade na biópsia em dias de vida (IDBIOD): # # # dias

Procedência (PROCED): (1) Porto Alegre (2) Interior do Estado do RS (3) Outros estados (99999) NR ou NA

Naturalidade (NATUR): (1) Porto Alegre (2) Interior do Estado do RS (3) Outros estados (99999) NR ou NA

Etnia: (1) Branco (2) Negro (3) Oriental (4) Outros (99999) NR ou NA

Data da primeira avaliação no HCPA em dias de vida (IDPRIAVD): # # # # # # (99999) NR ou NA

Peso de nascimento (PN): # # # # gramas (99999) NR ou NA

Local de Nascimento (LOCNASC): (1) HCPA (2) Outros (99999) NR ou NA

Idade de início da icterícia em dias (INICT): # # # dias (99999) NR ou NA

Quadro clínico:

Peso na primeira avaliação no HCPA (PESO): # # # # gramas (99999) NR ou NA

Estatua na primeira avaliação no HCPA (ESTAT): # # # cm (99999) NR ou NA

Icterícia (ICT): (1) presente (2) ausente (99999) NA

Colúria (COLU): (1) presente (2) ausente (3) NR (99999) NA

Acolia persistente (ACOL): (1) presente (2) ausente (3) NR (99999) NA

Anomalias extra-hepáticas associadas (AEH): (1) presentes (2) ausentes

Se (1), especificar: (1) anomalia de lateralidade completa (2) "não-sindrômico" (3) anomalia de lateralidade incompleta (99999) NA

Exames laboratoriais:

Bilirrubina total (BT) # # # (99999) NA

Bilirrubina indireta (BI): # # # (99999) NA

Bilirrubina de reação direta (BD): # # # (99999) NA

Alanina aminotransferase (ALT): # # # (99999) NA

Aspartato aminotransferase (AST): # # # (99999) NA

Gamaglutamil transpeptidase (GGT): # # # (99999) NA

Fosfatase alcalina (FA): # # # (99999) NA

Infecções congênitas (STORCH): (1) ausente (2) presente (3) NR (99999) NA

Alfa-1 antitripsina sérica (AIAT): # # # (99999) NR ou NA

Evolução:

Resolução da Icterícia após a cirurgia (RESICT): (1) sim (2) não (3) NR (99999) NA

Se (1) , idade em que anicterizou (IDRESICT): # # # # # (99999) NA

Diminuiu icterícia após a cirurgia (DIMICT): (1) sim (2) não (3) NR (99999) NA

Se (1) , idade em que ocorreu (IDDIMIC): # # # # # ou (99999) NA

Transplante Hepático (TRANSPL): (1) sim (2) não (3) NR (99999) NA

Se (1), idade, em meses de vida, em que ocorreu (IDTX): # # #

Acompanhamento em ambulatório (ACOMAMB): (1) sim (2) não (3) NR (99999) NA

Óbito (VM): (1) vivo (2) morto (3) NR

Se (2): idade do óbito (IDOBT): # # # (99999) NA

causa do óbito (CAUSOBT): (1) associada à hepatopatia (2) não associada a hepatopatia

(3) NR (99999) NA

Presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS): (1) sim (2) não

Estudo histológico:

Presença de malformação de placa ductal (MPD): (1) presente (2) ausente

Presença de ducto biliar maduro (DBM): (1) presente (2) ausente

Distribuição de ducto biliar maduro (LOCDBM): (1) focal (2) difuso (99999) NA

Presença de proliferação ductular (PD): (1) presente (2) ausente

Distribuição da proliferação ductular (LOCPD): (1) focal (2) difusa (99999) NA

Densidade de colágeno (DCOL): # # #

Elementos estruturais vasculares e suas relações (vide material e métodos), incluindo número de vasos por caso (N), seguidos das letras:

A: arteríolas na primeira etapa do estudo histológico

B: artérias na primeira etapa do estudo histológico

A2: arteríolas na segunda e terceira etapas do estudo histológico

B2: artérias na segunda e terceira etapas do estudo histológico

NA - não se aplica; NR - não referido



Impressão: Gráfica UFRGS
Rua Ramiro Barcelos, 2705 - 1º andar
Fone: 3316 5083 Fax: 3316 5445 - Porto Alegre - RS
E-mail: grafica@vortex.ufrgs.br