LUIS RICARDO LONGO DOS SANTOS

Padrões histopatológicos e deposição de colágenos
durante a progressão da fibrose hepática
como fatores prognósticos da atresia de vias biliares

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Programa de Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Uenis Tannuri

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Longo dos Santos, Luis Ricardo

Padrões histopatológicos e deposição de colágenos durante a progressão da
fibrose hepática como fatores prognósticos da atresia de vias biliares /
Luis Ricardo Longo dos Santos. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: Uenis Tannuri.

Descritores: 1.Atresia biliar 2.Fibrose 3.Cirrose hepática biliar
4.Transplante de fígado 5.Portoenterostomia hepática 6.Prognóstico 7.Colágeno
tipo I 8.Colágeno tipo III 9.Colágeno tipo IV 10.Colágeno tipo V 11.Técnica
indireta de fluorescência para anticorpo

USP/FM/DBD-038/15

Este trabalho foi desenvolvido com a colaboração interdisciplinar do Laboratório de Investigação Médica em Cirurgia Pediátrica (LIM 30), do Laboratório de Investigação Médica em Patologia Hepática (LIM 14), do Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia e Matriz Extracelular (LIM 17) e do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

O projeto foi aprovado na Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob número 0639/09, em sessão de 01/07/2009.

Os recursos financeiros foram obtidos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2009/15549-2 – São Paulo, Brasil.

Aos meus pais, Joel e Eunice, pelo amor infinito e por me ensinarem a lutar por um mundo melhor e a sobreviver no mundo real.

À minha esposa, Luciana, pelo amor e pelo apoio incondicional, que tornaram possível esta empreitada.

Aos meus filhos, Ana Clara, Cecília e Vladimir, pelo sonho de educá-los para a liberdade, igualdade e fraternidade.

À minha irmã Tatiana e toda minha família, por terem ajudado a estruturar meu caráter e a inspirar meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Uenis Tannuri, meu orientador, pelo incentivo pessoal e pelos incontáveis ensinamentos desde o início de minha residência médica até a conclusão de minha tese de doutorado. Sua simplicidade, bom senso e seriedade, como homem e como pesquisador, inspiraram e pautaram meu desenvolvimento e atuação profissional e acadêmica.

Ao Prof. Dr. João Gilberto Maksoud e ao Dr. Arthur Loghetti Mathias, meus professores decanos, pelos exemplos pessoais e profissionais durante nossa profícua convivência, que muito contribuíram para minha formação.

Ao Prof. Dr. Pedro Muñoz Fernandez, pelo incentivo acadêmico, pela confiança profissional e sobretudo pela amizade, que muito me honram e me inspiram.

À Profa. Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri, pela amizade e incentivo, e pelas preciosas sugestões na elaboração das várias etapas desta tese.

À Dra. Maria Mercês Santos, pela amizade sincera e pelo chamado insistente para meu reencontro com a atividade científica.

Aos amigos, e meus professores, da Disciplina de Cirurgia Pediátrica e Transplante Hepático, Prof. Dr. Manoel Carlos Pietro Velhote, Dr. Ali Abdul Rahman Ayoub, Dr. Marcos Marques da Silva, Dr. João Gilberto Maksoud Filho, Dr. Nelson Elias Mendes Gibelli, Dra. Maria Lúcia de Pinho-Apezato e Dr. Wagner de Castro Andrade, pelo convívio, pelas lições recebidas e pela grande contribuição em minha formação profissional.

À Dra. Walcy Rosolia Teodoro e Dra. Ana Paula Pereira Velosa, pelo incentivo e por sua dedicação e competência na estruturação dos procedimentos laboratoriais de imunofluorescência.

Ao Prof. Dr. Evandro Sobroza de Mello, pelo incentivo, orientações e atenção na estruturação da avaliação histológica.

À Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi e ao Dr. Edwing Roger Parra, pela colaboração inestimável na discussão do trabalho e na estruturação dos testes estatísticos.

À Sra. Patrícia Lopes Pereira, Srta. Maria Cecília de Mendonça Coelho e Sra. Eliane Falconi Monico Gazetto pela presteza e auxílio desde a elaboração dos projetos e relatórios até a conclusão desta tese.

Aos enfermeiros Helena Thie Miyatani e Paulo Renato de Alencar Pereira, pelo auxílio na obtenção dos termos de consentimento informado dos pacientes envolvidos no estudo.

Aos funcionários do Serviço de Anatomia Patológica do HCFMUSP, pelo inventário e preparo do material anatomopatológico, que tornou possível acessar o objeto deste estudo.

À minha esposa Luciana Soldi, pelo reiterado incentivo para minha matrícula na pós-graduação e pelo trabalho de revisão gramatical deste texto.

À minha prima Denise Carmen dos Santos Longo, pelo trabalho de revisão gramatical dos textos em inglês e pela ajuda na preparação de minha apresentação oral do trabalho em inglês no Congresso Internacional de Patologia, em Praga.

*“Quem busca o conhecimento e o acha, obterá dois prêmios:
um por procurá-lo e outro por encontrá-lo.
E mesmo que não o encontre, ainda restará
a primeira recompensa.”*

Texto islâmico.

*“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas.
Muito conhecimento, que se sintam humildes”.*

Leonardo da Vinci.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	23
3. MÉTODOS	25
3.1. Seleção da casuística.....	26
3.2. Preparação dos cortes histológicos	30
3.3. Avaliação das alterações biliares	30
3.4. Avaliação da fibrose hepática	32
3.5. Imunofluorescência indireta para os colágenos I, III, IV e V	32
3.6. Avaliação qualitativa e quantitativa dos tipos de colágenos.....	33
3.7. Análise estatística.....	34
4. RESULTADOS	36
4.1. Caracterização da casuística.....	37
4.2. Avaliação morfológica dos espaços-porta e das estruturas biliares	38
4.3. Avaliação morfológica e morfometria da fibrose hepática.....	41
4.4. Avaliação morfológica da deposição dos colágenos I, III, IV e V	47
4.5. Avaliação morfométrica da deposição dos colágenos I, III, IV e V	54
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	73
7. ANEXOS	76
8. REFERÊNCIAS.....	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AVB	Atresia de vias biliares
BA	<i>Biliary atresia</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
Col.	Tipo de colágeno (especificado em algarismos romanos)
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride</i>
DP	Desvio-padrão
EP	Espaço-porta
EUA	Estados Unidos da América
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da FMUSP
HE	Hematoxilina-eosina
IC	Intervalo de confiança
ICr	Instituto da Criança do HCFMUSP
IF	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
KASAI	Hepatoportoenterostomia pela técnica cirúrgica de Kasai
KPE	<i>Kasai hepatoportoenterostomy</i>
LIM	Laboratório de investigação médica
LTx	<i>Liver transplantation</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PT	Região portal e periportal
Si	Região perissinusoidal
TGF	Fator de transformação de crescimento (<i>transforming growth factor</i>)
Tx	Transplante hepático pediátrico
µm	Micrometro
%	Porcentagem
%Col.	Porcentagem de área marcada para tipo específico de colágeno

RESUMO

Longo dos Santos, L.R. *Padrões histopatológicos e deposição de colágenos durante a progressão da fibrose hepática como fatores prognósticos da atresia de vias biliares*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Atresia de vias biliares (AVB) é uma hepatopatia colestática específica da criança, de etiologia desconhecida, com evolução para fibrose hepática precoce. AVB é a principal causa de cirrose na infância e principal indicação de transplante hepático pediátrico (Tx). Compreender os fatores envolvidos na progressão da fibrose é fundamental para estabelecer tratamentos efetivos nas hepatopatias crônicas. Identificar padrões histopatológicos associados ao prognóstico da AVB permitiria melhor planejamento dos centros de transplante e adequado aconselhamento familiar. OBJETIVO: Estabelecer padrões de marcadores histopatológicos e de imunofluorescência para colágenos em biópsias hepáticas iniciais e finais de pacientes com AVB submetidos a tratamento cirúrgico. Correlacionar esses marcadores com o prognóstico da doença, definido com base no tempo de evolução até realização do Tx. MÉTODO: Avaliação histológica de alterações biliares e fibrose hepática e histomorfometria da fibrose marcada por picrossírius e da deposição dos colágenos tipos I, III, IV e V marcados por imunofluorescência indireta (IF), em biópsias hepáticas iniciais e finais de 36 pacientes com AVB submetidos à hepatoportoenterostomia de Kasai (KPE) e ao Tx nos últimos 20 anos em nossa instituição. RESULTADOS: A mediana das idades de realização da KPE foi de 12,5 semanas (6-20) e do Tx foi de 27 meses (6-120). Reação ductular e malformação de placa ductal foram mais intensas nas biópsias iniciais ($p < 0,05$), enquanto fibrose hepática e ductopenia apresentaram padrão progressivo ($p < 0,001$), sem correlações com a idade de realização da KPE nem com o tempo de evolução até Tx. A morfometria da fibrose hepática marcada pelo picrossírius nas biópsias iniciais apresentou correlação positiva com a idade da KPE ($p = 0,01$), mas não com a idade do Tx ($p = 0,24$). A deposição perissinusoidal dos colágenos dos tipos III e V foi mais intensa nas biópsias iniciais ($p < 0,01$), enquanto os colágenos dos tipos I e IV

apresentaram padrão de deposição progressiva ($p < 0,01$). Pacientes com maior deposição perissinusoidal de colágeno tipo I nas biópsias iniciais apresentaram curva de tempo de evolução até Tx sugerindo pior prognóstico ($p = 0,04$). **CONCLUSÃO:** Marcadores histopatológicos de alterações biliares, fibrose hepática e deposição de colágenos apresentaram características evolutivas distintas nas fases inicial e final da AVB, sem correlação com o tempo de evolução até Tx. A morfometria da deposição perissinusoidal de colágeno tipo I em biópsias iniciais marcadas por IF pode ser correlacionada ao tempo de evolução até Tx em pacientes com AVB operada.

Descritores:

1. Atresia biliar; 2. Fibrose; 3. Cirrose hepática biliar; 4. Transplante de fígado; 5. Portoenterostomia hepática; 6. Prognóstico; 7. Colágeno tipo I; 8. Colágeno tipo III; 9. Colágeno tipo IV; 10. Colágeno tipo V; 11. Técnica indireta de fluorescência para anticorpo.

SUMMARY

Longo dos Santos, L.R. *Histopathological and collagens deposition patterns during hepatic fibrosis progression as prognostic factors in biliary atresia*. [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Biliary atresia (BA) is a specific cholestatic liver disease of unknown etiology that affects children and progresses to early hepatic fibrosis. BA is the main indication of pediatric liver transplantation (LTx). Understanding the factors involved in the progress of fibrosis is essential to establish effective treatment to chronic liver disease. Histopathological markers in liver biopsies could be useful to predict progression to end stage disease and to make it possible to improve planning in transplantation centers and parental orientation. **OBJECTIVE:** To establish histopathological or immunohistochemical markers in initial or final liver biopsies of BA patients and correlate those markers with prognosis, as defined by progression time lapse until LTx. **METHOD:** Histological analysis of multiple parameters of biliary alterations and morphometrical assessment of liver fibrosis were performed, besides indirect immunofluorescence assays (IF) for type I, III, IV and V collagens in initial and final liver biopsies of 36 patients with BA submitted to Kasai hepatoportoenterostomy (KPE) and LTx in the last 20 years in a single center. **RESULTS:** The median of the ages at KPE was 12.5 weeks (6-20) and at LTx was 27 months (6-120). Ductular reaction and ductal plate malformation were more severe in the initial biopsies ($p < 0.05$), while ductopenia and liver fibrosis were more severe in final biopsies ($p < 0.001$), though without correlation with age at KPE nor with progression time lapse until LTx. Morphometrical assessment of liver fibrosis marked by picrosirius red in initial biopsies demonstrated positive correlation with age at KPE ($p = 0.01$) but not with age at LTx ($p = 0.24$). The perisinusoidal deposition of type III and V collagens was more extended in the initial biopsies ($p < 0.01$), while type I and IV collagens deposition indicated progression ($p < 0.01$). Patients with large amounts of perisinusoidal type I collagen in the initial biopsies had worse progression time curve until LTx ($p = 0.04$). **CONCLUSION:** Biliary alterations, liver fibrosis and collagens deposition demonstrated distinctive progression findings in the initial or final phases

of the BA, without prognostic correlation. Morphometrical assessment of perisinusoidal deposition of type I collagen by IF in the initial biopsies can be correlated with progression time until LTx in patients with post-surgical BA.

Descriptors:

1. Biliary atresia; 2. Fibrosis; 3. Liver cirrhosis, biliary; 4. Liver transplantation; 5. Portoenterostomy, hepatic; 6. Prognosis; 7. Collagen type I; 8. Collagen type III; 9. Collagen type IV; 10. Collagen type V; 11. Fluorescent antibody technique, indirect.

1. INTRODUÇÃO

A atresia de vias biliares (AVB) é uma doença hepática colestática progressiva específica da criança. A compreensão de sua fisiopatologia e a busca de uma terapêutica definitiva vem desafiando e estimulando gerações de cirurgiões pediátricos, hepatologistas e patologistas¹. Em decorrência de sua relevante prevalência e das características evolutivas da fibrose hepática, a despeito do tratamento cirúrgico disponível, a atresia de vias biliares é a mais importante causa de cirrose hepática na infância e principal indicação de transplante hepático pediátrico (Tx)²⁻⁵.

As manifestações clínicas têm início nas primeiras semanas de vida, com icterícia progressiva à custa de hiperbilirrubinemia direta, colúria e acolia fecal persistentes e hepatomegalia associada ao aumento da consistência do fígado. Inicialmente os pacientes mantêm bom estado geral e nutricional, sem febre ou outros sinais infecciosos⁶. Com a evolução da colestase, em poucas semanas surgem os primeiros sinais de hepatopatia crônica, precocemente observada pela hipertensão portal (esplenomegalia, circulação colateral na parede abdominal) e finalmente como disfunção hepatocelular decorrente de cirrose hepática^{3,6}.

Apesar da importância da atresia de vias biliares dentre as patologias hepáticas pediátricas, sua etiologia e fisiopatologia não estão ainda estabelecidas⁷⁻⁸. Malformações embriológicas da placa ductal biliar^{7,9-11}, infecções virais perinatais^{7,8,12-17} e fenômenos relacionados a autoimunidade^{7,8,18-21} são os principais fatores investigados como os prováveis envolvidos na patogênese do processo inflamatório crônico que leva a destruição progressiva das vias biliares intra e extra-hepáticas e consequente interrupção do fluxo biliar (Figura 1).

Figura 1 – Fotografia mostrando o aspecto macroscópico do fígado de paciente com AVB durante a cirurgia de Kasai, com hilo hepático exposto após laparotomia ampla, e os achados cirúrgicos característicos de doença: fígado com superfície rugosa e irregular, coloração esverdeada, vesícula biliar atresíca (seta longa) e resquícios biliares extra-hepáticos fibrosados (seta curta).

A colestase crônica decorrente da obstrução biliar seria a responsável por desencadear o processo inflamatório que evolui para fibrose hepática progressiva, iniciando-se nas regiões portais e periportais e estendendo-se para formação de septos no parênquima do fígado, desorganização da estrutura lobular e sinusoidal, culminando com cirrose rapidamente estabelecida^{6,22}.

No entanto são frequentes os casos de atresia de vias biliares em que a progressão da fibrose hepática persiste, a despeito da resolução da colestase após uma derivação biliodigestiva (hepatoportoenterostomia pela técnica de Kasai²³) bem sucedida²⁴⁻²⁷. Também não há perfeita correlação entre o tempo de evolução da colestase e o grau de fibrose hepática observada no momento da exploração cirúrgica, com significativa variação na progressão da doença em diferentes pacientes⁶. Esses achados clínicos sugerem que a fibrose hepática, embora possa ser desencadeada como

resposta à lesão decorrente da estase biliar, pode ser agravada e perpetuada por outros fatores que independem do restabelecimento do fluxo biliar. Além disso, a progressão da fibrose hepática ocorre em ritmo distinto nos principais compartimentos histológicos hepáticos: portal e parenquimatoso (Figura 2). A deposição precoce de colágeno nas regiões portais e periportais é característica marcante da atresia de vias biliares, enquanto a deposição perissinusoidal e a formação de septos fibrosos no parênquima estão associadas ao avanço dos sinais de disfunção hepatocelular típicos das fases tardias da doença.

Figura 2 – Microfotografia mostrando histologia normal do fígado, na coloração HE, em aumento óptico de 40 vezes. O compartimento parenquimatoso ocupa a maior parte do lóbulo hepático e é formado pelas colunas de hepatócitos separadas por capilares sinusoides. Os espaços-porta (setas longas) são pequenos e formados pelos ramos da veia porta e da artéria hepática, ductos biliares e pouco interstício conjuntivo. Pelos sinusoides circula sangue arterial e venoso portal, que é drenado pelas veias centrolobulares (setas curtas).

O conhecimento dos mecanismos de progressão e perpetuação da fibrose hepática tem avançado bastante nos últimos anos, sendo a chave para estabelecer tratamentos efetivos nas hepatopatias crônicas²⁸⁻³¹. Nesta direção, grande atenção tem sido dada às interações entre os elementos celulares³²⁻³⁸ (características do infiltrado inflamatório, origem e biologia dos miofibroblastos ativados), as citocinas envolvidas na modulação do processo inflamatório e na ativação das células produtoras de colágeno (especialmente interleucinas e TGF beta)^{27,39-46} e os próprios componentes da matriz extracelular (moléculas de adesão e quimiotaxia, diferentes tipos de colágeno depositados e remodelagem da fibrose cicatricial)^{45,47-53}.

O entendimento da importância fisiológica e patológica da matriz extracelular também avançou consideravelmente. Está bem estabelecido atualmente que a matriz extracelular, ao invés de representar apenas um arcabouço inerte de sustentação celular, representa componente biologicamente ativo e interativo com os elementos celulares para estruturação e dinâmica dos tecidos vivos⁵⁴⁻⁵⁸.

Dentre os integrantes da matriz extracelular, a família de moléculas quantitativamente mais importante e abundante é a dos colágenos. Como característica geral, os colágenos são proteínas formadas por cadeias com sequências repetidas de três aminoácidos, com moléculas arranjadas em tripla hélice formada por cadeias idênticas ou não, com as porções terminais em arranjo globular. Em decorrência das variações na sua estrutura primária, secundária e terciária, cada tipo de colágeno apresenta características bioquímicas e funções biológicas específicas, com distribuição tecidual fisiológica própria^{59,60}.

No tecido hepático normal destacam-se os colágenos tipos I e III, principais colágenos fibrilares de sustentação encontrados nos espaços-porta, no arcabouço

lobular e na cápsula hepática, e o colágeno tipo IV, colágeno não-fibrilar presente nas membranas basais epiteliais dos ductos biliares, do endotélio vascular e das colunas de hepatócitos perissinusoidais⁶¹. O colágeno tipo V forma fibras finas ou associa-se com outros colágenos em fibras heterotípicas e participa como elemento de ancoragem e ligação entre o colágeno tipo I do arcabouço tecidual e o colágeno tipo IV das membranas basais.

O colágeno tipo I é o principal colágeno depositado em processos de reparação cicatricial e sua presença está associada a fibrose madura, formando fibras mais grossas, maior frequência de ligações moleculares cruzadas e maior estabilidade frente ao processo de remodelação da matriz conjuntiva. O colágeno tipo III também é depositado inicialmente em fibroses cicatriciais e tecidos de granulação, mas geralmente é substituído nas fases mais tardias e estáveis do processo de fibrogênese. O colágeno tipo IV geralmente é descrito como restrito às membranas basais epiteliais e não como elemento quantitativamente importante na fibrose cicatricial.

Estudos recentes em modelos animais demonstraram a importância do colágeno tipo V como autoantígeno responsável por desencadear e/ou modular inflamação crônica e fibrose tecidual em doenças autoimunes⁶²⁻⁶⁶ e em rejeição crônica a transplante pulmonar⁶⁷⁻⁷³. Além disso, embora participe como elemento minoritário (3 a 5% do total) na composição das fibras heterotípicas com o colágeno tipo I e III, o colágeno tipo V desempenha função biológica central como estruturador da fibrogênese, regulando a inicialização do processo de nucleação das fibrilas e o diâmetro final das fibras colágenas depositadas na matriz extracelular⁷⁴⁻⁸⁵.

Contudo, a relevância dos diferentes tipos de colágenos no processo de progressão da fibrose hepática^{78,86} ainda não tinha sido estudada em pacientes com

atresia de vias biliares. Testes preliminares (não publicados) no modelo animal de colestase induzida por ligadura do ducto hepático em ratos jovens⁸⁷⁻⁸⁹ demonstraram intensa imunomarcção de colágeno tipo V no parênquima hepático, paralelamente ao processo de fibrose portal e periportal.

Alterações no padrão normal de deposição dos colágenos durante a evolução da fibrose podem contribuir para perda funcional hepática tanto pelo espessamento das membranas basais dos sinusoides, que prejudica a troca de macromoléculas entre os hepatócitos e o plasma sanguíneo, quanto pela formação de septos fibrosos no parênquima, que contribui para desestruturação da irrigação nos lóbulos hepáticos funcionais. Além disso, a exposição antigênica anormal poderia estimular a perpetuação do processo inflamatório e do estímulo para fibrogênese, inclusive nos pacientes com drenagem biliar restabelecida a partir da hepatoportoenterostomia (KASAI).

Esta última possibilidade abriria perspectivas para compreensão do processo que leva crianças com AVB a evoluírem progressivamente para cirrose hepática terminal mesmo nos casos operados com sucesso, portanto sem obstrução biliar crônica. Abriria também a possibilidade de intervir modulando farmacológica ou imunologicamente esse processo⁹⁰⁻⁹⁵, com vistas a um tratamento da atresia de vias biliares que avance além da simples tentativa de restabelecimento do fluxo biliar.

Dando continuidade à linha de pesquisa desenvolvida na Disciplina de Cirurgia Pediátrica e Transplante Hepático da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, com intuito de estudar a fibrose hepática relacionada à obstrução biliar, iniciada com os trabalhos de Gibelli⁸⁷⁻⁸⁹, desenvolvendo modelo experimental de ligadura biliar em ratos jovens, e seguida pelos trabalhos de Andrade⁹³⁻⁹⁵ acerca da

modulação farmacológica da fibrose hepática nesse modelo animal, nosso estudo avaliou parâmetros histopatológicos de alterações biliares, fibrose hepática e deposição de diferentes tipos de colágenos durante a progressão da AVB em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico pela hepatoportoenterostomia de Kasai (que serão referidos no texto a partir de agora simplesmente como “AVB operada”), investigando suas correlações com o prognóstico da doença.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi investigar padrões histológicos associados ao prognóstico da atresia de vias biliares, avaliando alterações dos ductos biliares, fibrose hepática e deposição compartimental de diferentes tipos de colágenos no tecido obtido a partir de biópsias hepáticas das fases inicial e final da evolução clínica de pacientes com AVB submetidos a hepatoportoenterostomia pela técnica de Kasai.

Para isso, nossos objetivos específicos foram:

1. Avaliar alterações histopatológicas dos ductos biliares na fase inicial e final da AVB e associá-las ao prognóstico da doença.
2. Avaliar a progressão da fibrose hepática na fase inicial e final da AVB e correlacioná-la ao prognóstico da doença.
3. Estabelecer o padrão de deposição compartimental hepática de colágeno tipo V e compará-lo com outros colágenos fibrilares (colágenos tipos I e III) e não-fibrilares (colágeno tipo IV), na fase inicial e final da AVB.
4. Correlacionar ao prognóstico da doença o padrão de deposição dos colágenos tipos I, III, IV e V na fase inicial da AVB.

3. MÉTODOS

3.1. Seleção da casuística

Foram selecionados todos os pacientes com diagnóstico definitivo de atresia de vias biliares, que foram admitidos no Serviço de Cirurgia Pediátrica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – ICr - HCFMUSP desde o início do programa de transplante hepático pediátrico da instituição (a partir de 1989), e que realizaram todas as etapas de diagnóstico e tratamento no próprio Serviço.

Os critérios para inclusão de pacientes no estudo foram:

1. Diagnóstico definitivo de AVB, confirmado por exames anatomopatológicos e por exploração cirúrgica, e sem malformações graves associadas.
2. Acompanhamento clínico e laboratorial regular no Serviço, desde o diagnóstico de AVB até a efetivação do transplante hepático pediátrico.
3. Realização de todas as biópsias hepáticas no próprio Serviço, representando momentos distintos da evolução clínica da AVB: biópsia percutânea por agulha realizada antes da indicação cirúrgica para investigação de diagnósticos diferenciais, biópsia cirúrgica em cunha realizada durante a hepatoportoenterostomia de Kasai e biópsia da peça cirúrgica do explante hepático realizado durante o Tx.
4. Realização de tratamento cirúrgico (hepatoportoenterostomia pela técnica de Kasai) em nosso Serviço e com idade de até 20 semanas de vida.

5. Disponibilidade de material histológico estocado de pelo menos uma biópsia hepática inicial (percutânea e/ou cirúrgica) e da biópsia hepática final (peça cirúrgica do explante).
6. Disponibilidade de material histológico adequado e representativo do tecido hepático (com parênquima e pelo menos três espaços-porta representados, sem autólise nem artefatos que inviabilizassem a avaliação histológica) e em quantidade suficiente para preparação de cortes, sem exaurir o tecido estocado.

Atendendo aos quatro primeiros critérios de seleção, foram identificados inicialmente 52 pacientes elegíveis para inclusão no estudo. Destes, dez casos foram excluídos porque os blocos parafinados das biópsias hepáticas iniciais ou finais não foram localizados no arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do HCFMUSP, apesar de registros de sua realização. Adicionalmente, outros seis casos foram excluídos porque os blocos recuperados continham material histológico inadequado, não representativo ou insuficiente para análises subsequentes.

A indicação de Tx foi definida por sinais clínicos (ascite refratária ao tratamento, desnutrição progressiva, encefalopatia recorrente, coagulopatia com repercussão clínica, infecções frequentes) e laboratoriais (hipoalbuminemia, dosagem baixa de fator V e alargamento dos tempos dos testes de coagulação, elevação progressiva dos níveis de hiperbilirrubinemia) de hepatopatia crônica terminal irreversível^{2-5,96}, segundo critérios e definições internacionalmente reconhecidos. Por sua vez, a realização do Tx dependeu da efetiva oferta e aceitação do potencial enxerto

para um paciente específico, levando em conta as condições clínicas do doador e do receptor e as diretrizes da Secretaria de Saúde para alocação de órgãos para transplante.

Os prontuários médicos de internações e consultas ambulatoriais foram avaliados e os pacientes foram classificados em dois grupos estruturados com base no tempo de evolução até realização de transplante hepático (Tx), a saber:

Grupo Tx precoce, quando Tx foi realizado com até dois anos de idade.

Grupo Tx tardio, quando Tx foi realizado com mais de dois anos de idade.

Esta definição foi utilizada como parâmetro de prognóstico evolutivo pós-operatório da AVB e baseou-se na mediana da distribuição das idades de realização do Tx na própria casuística. Em função da rápida e elevada mortalidade associada à hepatopatia terminal, da instabilidade clínica dos pacientes candidatos ao Tx e das dificuldades para obtenção imediata de órgãos em condições adequadas para transplante hepático, assumimos a premissa empírica de que quanto mais prolongado tivesse sido o intervalo de tempo até a realização do Tx, mais favorável teria sido a evolução clínica dos pacientes com AVB operada.

Para a análise histopatológica foi utilizado material de fragmentos hepáticos obtidos em biópsias INICIAIS, realizadas para investigação diagnóstica da AVB (Figura 3) e/ou na cirurgia de Kasai, e biópsias FINAIS, realizadas no explante hepático do Tx. Todo o material hepático avaliado foi obtido durante procedimentos cirúrgicos realizados com objetivos diagnósticos ou terapêuticos na ocasião de sua indicação clínica, sem qualquer intencionalidade correlacionada com o presente estudo. Esse material rotineiramente permanece estocado em blocos parafinados no Serviço de Anatomia Patológica do HCFMUSP para revisões diagnósticas e para

investigações científicas. Sua disponibilização respeitou as regras daquele setor, a partir da aprovação do projeto de pesquisa junto à Comissão de Ética (CAPPesq) e à Divisão de Anatomia Patológica da instituição.

Figura 3 – Fotografia ilustrando a técnica de biópsia hepática percutânea com agulha de “Tru-cut”, realizada para diagnóstico antes da indicação de exploração cirúrgica na suspeita de AVB.

Termos de consentimento informado foram obtidos junto aos responsáveis legais dos respectivos pacientes, com autorização para utilização do material biológico armazenado e das informações contidas em seus prontuários médicos, não sendo solicitado ou realizado nenhum outro exame, biópsia, procedimento ou entrevista médica direcionados para o projeto de pesquisa. Foram protegidos o anonimato e a privacidade de pacientes e familiares, sendo os dados e resultados organizados e divulgados de modo impessoal. O projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital

das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O pesquisador e os demais indivíduos e instituições envolvidos no projeto não manifestaram nenhum tipo de conflito de interesses em relação ao objeto e aos resultados da pesquisa.

3.2. Preparação dos cortes histológicos

A partir dos blocos parafinados contendo material histológico das biópsias hepáticas, foram confeccionados cortes de quatro a cinco micrometros de espessura, aderidos em seguida a lâminas de vidro. Essas lâminas foram então desparafinizadas e submetidas aos métodos de coloração pela hematoxilina-eosina (HE), possibilitando análise morfológica geral e avaliação semiquantitativa das alterações biliares; pelo picrossírius⁹⁷⁻¹⁰⁰, possibilitando avaliação semiquantitativa e morfometria da fibrose hepática; e pela técnica de imunofluorescência indireta para colágenos dos tipos I, III, IV e V^{62, 64-66}, possibilitando estudo morfológico e quantificação dos colágenos envolvidos na fibrose hepática da AVB, conforme exposto a seguir.

3.3. Avaliação das alterações biliares

Com participação de médico patologista vinculado ao Laboratório de Investigação Médica em Patologia Hepática (LIM 14) da FMUSP, com grande experiência no diagnóstico de AVB e de outras hepatopatias pediátricas, foram estabelecidos todos os escores para graduação semiquantitativa, os quais foram utilizados na definição de padrões histológicos descritivos e na análise estatística.

Nas lâminas de biópsia coradas pela hematoxilina-eosina foram avaliados parâmetros histopatológicos habitualmente associados às doenças colestáticas neonatais, assim definidos:

1. Reação ductular, caracterizada pela proliferação de pequenos ductos neoformados, com aspecto imaturo, nas margens dos espaços-porta (EP);
2. Malformação da placa ductal, caracterizada pela presença de estruturas biliares primitivas constituídas por ductos alongados e alargados, dispostos em forma de ferradura ao redor dos elementos vasculares portais ou na periferia dos EP;
3. Ductopenia, caracterizada pela ausência de ductos biliares originais periarteriais em mais da metade dos EP da biópsia hepática analisada.

A ductopenia foi classificada como presente (grau 1) ou ausente (grau 0), enquanto a avaliação semiquantitativa da reação ductular e da malformação da placa ductal foi baseada em escores definidos pela intensidade e extensão das alterações:

grau zero (ausência de alterações descritas);

grau 1 (alterações discretas e observadas em menos que 25% dos EP);

grau 2 (alterações moderadas e observadas entre 25 e 50% dos EP);

grau 3 (alterações intensas e observadas em até 75% dos EP);

grau 4 (alterações muito intensas e observadas em mais de 75% dos EP).

3.4. Avaliação da fibrose hepática

Para avaliação semiquantitativa da fibrose hepática nas lâminas de biópsia coradas pelo picrossírius, foi utilizado escore com pontuação de zero a quatro, definindo:

grau zero (ausência de fibrose hepática);

grau 1 (fibrose leve, restrita aos espaços-porta e regiões periportais);

grau 2 (fibrose moderada, com formação ocasional de septos);

grau 3 (fibrose avançada, com septos frequentes e nódulos incompletos);

grau 4 (cirrose, com fibrose intensa e nódulos regenerativos completos).

Para avaliação quantitativa da fibrose hepática nas lâminas de biópsia coradas pelo picrossírius, foi realizada histomorfometria por análise de imagens (detalhamento descrito no Anexo A). A partir de cinco medições de campos representativos do tecido hepático, visualizados em pequeno aumento óptico (40 vezes), incluindo sempre espaços-porta e parênquima lobular e excluindo regiões capsulares, a porcentagem de área marcada pelo picrossírius foi calculada em relação à área total dos campos delimitados, sendo utilizada como parâmetro da porcentagem de área ocupada pela fibrose hepática.

3.5. Imunofluorescência indireta para os colágenos dos tipos I, III, IV e V

Para imunomarcção dos colágenos dos tipos I, III, IV e V, envolvidos na progressão da fibrose hepática na AVB, foi utilizado o método de imunofluorescência

indireta com anticorpos tipo-específicos, conforme padronizações estabelecidas no Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia e Matriz Extracelular (LIM 17) da FMUSP (detalhamento descrito no Anexo B).

3.6. Avaliação qualitativa e quantitativa dos tipos de colágenos

Os dados descritivos da distribuição compartimental dos colágenos dos tipos I, III, IV e V foram embasados em avaliação semiquantitativa da distribuição de imunomarcção tipo-específica dos respectivos colágenos nos subcompartimentos dos espaços-porta (regiões intersticial, perivascular, periductal e perirreação ductular) e no parênquima hepático (região perissinusoidal), sendo referidos comparativamente entre as biópsias INICIAIS e FINAIS e entre os demais tipos de colágenos estudados.

Para graduação da imunomarcção foi definido escore com a pontuação:

grau zero (imunomarcção ausente no compartimento);

grau 1 (imunomarcção discreta ou não destacada em relação às demais estruturas);

grau 2 (imunomarcção intensa e destacada em relação às estruturas adjacentes).

Os dados quantitativos da imunomarcção dos colágenos dos tipos I, III, IV e V foram mensurados exclusivamente no compartimento perissinusoidal pelo método de histomorfometria por análise de imagem (detalhamento descrito no Anexo C). Baseada em 5 a 10 medições em campos representativos de parênquima lobular, visualizados em grande aumento óptico (200 vezes), incluindo as regiões ocupadas por hepatócitos e capilares sinusoidais, mas não por espaços-porta nem septos cirróticos, a porcentagem de área imunomarcada para cada tipo de colágeno foi calculada em relação à área total dos campos delimitados.

Para cada tipo de colágeno quantificado, os pacientes foram distribuídos em dois grupos, de acordo com a mediana das porcentagens de área perissinusoidal imunomarcada nas biópsias INICIAIS:

Grupo % Colágeno baixa, constituído por pacientes que apresentaram porcentagem de área imunomarcada, para aquele tipo específico de colágeno, abaixo da mediana;

Grupo % Colágeno alta, constituído por pacientes que apresentaram porcentagem de área imunomarcada, para aquele tipo específico de colágeno, acima da mediana.

3.7. Análise estatística

Para cálculos e análises estatísticas foi utilizado o programa computacional SPSS Statistic 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, EUA) e definido o nível de significância estatística de $p < 0,05$ em distribuição bicaudal.

As distribuições das frequências dos escores relativos a alterações biliares, fibrose hepática e imunomarcção compartimental dos tipos de colágenos foram testadas em relação às fases evolutivas da AVB (comparando biópsias INICIAIS e FINAIS) e ao tempo de evolução até realização do Tx (comparando grupos Tx precoce e Tx tardio), aplicando-se o teste qui-quadrado de Pearson. Foram também calculados os índices de regressão linear de Pearson para correlação desses parâmetros com as idades de realização da cirurgia de Kasai e do transplante hepático.

Os dados quantitativos das porcentagens de área marcada pelo picrossírius e pela imunofluorescência para cada colágeno foram expressos como médias, desvios-padrão (DP) e intervalos de confiança de 95%. Utilizando o teste de Levene, para igualdade entre as variâncias, e teste t de Student, para igualdade entre as médias,

foram avaliadas as diferenças entre as médias de porcentagem de área marcada em relação aos grupos estabelecidos em função do tempo de evolução até Tx, definido como parâmetros de prognóstico da AVB. O teste t pareado foi utilizado para comparação das médias de marcação pelo picrossírius ou de imunomarcação para cada tipo de colágeno entre as biópsias INICIAIS e FINAIS da AVB, com intenção de definir o padrão evolutivo da deposição de colágenos na progressão da fibrose hepática após cirurgia de Kasai.

Pelo método de Kaplan-Meier, para cada tipo de colágeno estudado, foram elaboradas curvas de tempo de evolução cumulativo até realização do Tx (desfecho clínico estabelecido para avaliação), comparando os grupos constituídos pelos casos com porcentagens de área imunomarcada superiores ou inferiores à mediana (%Col. alta e %Col. baixa). A diferença estatística entre as curvas foi avaliada pelos testes de Breslow (Wilcoxon generalizado), Log Rank (Mantel-Cox) e Tarone-Ware.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da casuística

Respeitando os critérios de inclusão estabelecidos, foram selecionados 36 pacientes com AVB que tinham sido submetidos a tratamento cirúrgico e a transplante hepático no ICr -HCFMUSP no período de 1994 a 2008.

Entre os dados revisados dos prontuários médicos, todos os pacientes apresentaram icterícia com predomínio de hiperbilirrubinemia direta, acolia fecal mantida por mais de duas semanas e hepatomegalia antes da realização da cirurgia de Kasai. Em apenas um paciente havia descrição de achados cirúrgicos compatíveis com diagnóstico de forma fetal da AVB. Em 20 pacientes foi avaliado o aspecto histológico do *porta hepatis*, sendo que 60% apresentavam padrão canalicular (tipo III de Gauthier, ductos maiores de 150 micrometros). Dez pacientes foram referidos como anictéricos em algum momento após a cirurgia de Kasai, porém os dados de prontuário não permitiram uma classificação formal do sucesso da cirurgia de Kasai para embasar análise apropriada dessa variável.

As biópsias hepáticas INICIAIS realizadas por via percutâneas (para diagnóstico antes da exploração cirúrgica) foram recuperadas em 72% dos casos (26 pacientes) e as realizadas durante a cirurgia de Kasai foram recuperadas em 86% dos casos (31 pacientes). Em 58% dos casos (21 pacientes), duas biópsias INICIAIS do mesmo paciente foram disponibilizadas para o estudo. As biópsias FINAIS, da peça cirúrgica do explante hepático, por constituírem um dos critérios de inclusão no estudo, foram analisadas em 100% dos casos.

Na distribuição por gênero, predominou o sexo feminino na proporção aproximada de 2:1, com 23 meninas (64%) e 13 meninos (36%).

Em relação à distribuição etária no momento dos procedimentos cirúrgicos, as biópsias percutâneas diagnósticas foram realizadas entre 5 e 18 semanas de idade, com mediana de 11 semanas e média de 10,8 +/- 3,8 semanas. As cirurgias de Kasai foram realizadas entre 06 e 20 semanas de idade, com mediana de 12,5 e média de 12,9 +/- 4,4 semanas. Os transplantes hepáticos foram realizados entre 6 e 120 meses de idade, com mediana de 27 e média de 33,5 +/- 24,4 meses. Os dados completos e individualizados em relação à distribuição etária estão compilados no Anexo D.

4.2. Avaliação morfológica dos espaços-porta e das estruturas biliares

Na Tabela 1 estão resumidos os dados da avaliação semiquantitativa dos padrões histopatológicos dos ductos biliares e da fibrose hepática, com respectivos escores mais frequentes e associações testadas (comparando as distribuições dos escores nas biópsias INICIAIS em função da idade de realização do KASAI, do tempo de evolução até Tx e entre biópsias INICIAIS e FINAIS). No Anexo E estão catalogados os dados completos que subsidiaram a análise apresentada a seguir.

Em todos os pacientes foi observado aumento da área ocupada pelos espaços-porta, decorrente de infiltrado inflamatório linfocitário, acúmulo de tecido fibroconjuntivo e proliferação de dúctulos biliares neoformados, que são achados histológicos característicos da síndrome colestática neonatal de padrão obstrutivo, cujo principal diagnóstico é a atresia de vias biliares.

Reação ductular foi classificada como intensa ou muito intensa (escore 3 ou 4) em 92% das biópsias INICIAIS. Dos 21 pacientes com duas biópsias INICIAIS consecutivas, 52% mostraram aumento do escore da reação ductular entre a primeira

e a segunda biópsia, enquanto 19% já apresentavam escore máximo na primeira biópsia e mantiveram na segunda. Nenhuma diferença significativa (teste Pearson qui-quadrado, $p = 0,44$) na distribuição dos escores da reação ductular foi observada entre os grupos com evolução para transplante hepático precoce (idade Tx ≤ 2 anos) ou tardio (idade Tx > 2 anos).

Tabela 1 – Escores mais frequentes (frequências relativas apresentadas como porcentagens) das alterações biliares e da fibrose hepática nas biópsias INICIAIS, e resultado dos testes de associação das distribuições desses escores em função das fases evolutivas (comparação com escores nas biópsias FINAIS), da idade de realização do KASAI e do tempo de evolução até Tx.

Parâmetro histopatológico	Escores mais frequentes nas biópsias INICIAIS (% dos casos)	Comparação entre escores das biópsias INICIAIS e FINAIS	Associação entre escores das biópsias INICIAIS e idade KASAI	Associação entre escores das biópsias INICIAIS e idade Tx
Reação ductular	3 ou 4 (92%)	Regressão * $p = 0,02$	NÃO $p = 0,55$	NÃO $p = 0,44$
Malformação de placa ductal	2 ou 3 (81%)	Regressão * $p = 0,01$	NÃO $p = 0,11$	NÃO $p = 0,50$
Ductopenia	0 (93%)	Progressão * $p < 0,001$	NÃO $p = 0,36$	NÃO $p = 0,82$
Fibrose hepática	3 ou 4 (71%)	Progressão * $p < 0,001$	NÃO $p = 0,31$	NÃO $p = 0,43$

Malformação de placa ductal foi identificada nas biópsias INICIAIS em 94% dos casos, com escores 2 (moderada) ou 3 (intensa) na maioria deles (com 31% e 50% de frequência, respectivamente). Não foi verificada associação da distribuição desses escores com o tempo de evolução até Tx ($p = 0,50$).

Os escores atribuídos às alterações dos ductos biliares apresentaram tendência de diminuição relativa no longo prazo, comparando-se o conjunto das biópsias INICIAIS e FINAIS. Os escores de reação ductular e de malformação da placa ductal foram significativamente menores nas biópsias FINAIS em comparação com os observados nas biópsias INICIAIS ($p = 0,02$ e $p = 0,01$, respectivamente).

Ductopenia foi observada apenas em dois pacientes (6,7% dos casos com material histológico representativo para diagnóstico) nas biópsias INICIAIS e em 77,8% dos casos nas biópsias FINAIS (Tabela 2), demonstrando que a ocorrência de ductopenia é uma alteração histológica típica da evolução tardia da AVB ($p < 0,001$). Todavia, a ocorrência de ductopenia nas biópsias iniciais não foi caracterizada como fator prognóstico, não estando associada à idade de realização da cirurgia de Kasai ($p = 0,36$) nem ao tempo de evolução até Tx ($p = 0,82$).

Tabela 2 – Distribuição da ocorrência de ductopenia nas biópsias hepáticas INICIAIS e FINAIS de pacientes com AVB operada. (* $p < 0,001$)

			DUCTOPENIA		Total
			Ausência de Ductopenia	Presença de ductopenia	
Biópsia hepática	INICIAL	Casos (n)	28	2	30
		%	93,3	6,7	100,0
	FINAL	Casos (n)	8	28	36
		%	22,2	77,8	100,0
Total	Biópsias (n)		36	30	66
	%		54,6	45,4	100,0

Na figura 4 estão representadas duas biópsias hepáticas INICIAIS consecutivas do mesmo paciente, realizadas por via percutânea para diagnóstico pré-operatório (A) e durante a cirurgia de Kasai (B), com achados histopatológicos típicos da AVB, ilustrando o aspecto histológico da malformação da placa ductal (ductos primitivos alongados dispostos em forma de ferradura em torno de ramo arterial) e da reação ductular (ductos neoformados imaturos dispostos nas margens do espaço-porta). Também observamos aumento importante da área ocupada pelos espaços-porta e pelos septos fibrosos, sendo as regiões de fibrose hepática realçadas pela coloração com picrossírius.

4.3. Avaliação morfológica e morfometria da fibrose hepática

Pelo método de coloração pelo picrossírius, que possibilita destacar o acúmulo de fibras colágenas e matriz conjuntiva nas áreas de fibrose hepática, foi observada intensa marcação com tonalidades púrpuras nos espaços-porta e nas regiões periportais, acompanhada da expansão desses compartimentos em relação ao compartimento parenquimatoso. Também foram observadas projeções de fibrose no parênquima, em direção às regiões centrolobulares e formação de septos fibrosos unindo espaços-porta e delimitando nódulos cirróticos.

Em nossa casuística, 71% (22/31) dos pacientes apresentaram fibrose avançada ou cirrose (escores 3 ou 4) no momento da realização da cirurgia de Kasai (Figura 5). Mesmo entre os pacientes operados precocemente (com até oito semanas de vida), 50% dos casos já apresentavam fibrose avançada nas biópsias hepáticas INICIAIS.

Figura 4 – Microfotografias de tecido hepático de mesmo paciente com AVB, em aumento óptico de 40 vezes, coloração pelo picossírius. Material de biópsia percutânea pré-operatória (A) e biópsia intraoperatória realizada durante a cirurgia de Kasai (B). Em destaque, expansão do espaço-porta com fibrose portal e formação de septos (marcados em vermelho pelo picossírius), malformação de placa ductal (setas) e reação ductular (cabeças de seta) muito intensas.

A análise de biópsias INICIAIS consecutivas do mesmo paciente não demonstrou variação do grau de fibrose hepática em 82% dos casos. Em contrapartida, a comparação entre os escores de fibrose das biópsias da cirurgia de Kasai e os escores de fibrose das biópsias do explante hepático (Tabela 3) confirmou a progressão da fibrose hepática como característica evolutiva da doença no longo prazo ($p < 0,001$).

Tabela 3 – Distribuição dos escores de fibrose observados nas biópsias hepáticas obtidas na cirurgia de hepatoportoenterostomia (KASAI) e no explante hepático (Tx). (* $p < 0,001$)

			Biópsias		Total (n)
			KASAI	Tx	
Escore fibrose	2	Casos (n)	9	0	9
		%	29,0	0	
	3	Casos (n)	11	0	11
		%	35,5	0	
	4	Casos (n)	11	36	47
		%	35,5	100	
Total	Casos (n)		31	36	67
	%		100	100	

Quanto à relação entre grau de fibrose hepática avaliado nas biópsias iniciais e o tempo de evolução até realização do Tx, os resultados sugerem não haver influência determinante. Dos 11 pacientes que apresentavam fibrose hepática leve ou moderada (escores 1 ou 2) nas biópsias INICIAIS (Figura 6), sete tiveram evolução desfavorável da hepatopatia e foram submetidos a transplante hepático antes de dois anos de idade. E entre as crianças submetidas a Tx com mais de quatro anos de idade (subgrupo com a evolução mais favorável da casuística), todas já apresentavam fibrose avançada ou cirrose em suas biópsias INICIAIS.

Figura 5 – Microfotografia de material de biópsia hepática em cunha realizada durante cirurgia de Kasai, coloração pelo picrossírius, aumento óptico de 40 vezes. Observar fibrose avançada na fase cirrótica (escore 4), septos fibrosos delimitando nódulos isolados de parênquima (cabeça de seta) e grande expansão da área dos espaços-porta (setas).

Este paciente foi submetido a Tx com 33 meses de vida (grupo Tx tardio).

Figura 6 – Microfotografia de material de biópsia hepática por punção realizada para diagnóstico da AVB, coloração pelo picrossírius, aumento óptico de 40 vezes. Observar fibrose leve restrita às regiões portal e periportal (setas), com arquitetura do parênquima preservada (escore 1).

Este paciente foi submetido a Tx com 16 meses de vida (grupo Tx precoce).

A Tabela 4 ilustra a distribuição dos escores de fibrose hepática observados nas biópsias realizadas durante as cirurgias de Kasai. A análise estatística da distribuição dos escores de fibrose entre os grupos de Tx precoce e tardio também não identificou diferença significativa ($p = 0,43$).

Tabela 4 – Distribuição dos escores de fibrose hepática nas biópsias realizadas durante as cirurgias de Kasai, em relação aos grupos definidos pelo tempo de evolução até Tx. ($p = 0,43$)

			Tempo evolução até Tx		Total
			Tx $\leq$ 2anos	Tx > 2anos	
Escore de fibrose nas biópsias KASAI	2	Casos (n)	5	4	9
		%	38,5	22,2	29,0
	3	Casos (n)	5	6	11
		%	38,5	33,3	35,5
	4	Casos (n)	3	8	11
		%	23,0	44,5	35,5
Total		Casos (n)	13	18	31
		%	100,0	100,0	100,0

Se por um lado, os dados sumarizados na Figura 7 demonstram a ausência de correlação entre idade de realização da cirurgia de Kasai e grau de fibrose hepática caracterizado nas respectivas biópsias intraoperatórias, por outro lado, na análise quantitativa da fibrose hepática por histomorfometria (Figura 8), as porcentagens de área marcada pelo picrossírius nas biópsias INICIAIS apresentaram correlação positiva com a idade de realização da cirurgia de Kasai ($p = 0,01$) (Figura 8A), mas não com a idade de realização do Tx ($p = 0,24$) (Figura 8B).

Figura 7 – Diagrama de dispersão e coeficiente de regressão linear entre a idade de realização da cirurgia de Kasai e o grau de fibrose hepática na biópsia obtida durante a cirurgia. ($r = 0,19$; $p = 0,31$)

Comparando as médias das porcentagens de área marcada pelo picrossírius nas biópsias INICIAIS entre os grupos definidos pelo tempo de evolução até Tx (Tabela 5), também não foi demonstrada diferença significativa ($p = 0,68$). Os dados completos e individualizados relativos à morfometria da fibrose hepática marcada pelo picrossírius encontram-se compilados no Anexo D.

Tabela 5 – Médias da área de fibrose hepática marcada pelo picrossírius nas biópsias INICIAIS, comparando os grupos definidos pelo tempo de evolução até Tx. ($p = 0,68$)

Tempo de evolução até Tx	Número de pacientes	Área de marcação picrossírius (% média +/- DP)
Tx precoce (≤ 2 anos)	17	18,79 +/- 8,2%
Tx tardio (> 2 anos)	18	19,83 +/- 6,6%

Figura 8 – Diagramas de dispersão e coeficientes de regressão linear demonstrando correlação positiva ($r = 0,41$; $p = 0,01$) entre a idade de realização da cirurgia de Kasai e a área de fibrose marcada pelo picrossírius nas biópsias INICIAIS (A) e ausência de correlação ($r = 0,07$; $p = 0,24$) entre a idade de realização do Kasai e o tempo de evolução até Tx (B).

4.4. Avaliação morfológica da deposição dos colágenos I, III, IV e V

A descrição dos padrões de distribuição dos quatro tipos de colágeno estudados e de suas relações com as principais estruturas morfológicas foi baseada em avaliação

semiquantitativa das biópsias hepáticas INICIAIS e FINAIS. Os escores de imunomarcção compartimental dos colágenos I, III, IV e V estão resumidos na Tabela 6, apresentando os escores predominantes para cada tipo de colágeno em cada compartimento. Os dados completos e individualizados relativos aos escores de imunomarcção compartimental dos diferentes tipos de colágeno estudados foram reunidos nos Anexos F, G, H e I.

A análise estatística dessas variáveis em relação aos grupos de Tx precoce e tardio não demonstrou diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos tipos de colágeno avaliados.

Tabela 6 – Escores predominantes de imunomarcção (com respectiva frequência relativa nas biópsias) dos colágenos tipos I, III, IV e V, nos diferentes compartimentos hepáticos, em biópsias INICIAIS e FINAIS de pacientes com AVB operada.

Avaliação de escores nos compartimentos hepáticos					
	Intersticial portal	Perivascular portal	Periductal portal	Reação ductular portal	Sinusoidal parênquima
Colágeno I					
<i>INICIAL</i>	2 (100%)	1 (88%)	1 (82%)	1 (82%)	2 (52%)
<i>FINAL</i>	2 (100%)	1 (94%)	1 (88%)	1 (88%)	2 (58%)
Colágeno III					
<i>INICIAL</i>	2 (97%)	1 (100%)	1 (97%)	2 (100%)	1 (48%)
<i>FINAL</i>	2 (91%)	1 (100%)	1 (100%)	2 (100%)	1 (77%)
Colágeno IV					
<i>INICIAL</i>	0 (86%)	1 (69%)	2 (66%)	1 (90%)	1 (76%)
<i>FINAL</i>	0 (88%)	1 (50%)	2 (76%)	1 (59%)	1 (65%)
Colágeno V					
<i>INICIAL</i>	2 (60%)	1 (100%)	1 (51%)	1 (97%)	2 (51%)
<i>FINAL</i>	1 (64%)	1 (97%)	1 (61%)	1 (76%)	1 (70%)

Escores da marcação por imunofluorescência:
ausente = 0, discreto/moderado = 1, intenso/realçado = 2

O padrão de distribuição compartimental do colágeno tipo V caracterizou-se por imunomarcção intensa no interstício dos espaços-porta e septos, sem realce perivascular ou periductal. A imunomarcção do colágeno tipo V foi especialmente destacada no compartimento perissinusoidal, sendo mais expressiva nas biópsias INICIAIS em comparação às biópsias FINAIS. As figuras 9 e 10 ilustram o padrão de deposição do colágeno tipo V em biópsias INICIAIS.

A imunomarcção para colágeno tipo IV apresentou-se mais intensa nas margens dos espaços-porta, nas regiões periductal e perirreação ductular, enquanto que nas regiões intersticiais dos espaços-porta e septos a imunomarcção foi mínima ou ausente. Esse padrão de realce periférico foi mais expressivo em biópsias com fibrose avançada, independentemente da fase evolutiva. No compartimento perissinusoidal, o colágeno tipo IV teve imunomarcção não destacada, delimitando as membranas basais. As figuras 11 e 12 ilustram o padrão de deposição do colágeno tipo IV em biópsias INICIAIS.

No compartimento portal, os colágenos tipo I e tipo III apresentaram padrão semelhante ao observado para o colágeno tipo V e oposto ao colágeno tipo IV, com intensa imunomarcção intersticial, sem realce perivascular e periductal. Apenas para o colágeno tipo III, observou-se realce da imunomarcção em torno das regiões de reação ductular. No compartimento perissinusoidal, a deposição dos colágenos tipos I e III foi mais heterogênea, variando de discreta a intensa nos diferentes pacientes. As figuras 13 e 14 ilustram a distribuição compartimental do colágeno tipo I e as figuras 15 e 16 ilustram o descrito em relação ao colágeno tipo III, sempre em biópsias INICIAIS.

Figuras 9 e 10 – Microfotografias de imunofluorescência para colágeno tipo V em biópsias INICIAIS (aumento óptico de 200 vezes). Observar a intensa imunomarcagem nas regiões perissinusoidais e no subcompartimento intersticial dos espaços-porta e septos.

Figuras 11 e 12 – Microfotografias de imunofluorescência para colágeno tipo IV em biópsias INICIAIS (aumento óptico de 200 vezes). Observar imunomarcção restrita às margens dos espaços-porta e em torno dos vasos portais, ductos biliares e sinusoides hepáticos, com mínima imunomarcção intersticial.

Figuras 13 e 14 – Microfotografias de imunofluorescência para colágeno tipo I em biópsias INICIAIS (aumento óptico de 200 vezes). Observar imunomarcagem intensa no interstício dos espaços-porta, sem realce periductular, e imunomarcagem perissinusoidal variável entre biópsias de diferentes pacientes.

Figuras 15 e 16 – Microfotografias de imunofluorescência para colágeno tipo III em biópsias INICIAIS (aumento óptico de 200 vezes). Observar imunomarcção intersticial intensa, com realce acompanhando regiões de reação ductular, e imunomarcção perissinusoidal discreta.

4.5. Avaliação morfométrica da deposição dos colágenos I, III, IV e V

A quantificação da marcação por imunofluorescência dos colágenos dos tipos I, III, IV e V, estabelecida pelo método de histomorfometria por análise de imagens, encontra-se sumarizada na tabela 7, com os resultados das médias das porcentagens de área imunomarcada no compartimento perissinusoidal, para cada tipo de colágeno, nas biópsias INICIAIS e FINAIS. Os dados completos e individualizados em relação à quantificação da imunofluorescência estão compilados no Anexo J.

Tabela 7 – Porcentagens de área imunomarcada para colágenos tipos I, III, IV e V, expressas como médias e desvios-padrão em relação às áreas totais delimitadas, comparando as biópsias INICIAIS e FINAIS de pacientes com AVB operada.

	% área marcada (média +/- DP)	Número de casos avaliados
Col. I Biópsia INICIAL	2,07 +/- 1,8 *	31
Biópsia FINAL	4,42 +/- 3,0 *	31
Col. III Biópsia INICIAL	4,69 +/- 2,4 *	21
Biópsia FINAL	3,01 +/- 1,5 *	21
Col. IV Biópsia INICIAL	5,32 +/- 1,7 *	25
Biópsia FINAL	7,62 +/- 2,0 *	25
Col. V Biópsia INICIAL	9,41 +/- 4,4 *	22
Biópsia FINAL	6,54 +/- 2,9 *	22

*p < 0,01 para todos os pares da comparação.

No comparativo entre as biópsias INICIAIS e FINAIS dos pacientes com AVB operada, observaram-se diferenças significativas para todos os colágenos estudados (teste t pareado para diferença entre as médias, $p < 0,01$). Para os colágenos tipos V e III, as médias das porcentagens de área perissinusoidal imunomarcada foram significativamente maiores nas biópsias INICIAIS em relação às biópsias FINAIS (Figura 17), enquanto para os colágenos tipos I e IV as médias foram maiores nas

biópsias FINAIS (Figura 18). O painel representado na figura 19 ilustra a imunomarcção nos compartimentos portal e perissinusoidal em biópsias INICIAIS e FINAIS, com os dados quantitativos referentes à morfometria das regiões perissinusoidais.

Figura 17 – Comparação entre médias das porcentagens de área perissinusoidal imunomarcada para colágenos tipos V e III nas biópsias INICIAIS e FINAIS, com respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%), demonstrando redução significativa. ($p = 0,006$ e $p = 0,004$, respectivamente)

Figura 18 – Comparação entre médias das porcentagens de área perissinusoidal imunomarcada para colágenos tipos I e IV nas biópsias INICIAIS e FINAIS, com respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%), demonstrando aumento significativo. ($p = 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente)

Figura 19 – Imunofluorescência qualitativa e quantitativa. Microfotografias de cortes histológicos sob aumento óptico de 200 vezes, ilustrando os padrões de imunomarcagem dos colágenos tipo I (A,B), tipo IV (D,E) e tipo V (G,H), nos espaços-porta (PT) e nas regiões perissinusoidais (Si), em biópsias hepáticas iniciais (A,D,G) e finais (B,E,H) de pacientes com AVB operada. Gráficos com resultados de morfometria da área imunomarcada nas regiões perissinusoidais (médias e IC 95%) e comparação entre biópsias iniciais e finais (C,F,I). Colágenos dos tipos I (C) e IV (F) apresentaram progressão da deposição, enquanto o colágeno tipo V (I) apresentou intensa deposição inicial e remodelação tardia.

Em testes estatísticos para avaliar a imunomarcagem perissinusoidal de cada um dos tipos de colágeno como fatores associados ao prognóstico da AVB, não foram observadas diferenças significativas das porcentagens de área imunomarcada nas biópsias INICIAIS entre os grupos definidos pelo tempo de evolução até Tx (Tx precoce e tardio), conforme apresentado na Tabela 8. Foram identificadas diferenças estatisticamente significativas apenas na quantificação perissinusoidal dos colágenos tipos I e IV nas biópsias FINAIS, com maiores médias de imunomarcagem no grupo

de Tx tardio (pacientes com maior tempo de evolução até realização do transplante), refletindo o padrão evolutivo da deposição desses tipos de colágeno na AVB.

Tabela 8 – Médias e desvios-padrão das porcentagens de área marcada por imunofluorescência para colágenos tipos I, III, IV e V, no compartimento perissinusal das biópsias INICIAIS e FINAIS dos pacientes com AVB operada, agrupados de acordo com o tempo de evolução até Tx.

Tipo de colágeno e fase da biópsia	Tempo de evolução até Tx	N	% área imunomarcada (média +/- DP)
Col. I biópsia INICIAL	Tx ≤ 2anos	17	2,23 +/- 1,7
	Tx > 2anos	16	1,75 +/- 1,8
Col. III biópsia INICIAL	Tx ≤ 2anos	11	3,83 +/- 1,7
	Tx > 2anos	16	4,63 +/- 2,7
Col. IV biópsia INICIAL	Tx ≤ 2anos	13	5,00 +/- 1,6
	Tx > 2anos	14	5,57 +/- 1,7
Col. V biópsia INICIAL	Tx ≤ 2anos	13	8,14 +/- 5,4
	Tx > 2anos	15	9,28 +/- 2,9
Col. I biópsia FINAL	Tx ≤ 2anos	17	2,14 +/- 1,2 *
	Tx > 2anos	14	7,19 +/- 2,0 *
Col. III biópsia FINAL	Tx ≤ 2anos	12	2,85 +/- 1,4
	Tx > 2anos	15	2,99 +/- 1,4
Col. IV biópsia FINAL	Tx ≤ 2anos	15	6,69 +/- 1,6 #
	Tx > 2anos	17	8,26 +/- 2,0 #
Col. V biópsia FINAL	Tx ≤ 2anos	11	5,52 +/- 2,2
	Tx > 2anos	18	6,51 +/- 3,7

* p<0,001 # p=0,02

Por fim, foram elaboradas curvas de tempo de evolução cumulativo até Tx nos primeiros dois anos de idade, comparando os grupos formados pelos pacientes com porcentagens de área imunomarcada abaixo ou acima da mediana da série (grupos

%Col. baixa ou alta), para cada tipo específico de colágeno, quantificadas por histomorfometria nas biópsias INICIAIS dos pacientes com AVB operada. A análise estatística das curvas de Kaplan-Meier, elaboradas para todos os tipos de colágeno estudados, demonstrou diferença significativa apenas para a imunomarcagem da deposição do colágeno tipo I ($p = 0,04$, teste de Breslow). Conforme ilustrado na Figura 20, o grupo constituído pelos pacientes com maiores porcentagens de área perissinusoidal imunomarcada para colágeno tipo I nas biópsias INICIAIS apresentou curva de tempo de evolução cumulativo até Tx com decaimento mais acelerado, indicando prognóstico desfavorável em comparação ao grupo com menor deposição inicial de colágeno tipo I.

Figura 20 – Curvas cumulativas de tempo de evolução até Tx nos primeiros dois anos, comparando os grupos com porcentagens de área de imunomarcagem para colágeno tipo I abaixo da mediana (grupo % Col. I baixa) e acima da mediana (grupo % Col. I alta), em biópsias INICIAIS de pacientes com AVB operada.

5. DISCUSSÃO

Sendo a atresia de vias biliares a principal indicação de transplante hepático pediátrico, identificar fatores prognósticos da AVB associados à necessidade mais precoce de Tx possibilitaria melhor programação do acompanhamento clínico nos serviços de transplante e aconselhamento familiar mais adequado, individualizando condutas e poupando vidas perdidas nas filas de espera por doadores de órgãos. Se estes fatores pudessem ser identificados nas biópsias hepáticas iniciais dos pacientes com AVB, realizadas rotineiramente no pré-operatório ou durante a cirurgia de Kasai, esses dados prognósticos seriam prontamente acessíveis.

Com esse intuito, os critérios de seleção da nossa casuística, definidos a partir de eventos facilmente identificáveis (biópsias hepáticas representando momentos distintos da evolução da AVB, desfecho clínico definido pelo transplante hepático, seguimento completo de todos pacientes numa mesma instituição, eventos cirúrgicos padronizados independentemente de intercorrências), procuraram estabelecer uma linha de análise focada em aspectos histopatológicos pré-definidos e suas inter-relações com o prognóstico da AVB após a cirurgia de Kasai, favorecendo conclusões que pudessem ser generalizadas, a despeito do labirinto de particularidades e múltiplos detalhes clínicos e cirúrgicos da doença.

A partir da suspeita clínica de AVB baseada em sinais e sintomas sugestivos (icterícia colestática, acolia fecal prolongada, hepatomegalia com fígado endurecido), a investigação diagnóstica prosseguiu com exames laboratoriais e biópsia hepática ou indicação cirúrgica diretamente. Na maioria dos casos foi realizada biópsia hepática percutânea por agulha de “*Tru-cut*”, com intuito de definir diagnósticos anatomopatológicos diferenciais antes da indicação de exploração cirúrgica. Podemos citar como diagnósticos diferenciais⁶ mais importantes e frequentes as hepatites

neonatais (decorrentes de infecção congênita ou perinatal por citomegalovirus, toxoplasmose, sífilis, hepatite B, herpes, entre outras), os erros inatos de metabolismo (deficiência de alfa1-antitripsina, tirosinemia, galactosemia e mucoviscidose, como os mais frequentes), as síndromes ductopênicas (como a síndrome de Alagille), e a colestase associada à utilização prolongada de nutrição parenteral total e à sepse neonatal.

Todos os pacientes da nossa casuística tiveram o diagnóstico anatomopatológico sugestivo de AVB confirmado através de exploração cirúrgica, sendo consecutivamente submetidos à cirurgia de hepatoportoenterostomia pela técnica descrita originalmente por Kasai²³. Em todos os casos analisados, a via de acesso cirúrgico foi através de laparotomia subcostal bilateral, sendo também rotineiramente realizada nesse momento uma biópsia hepática em cunha, com objetivo de complementar o diagnóstico histopatológico mesmo em pacientes submetidos previamente a biópsia por punção percutânea. A partir da identificação dos achados cirúrgicos característicos de AVB (fígado com tamanho aumentado e consistência endurecida, vesícula biliar atrésica ou com luz preenchida por mínima quantidade de muco hialino, resquícios atrésicos e fibrosados das vias biliares extra-hepáticas), seguiu-se dissecação ampla do hilo hepático e ressecção dos resquícios biliares e da fibrose presentes no *porta hepatis*, região anatômica de convergência das vias biliares intra-hepáticas localizada entre a emergência dos ramos vasculares arteriais e portais no hilo hepático. Finalmente, foi realizada derivação biliodigestiva, com anastomose de alça jejunal em Y de Roux longo na região do *porta hepatis*. Em casos duvidosos, foi realizada colangiografia intra-operatória para confirmação da obstrução biliar proximal antes de iniciar a ressecção das estruturas biliares⁶.

Os pacientes foram acompanhados no estudo por período de tempo variável, iniciado pouco antes da realização da primeira biópsia (para diagnóstico diferencial da AVB ou durante cirurgia de Kasai) e encerrado com a realização do transplante hepático. Deste modo, pacientes transplantados com AVB não-operada ou operada em outro Serviço, pacientes submetidos a cirurgia de Kasai e que evoluíram a óbito antes de terem sido submetidos ao Tx ou que permaneceram vivos sem Tx no período avaliado não foram incluídos no presente estudo.

Foram estudados 36 pacientes com as biópsias iniciais e tardias adequadamente disponíveis, abrangendo casos admitidos com diagnóstico de AVB e submetidos a transplante hepático entre 1994 e 2008. Outros casos de AVB operados no período e submetidos a transplante hepático após 2008 poderão ser ainda incluídos na casuística de estudos complementares nesta linha de pesquisa.

O principal motivo para exclusão de potenciais participantes inicialmente selecionados foi devido à inexistência, insuficiência ou inadequação do material histológico arquivado no Serviço de Anatomia Patológica do HCFMUSP. Tendo em vista que essa indisponibilidade de material estocado não está relacionada a nenhum outro aspecto clínico ou cirúrgico dos próprios pacientes com AVB, e não identificando nenhum outro viés de seleção, podemos sugerir que as distribuições das idades de realização da cirurgia de Kasai e do transplante hepático em nossa casuística correspondem ao observado na prática clínica de serviços terciários de referência em Cirurgia Pediátrica em nosso meio.

Dadas as reconhecidas dificuldades estruturais dos serviços de saúde para estabelecer diagnósticos precoces e encaminhamentos rápidos para tratamento dos pacientes com AVB, cerca de 50% dos pacientes foram submetidos ao tratamento

cirúrgico com idade superior a 12 semanas de vida. Autores como Kasai²³, Tan¹⁰¹ e Howard¹⁰² sugeriram que a idade ideal da cirurgia seria a de até 8 semanas, enquanto outros como Miyano¹⁰³ não identificaram diferença significativa na evolução em função da idade de realização da cirurgia.

Em nossa casuística, o achado predominante de fibrose hepática avançada ou cirrose nas biópsias realizadas no momento da cirurgia de Kasai reflete essa dificuldade para realização de tratamento precoce. Porém, também está relacionado à história natural e evolução habitual da AVB²², que apresenta rápida progressão da fibrose hepática mesmo em pacientes nos quais o diagnóstico e tratamento foram estabelecidos prontamente, conforme observado em nosso estudo. Além disso, os resultados apresentados, ao não corroborarem com a noção simplista de que a cirurgia de Kasai realizada precocemente implica mínima fibrose e bom prognóstico, encorajam a indicação da derivação biliar mesmo em pacientes com mais de 12 semanas de idade e/ou naqueles com biópsias hepáticas iniciais apresentando fibrose avançada, visto que nem a idade nem o grau de fibrose no momento da cirurgia de Kasai foram correlacionados ao tempo de evolução até Tx, o parâmetro de prognóstico da AVB utilizado em nosso estudo. Isso contraria de certa forma autores como Balistreri¹⁰⁴, Grosfeld¹⁰⁵ e Altman¹⁰⁶, que sugerem associação entre presença de cirrose na biópsia inicial e prognóstico desfavorável, mas que analisaram principalmente o sucesso inicial da drenagem biliar e não propriamente a sobrevida. E concorda com Pape¹⁰⁰, Maksoud¹⁰⁷, Carceller¹⁰⁸ e Schoen¹⁰⁹, que também não encontraram essa associação prognóstica.

Analisando as idades de realização do Tx como desfecho clínico final para os pacientes com AVB, observamos ampla variação entre os extremos de idade (cerca de

10 anos), além de assimetria na distribuição das idades em nossa casuística, o que pode ser evidenciado pela média (33 meses) e mediana (27 meses) discordantes e pelo grande desvio padrão (24 meses). Associando o fato de que a realização do transplante hepático depende de inúmeros fatores, da indicação oportuna à disponibilidade de doadores no momento adequado, essa distribuição de idades decorre e demonstra a grande variação na evolução clínica dos pacientes com AVB operada. Reforça também a importância de tentar identificar desde o início da doença fatores preditivos de pior prognóstico, a fim de priorizar a realização do transplante e minimizar a mortalidade nas listas de espera pelo procedimento.

Em função da significativa mortalidade em lista de espera para Tx, associada às dificuldades na obtenção imediata de órgãos adequados ao transplante, tanto no período de alocação de doadores com base no critério de antiguidade na lista única de receptores (vigente durante a maior parte do período analisado, ou seja, até maio de 2006), quanto a partir da alocação por critérios de gravidade, assumimos a premissa empírica de que quanto menor tivesse sido o tempo de evolução até realização de Tx, mais desfavorável teria sido a evolução clínica dos pacientes com AVB operada.

Com base nos conceitos descritos acima, utilizamos o tempo de evolução até Tx como marcador de evolução clínica favorável ou desfavorável. A realização do transplante hepático após dois anos de idade foi assumida como indicativo de prognóstico favorável (definindo os grupos Tx tardio e Tx precoce) e utilizada para testar os fatores prognósticos investigados. Essa definição não foi arbitrária, mas estabelecida a partir do cálculo da mediana na própria casuística (de 27 meses), permitindo estabelecer dois grupos de comparação com quantidade semelhante de casos.

Na investigação das síndromes colestáticas neonatais para estabelecer os diagnósticos diferenciais da AVB, a avaliação anatomopatológica das biópsias hepáticas tem papel central, evitando explorações cirúrgicas indiscriminadas e desnecessárias. Os achados mais significativos e precocemente observados nas biópsias de pacientes com AVB estão relacionados à fibrose hepática e às alterações dos ductos biliares¹¹⁰. Assim, foram esses os parâmetros analisados, tanto com relação a modificações entre as fases inicial e final da hepatopatia quanto à correlação entre os achados histológicos iniciais e o prognóstico pós-operatório da AVB.

Os dados obtidos na avaliação morfológica semiquantitativa, comparando as biópsias iniciais e finais, apontaram tendência de progressão da fibrose hepática (com alteração da arquitetura lobular e acúmulo de tecido fibroconjuntivo nos espaços portais e no parênquima) e modificação do padrão das alterações biliares avaliadas (com diminuição dos escores de intensidade da proliferação ductular e da malformação de placa ductal acompanhada de ocorrência mais frequente de ductopenia). Essas alterações histopatológicas poderiam estar associadas à desestruturação das unidades funcionais do fígado e às manifestações clínicas de insuficiência hepatocelular e hipertensão venosa portal, determinantes na indicação de Tx em pacientes com AVB. Entretanto não foram encontradas correlações desses parâmetros com o tempo de evolução até Tx, nem tão pouco com a idade de realização da cirurgia de Kasai. Em concordância com o observado por Santos¹¹¹ e em oposição a Desmet¹¹, nossos resultados sugerem que alterações histológicas biliares e fibrose hepática evoluam em longo prazo como parte da progressão própria da doença e que as variações morfológicas nas biópsias iniciais sejam pouco relevantes para determinar o prognóstico dos pacientes com AVB operada.

O método de coloração pelo picrossírius, com marcação não-específica de fibras colágenas e de outros componentes da matriz extracelular presentes na fibrose hepática, possibilitou nítida distinção entre tecido normal e regiões com fibrose significativa, sendo utilizado para avaliação morfológica e para histomorfometria. Em nosso estudo, uma gama de tonalidades de coloração pelo picrossírius foi observada em diferentes biópsias e essa variação foi adequadamente incluída na padronização do espectro colorimétrico para correta morfometria. Isso em parte pode estar relacionado à utilização para análise de material histológico antigo estocado, com longo período de armazenamento e intervalo entre fixação e processamento inicial desconhecido e variável.

Na avaliação quantitativa das áreas de fibrose hepática, foram selecionados campos sob magnificação óptica menor (40 vezes), a fim de permitir uma visão panorâmica das biópsias e propiciar homogeneização dos campos analisados, com objetivo de diluir a influência que septos espessados e espaços-porta alargados causariam no cálculo da porcentagem de área de fibrose hepática marcada pelo picrossírius, caso fossem visualizados em maiores aumentos ópticos. Também foram excluídas dos campos analisados todas as regiões de fibrose subcapsular (área de fibrose normal, excessivamente representada nas biópsias em cunha), pois poderiam distorcer a quantificação da fibrose hepática estritamente relacionada à doença colestática.

Os resultados obtidos a partir da análise dos dados semiquantitativos e da histomorfometria digital são consistentes com o conceito de que o quadro de insuficiência hepática não decorre apenas da quantidade total de fibrose hepática acumulada progressivamente, mas também do processo de remodelação e rearranjo

das áreas de fibrose e de parênquima funcional. Essa dinâmica não poderá ser adequadamente explicada por uma relação linear entre o tempo de evolução da doença, a quantidade de tecido fibroso acumulado nesse período e as manifestações clínicas da hepatopatia terminal, ou seja, entre a fibrose hepática inicial e o prognóstico esperado para os pacientes com AVB operada.

O passo seguinte na investigação da evolução da fibrose hepática na AVB foi estudar os padrões de distribuição compartimental dos principais tipos de colágeno encontrados no fígado durante a progressão da fibrose e buscar correlacionar esses padrões com o prognóstico da doença, o que constitui estudo inédito na literatura. Levando em conta que nem a avaliação histológica habitual nem a quantificação da fibrose total se apresentaram como fatores prognósticos fidedignos para compreender a evolução pós-operatória da AVB, mas reconhecendo que a fibrose hepática progressiva constitui o achado histopatológico mais proeminente e recorrente nas hepatopatias crônicas em geral e na AVB em particular, procuramos avançar no estudo dos componentes mais importantes da fibrose, ou seja, os tipos de colágeno depositados nos diferentes compartimentos histológicos do fígado durante a evolução da AVB até a fase terminal da doença.

Nessa tarefa enfrentamos dificuldades iniciais para padronização dos métodos de recuperação antigênica e marcação por imunofluorescência de tecidos hepáticos provenientes de biópsias armazenadas em blocos de parafina, as quais não tinham sido originalmente fixadas nem processadas para execução desses métodos. A adequada calibração do espectro de fluorescência correspondente à imunomarcação positiva foi padronizada a partir da variedade de biópsias disponíveis e da variabilidade da coloração de fundo, minimizando os problemas decorrentes da autofluorescência do

tecido hepático. Além disso, devido à evanescência inerente ao método de imunofluorescência indireta, foi necessária pronta avaliação das lâminas preparadas, com imediata seleção dos campos microscópicos e aquisição de imagens fotográficas, a fim de garantir a magnitude da reação para posterior análise e quantificação. Levando-se em conta que para cada caso havia duas ou três biópsias, com 5 a 10 campos selecionados para cada um dos quatro tipos de colágeno estudados, totalizamos cerca de 2500 imagens selecionadas, delimitadas e quantificadas para obtenção dos dados apresentados.

A avaliação da marcação por imunofluorescência dos diferentes tipos de colágeno foi realizada em campos com grande magnificação óptica (200 vezes), permitindo detalhamento da distribuição compartimental e melhor definição das regiões efetivamente marcadas. A histomorfometria digital para cálculo das porcentagens de área imunomarcada foi realizada exclusivamente no compartimento parenquimatoso (perissinusoidal). Essa decisão foi tomada em função de essa região histológica ser relativamente homogênea, constituída essencialmente por hepatócitos, capilares sinusoides e tecido conjuntivo de suas membranas basais, o que favoreceria maior consistência e reprodutibilidade dos resultados obtidos. E também porque é no compartimento parenquimatoso que se concentra o tecido hepático funcionalmente importante para o metabolismo do órgão, o que implicaria maior relevância clínica aos resultados obtidos.

Devido à heterogeneidade dos espaços-porta, com grande variabilidade de seus elementos biliares, vasculares, inflamatórios e conjuntivos em diferentes cortes histológicos, no compartimento portal optou-se pela avaliação semiquantitativa dos vários subcompartimentos (intersticial, perivascular, periductal, perirreação ductular),

a fim de obter resultados mais confiáveis. Também com essa finalidade, e contando com a participação integral de patologista experiente em hepatopatias pediátricas, foi elaborado escore simplificado, classificando a imunomarcagem em ausente (zero), leve/moderada e sem realce (1) ou intensa e realçada em relação aos elementos circundantes (2), a fim de reduzir ao mínimo a subjetividade da avaliação proposta. A análise sistemática dos escores atribuídos no conjunto dos casos avaliados forneceu suporte para a elaboração da descrição morfológica da distribuição compartimental de cada tipo de colágeno estudado, o que também não estava completamente disponível na literatura científica revisada.

O padrão de imunomarcagem do colágeno tipo IV caracterizou-se pela deposição mais intensa nas margens dos espaços-porta e em torno de elementos biliares, com mínima deposição no interstício portal e septal. Esse padrão de distribuição sugere que o processo de expansão dos espaços-porta, que é um achado característico nas biópsias hepáticas de pacientes com AVB, ocorra principalmente pela deposição e remodelação intersticial dos colágenos fibrilares dos tipos I, III e V, sendo que a deposição do colágeno tipo IV persiste essencialmente nas membranas basais epiteliais e endoteliais.

O padrão da imunomarcagem do colágeno tipo V, muito intensa no interstício dos espaços-porta e regiões perissinusoidais e mais proeminente em biópsias da fase inicial da AVB, sugere que a deposição de colágeno tipo V ocorre de forma precoce e rápida precisamente nos compartimentos onde o acúmulo da fibrose hepática é mais significativo, quantitativa e qualitativamente. Esse padrão de distribuição sugere ainda que o colágeno tipo V possa desempenhar papel relevante na estruturação e na progressão inicial da fibrose hepática em pacientes com AVB, com remodelamento

parcial na fase tardia da doença, concordando com os achados de Takai⁷⁸ e Vassiliadis⁸⁶ em modelos animais de fibrose hepática.

O padrão de imunomarcção do colágeno tipo I caracterizou-se por intensa deposição no subcompartimento intersticial dos espaços-porta e dos septos fibrosos, e menor deposição em torno dos elementos vasculares e biliares, apresentando assim padrão de distribuição oposto àquele descrito para o colágeno tipo IV. No compartimento perissinusoidal, a imunomarcção do colágeno tipo I foi bastante variada entre diferentes biópsias, sem padrão explicitamente reconhecido na avaliação morfológica. A intensa imunomarcção nos espaços-porta e septos, principais áreas de acúmulo de fibrose hepática na AVB, demonstra a importância do colágeno tipo I para a progressão da doença.

Por sua vez, o padrão de imunomarcção do colágeno tipo III, além com intensa deposição intersticial portal, acompanhando o padrão dos colágenos tipos I e V, demonstrou realce nas regiões de reação ductular, nas margens dos espaços-porta, coincidente com o padrão do colágeno tipo IV.

Os resultados quantitativos das porcentagens de área imunomarcada no compartimento perissinusoidal demonstraram diferenças significativas entre as biópsias iniciais e finais para os quatro tipos de colágeno avaliados, permitindo definir padrões bem estabelecidos de deposição e remodelamento para cada colágeno durante a progressão da fibrose hepática na AVB operada. Para os colágenos do tipo III e do tipo V, as médias maiores nas biópsias iniciais sugerem deposição precoce e remodelamento tardio, enquanto para os colágenos dos tipos I e IV observou-se deposição progressiva nas regiões perissinusoidais em paralelo ao avanço da fibrose hepática, com médias significativamente maiores na fase final da AVB. Esses achados

são coincidentes com o descrito por Zeitlin⁴⁸ em pacientes com hepatopatias colestáticas neonatais.

No que diz respeito a correlações com prognóstico, não foram demonstradas diferenças significativas nas médias de imunomarcção perissinusoidal em biópsias iniciais, quando comparados os grupos de prognóstico (Tx precoce e Tx tardio). As diferenças que foram observadas na comparação das biópsias finais (médias maiores de imunomarcção para colágeno tipo I e IV no grupo de Tx tardio) não podem ser associadas ao prognóstico, e possivelmente podem ser atribuídas ao maior tempo de evolução da doença até realização do Tx, que permitiu maior acúmulo dos tipos de colágeno com deposição progressiva demonstrada.

Entretanto, com outra abordagem, quando foram ordenadas as médias de imunomarcção nas biópsias iniciais e constituídos dois grupos segregados com base na quantificação abaixo ou acima da mediana da série (porcentagem de área imunomarcada baixa ou alta, para cada tipo de colágeno estudado), analisando as curvas de Kaplan-Meier para tempo de evolução cumulativo até a realização do Tx, foi possível definir que o grupo de pacientes com maior deposição perissinusoidal de colágeno tipo I nas biópsias iniciais apresentou curva evolutiva com descenso mais acentuado, portanto, com evolução mais rápida para Tx.

Isso sugere que a deposição precoce de maiores quantidades de colágeno tipo I no parênquima hepático, avaliada nas biópsias iniciais de pacientes com AVB, poderia prever prognóstico pós-operatório desfavorável e provável necessidade de transplante precoce. Conforme exposto no capítulo introdutório, o colágeno tipo I tem sido associado a estágios de fibrose cicatricial consolidada e demonstrou padrão de acumulação progressiva durante a evolução da fibrose hepática na AVB. Assim, a

deposição precoce de maiores quantidades de colágeno tipo I no parênquima hepático poderia desencadear prejuízo funcional mais acelerado, afetando o metabolismo hepatocelular e a troca de nutrientes e toxinas entre hepatócitos e circulação sinusoidal, propiciando morte celular, exacerbação do processo inflamatório, lesão tecidual progressiva e indução para formação de mais tecido fibroso, em um círculo vicioso de mais lesão hepatocelular e mais reparação cicatricial.

Nossos resultados vão ao encontro do conceito de que, embora a fibrose portal e periportal ocorram inexoravelmente nos pacientes com AVB ou outras hepatopatias colestáticas, como reação tecidual padronizada em resposta à obstrução biliar, a disfunção hepatocelular e a falência hepática dependem de lesão parenquimatosa extensa, com desorganização estrutural da circulação sinusoidal e perda de massa de hepatócitos metabolicamente ativos causando repercussão clínica importante.

A deposição precoce e acentuada de colágeno tipo I pode ser reconhecida como fator de pior prognóstico na AVB, sendo um possível marcador histológico associado à evolução mais rápida da disfunção hepática e à necessidade de realização de transplante hepático em mais curto prazo. Embora sejam necessários novos estudos para confirmar esse marcador histopatológico como fator prognóstico e para estabelecer um ponto de corte preciso na sua quantificação, a imunomarcagem do colágeno tipo I em biópsias iniciais de pacientes com AVB submetidos a tratamento cirúrgico poderia ser útil para orientar as expectativas dos familiares e da equipe multidisciplinar imediatamente após a cirurgia de Kasai.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, nos objetivos propostos, e considerando as limitações metodológicas da pesquisa, podemos concluir que:

1. As alterações histológicas biliares estudadas apresentam caráter evolutivo, mas não estão associadas ao prognóstico dos pacientes com AVB operada. Reação ductular e malformações de placa ductal são mais intensas nas biópsias de fase inicial e ductopenia é caracteristicamente observada na fase tardia da doença.

2. Durante a evolução da AVB ocorre progressão da fibrose hepática, tanto em curto como em longo prazo. Entretanto as avaliações semiquantitativa e quantitativa da fibrose hepática global nas biópsias iniciais não estão correlacionadas ao prognóstico, definido com base no tempo de evolução até realização de transplante hepático.

3. Os diferentes tipos de colágenos estudados apresentam padrões característicos de deposição compartimental na fibrose hepática da AVB operada. No compartimento portal predomina deposição de colágenos tipos I, III e V no interstício, de colágeno tipo IV nas regiões periductais e de colágeno tipo III nas regiões perirreação ductular. No compartimento parenquimatoso predomina deposição inicial de colágeno tipo V. Durante a progressão tardia da AVB operada ocorre remodelação da fibrose hepática no compartimento parenquimatoso, com diminuição dos colágenos tipos III e V e aumento dos colágenos tipos I e IV.

4. Pacientes com maior deposição perissinusoidal de colágeno tipo I nas biópsias iniciais apresentam evolução mais acelerada para transplante hepático nos primeiros dois anos de idade, sugerindo associação entre deposição precoce de colágeno tipo I no compartimento parenquimatoso hepático e pior prognóstico da AVB operada.

7. ANEXOS

Anexo A - Histomorfometria digital da marcação pelo picrossírius

Para análise quantitativa da área de fibrose hepática marcada pelo picrossírius foi utilizado método de histomorfometria por análise de imagens⁵⁶, com auxílio do sistema computacional Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Com microscópio óptico Nikon Eclipse 50i acoplado a câmera fotográfica digital Nikon Head DS-Fi 1 e sistema digitalizador de imagens Nikon NIS-Elements BR (Nikon Corporation, Tóquio, Japão), em campos sob aumento óptico de 40 vezes, incluindo espaços-porta (EP) e parênquima e excluindo regiões capsulares, foram determinadas as porcentagens de área marcada pelo picrossírius. Para isso foram selecionados espectros de tonalidade pré-determinados correspondentes à marcação positiva e calculada a razão entre a somatória de todas as áreas marcadas pelo picrossírius e a somatória da área total dos campos delimitados em cada biópsia analisada.

Anexo B - Método de imunofluorescência indireta para colágenos

Pela técnica de imunofluorescência indireta⁵¹ foram realizadas avaliação morfológica e quantificação dos colágenos tipos I, III, IV e V. Para cada colágeno estudado, cortes do material das biópsias hepáticas com 4 a 5 micrometros de espessura, foram aderidos a lâminas contendo amino-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). As lâminas foram imersas em xilol quente, por 20 minutos, submetidas a dois banhos de xilol frio e os cortes hidratados com sucessivas lavagens com álcool etílico, em concentrações decrescentes (100%-75%), água destilada e tampão fosfato de sódio (PBS). Para a exposição e recuperação de sítios antigênicos, após desparafinização, os cortes foram submetidos à digestão enzimática com pepsina de porco 10,000 U/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) dissolvida em 1 mM de ácido acético por 30 min a 37°C. Para bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foram utilizadas soluções de peróxido de hidrogênio a 3%, Avidina e Biotina (Dako, Carpinteria, CA, EUA) e finalmente, leite desnatado a 5% em PBS. Após bloqueio, as lâminas foram incubadas por uma noite, à temperatura de 4°C, com imunoglobulina IgG policlonal de coelho (Rockland Inc., Gilbertsville, PA, EUA) anti-colágeno tipo I (1:30), IgG policlonal de coelho (LIM17 FMUSP, São Paulo, Brasil) anti-colágeno tipo V (1:50), IgG monoclonal de camundongo (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) anti-colágeno tipo III (1:100) ou IgG monoclonal de camundongo (Sigma

Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) anti-colágeno tipo IV (1:100) diluídos em PBS. Os cortes foram lavados com PBS com Tween₂₀ 0,05% e incubados por 60 minutos, à temperatura ambiente, com o anticorpo de cabra conjugado com fluorocromo, Alexa Fluor 488 – fluorescência verde (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), anti-IgG de coelho ou camundongo, de acordo com o anticorpo primário utilizado, diluídos 1:200 em PBS contendo azul de Evans 0,006%. Finalmente, as lâminas foram lavadas com PBS e montadas com solução de glicerina tamponada. Como controles negativos da reação, foram utilizadas lâminas com material hepático, incubadas somente com o anticorpo secundário e com soro normal isotópico para cada anticorpo específico utilizado.

Para microscopia confocal, após lavagem com PBS/Tween₂₀ 0,05%, os cortes foram incubados por 180 minutos, à temperatura ambiente, com o anticorpo de cabra conjugado com fluorocromo (Alexa Fluor 488) anti-IgG de coelho ou camundongo (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), diluídos 1:400 em PBS e 1 µg/ml de DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) para evidenciar o núcleo celular. Para dupla marcação foi utilizado conjuntamente o fluorocromo Alexa Fluor 633 (fluorescência vermelha). Para avaliação morfológica da distribuição compartimental dos colágenos foi utilizado microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta / UV (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemanha).

Anexo C - Histomorfometria digital da marcação por imunofluorescência

Para análise quantitativa da marcação por imunofluorescência específica para cada tipo de colágeno estudado, foi utilizado método de histomorfometria por análise de imagens⁵⁶, com auxílio do sistema computacional Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Com microscópio de fluorescência Olympus-BX51 acoplado a câmera fotográfica digital Olympus Q-color5 (Olympus, Hamburgo, Alemanha), em campos sob aumento óptico de 200 vezes, incluindo somente compartimento parenquimatoso hepático, foram determinadas as porcentagens de área imunomarcada para cada tipo de colágeno estudado. Para isso foram selecionados os espectros de fluorescência pré-determinados correspondentes à imunomarcação positiva e calculada a razão entre a somatória de todas as áreas marcadas pela imunofluorescência e a somatória da área total dos campos delimitados em cada biópsia analisada.

Anexo D - Tabela com idade de cada paciente no momento das diferentes biópsias avaliadas e porcentagem de área de fibrose total (incluindo espaços-porta, septos e parênquima) marcada pelo picrossírius nas biópsias INICIAIS.

Caso	Idade de realização da biópsia diagnóstica (semanas)	Idade de realização do KASAI (semanas)	Idade de realização do Tx (meses)	Área fibrose marcada por picrossírius nas biópsias INICIAIS (%)
1		15	6	32,99
2	11	12	9	28,58
3	18	20	9	26,66
4	8	9	10	11,86
5		20	11	23,27
6		9	11	14,31
8		8	13	11,97
10	8	19	15	20,04
11		6	16	5,03
12	6	6	16	13,05
13	5	17	17	27,23
14	17	9	18	10,86
15	8	6	18	11,65
16	6	18	20	27,48
17		15	21	9,95
18		11	22	20,91
19	14	15	24	23,58
20	12	13	26	18,02
21		12	28	18,53
22		18	32	11,78
24	7	7	33	29,37
25	12	13	35	15,04
26		8	35	11,55
27	14	17	40	23,06
28	11	12	41	19,83
29	16	19	41	9,96
30	8	9	42	22,23
31		17	42	
34	8	9	47	14,72
36	10	10	49	12,86
37	18	20	58	26,06
38	7	13	59	16,67
39	13	15	64	31,40
40	11	12	75	23,59
41	10	10	82	29,31
42	13	15	120	23,00

Anexo E - Tabela com escores da avaliação histopatológica semiquantitativa das alterações biliares e fibrose hepática de cada paciente da casuística, nas biópsias diagnósticas pré-operatórias (A), biópsias realizadas durante cirurgia de Kasai (B) e biópsias dos explantes hepáticos (C).

Caso e Biópsia	Fibrose hepática	Reação ductular	Malformação placa ductal	Ductopenia
1 B	3	3	3	0
1 C	4	4	3	0
2 A	3	3	2	0
2 B	3	4	2	0
2 C	4	4	2	1
3 A	2	3	2	0
3 B	3	4	2	0
3 C	4	4	2	1
4 B	2	4	1	0
4 C	4	4	3	0
5 B	2	4	2	0
5 C	4	4	3	0
6 B	2	3	2	0
6 C	4	4	1	1
8 A	3	4	3	0
8 C	4	3	1	1
10 A	3	3	2	0
10 B	4	3	3	0
10 C	4	3	2	1
11 A	1	2	2	0
11 C	4	3	3	0
12 A	2	2	3	0
12 C	4	4	3	0
13 A	4	4	3	1
13 B	4	3	4	1
13 C	4	4	4	1
14 A	2	3	3	0
14 B	2	3	3	0
14 C	4	3	1	1
15 A	3	3	3	0
15 C	4	3	3	1
16 B	4	4	3	0
16 C	4	4	1	1
17 B	2	3	2	0
17 C	4	3	0	1
18 A	3	3	3	0
18 B	3	4	3	0
18 C	4	3	0	1
19 A	3	3	3	0
19 B	3	4	3	0
19 C	4	3	0	1
20 B	3	4	2	0
20 C	4	3	2	1
21 B	3	3	3	0
21 C	4	3	1	1

Caso e Biópsia	Fibrose hepática	Reação ductular	Malformação placa ductal	Ductopenia
22 A	2	3	1	0
22 B	2	4	3	0
22 C	4	3	1	1
24 A	4	4	3	0
24 B	4	4	3	0
24 C	4	2	0	1
25 A	3	3	2	0
25 B	3	4	3	0
25 C	4	2	0	1
26 B	2	2	0	1
26 C	4	2	0	1
27 A	3	3	3	0
27 B	4	3	4	0
27 C	4	3	1	1
28 A	2	3	2	0
28 B	2	3	2	0
28 C	4	3	3	1
29 A	3	3	3	0
29 C	4	1	3	1
30 A	4	3	3	0
30 B	4	3	3	0
30 C	4	3	2	1
31 B	2	3	3	0
31 C	4	3	0	1
34 A	3	4	2	0
34 B	3	4	3	0
34 C	4	3	0	1
36 A	3	4	2	0
36 B	3	4	2	0
36 C	4	3	0	0
37 A	4	3	4	0
37 B	4	4	4	0
37 C	4	2	0	1
38 B	4	4	2	0
38 C	4	2	0	1
39 A	4	4	3	0
39 B	4	4	4	0
39 C	4	3	3	0
40 A	3	4	1	0
40 B	3	4	2	0
40 C	4	3	2	0
41 B	4	4	4	0
41 C	4	3	2	1
42 B	4	4	3	0
42 C	4	3	0	1

Anexo F – Tabela com escores de imunomarcção do colágeno tipo V nos diferentes subcompartimentos hepáticos, em biópsias INICIAIS e FINAIS de pacientes com AVB operada.

Caso	Col. V INICIAL Intersticial	Col. V INICIAL Peri vascular	Col. V INICIAL Periductal	Col. V INICIAL Reação ductular	Col. V INICIAL Peri sinusoidal	Col. V FINAL Intersticial	Col. V FINAL Peri vascular	Col. V FINAL Periductal	Col. V FINAL Reação ductular	Col. V FINAL Peri sinusoidal
1	1	1	0	2	2	1	1	1	1	1
2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2
3	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2
4	2	1	1	1	1					
5	2	1	1	1	2					
6	2	1	0	1	1	2	1	0	0	1
8	2	1	0	1	0	2	1	1	0	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
11	2	1	1	1	2	1	1	0	1	1
12	2	1	0	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	0	1	2	1	1	1	1	1
14	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1
15	1	1	0	1	1	2	1	0	1	1
16	1	1	0	1	0	1	1	1	1	2
17	2	1	0	1	1	1	1	0	1	2
18	2	1	1	1	1					
19	2	1	0	1	1	1	1	0	1	1
20	1	1	0	1	1	1	2	1	0	1
21	2	1	0	1	1	1	1	0	1	1
22	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1
24	1	1	0	1	2	1	1	0	0	1
25	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2
26	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2
27	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2
28	1	1	1	1	2	1	1	1	0	1
29	2	1	1	1	2	1	1	0	1	1
30	1	1	0	1	2	1	1	0	1	1
31						1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	2	1	1	0	2	2
36	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
37	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1
38	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2
39	2	1	0	1	2	2	1	1	1	1
40	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1
41	1	1	0	1	1	2	1	1	1	1
42	1	1	0	1	1	2	1	1	1	1

Anexo G – Tabela com escores de imunomarcção do colágeno tipo IV nos diferentes subcompartimentos hepáticos, em biópsias INICIAIS e FINAIS de pacientes com AVB operada.

Caso	Col. IV INICIAL Intersticial	Col. IV INICIAL Peri vascular	Col. IV INICIAL Periductal	Col. IV INICIAL Reação ductular	Col. IV INICIAL Peri sinusoidal	Col. IV FINAL Intersticial	Col. IV FINAL Peri vascular	Col. IV FINAL Periductal	Col. IV FINAL Reação ductular	Col. IV FINAL Peri sinusoidal
1	0	2	2	1	1	0	2	2	2	1
2	0	2	2	1	1	0	2	2	2	2
3	0	2	2	1	1	0	2	2	2	2
4	0	1	1	1	2	0	2	2	2	1
5	1	1	1	1	0	0	2	2	1	1
6						0	2	2	2	2
8	0	1	1	1	1					
10						0	1	1	1	1
11	0	1	1	1	1	0	2	2	2	1
12	0	1	2	1	1	0	2	2	2	2
13	0	2	2	2	1	0	2	2	1	1
14	0	1	2	1	1	0	1	2	1	1
15	0	1	2	1	1	0	2	2	1	1
16	0	1	1	1	1	0	1	2	2	1
17	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
18	1	1	2	1	1	0	2	2	2	2
19	0	2	2	1	1	0	2	2	2	1
20	0	1	2	1	1	0	1	2	1	1
21	0	1	2	1	1	0	1	2	1	1
22	0	1	2	1	1	0	1	2	1	2
24	0	2	2	2	2	0	2	2	2	2
25	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2
26						0	2	2	1	2
27	0	2	2	1	2	1	2	2	2	2
28	0	2	2	1	2	0	1	1	1	1
29	0	2	2	1	1	0	2	2	1	1
30	0	1	2	1	1	0	1	2	1	1
31						1	1	1	1	1
34										
36						1	1	1	1	1
37	0	1	1	1	1	0	1	1	2	1
38	0	1	2	1	1	0	1	2	1	2
39	0	1	2	2	1	0	1	2	2	1
40	0	1	1	1	2	0	1	2	1	2
41	0	1	1	1	1	0	2	2	1	1
42						0	1	1	1	1

Anexo H – Tabela com escores de imunomarcação do colágeno tipo III nos diferentes subcompartimentos hepáticos, em biópsias INICIAIS e FINAIS de pacientes com AVB operada.

Caso	Col. III INICIAL Intersticial	Col. III INICIAL Peri vascular	Col. III INICIAL Periductal	Col. III INICIAL Reação ductular	Col. III INICIAL Peri sinusoidal	Col. III FINAL Intersticial	Col. III FINAL Peri vascular	Col. III FINAL Periductal	Col. III FINAL Reação ductular	Col. III FINAL Peri sinusoidal
1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1
2	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
3	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1
4	2				2	1	1	1	2	1
5	2	1	1	2	2	2	1	1	2	0
6	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
8	2	1	1	2	1	1	1	1	2	0
10	1	1	2	2	0	2	1	1	2	1
11	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
12	2	1	1	2	1	2	1	1	2	2
13	2	1	1	2	2	2	1	1	2	0
14	2	1	1	2	1	2	1	1	2	2
15	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
16	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1
17	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1
18	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1
19	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
20	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
21	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
22	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1
24	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
25	2	1	1	2	1	2	1	1	2	0
26	2				0	2	1	1	2	1
27	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
28	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
29	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1
30	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
31										
34	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2
36	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1
37	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1
38	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1
39	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2
40	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1
41	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
42	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1

Anexo I – Tabela com escores de imunomarcção do colágeno tipo I nos diferentes subcompartimentos hepáticos, em biópsias INICIAIS e FINAIS de pacientes com AVB operada.

Caso	Col. I INICIAL Intersticial	Col. I INICIAL Peri vascular	Col. I INICIAL Periductal	Col. I INICIAL Reação ductular	Col. I INICIAL Peri sinusoidal	Col. I FINAL Intersticial	Col. I FINAL Peri vascular	Col. I FINAL Periductal	Col. I FINAL Reação ductular	Col. I FINAL Peri sinusoidal
1	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1
2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2
3	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2
4	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1
5	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1
6	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1
8	2	1	1	1	1	2	2	2	1	1
10	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2
11	2	1	1	1	2	2	1	1	2	2
12	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1
13	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2
14	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1
15	2	1	1	1	1	2	1	2	1	2
16	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1
17	2	1	1	1	0	2	1	1	1	1
18	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2
19	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2
20	2	1	1	2	2					
21										
22										
24										
25	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1
26	2	1	1	1	2	2	1	1	1	0
27	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2
28	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2
29	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2
30	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2
31	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2
34	2	1	1	1	0	2	1	1	1	2
36	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1
37	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2
38	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2
39	2	1	2	1	2	2	1	1	1	1
40	2	2	1	1	1					
41	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2
42	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2

Anexo J. Tabela com frações de área marcada por imunofluorescência nas regiões perissinusoidais, para cada tipo de colágeno, nas biópsias INICIAIS e FINAIS de cada paciente da casuística.

Caso	Col. I INICIAL	Col. I FINAL	Col. III INICIAL	Col. III FINAL	Col. IV INICIAL	Col. IV FINAL	Col. V INICIAL	Col. V FINAL
1	0.0258	0.0133	0.0431	0.0172	0.0567	0.0559	0.1208	0.0745
2	0.0362	0.0437	0.0399	0.0530	0.0625	0.0966	0.2165	0.0973
3	0.0439	0.0552	0.0311		0.0526	0.0820	0.1517	0.0460
4	0.0636	0.0167	0.0289	0.0211	0.0688	0.0504	0.0627	
5	0.0428	0.0339	0.0352		0.0688	0.0717	0.0852	
6	0.0269	0.0176			0.0664	0.0801	0.0663	
8	0.0045	0.0163					0.0589	0.0419
10	0.0122	0.0219		0.0131	0.0430	0.0649		0.0590
11	0.0283	0.0213		0.0184	0.0257	0.0523	0.0644	0.0520
12	0.0128	0.0163	0.0164	0.0248		0.0667	0.0363	
13	0.0075	0.0169	0.0513	0.0185	0.0380	0.0629	0.0457	
14	0.0263	0.0183	0.0269	0.0265	0.0283	0.0536	0.0400	0.0479
15	0.0112	0.0239		0.0316		0.0459		0.0321
16	0.0133	0.0059	0.0787	0.0552	0.0402			0.0449
17	0.0031	0.0094		0.0207	0.0350	0.0505	0.0245	0.0864
18	0.0137	0.0142	0.0470		0.0634	0.0965	0.0856	
19	0.0060	0.0187	0.0227	0.0418		0.0733		0.0247
20	0.0101		0.0298		0.0458	0.0548	0.0484	0.0766
21			0.0146		0.0475	0.0466		
22			0.0274	0.0235	0.0643	0.0533	0.0568	0.0376
24			0.0324	0.0177	0.0643	0.0855	0.0961	0.0479
25	0.0053	0.0611	0.0183		0.0580		0.0747	0.0884
26	0.0062	0.1059		0.0478		0.0902	0.1369	0.1472

Caso	Col. I INICIAL	Col. I FINAL	Col. III INICIAL	Col. III FINAL	Col. IV INICIAL	Col. IV FINAL	Col. V INICIAL	Col. V FINAL
27	0.0064	0.0784	0.0121	0.0099	0.0457	0.1217	0.0622	0.0555
28	0.0067	0.0689	0.0508	0.0148	0.1051	0.0980	0.1097	0.0566
29	0.0242	0.0918	0.0729	0.0103	0.0553	0.0987	0.1214	0.0409
30	0.0080	0.0816	0.0166	0.0246	0.0393	0.0890	0.0673	0.0530
31	0.0645	0.0777			0.0449	0.0856		0.1320
34	0.0170	0.0654	0.1016	0.0423			0.1126	0.1069
36	0.0308	0.0626	0.0492	0.0341		0.0512	0.0809	0.0152
37	0.0124	0.0856	0.0810	0.0234		0.0842	0.1460	0.0704
38	0.0116	0.0685	0.0401	0.0358		0.0912	0.0961	0.0931
39	0.0561	0.0764	0.0681	0.0340	0.0724	0.0901	0.0887	0.0643
40	0.00711			0.0251	0.0438	0.0830		0.0320
41	0.00713	0.0672	0.0635	0.0516	0.0407	0.0973	0.0949	0.0392
42	0.0056	0.0159	0.0623	0.0529	0.0522	0.0830		0.0146
mediana	0.0124	0.0339	0.0399	0.0248	0.0522	0.0811	0.0831	0.0530
média	0.0199	0.0442	0.0439	0.0292	0.0529	0.0752	0.0875	0.0613

8. REFERÊNCIAS

1. Mowat AP. Biliary atresia into the 21st century: a historical perspective. *Hepatology* 1996;23(6):1693-5.
2. Tannuri U, Velhote MCP, Santos MM, Gibelli NE et al. Pediatric liver transplantation: fourteen years of experience at the children institute in São Paulo, Brazil. *Transpl Proceed* 2004;36(4):941-94.
3. Maksoud JG, Tannuri U, Santos MM, Ayoub AAR, Silva MM, Maksoud Filho JG. Transplante de fígado. In: Maksoud JG. *Cirurgia Pediátrica*. 2a ed. Rio de Janeiro: Revinter editores; 2003. p.949-69.
4. Whittington PF, Balistreri WF. Liver transplantation in pediatrics: indications, contraindications, and pretransplant management. *J Pediatr* 1991;118(2):169-77.
5. Esquivel CO, Iwatsuki S, Gordon RD, Starzl T et al. Indications for pediatric liver transplantation. *J Pediatr* 1987;111:1039-45.
6. Silva MM, Maksoud JG. Atresia das vias biliares. In: Maksoud JG. *Cirurgia Pediátrica*. 2a ed. Rio de Janeiro: Revinter editores; 2003. p.904-22.
7. Nakanuma Y, Harada K, Sato Y, Ikeda H. Recent progress in the etiopathogenesis of pediatric biliary disease, particularly Caroli's disease with congenital hepatic fibrosis and biliary atresia. *Histol Histopathol* 2010;25(2):223-35.
8. Selmi C, Vergani D, Mieli-Vergani G. Viruses and autoantibodies in biliary atresia. *Gastroenterol* 2010;139(5):1461-64.

9. Awasthi A, Das A, Srinivasan R, Joshi K. Morphological and immunohistochemical analysis of ductal plate malformation: correlation with fetal liver. *Histopathology* 2004;45(3):260-7.
10. Tan CEL, Moscoso GJ. The developing human biliary system at the porta hepatis level between 11 and 25 weeks of gestation – a way to understanding biliary atresia. *Pathol Int.* 1994;44(8):600-10
11. Desmet V. Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: variations on the theme Ductal Plate Malformation. *Hepatology* 1992;16(4):1069-83.
12. Fischler B, Woxenius S, Nemeth A, Papadogiannakis N. Immunoglobulin deposits in liver tissue from infants with biliary atresia and the correlation to cytomegalovirus infection. *J Pediatr Surg.* 2005;40(3):541-6.
13. Fjaer RB, Bruu AL, Nordbo SA. Extrahepatic bile duct atresia and viral involvement. *Pediatr Transplant.* 2005;9(1):68-73.
14. Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus S. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology* 1998;27(6):1475-82.
15. Fischer B, Ehrnst A, Forsgren M. The viral association of neonatal cholestasis in Sweden: a possible link between CMV infection and extrahepatic atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998;27(1):57-64.
16. Peterson C, Biermanns D, Kuske M. New aspects in a murine model for extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 1997;32(8):1190-5.

17. Tarr PI, Haas JE, Christie DL. Biliary atresia, cytomegalovirus and age at referral. *Pediatrics* 1996;97:828-34.
18. Feng J, Li M, Gu W, Tang H, Yu S. The aberrant expression of HLA-DR in intrahepatic bile ducts in patients with biliary atresia: an immunohistochemistry and immune electron microscopy study. *J Pediatr Surg*. 2004;39(11):1658-62.
19. Ahmed AF, Nio M, Ohtani H, Nagura H, Ohi R. In situ CD14 expression in biliary atresia: comparison between early and late stages. *J Pediatr Surg*. 2001;36(1):240-3.
20. Kobayashi H, Puri P, O'Briain DS. Hepatic overexpression of MHC class II antigens and macrophage-associated antigens CD68 in patients with biliary atresia of poor prognosis. *J Pediatr Surg* 1997;32(4):590-3.
21. Silveira TR, Salzano FM, Donaldson PT. Association between HLA and extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;16(2):114-17.
22. Shirahase I, Ooshima A, Tanaka K, Inamoto T, Yamamoto E, Ozawa K, Yamabe H. The slow progression of hepatic fibrosis in intrahepatic cholestasis as compared with extrahepatic biliary atresia. *Eur J Pediatr Surg*. 1995;5(2):77-81.
23. Kasai M. Treatment of biliary atresia with special reference to hepatic portoenterostomy and its modifications. *Prog Pediatr Surg* 1974;6:5-52.
24. Lykavieris P, Chardot C, Sokhn M, Gauthier F, Valayer J, Bernard O. Outcome in adulthood of biliary atresia: a study of 63 patients who survived for over 20 years with their native liver. *Hepatology*. 2005;41(2):366-71.

25. Petersen C. Surgery in biliary atresia--futile or futuristic? *Eur J Pediatr Surg.* 2004;14(4):226-9.
26. Hadzic N, Davenport M, Tizzard S, Singer J, Howard ER, Mieli-Vergani G. Long-term survival following Kasai portoenterostomy: is chronic liver disease inevitable? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;37(4):430-3.
27. Kobayashi H, Horikoshi K, Yamataka A, Lane GJ, Furuhashi A, Sueyoshi N, Miyano T. Are stable postoperative biliary atresia patients really stable? *Pediatr Surg Int.* 2001;17(2):104-7.
28. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005;115(2):209-18.
29. Brenner DA, Waterboer T, Choi SK, Lindquist JN, Stefanovic B, Burchardt E, Yamauchi M, Gillan A, Rippe RA. New aspect of hepatic fibrosis. *J Hepatol.* 2000;32(1 Suppl):32-8.
30. Alcolado R, Arthur MJ, Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci (London).* 1997;92(2):103-12.
31. Davis BH, Kresina TF. Hepatic fibrogenesis. *Clin Lab Med.* 1996;16(2):361-75.
32. Chuang JH, Wang PW, Tai MH. An adipocentric view of liver fibrosis and cirrhosis. *Chang Gung Med J.* 2004;27(12):855-68.
33. Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci.* 2002;7:808-26.
34. Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2001;21(3):437-51.

-
35. Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis.* 2001;21(3):427-36.
 36. Ramm GA, Nair VG, Bridle KR, Shepherd RW, Crawford DH. Contribution of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells to hepatic fibrogenesis in biliary atresia. *Am J Pathol.* 1998;153(2):527-35.
 37. Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Heinrichs OE. Cellular sources of extracellular matrix proteins in normal and fibrotic liver. Studies of gene expression by in situ hybridization. *J Hepatol.* 1995;22(2 Suppl):71-6.
 38. Yamamoto K, Sargent PA, Fisher MM, Youson JH. Periductal fibrosis and lipocytes (fat-storing cells or Ito cells) during biliary atresia in the lamprey. *Hepatology.* 1986;6(1):54-9.
 39. Kobayashi H, Hayashi N, Hayashi K, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T. Connective tissue growth factor and progressive fibrosis in biliary atresia. *Pediatr Surg Int.* 2005;21(1):12-6.
 40. Honsawek S, Chongsrisawat V, Vejchapipat P, Thawornsuk N, Tangkijvanich P, Poovorawan Y. Serum interleukin-8 in children with biliary atresia: relationship with disease stage and biochemical parameters. *Pediatr Surg Int.* 2005;21(2):73-7.
 41. Nobili V, Marcellini M, Giovannelli L, Girolami E, Muratori F, Giannone G, Devito R, De Benedetti F. Association of serum interleukin-8 levels with the degree of fibrosis in infants with chronic liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;39(5):540-4.

-
42. Kershenovich Stalnikowitz D, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol.* 2003;2(4):159-63.
 43. Gabele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci.* 2003;8:69-77.
 44. Faiz KUA, Ohtani H, Nio M, Funaki N, Iwami D, Kumagai S, Sato E, Nagura H, Ohi R. In situ expression of fibrogenic growth factors and their receptors in biliary atresia: comparison between early and late stages. *J Pathol.* 2000;192(1):73-80.
 45. Lamireau T, Le Bail B, Boussarie L, Fabre M, Vergnes P, Bernard O, Gautier F, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. Expression of collagens type I and IV, osteonectin and transforming growth factor beta-1 (TGFbeta1) in biliary atresia and paucity of intrahepatic bile ducts during infancy. *J Hepatol.* 1999;31(2):248-55.
 46. Lissos TW, Davis BH. Pathogenesis of hepatic fibrosis and the role of cytokines. *J Clin Gastroenterol.* 1992;15(1):63-7.
 47. Huang CC, Chuang JH, Chou MH, Wu CL, Chen CM, Wang CC, Chen YS, Chen CL, Tai MH. Matrilysin (MMP-7) is a major matrix metalloproteinase upregulated in biliary atresia-associated liver fibrosis. *Mod Pathol.* 2005;18(7):941-50.
 48. Zeitlin L, Resnick MB, Konikoff F, Schuppan D, Bujanover Y, Lerner A, Belson A, Lifschitz B, Reif S. Divergent patterns of extracellular matrix protein

- expression in neonatal versus adult liver fibrosis. *Pediatr Pathol Mol Med*. 2003;22(4):349-62.
49. Lamireau T, Dubuisson L, Lepreux S, Bioulac-Sage P, Fabre M, Rosenbaum J, Desmouliere A. Abnormal hepatic expression of fibrillin-1 in children with cholestasis. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(5):637-46.
50. Shirahase I, Ooshima A, Tanaka K, Yamabe H, Inomata Y, Ozawa K. Immunohistochemical demonstration of collagen types III and IV and myofibroblasts in the liver of patients with biliary atresia. *J Pediatr Surg*. 1994;29(5):639-44.
51. Shirahase I, Ooshima A, Tanaka K, Ozawa K, Yamabe H, Yamamoto T. Increased deposition and serum level of type IV collagen in patients with extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Surg*. 1993;28(6):847-50.
52. Sasaki F, Hata Y, Hamada H, Takahashi H, Uchino J. Laminin and procollagen-III-peptide as a serum marker for hepatic fibrosis in congenital biliary atresia. *J Pediatr Surg*. 1992;27(6):700-3.
53. de Freitas LA, Chevallier M, Louis D, Grimaud JA. Human extrahepatic biliary atresia: portal connective tissue activation related to ductular proliferation. *Liver*. 1986;6(5):253-61.
54. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*. 2001;21(3):351-72.
55. Neubauer K, Saile B, Ramadori G. Liver fibrosis and altered matrix synthesis. *Can J Gastroenterol*. 2001;15(3):187-93.

-
56. McCrudden R, Iredale JP. Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Histol Histopathol.* 2000;15(4):1159-68.
 57. Arthur MJ. Degradation of matrix proteins in liver fibrosis. *Pathol Res Pract.* 1994;190(9-10):825-33.
 58. Biagini G, Ballardini G. Liver fibrosis and extracellular matrix. *J Hepatol.* 1989;8(1):115-24.
 59. Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK. *Collagen: Primer in structure, processing and assembly.* New York: Springer; 2005.
 60. Mayne R, Burgeson R. Structure and function of collagens types. In: Ulecham R(ed). *Biology of extracellular matrix*, 20th ed. London: Academic; 1993. p.1-283.
 61. Aycock RS, Seyer JM. Collagens of normal and cirrhotic human liver. *Connect Tissue Res.* 1989;23(1):19-31.
 62. Callado MR, Viana VS, Vendramini MB, Leon EP, Bueno C, Velosa AP, Teodoro WR, Yoshinari NH. Autoantibody profile in the experimental model of scleroderma induced by type V human collagen. *Immunology.* 2007;122(1):38-46.
 63. Mackay IR, Rowley MJ. Autoimmune epitopes: autoepitopes. *Autoimmun Rev.* 2004;3(7-8):487-92.
 64. Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, Garippo AL, Farhat C, Parra ER, Sonohara S, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Architectural remodelling in lungs of rabbits

- induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract*. 2004;200(10):681-91.
65. Teodoro WR, Miron BG, Tsuzuki L, Ogido I, Velosa AP, Abatepaulo F, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Synovial remodeling process induced by type V collagen immunization in rabbits. *Pathol Res Pract*. 2003;199(9):605-12.
66. Teodoro WR. Imunogenicidade ao colágeno tipo V em coelhos: um novo modelo experimental para o estudo da patogênese da vasculite de hipersensibilidade. *Tese (doutorado)*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.
67. Sumpter TL, Wilkes DS. Role of autoimmunity in organ allograft rejection: a focus on immunity to type V collagen in the pathogenesis of lung transplant rejection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286(6):1129-39.
68. Wilkes DS. The role of autoimmunity in the pathogenesis of lung allograft rejection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2003;51(4):227-30.
69. Mizobuchi T, Yasufuku K, Zheng Y, Haque MA, Heidler KM, Woods K, Smith GN Jr, Cummings OW, Fujisawa T, Blum JS, Wilkes DS. Differential expression of Smad7 transcripts identifies the CD4⁺CD45RChigh regulatory T cells that mediate type V collagen-induced tolerance to lung allografts. *J Immunol*. 2003;171(3):1140-7.
70. Haque MA, Mizobuchi T, Yasufuku K, Fujisawa T, Brutkiewicz RR, Zheng Y, Woods K, Smith GN, Cummings OW, Heidler KM, Blum JS, Wilkes DS.

- Evidence for immune responses to a self-antigen in lung transplantation: role of type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. *J Immunol.* 2002;169(3):1542-9.
71. Yasufuku K, Heidler KM, Woods KA, Smith GN, Cummings OW, Fujisawa T, Wilkes DS. Prevention of bronchiolitis obliterans in rat lung allografts by type V collagen-induced oral tolerance. *Transplantation.* 2002;73(4):500-5.
72. Yasufuku K, Heidler KM, O'Donnell PW, Smith GN, Cummings OW, Foresman BH, Fujisawa T, Wilkes DS. Oral tolerance induction by type V collagen downregulates lung allograft rejection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25(1):26-34.
73. Mares DC, Heidler KM, Smith GN, Cummings OW, Harris ER, Foresman B, Wilkes DS. Type V collagen modulates alloantigen-induced pathology and immunology in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(1):62-70.
74. Fang M, Jacob R, McDougal O, Oxford JT. Minor fibrillar collagens, variable regions alternative splicing, intrinsic disorder, and tyrosine sulfation. *Protein Cell.* 2012;3(6):419-433.
75. Piechocka IK, Oosten ASG, Breuls RGM, Koenderink GH. Rheology of heterotypic collagen networks. *Biomacromolecules.* 2011;12(7):2797-2805.
76. Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, Bell SM, Chervoneva I, Birk DE. Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J Biol Chem.* 2004;279(51):53331-7

-
77. Wenstrup RJ, Florer JB, Cole WG, Willing MC, Birk DE. Reduced type I collagen utilization: a pathogenic mechanism in COL5A1 haplo-insufficient Ehlers-Danlos syndrome. *J Cell Biochem.* 2004;92(1):113-24.
 78. Takai KK, Hattori S, Irie S. Type V collagen distribution in liver is reconstructed in coculture system of hepatocytes and stellate cells; the possible functions of type V collagen in liver under normal and pathological conditions. *Cell Struct Funct.* 2001;26(5):289-302.
 79. Birk DE. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron.* 2001;32(3):223-37.
 80. Chanut-Delalande H, Fichard A, Bernocco S, Garrone R, Hulmes DJ, Ruggiero F. Control of heterotypic fibril formation by collagen V is determined by chain stoichiometry. *J Biol Chem.* 2001;276(26): 24352-9.
 81. Kypreos KE, Birk D, Trinkaus-Randall V, Hartmann DJ, Sonenshein GE. Type V collagen regulates the assembly of collagen fibrils in cultures of bovine vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem.* 2000;1880(1):146-55.
 82. Underwood PA, Bean PA, Whitelock JM. Inhibition of endothelial cell adhesion and proliferation by extracellular matrix from vascular smooth muscle cells: role of type V collagen. *Atherosclerosis.* 1998;141(1):141-52.
 83. Tillet E, Franc JM, Franc S, Garrone R. The evolution of fibrillar collagens: a sea-pen collagen shares common features with vertebrate type V collagen. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1996;113(2): 239-46.

-
84. Fichard A; Kleman JP; Ruggiero F. Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biol.* 1995;14(7):515-31.
 85. Andrikopoulos K, Liu X, Keene DR, Jaenisch R, Ramirez F. Targeted mutation in the col5a2 gene reveals a regulatory role for type V collagen during matrix assembly. *Nat Genet.* 1995;9(1):31-6.
 86. Vassiliadis E, Veidal SS, Hansen C, Karsdal MA, Leeming DJ. Circulating levels of a collagen type V propeptide fragment in a carbon tetrachloride reversible model of liver fibrosis. *Biomarker Insights* 2012;7:159-166.
 87. Gibelli NE, Tannuri U, de Mello ES, Rodrigues CJ. Bile duct ligation in neonatal rats: is it a valid experimental model for biliary atresia studies? *Pediatr Transplant.* 2009;13(1):81-7.
 88. Gibelli NE, Tannuri U, Mello ES. Immunohistochemical studies of stellate cells in experimental cholestasis in newborn and adult rats. *Clinics (São Paulo)* 2008;63(5):689-94.
 89. Gibelli NEM. Fibrose portal e periportal na obstrução extra-hepática experimental em ratos jovens e adultos: contribuição para o estudo da atresia das vias biliares. *Tese (doutorado)*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.
 90. Kobayashi H, Yamataka A, Koga H, Okazaki T, Tamura T, Urao M, Yanai T, Lane GJ, Miyano T. Optimum prednisolone usage in patients with biliary atresia postportoenterostomy. *J Pediatr Surg.* 2005;40(2):327-30.

-
91. Muraji T, Nio M, Ohhama Y, Hashimoto T, Iwanaka T, Takamatsu H, Ohnuma N, Kato, T Ohi R; Japanese Biliary Atresia Society. Postoperative corticosteroid therapy for bile drainage in biliary atresia — a nationwide survey. *J Pediatr Surg.* 2004;39(12):1803-5.
 92. Dolgin SE. Answered and unanswered controversies in the surgical management of extra hepatic biliary atresia. *Pediatr Transplant.* 2004;8(6):628-31.
 93. Andrade WC, Silva LF, Coelho MC, Tannuri AC, Alves VA, Tannuri U. Effects of the administration of pentoxifylline and prednisolone on the evolution of portal fibrogenesis secondary to biliary obstruction in growing animals: immunohistochemical analysis of the expression of TGF- β and VEGF. *Clinics (São Paulo)* 2012;67(12):1455-61.
 94. Andrade WC, Tannuri U, da Silva LF, Alves VA. Effects of the administration of pentoxifylline and prednisolone on the evolution of portal fibrogenesis secondary to biliary obstruction-an experimental study in growing animals. *J Pediatr Surg.* 2009;44(11):2071-7.
 95. Andrade WC. Efeitos da administração de pentoxifilina e prednisolona na evolução da fibrose portal secundária à obstrução biliar: estudo experimental em animais em crescimento. *Tese (doutorado)*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.
 96. McDiarmid SV, Merion RM, Dykstra DM, Harper AM. Selection of pediatric candidates under the PELD system. *Liver Transpl.* 2004;10(10 Suppl 2):S23-30.

-
97. Junqueira LCU, Bignolas C, Brentani RR. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Anal Biochem.* 1979;94(1):96-99.
 98. Junqueira LCU, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picrosirius polarization method. *Histochemistry.* 1982;74(1):153-56.
 99. 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(2):349-55.
 100. Pape L, Olsson K, Petersen C, von Wasilewski R, Melter M. Prognostic value of computerized quantification of liver fibrosis in children with biliary atresia. *Liver Transpl* 2009;15(8):876-82.
 101. Tan CEL, Davenport M, Driver M. Does the morphology of the extrahepatic biliary remnants in biliary atresia influence survival? *J Pediatr Surg* 1994; 29(11):1459-65.
 102. Howard ER. Extrahepatic biliary atresia: a review of current management. *Br J Surg* 1983;70(4):193-97.
 103. Miyano T, Fujimoto T, Ohya T, Shimomura H. Current concept of the treatment of biliary atresia. *World J Surg* 1993;17(3):332-36.
 104. Balistreri WF, Grand R, Hoofnagle JH, Suchy FJ, Ryckman FC, Perlmutter DH. Biliary atresia: current concepts an research directions. Summary of a symposium. *Hepatology* 1996;23(6):1682-92.

-
105. Grosfeld J, Rescorla F, Skinner M, West K, Scherer L. The spectrum of biliary tract disorders in infants and children. Experience with 300 cases. *Arch Surg* 1994;129(5):513-18.
 106. Altman RP, Lilly JR, Greenfeld J, Weinberg A, van Leeuwen K, Flanigan L. A multivariable risk factor analysis of the portoenterostomy (Kasai) procedure for biliary atresia: twenty-five years of experience from two centers. *Ann Surg* 1997;226(3):348-53.
 107. Maksoud J, Fauza D, Silva M, Porta G, Miura I, Zerbini M. Management of biliary atresia in the liver transplantation era: a 15-years, single-center experience. *J Pediatr Surg* 1998;33(1):115-118.
 108. Carceller A, Blanchard H, Alvarez F, Dickens S, Bensoussan A, Di Lorenzo M. Past and future of biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2000;35(5):717-20.
 109. Schoen B, Lee H, Sullivan K, Ricketts R. The Kasai portoenterostomy: when is too late? *J Pediatr Surg* 2001;36(1):97-99.
 110. Zerbini MC, Gallucci SD, Maezono R, Ueno CM, Porta G, Maksoud JG, Gayotto LC. Liver biopsy in neonatal cholestasis: a review on statistical grounds. *Mod Pathol* 1997;10(8):793-99.
 111. Santos JL, Cerski CT, Silva VD, Mello ES, Wagner MB, Silveira TR. Factors related to the post-portoenterostomy prognosis of biliary atresia. *J Pediatr* (Rio J) 2002;78(4):341-346.