

**Avaliação Histopatológica da Colestase
Neonatal
Aspetos de Diagnóstico e Prognóstico**

Paulo Jorge Tavares de Castro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(Mestrado integrado)

Orientador: Prof. Doutor Jorge Luiz dos Santos

Abril de 2021

Agradecimentos

Este estudo só se tornou possível devido ao trabalho incansável de diversas pessoas. Deste modo, agradeço:

- ✓ ao **Professor Doutor Jorge Luiz dos Santos** pela disponibilidade para me orientar ao longo deste percurso, pela acessibilidade para discutir ideias e esclarecer dúvidas, e por me fazer perceber a importância da investigação em saúde e da atualização do conhecimento constante;
- ✓ à **Doutora Michele Claire Breton** pela dedicação e pelo capricho na obtenção das imagens histológicas sujeitas a análise bem como pela realização da respetiva avaliação estatística dos dados;
- ✓ ao **Professor Doutor Carlos Thadeu Cerski**, patologista do Hospital Clínicas de Porto Alegre, colaborador incansável na produção e na análise do material histológico, mostrando-se sempre disponível para discutir as dúvidas surgidas na avaliação histológica;
- ✓ ao **Professor Doutor Carlos Oscar Kieling**, gastroenterologista pediátrico do Hospital Clínicas de Porto Alegre, pela ajuda na seleção dos casos e controles estudados;
- ✓ ao **Professor Jorge Gama**, professor auxiliar do departamento de Matemática da Universidade da Beira Interior, pela colaboração fundamental na avaliação estatística dos dados obtidos.

Agradeço, também, à **Covilhã**, à **Universidade da Beira Interior** e à **Faculdade de Ciências da Saúde** por tão bem me terem acolhido, e pelo contributo tanto na minha formação profissional como no meu desenvolvimento pessoal. Agradeço os meus **amigos** por tornarem a Covilhã um lugar mais especial.

Agradeço aos **meus pais**, ao **meu irmão**, ao **Carlos Jacinto**, à **Noémia Janela**, à **tia Florência**, ao **tio Domingos**, à **tia Ressurreição** e ao **avô Armando**, o apoio incondicional que me deram ao longo deste meu percurso académico.

Finalmente, quero deixar um agradecimento especial à **Joana** pela enorme paciência e por me apoiar em todos os momentos, estando sempre disponíveis para me ouvir e dar motivação para continuar. Obrigada por teres estado sempre ao meu lado ao longo deste percurso, e pelo amor e apoio constante e incondicional.

Resumo

Introdução: A colestase neonatal, apesar de ser uma doença com baixa incidência mundial, apresenta uma elevada taxa de mortalidade se não for identificada e tratada de forma precoce. A colestase neonatal é classificada em dois grupos etiológicos distintos: colestase extra-hepática e colestase intra-hepática. Esta é uma distinção crucial, uma vez que a etiologia da colestase vai influenciar a escolha do tratamento. A análise da biópsia hepática percutânea é a principal ferramenta de diagnóstico na avaliação inicial de um lactente colestático, demonstrando os níveis de acurácia mais elevados quando comparado com os restantes métodos de diagnósticos utilizados para este fim. Este estudo teve como objetivo fazer uma extensa revisão bibliográfica da avaliação histopatológica da colestase neonatal, e uma análise histopatológica de amostras de lactentes colestáticos de forma a correlacionar as variáveis histopatológicas com o diagnóstico etiológico final e avaliar a acurácia da biópsia hepática percutânea.

Materiais e métodos: Quarenta e sete biópsias hepáticas (27 biópsias em cunha e 20 biópsias percutâneas) obtidas entre 2006 e 2021 de pacientes com colestase neonatal tratados no Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre foram estudadas prospectivamente através de um protocolo histopatológico específico. Foram utilizadas pelo menos 3 colorações diferentes e estudadas 18 variáveis histopatológicas hepáticas relacionadas com diagnóstico diferencial da colestase neonatal. Este protocolo histopatológico foi desenvolvido e usado em consenso por 2 experts em histopatologia hepática, acompanhados pelo mestrando. Todo o processo foi feito de forma cega em relação à história clínica, aos resultados de imagem, aos dados laboratoriais e ao diagnóstico final dos pacientes. As alterações histopatológicas avaliadas nos pacientes pediátricos com colestase neonatal foram divididas em 32 fatores relacionados e foram analisados por regressão logística.

Resultados: A Reação Ductular ($p < 0.001$), a Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas ($p < 0.001$), e o Padrão obstrutivo ($p < 0.001$) foram os melhores indicadores de Atresia Biliares. A associação entre as variáveis “Padrão Obstrutivo” e “Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas” apresenta uma acurácia de 76,6% no diagnóstico de Atresia Biliar. A sensibilidade e a especificidade da biópsia hepática para o diagnóstico de Atresia Biliar, utilizando o nosso modelo, foi de 71,4% e 80,8%, respetivamente.

Conclusão: A identificação da “Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas” constitui uma variável adicional às variáveis atualmente consideradas de “Padrão obstrutivo”, acrescentando desta forma acurácia na diferenciação histopatológica entre a Atresia Biliar e colestase intra-hepática. No entanto, o diagnóstico diferencial da colestase neonatal continua a ser desafiador e deve incluir, de forma complementar à avaliação histopatológica, uma correlação clínica adequada e estudos genéticos.

Palavras-chave

Colestase Neonatal; Histopatologia; Biópsia Hepática; Diagnóstico Diferencial; Atresia Biliar.

Abstract

Introduction: Neonatal cholestasis, despite having low incidence worldwide, presents a health burden with elevated mortality rate if not early identified and treated. Neonatal cholestasis is broadly classified in two etiological groups: extrahepatic mechanical obstructive and intrahepatic cholestasis. This is a crucial distinction, since has precise therapeutic implications. The analysis of a percutaneous liver biopsy is a main diagnostic tool in the initial evaluation of a cholestatic infant, presenting the highest levels of accuracy among the diagnostic methods employed for this purpose. This study aimed to do an extensive bibliographic review of the histopathological evaluation of neonatal cholestasis, and a histopathological analysis of the samples of cholestatic infants to correlate the histopathological variables with the final etiological diagnosis and assessed the accuracy of percutaneous liver biopsy.

Materials and Methods: Forty-seven liver biopsies (27 wedge biopsies and 20 percutaneous biopsies), all from patients cared for neonatal cholestasis in the Pediatrics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre from 2006 to 2021 were prospectively studied using a specifically designed histopathological protocol. At least 3 different stains were used, and 18 hepatic histopathological variables related to the differential diagnosis of neonatal cholestasis were studied. This histopathological protocol was developed and then used by 2 hepatic's histopathology experts and the M.D student, blinded for the clinical history, imaging results, laboratory data or final diagnosis of each case. The histopathological changes analysed in pediatric patients with neonatal cholestasis were divided into 32 related factors and evaluated by logistic regression analyses.

Results: Ductular proliferation ($p < 0.001$), Vascular proliferation in the portal tracts and fibrous bridges ($p < 0.001$), and Obstructive pattern ($p < 0.001$) were the most accurate variable for the diagnosis of Biliary Atresia. The association between the variable "Obstructive pattern" and "Vascular Proliferation in portal tracts and fibrous bridges" had an accuracy of 76,6% for the diagnosis of Biliary Atresia. Sensitivity and specificity of liver biopsy for diagnosing Biliary Atresia was 71,4% and 80,8%, respectively.

Conclusion: The variable “Vascular proliferation in portal tracts and fibrous bridges” added accuracy to the presence of an “Obstructive pattern” in the histopathological differentiation between Biliary Atresia and intrahepatic cholestatic diseases. The differential diagnosis, however, remains challenging and must include proper clinical correlation and genetic studies.

Keywords

Neonatal Cholestasis; Histopathology; Liver Biopsy; Differential Diagnosis; Biliary Atresia.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Acrónimos e Siglas	xv
1. Introdução	1
2. Objetivos	7
3. Materiais e Métodos	9
3.1 Amostra	9
3.2 Pesquisa Bibliográfica	10
3.3 Preparação Histológica e Imunohistoquímica	11
3.4 Estudo Histológico	12
3.5 Protocolo da Análise Histopatológica	12
3.5.1 Variáveis Qualitativas	12
3.5.2 Variáveis Semi-quantitativas	15
3.6 Padrão Histopatológico	16
3.7 Análise Estatística	23
3.7.1 Definição de variável e atribuição de modelo de análise de regressão logística	23
3.7.2 Método Estatístico	23
4. Resultados	25
4.1 Caracterização da amostra	25
4.2 Resultado teste do qui-quadrado de Pearson e teste exato de Fisher	27
4.3 Resultado da análise de regressão logística binária	33
4.4 Resultado da Análise da Curva ROC	35
4.5 Resultado da Pesquisa Bibliográfica	37
5. Discussão	39
6. Conclusão	45
7. Referências Bibliográficas	47

Anexo I	51
Anexo II	53
Anexo III	55
Anexo IV	57
Anexo V	59

Lista de Figuras

Figura 1 – Alterações histopatológicas indicativas de colestase neonatal obstrutiva de causa extra-hepática.....	17
Figura 2 – Pseudoácinos.....	18
Figura 3 – Padrão inflamatório.....	19
Figura 4 – Glóbulos de A1AT dentro dos hepatócitos periportais num doente com doença hepática associada a deficiência de A1AT.....	19
Figura 5 – Esteatose macrovesicular num doente com tirosinémia.....	21
Figura 6 – Esteatose microvesicular numa criança com deficiência mitocondrial da cadeia respiratória.....	21
Figura 7 – Reação ductular com características semelhantes a malformação de placa ductal em paciente com atresia biliar.....	29
Figura 8 – Padrão obstrutivo.....	29
Figura 9 – Padrão obstrutivo com evidente proliferação vascular no espaço porta e ponte porta-porta.....	30
Figura 10 – Aglomerados vasculares subcapsulares.....	31
Figura 11 – Curva ROC que avalia a sensibilidade e a especificidade dos fatores de risco para o diagnóstico de atresia biliar.....	36
Figura 12 – Fluxograma para a seleção da literatura revista.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Diagnóstico diferencial da colestase neonatal.....	2 e 3
Tabela 2 – Critérios seleção da literatura revista.....	11
Tabela 3 – Achados histopatológicos do fígado na apresentação de doenças de armazenamento que causam colestase neonatal.....	22
Tabela 4 – Nomes e atribuições de variáveis de fatores histopatológicos para o diagnóstico em pacientes com colestase neonatal.....	24
Tabela 5 – Classificação do tipo de colestase das diferentes patologias de colestase neonatal que incluíram a amostra.....	25
Tabela 6 – Características dos grupos de pacientes quanto à etiologia da colestase neonatal e quanto ao tipo de biópsia.....	26
Tabela 7 – Análise estatística da frequência de observação dos padrões histopatológicos entre pacientes diagnosticados com atresia biliar e outras colestases neonatais.....	28
Tabela 8 – Resíduo padronizado das alterações histopatológicas que são significativas no teste do qui-quadrado de Pearson e no teste exato de Fisher.....	32
Tabela 9 – Resultado de predição de diagnóstico em pacientes com colestase neonatal por análise de regressão logística binária.....	34
Tabela 10 – Resultado de predição de diagnóstico em pacientes com colestase neonatal por análise de regressão logística binária, com 2 padrões.....	34
Tabela 11 – Coordenadas da Curva Roc.....	36

Lista de Acrónimos e Siglas

AB	Atresia Biliar
A1AT	Alfa-1-antitripsina
A1ATd	Deficiência de Alfa-1-antitripsina
CK	Células de Kupffer
CMV	Citomegalovírus
CN	Colestase Neonatal
GGT	Gama Glutamil Transferase
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
MMP-7	Metaloproteinase-7
PFIC	Colestase Intra-hepática Progressiva Familiar
READ	Retículo Endoplasmático associado ao Sistema de Degeneração

1. Introdução

A icterícia por predomínio da bilirrubina indireta nos recém-nascidos é comum e, na maioria das vezes, fisiológica. Contudo, o aumento da bilirrubina direta traduz a presença de doença hepatocelular ou biliar e necessita de exploração clínica urgente. Nesses casos, o esclarecimento precoce do diagnóstico etiológico e a instituição de tratamento adequado exercem influência decisiva na sobrevivência e na qualidade de vida de muitos doentes. Assim, pode-se considerar a CN uma urgência em gastroenterologia pediátrica.(1)

Colestase é o termo usado para descrever os estados patológicos que cursam com a redução do fluxo biliar, por alterações anatômicas ou funcionais do sistema biliar, independentemente da causa e do local da obstrução. Conseqüentemente, os doentes colestáticos apresentam concentrações séricas elevadas de substâncias habitualmente excretadas na bÍlis, como a bilirrubina conjugada, ácidos biliares, colesterol e outros fosfolípidos. Colestase é considerada neonatal quando começa nos três primeiros meses de vida (2) e apresenta uma incidência de 1 em cada 2500 nascidos vivos.(3) Os principais achados clínicos são a icterícia, acolia, colúria, prurido e xantomas.(1) Do ponto de vista histopatológico, existe uma acumulação do pigmento biliar nos hepatócitos, nos canalículos e nos ductos biliares.(2)

A CN é amplamente classificada em dois grupos etiológicos: obstrução extra-hepática e colestase intra-hepática (tabela 1).

Tabela 1 - Diagnóstico diferencial da colestase neonatal.

CAUSAS INTRA-HEPÁTICAS
A. Hepatite neonatal idiopática – mecanismo desconhecido
<p>B. Transtorno da embriogénese</p> <p>1. Síndrome de Alagille</p> <p>2. Malformação da Placa Ductal: ARPKD, ADPLD, doença de Caroli, Síndrome de Joubert com fibrose hepática congénita (Síndrome COACH), Síndrome de Meckel, Displasia renal-hepático-pancreática 1 (gene NPHP3)</p>
<p>C. Transtorno da biossíntese e conjugação dos sais biliares</p> <p>1. Deficiência de 3-oxo-4-esteroide 5β-redutase</p> <p>2. Deficiência de 3β-hidroxi-5-C27-esteroide desidrogenase</p> <p>3. Deficiência de oxisterol 7α-hidroxilase</p> <p>4. Deficiência de BACAT (Hipercolenémia familiar)</p> <p>5. Transtorno funcional da alfa-metilacil-CoA racemase (AMACR) – Defeito congénito da síntese de ácido biliar tipo 4</p>
<p>D. Transtorno do transporte e secreção pela membrana</p> <p>1. Transtorno da secreção canicular</p> <p>a. Transporte de sais biliares – Deficiência de BSEP</p> <p>i. Persistente progressiva (PFIC2)</p> <p>ii. Recorrente benigna (BRIC2)</p> <p>b. Transporte de fosfolípidos – Deficiência MDR3 (PFIC3)</p> <p>c. Anormalidade da proteína de junção oclusiva 2 (PFIC4)</p> <p>d. Transporte iónico –Fibrose Cística (CFTR)</p> <p>2. Transtorno das junções oclusivas entre os hepatócitos e os canalículos biliares</p> <p>a. Anormalidade da proteína de junção oclusiva 2 (PFIC4)</p> <p>3. Transtornos complexos ou multiorgânicos</p> <p>a. Deficiência da FIC1 (distúrbio da translocação da fosfatidilserina)</p> <p>i. Persistente progressiva (PFIC1)</p> <p>ii. Recorrente benigna (BRIC1)</p> <p>b. Colangite esclerosante neonatal com ictiose</p> <p>c. Colangite esclerosante neonatal sem ictiose (gene DCDC2)</p> <p>d. Disfunção artrogripose-renal-colestase (genes VPS33B, VIPAS39)</p> <p>e. Xantomatose cerebrotendinosa (gene CYP27A1)</p> <p>f. Disfunção da glicosilação congénita (ALG 3, ALG 8, GLS1, PMM2, MPI, COG1, COG7, ATP6AP1)</p> <p>g. Disfunção Secundária do metabolismo dos sais biliares: Síndrome de Zellweger, distúrbios dos peroxissomos com envolvimento de mutação do gene PEX e doença de Refsum neonatal</p> <p>h. Disfunção do ciclo de ureia: citrulinemia do tipo II (colestase por deficiência de citrina, gene SLC25A13)</p> <p>i. <i>Outras:</i> hepatopatias mitocondriais (síndrome de depleção mitocondrial, genes dGK, POLG, MPV17) e défice do complexo III (gene BCS1L)</p>

<p>E. Distúrbio funcional dos recetores nucleares dos ácidos biliares</p> <p>1. PFIC 5 (gene NR1H4) – defeito funcional do FXR</p>
<p>F. Doenças hepáticas metabólicas</p> <p>1. Transtorno Glandular: hipotireoidismo, hipopituitarismo</p> <p>2. Com envolvimento do trato biliar: doença de depósito da α1-antitripsina, fibrose cística</p> <p>3. Sem envolvimento do trato biliar: Transtorno do metabolismo de hidratos de carbono (Galactosemia, Intolerância hereditária à frutose, Glicogenose IV, Síndrome de deficiência da glicoproteína dos hidratos de carbono), Transtorno do metabolismo dos aminoácidos (Tirosinemia), Transtorno do metabolismo dos lípidos (Síndrome de Wolman, Niemann-Pick, Gaucher tipo 2 e doença de Farber)</p>
<p>G. Infecções Congénitas</p> <p>1. Parasítica: Toxoplasmose</p> <p>2. Viral: Rubéola, Citomegalovírus, herpes simples, Vírus hepatotrópicos (A, B e C), HIV, Parvovírus 19, Varicela, Paramixovírus, Sepse entérica viral (echo-, coxsackie e adenovírus)</p> <p>3. Bacteriana: Sífilis, Sépsis bacteriana, Infecção do trato urinário, Listeriose, Tuberculose</p>
<p>H. Transtornos Imunes</p> <p>1. Lúpus eritematoso neonatal</p> <p>2. Hepatite neonatal com anemia hemolítica autoimune</p> <p>3. Hemocromatose neonatal</p>
<p>I. Associado à nutrição parentérica total</p>
<p>J. Miscelânea</p> <p>1. Histiocitose X</p> <p>2. Hepatite fibrosante com leucemia transitória (trissomia 21)</p> <p>3. Choque e hipoperfusão</p> <p>4. Asfixia neonatal</p> <p>5. Associada a obstrução intestinal</p>
<p>CAUSAS EXTRA-HEPÁTICAS</p> <p>Atresia Biliar</p> <p>Cisto do Colédoco</p> <p>Perfuração Espontânea do Ducto Biliar Comum</p> <p>Barro Biliar</p> <p>Colelitíase</p>

Esta é uma distinção crucial, pois após a confirmação da CN há uma necessidade urgente de diagnosticar e tratar a obstrução mecânica. Sem este tratamento a cirrose ocorrerá rapidamente.(4) Também os tratamentos disponíveis para a CN de causa intra-hepática devem ser administrados o mais precocemente possível de forma a evitar os efeitos nocivos da acumulação crônica de ácidos biliares e metabólitos.(5) Em diversos pacientes, torna-se mesmo necessário a realização de uma laparotomia exploratória associada a colangiografia transoperatória, com o objetivo de confirmar a presença ou ausência de uma obstrução mecânica extra-hepática.

A causa mais frequente de CN é a AB que se caracteriza por completa obstrução de parte ou da totalidade das vias biliares extra-hepáticas. Inicia-se exclusivamente na infância, manifestando-se por icterícia colestática ao nascimento ou nas primeiras semanas de vida, hepatomegália, acolia e colúria persistentes. Associa-se também a colangiopatia esclerosante intra-hepática progressiva.(1) A etiologia da AB não é totalmente percebida, mas suspeita-se de uma predisposição genética, associada a uma exposição multifatorial que desencadeia uma resposta imune desregulada que desorganiza o revestimento epitelial biliar e que leva a inflamação e fibrose progressivas.(6) A importância da inflamação e da fibrinogênese no desenvolvimento da AB foi recentemente reforçada com a descoberta de que a MMP-7 é expressa nos colangiócitos, comportando-se como marcador de lesão epitelial na AB e constituindo uma ferramenta útil para o diagnóstico diferencial da doença.(7)

O prognóstico pós-operatório da portoenterostomia, desenvolvida pelo Dr. Kasai com o objetivo de restabelecer a drenagem biliar ao desobstruir os ductos na região do hilo hepático nos pacientes com AB, é sobretudo afetado pela idade de realização do procedimento, beneficiando com a sua realização nos primeiros 65 dias de vida.(8) A portoenterostomia é um procedimento paliativo e, mesmo quando é realizado em condições ideais, ocorre colangiopatia, cirrose e insuficiência hepática, necessitando de transplante na idade adulta na maioria dos casos.(9) Existem diferentes formas clínicas de AB: a variante "perinatal" apresenta um intervalo livre de icterícia ao nascimento e nenhuma anomalia extra-hepática associada, enquanto a variante "embrionária" apresenta icterícia persistente desde o nascimento, e inclui anomalias extra-hepáticas, como a malformação esplênica da AB. Uma variante "cística" da AB é reconhecida, apresentando melhores resultados pós-operatórios(6), enquanto o subconjunto de pacientes com AB com evidências de positividade da IgM sérica para o CMV apresentam pior prognóstico no pós-operatório.(10) Este conjunto heterogêneo de apresentações clínicas sugere que a AB representa um fenótipo associado a fatores desencadeantes distintos.(11)

As causas de CN intra-hepáticas estão indicadas na tabela 1. No entanto, grande número dos casos de CN ainda permanecem sem definição etiológica sendo, por isso, classificados como “Hepatite Neonatal Idiopática” cujas características histopatológicas são colestase intra-hepática inespecífica e transformação dos hepatócitos em células gigantes.(12)

São vários os métodos que tentam diferenciar as causas extra e intra-hepáticas da CN. Um deles é a ecografia uma vez que a presença de um “sinal de cordão triangular”, ou seja, uma estrutura triangular hiperecogénica no hilo do fígado com mais de 3 mm de espessura, é sinal patognomónico com alta precisão de causas extra-hepáticas de colestase, como a AB. A artéria hepática com dilatação do lúmen no hilo do fígado, as telangiectasias subcapsulares e o formato anormal da vesícula biliar podem aumentar a precisão do diagnóstico, contudo a ecografia não permite a diferenciação entre AB e causas intra-hepáticas de colestase na infância, como síndrome de Alagille e hepatite neonatal.(3,13)

Desenvolveram-se algumas pontuações clínicas e laboratoriais para prever a causa da CN e distinguir entre AB e não-AB. Apesar dos valores aceitáveis dos resultados, a alta precisão para essa distinção não foi alcançada.(14) A avaliação, no sangue, do nível de MMP-7 em associação com o nível de GGT foi recentemente proposta como um método preciso para o diagnóstico diferencial da CN. Contudo, ainda são escassos os estudos prospetivos relativos a este novo teste não invasivo.(7)

A análise histopatológica de uma biópsia percutânea do fígado é considerada a ferramenta de diagnóstico mais importante na avaliação inicial de uma criança colestática, apresentando os mais altos níveis de precisão entre os métodos de diagnóstico empregados para esse fim.(3,14,15) Além do seu papel diagnóstico, a avaliação da biópsia hepática pode também revelar características histológicas significantes em termos de prognóstico. Um exemplo é o grau de fibrose ou a extensão da reação ductular que pode ajudar a prever o resultado após uma portoenterostomia de Kasai.

2. Objetivos

O objetivo desta tese de mestrado é apresentar, de forma estruturada, uma revisão bibliográfica extensa e atualizada sobre o tema descrito no título, e uma análise histopatológica das amostras de lactentes colestáticos. Ou seja, em primeiro lugar contribuirá no diagnóstico diferencial entre as causas extra e intra-hepáticas da CN. Em segundo lugar, pretenderá fazer uma correlação das variáveis histopatológicas com o diagnóstico etiológico final.

3. Materiais e Métodos

3.1 Amostra

Este estudo contou com 47 pacientes com CN, de ambos os sexos, submetidos ao protocolo de investigação de CN no Setor de Hepatologia Pediátrica, da Unidade de Gastroenterologia Pediátrica do Serviço de Pediatria do HCPA no período compreendido entre 2006 e 2021. Dentro deste protocolo, além dos exames clínico-laboratoriais e de imagem, realizou-se uma biópsia percutânea (n=20), onde 3 biópsias foram de doentes com AB e 17 biópsias foram de doentes com Colestase intra-hepática. Em pacientes cuja gravidade clínica e imprecisão no diagnóstico dos exames citados exigiram, a definição etiológica da doença foi confirmada através de colangiografia transoperatória durante uma laparotomia exploratória. Nos casos em que foi confirmada a obstrução mecânica do ducto biliar comum através da inspeção cirúrgica e da colangiografia, prosseguiu-se o procedimento para uma portoenterostomia (cirurgia de Kasai) (n=22). Os restantes pacientes incluídos neste estudo como controlos, são 26 doentes portadores de doença colestática de causa intra-hepática, que se diagnosticou com a ausência obstrução mecânica na qual se realizaram terapêuticas específicas, quando disponíveis, para além do tratamento sintomático. Ainda, durante a laparotomia, respeitando a etapa cirúrgica do protocolo de investigação da colestase neonatal no HCPA, foi obtida uma amostra hepática em cunha (n=27) para posterior análise histológica. Em alguns casos de colestase intra-hepática cujo diagnóstico foi obtido sem necessidade de procedimento cirúrgico, a biopsia hepática foi obtida apenas por técnica percutânea. Neste estudo foram incluídos todos pacientes com CN menores que 90 dias de vida por ocasião da laparotomia exploratória. Por sua vez foram excluídos os pacientes que comprem o critério de inclusão, mas os pais não deram o devido consentimento para a recolha de material histológico ou para a utilização dos dados, e os restantes pacientes que não cumprem com o critério de inclusão. Para cada caso de CN foi preenchido um termo de consentimento informado para a colheita e armazenagem de material biológico (anexo I), e de informações clínicas, componentes de um banco de dados de bases históricas relacionados com a sobrevida do fígado nativo destes pacientes, e para a sua aplicação, assinamos um Termo de Compromisso para o uso de dados, na qual nos comprometemos ao respeito, anonimato e sigilo, e uso das informações apenas com fins científicos (anexo II). Este projeto contou ainda com a aprovação da Comissão de Ética da Universidade da Beira interior que não identificou matéria que ofenda os princípios éticos e morais (anexo III).

3.2 Pesquisa Bibliográfica

A pesquisa bibliográfica aconteceu entre março e abril de 2020, tendo sido atualizada em outubro de 2020. Realizou-se uma revisão de literatura narrativa.

Fez-se a pesquisa recorrendo ao motor de busca *PubMed* através da seguinte sequência:

“Neonatal Cholestasis” OR “Neonatal Hepatitis” OR ((Pediatric OR Paediatric) AND liver AND (disorder OR disease)) OR ((Pediatric OR Paediatric) AND hepatic disease)

AND

“Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis” OR PFIC OR PFIC1 OR “PFIC 1” OR PFIC2 OR “PFIC 2” OR PFIC3 OR “PFIC 3” OR PFIC4 OR “PFIC 4” OR PFIC5 OR “PFIC 5” OR BRIC1 OR “BRIC 1” “Alagille Syndrome” OR “Ductal Plate Malformation” OR “Caroli disease” OR “Joubert syndrome with congenital hepatic fibrosis” OR “Meckel syndrome” OR “Renal-hepatic-pancreatic dysplasia 1” OR Galactosemia OR Tyrosinemia OR “hereditary fructose intolerance” OR “Cystic Fibrosis” OR “Niemann Pick” OR “Mitochondrial Respiratory-chain liver diseases” OR “Neonatal Hemochromatosis” OR Hypothyroidism OR “Arthrogryposis-renal Dysfunction-cholestasis Syndrome” OR “Neonatal Sclerosing Cholangitis” OR “Inborn errors of bile acid metabolism” OR “BACAT deficiency” OR “amidation defect” OR “Bile acid-CoA ligase deficiency” OR “Bile acid-CoA amino acid N-acetyltransferase deficiency” OR “bile duct paucity” OR “ductular reaction” OR “biliary hyperplasia” OR “giant cell” OR “giant cell transformation” OR “congenital hepatic fibrosis” OR “Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis” OR BRIC OR “Biliary Atresia” OR “Choledochal Cyst” OR “Spontaneous perforation of the common bile duct” OR Cholelithiasis OR “Biliary sludge” OR “Mucous plug” OR “Extrahepatic Causes” OR “Intrahepatic Causes” OR “Drug Induced” OR DILI

AND

Histopathology OR Histology OR (Histopathology AND Liver) OR (Histology AND Liver) OR “Liver Biopsy”

AND

Prognosis OR Differential Diagnosis OR Diagnosis OR ((Pediatric OR Paediatric) AND “Liver Transplant”) OR fibrogenesis OR cirrhogenesis OR fibrosis

AND

Date – Publication: 01/01/2012 to present

Foram incluídos na pesquisa artigos dos idiomas inglês e português. Foi dada preferência aos artigos mais recentes, contudo sem excluir outros menos recentes sempre que o seu conteúdo fosse considerado relevante. Os critérios de inclusão e exclusão encontram-se na tabela 2.

Consultaram-se também livros da área da Doença Hepática, e em específico sobre o tema da CN. Foram de igual forma incluídas publicações fornecidas pelo Orientador deste estudo, entendidas pelo mesmo como pertinentes.

Tabela 2 – Critérios seleção da literatura revista.

Critérios de Inclusão	<ul style="list-style-type: none"> • Estudos experimentais, observacionais, de revisão e meta-análises • Protocolos internacionais relacionados ao tema estudo • Artigos publicados preferencialmente nos últimos 10 anos
Critérios de Exclusão	<ul style="list-style-type: none"> • Textos noutras línguas que não português ou inglês • Estudos experimentais realizados em animais • Estudos de descrição de casos isolados • Estudos com metodologia inadequada • Artigos publicados anteriormente a 10 anos antes do estudo

3.3 Preparação Histológica e Imunohistoquímica

De cada amostra de tecido dos casos de CN obtidos por ocasião da portoenterostomia e dos controlos, foram utilizados cinco secções de 5 µm de espessura. Três secções foram utilizadas para reagir com um anticorpo primário: o anticorpo monoclonal anticitoqueratina 19 humana utilizado para facilitar o estudo das estruturas biliares. Além da marcação imunohistoquímica, duas outras colorações foram empregadas: a hematoxilina-eosina e o picrossírius.

3.4 Estudo Histológico

A análise das lâminas obtidas dos 47 pacientes que constituíram a amostra foi feita por 2 experts em histopatologia hepática (CTC e JLS), em consenso e de forma cega em relação ao diagnóstico final dos lactentes, acompanhados pelo mestrando. Foi utilizado um protocolo histopatológico que será descrito na secção seguinte e que envolveu 18 variáveis, das quais 17 foram dicotômicas e 1 foi categórica. Durante o processo de análise de cada caso, além dos resultados obtidos em relação a cada variável histológica, os casos foram classificados em 2 grupos de acordo com o Padrão Histopatológico: 1) Padrão Obstrutivo e 2) Padrão Não-obstrutivo. No Padrão Não-obstrutivo de acordo com as características apresentadas foi feita a distinção, sempre que possível, em Padrão Inflamatório (Hepatítico), Padrão Ductopénico, Padrão de Esteatose (Micro ou Macrovesicular) e Padrão de Depósito. Os dados foram armazenados num Banco de Dados em formato Excel, para posterior análise estatística.

3.5 Protocolo da Análise Histopatológica

O protocolo utilizado para a análise histopatológica das biópsias obtidas é composto por 17 variáveis qualitativas e 1 variável semi-quantitativas, que serão devidamente descritas e conceituadas nesta secção.

3.5.1 Variáveis Qualitativas

- **Estruturas biliares dos espaços-porta:**
 - ✓ **Reação ductular** - considerou-se o parâmetro de reação ductular no espaço-porta a presença de ductos biliares em número aumentado, localizados no tecido hepático, no interior dos espaços porta (ducto interlobular), ao longo da interface portal-lobular e em focos no lóbulo hepático. Quando ultrapassam os limites do espaço portal, proliferam para as pontes fibrosas porta-porta e porta-centro.(16)
 - ✓ **Rarefação biliar** – consiste na diminuição da razão numérica ducto biliar interlobular/ramo arterial portal menor que 0,8 (normal 0,9 a 1,8). Para alguns autores o valor desta razão associado a rarefação biliar é 0,4. Para a análise desta relação são

indispensáveis pelo menos 6 espaços porta completos, embora o ideal seja 20 espaços porta.(17)

- **Pseudoácinos:** canalículos biliares dilatados rodeados por mais de dois hepatócitos em arranjo pseudotubular, com ou sem pigmento biliar.(16)
- **Células Gigantes:** hepatócito multinucleado que resultam da inibição mitótica do fígado jovem em crescimento por um agente prejudicial ou resultam da fusão sincicial de hepatócitos contíguos. Associa-se a distúrbios da síntese de ácidos biliares.(16)
- **Pigmento Biliar em hepatócitos e células de Kupffer:** presença de pigmento biliar, observável ao microscópio, nestas estruturas.(16)
- **Degeneração Balonizante:** edema e arredondamento dos hepatócitos, como se observa na esteatohepatite e na hepatite viral. Presume-se que seja causado por um dano da membrana, que permite o fluxo de fluido para o interior da célula, ou por um dano do citoesqueleto, levando à perda da forma celular.(16)
- **Infartes Biliares:** áreas de necrose dos hepatócitos periportais devido ao extravassamento de bilis.(16)
- **Tampões biliares em canalículos e ductulos:** presença de pigmento biliar, observável ao microscópio, nestas estruturas.(16)
- **Metaplasia Mieloide:** Corresponde à presença de hematopoiese extra-medular, sugestiva de colestase de causa intra-hepática.(18)
- **Presença de Esteatose(19):**
 - ✓ **Esteatose Macrovesicular:** quando os vacúolos lipídicos citoplasmáticos deslocam o núcleo para a periferia.
 - ✓ **Esteatose Microvesicular:** quando o núcleo permanece na posição central e se encontra rodeado por múltiplas e pequenas vesículas lipídicas.

- **Elementos estruturais dos ramos da artéria hepática:** foram avaliadas artérias musculares e arteríolas presentes no tecido hepático quanto ao aparente espessamento das túnicas média e íntima.
 - ✓ **Artéria Muscular:** Vaso de parede muscular espessa e compacta de diâmetro do lúmen igual a 4 mm e espessura da parede igual a 1 mm. A túnica íntima é constituída por um revestimento endotelial interno, uma camada de tecido conjuntivo conjuntivo (subendotélio) e uma camada externa de elastina (lâmina elástica interna). A túnica média é constituída por células musculares lisas rodeadas de componentes de matriz extracelular em quantidade variável. A túnica externa, ou adventícia, é composta por tecido conjuntivo.(20)
 - ✓ **Arteriola:** Vaso de parede muscular compacta de diâmetro do lúmen igual a 20 µm e espessura da parede igual a 15 µm. Em cortes histológicos, a espessura da parede da arteriola é aproximadamente igual ao diâmetro do lúmen. A túnica íntima possui um endotélio, um subendotélio e uma lâmina elástica interna. A túnica média normal consiste em até 5 camadas concêntricas de células musculares lisas. A túnica adventícia, ou túnica externa, contém pouca quantidade de tecido conjuntivo frouxo, unindo o vaso ao meio que o rodeia.(20)
- **Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas:** aumento do número de artérias e arteríolas observadas no espaço porta e pontes fibrosas, relacionado com o agravamento da reação ductular e com a angiogénese secundária.(21,22)
- **Pontes fibrosas porta-porta e porta-centro:** as pontes fibrosas surgem quando a fibrose, a hiperplasia vascular e a reação ductular existente no tecido hepático lesado ultrapassam os limites do espaço porta. Dependendo da sua direção podem ser porta-porta (entre 2 espaços porta) e porta-centro (entre o espaço porta e a veia centro-lobular).(9)
- **Expansão Portal:** é causada pela reação ductular, pela infiltração celular inflamatória, pelo edema e pela fibrose que se observa no tecido hepático lesado, que resulta no alargamento do espaço porta em direção ao lóbulo hepático.(9)

- **Presença de estruturas semelhantes à malformação da placa ductal:** a malformação da placa ductal foi caracterizada com a persistência de estruturas biliares de características embrionárias com morfologia irregular, dilatada, formando anel circundante a tecido mesenquimatoso com ou sem ramo de veia porta no centro.(1,23)
- **Presença de mini-placas ductais:** as mini placas-ductais são compostas por um pequeno vaso sanguíneo central, rodeado por uma pequena quantidade de mesênquima derivado do espaço de Disse e por uma camada dupla de células epiteliais do tipo biliar, formando um lumén circular, quase virtual, entre ambas as camadas.(23)
- **Aglomerados Vasculares na Região Subcapsular:** As telangiectasias subcapsulares são pequenas dilatações das artérias na área subcapsular hepática em pacientes com atresia biliar. Também surgem outros vasos que se revelam como capilares sinusoidais dilatados na área subcapsular hepática, formados por uma única camada de células endoteliais altamente permeáveis com espaços entre elas e circundadas por uma lâmina basal. São subcapsulares pois surgem sob a cápsula de Glisson, estando diretamente relacionadas com o mesênquima portal vascularizado por ramos da artéria hepática.(20,24)

3.5.2 Variáveis Semi-quantitativas

- **Score de Fibrose específico para a AB(25):**
 - ✓ **FS1 - leve:** de expansão fibrosa portal a pontes fibrosas envolvendo menos de 50% dos espaços-porta;
 - ✓ **FS2 - moderada:** pontes fibrosas em mais de 50% dos espaços-porta, sem arquitetura nodular;
 - ✓ **FS3 - intensa:** pontes fibrosas em mais de 50% espaços-porta, acompanhadas de arquitetura nodular cirrótica, e consequente cirrose.

3.6 Padrão Histopatológico

Antes de classificar uma amostra em um tipo de padrão histológico, importa ter em atenção que existem diversos achados inespecíficos relacionados à CN, independentemente de causa ou local da lesão. Esses achados são as Células Gigantes, o Pigmento em hepatócitos e CK, Degeneração balonizante, Corpúsculos de Mallory, Infartos biliares e Pseudoácinos.(26) Tendo em conta este aspeto, os casos foram classificados de acordo com seguintes padrões histopatológicos:

Padrão Obstrutivo

A maior utilidade do estudo histopatológico para o diagnóstico de AB repousa na identificação das variáveis que se associam especificamente a um quadro obstrutivo mecânico extra-hepático, onde se inclui a Reação Ductular envolvendo tanto o ducto interlobular como a interface portal lobular, a Expansão Portal por infiltrado inflamatório, edema e fibrose, os Tampões Biliares em ductulos e ductos maiores, e as Pontes Fibrosas porta-porta e porta-centro.(27) A figura 1 mostra uma representação esquemática destas alterações histopatológicas indicativas de CN obstrutiva de causa extra-hepática.

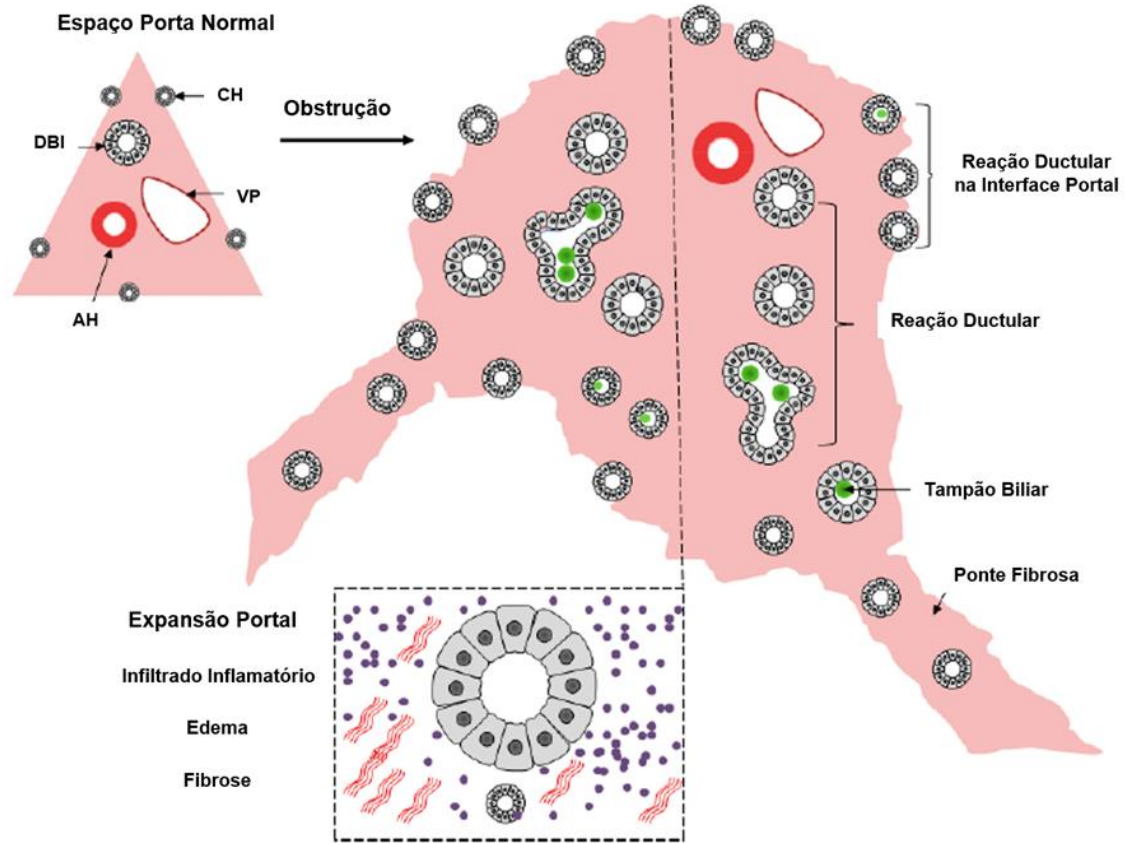


Figura 1 – Alterações histopatológicas indicativas de colestase neonatal obstrutiva de causa extra-hepática. O canto superior esquerdo da imagem mostra um espaço porta normal, onde se observa a tríade portal que inclui o ducto biliar interlobular (DBI), os ramos da veia porta (VP) e da artéria hepática (AH). Na periferia do espaço porta existem os canais de Hering (CH) que apresentam um aglomerado de células estaminais e células bipotenciais (hepatoblastos) que dão origem às linhagens de hepatócitos e colangiócitos. Nas alterações biliares de carácter obstrutivo (à direita da imagem) existe uma expansão portal causada pela reação ductular, infiltração celular inflamatória, edema e fibrose. Os ductos/dúctulos proliferados são obstruídos pelos tampões biliares formados. A fibrose, a proliferação vascular e a reação ductular ultrapassam os limites do espaço porta formando pontes fibrosas.

Padrão Inflamatório

Apresenta as características inespecíficas presentes na CN como a presença de pseudoácinos (figura 2), células gigantes, pigmentos biliares em hepatócitos e células de Kupffer e tampões biliares em canaliculos, demonstrando os efeitos histopatológicos gerais da colestase sobre as estruturas hepatobiliares. Apresenta também um infiltrado inflamatório muito característico (figura 3).

Algumas doenças incluídas no padrão inflamatório podem ser distinguidas por características particulares, como os glóbulos PAS-Positivo de A1AT nas células hepatobiliares presentes na A1ATd (figura 4). Nesta doença há uma anormal formação da molécula A1AT que é polarizada dentro do retículo endoplasmático hepatocelular, causando doença hepática. Esta molécula anormalmente polarizada não pode ser removida de forma adequada do READ e, de forma consequente acumula-se e degrada o tecido hepático por um distúrbio mitocondrial que promove a apoptose hepatocelular. (28) Além da biópsia hepática, o diagnóstico da A1ATd é realizado pela avaliação da concentração sérica de A1AT e pelos estudos de confirmação através do genótipo ou fenótipo.

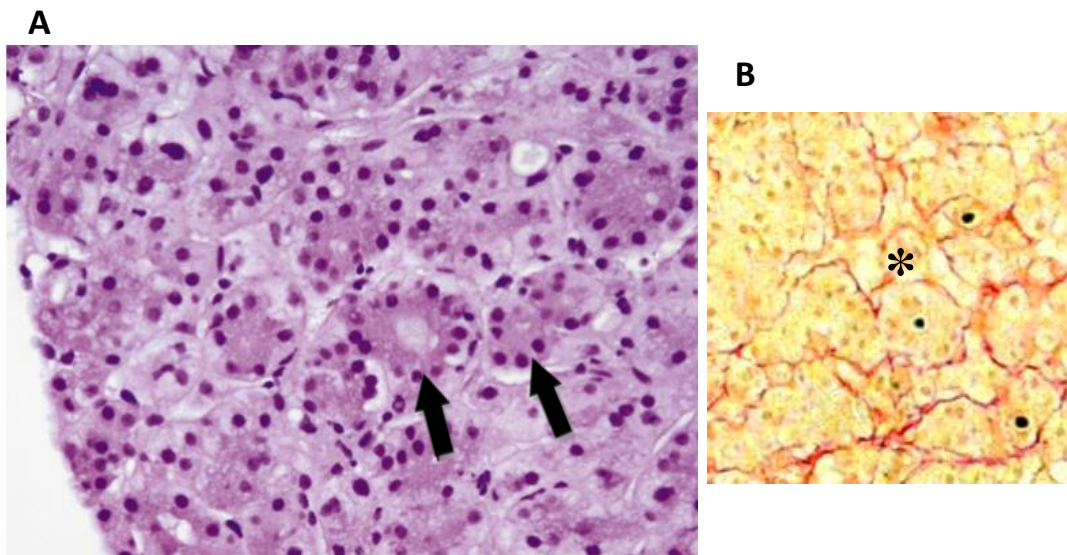


Figura 2 – Pseudoácinos. A: Pseudoácinos tipo I, sem tampão biliar (setas). Marcação: Hematoxilina-eosina (400x); B: Pseudoácino tipo II, com tampão biliar (asterisco) . Marcação: Picrossírius (400x)

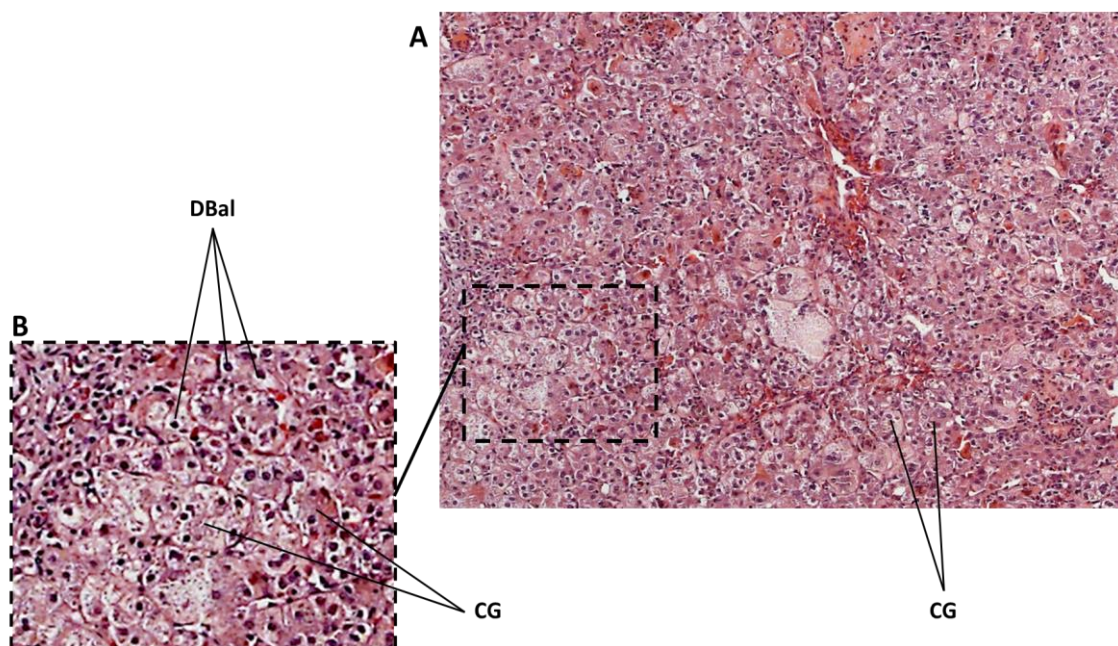


Figura 3 - Padrão inflamatório. A- Desorganização do parênquima, com presença de abundante transformação de células gigantes (CG); B- Detalhe da região especificada como retângulo na imagem A: hepatócitos arredondados com citoplasma claro, caracterizando Degeneração balonzante (Dbal); adicionalmente, transformação de células gigantes (CG). Marcação: Hematoxilina-eosina (100x).

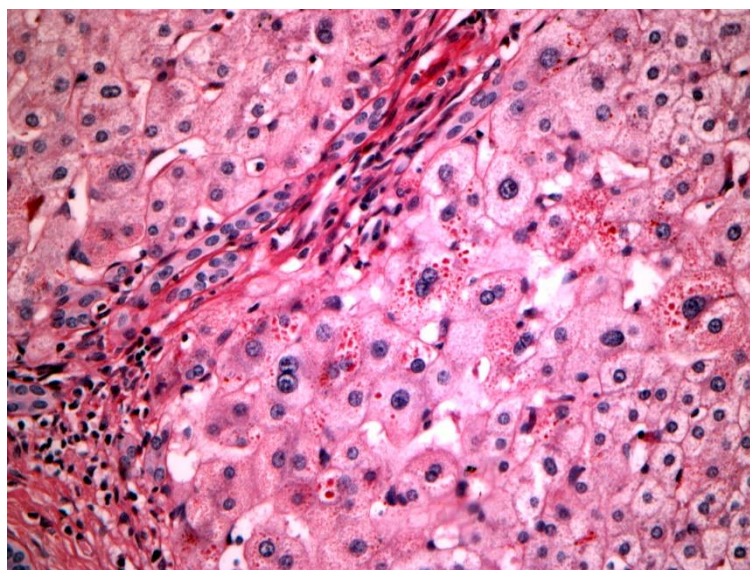


Figura 4 – Glóbulos de A1AT dentro dos hepatócitos periportais num doente com doença hepática associada a deficiência de A1AT. PAS com compensação da diástase (400x).

Padrão Ductopénico

Nas crianças, a rarefação biliar ocorre frequentemente em associação com o padrão inflamatório não-específico, e a sua identificação consiste na diminuição da razão numérica ducto biliar interlobular/ramo arterial portal menor que 0,8 (normal 0,9 a 1,8). Para alguns autores o valor desta razão associado a rarefação biliar é 0,4. Para a análise desta relação são indispensáveis pelo menos 6 espaços porta completos, embora o ideal seja 20 espaços porta.(17) Esta variável é altamente sugestiva da síndrome de Alagille, uma síndrome displásica das artérias autossómica dominante complexa que exhibe um envolvimento multissistémico com fezes hipocólicas, icterícia, prurido intenso, xantomas, desnutrição, doença óssea, face típica (testa proeminente, olhos fundos, hipertelorismo, queixo pequeno e nariz reto), malformações congénitas cardíacas, malformações renais funcionais ou anatómicas, alterações vasculares, incluindo malformações vasculares do sistema nervoso central e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor.(29) É importante considerar que muitas outras doenças colestáticas neonatais podem apresentar um padrão histológico ductopénico tais como CN associada a infeções (CMV, sarampo, sífilis, hepatite B), doenças metabólicas (A1ATd, fibrose cística, síndrome de Zellweger, PFIC, hipopituitarismo), alterações cromossómicas, hepatite neonatal idiopática e colestase induzida por drogas. Este padrão também pode aparecer em bebés prematuros sem doença hepática.(23,30)

Padrão de Esteatose

A esteatose hepática surge devido à acumulação hepatocelular de lipídios que resulta do aumento da libertação de ácidos gordos, da diminuição da oxidação hepática destes ácidos gordos, da alteração do metabolismo das lipoproteínas e do armazenamento lisossomal. O distúrbio metabólico que induz a esteatose pode ser produzido por várias doenças caracterizadas por CN, como a colestase associada à nutrição parenteral total, associada a fármacos, associada a distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono, como galactosemia e intolerância hereditária à frutose, e associadas a distúrbios do metabolismo dos aminoácidos, como a tirosinemia neonatal.(31) A esteatose pode apresentar um padrão macrovesicular (figura 5), microvesicular (figura 6) ou misto.(19)

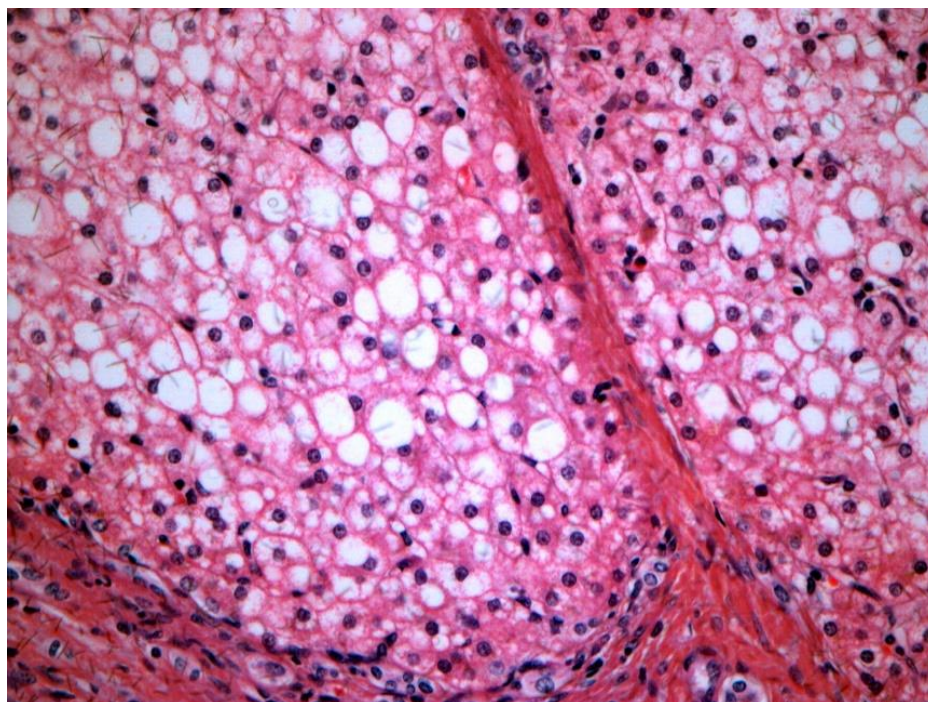


Figura 5 – Esteatose macrovesicular num doente com tirosinemia. Observa-se a presença de pontes fibrosas associadas. Marcação: Hematoxilina-eosina (200x).

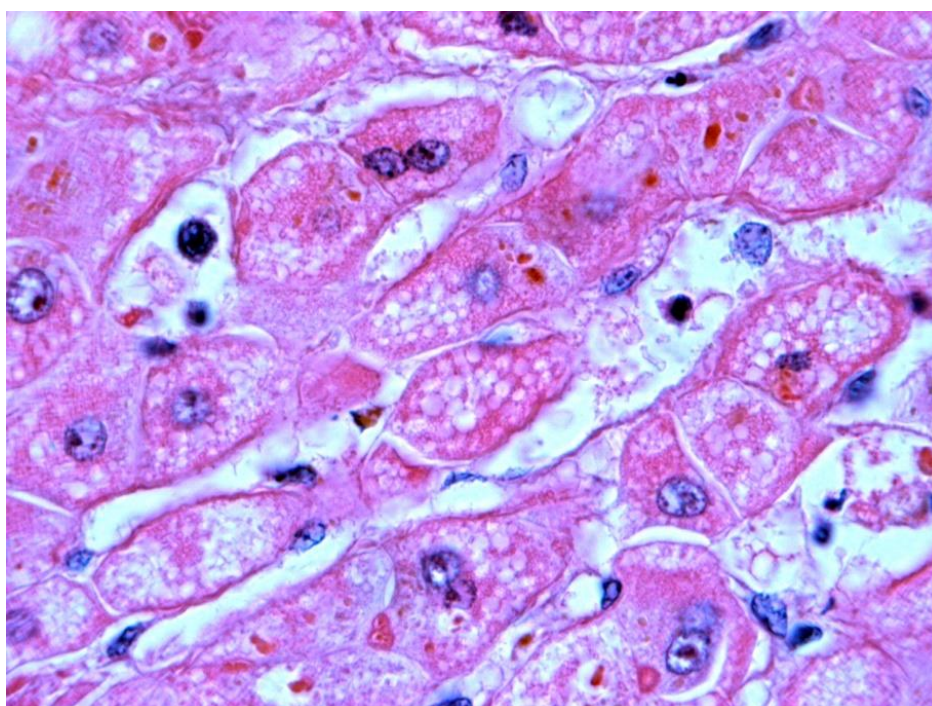


Figura 6 – Esteatose microvesicular numa criança com deficiência mitocondrial da cadeia respiratória. Marcação: Hematoxilina-eosina (200x).

Padrão de Depósito

A CN pode ser causada por doenças de depósito que afetam o fígado, bem como outros sistemas do corpo, e mostram algumas características histopatológicas específicas que podem ajudar a diagnosticar a entidade responsável (tabela 3).

Tabela 3 - Achados histopatológicos do fígado na apresentação de doenças de armazenamento que causam colestase neonatal. Baseado em Jevon et al.(19)

Doença	Achado Histopatológico
Mucopolissacaridose	Formação de vacúolos e edema nas CK e hepatócitos dentro do lóbulo com distribuição zonal (> periportal; <pericentral). Mucopolissacarídeos demonstram várias manchas (ex. ferro coloidal).
Doença de Gaucher	CK aumentadas, macrófagos em sinusoides e espaços porta com o núcleo excêntrico e citoplasma eosinofílico e estriado (resultado da acumulação de esfingolípídeos). Hepatócitos não são envolvidos. Fibrose portal e lobular.
Niemann-Pick	
Tipo C	Transformação de células gigantes (padrão hepático).
Tipo A e B	Quantidades crescentes de células reticuloendoteliais com gotículas citoplasmáticas (incomum nos bebês). Formação de vacúolos hepatocelulares. Achados inespecíficos de colestase, e distorção da arquitetura lobular com fibrose portal e septal.
Mucolipidose	Formação de vacúolos de fibrócitos nas vias portais e hepatócitos. Histiócitos espumosos. Coloração de vacúolo para lipídios neutros.
Sialidose	Formação de vacúolos nas CK e hepatócitos. Vacúolos com coloração PAS-positiva e resistente a diástase. Fibrose portal marcada.
Doença de Wolman e Doença de Armazenamento de Ester de Colesterol	Formação de vacúolos nas CK e hepatócitos. Histiócitos espumosos localizados nas áreas portal e periportal. Fibrose portal e periportal, com cirrose inicial. Na Doença de Wolman há reação ductular.
Doença de Armazenamento de Glicogénio do tipo IV	Fibrose e cirrose precoce. Inclusões citoplasmáticas grandes, claras e eosinofílicas circundadas por um halo na maioria dos hepatócitos (> zona periportal). Inclusões resistentes à diástase que podem manchar com iodo de Lugol.

3.7 Análise Estatística

3.7.1 Definição de variável e atribuição de modelo de análise de regressão logística

As alterações histopatológicas analisadas em pacientes pediátricos com CN foram divididas em 32 fatores relacionados, incluindo reação ductular (no tecido hepático, nos espaços porta, na interface portal-lobular, em focos no lóbulo hepático, em pontes fibrosas porta-porta, e em pontes fibrosas porta-centro), presença de estruturas semelhantes à malformação de placa ductal, mini-placas ductais, pontes fibrosas porta-porta, pontes fibrosas porta-centro, nódulos cirróticos, expansão portal, plugs biliares em canalículos, plugs biliares em ductulos, plugs biliares em ductos maiores, focos de metaplasia mieloide, pseudoácinos, células gigantes, pigmento biliar em hepatócitos, pigmento biliar em CK, degeneração balonizante, infartos biliares, corpúsculo de Mallory, esteatose macrovesicular, esteatose microvesicular necrose hepatocelular grave, rarefação biliar, inclusões virais, artérias/arteríolas com aparente espessamento de túnica média, proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas, score de fibrose e padrão histológico obstrutivo. Os nomes de variáveis e atribuições para os fatores histopatológico em tecido de fígado de pacientes com CN são mostrados na tabela 4.

3.7.2 Método estatístico

O software estatístico SPSS27.0 foi usado para a análise estatística. Métodos estatísticos descritivos foram utilizados para contagem dos dados, os quais foram expressos em percentagens e razões constituintes. Os testes do qui-quadrado de Pearson e teste exato de Fischer foram realizados para encontrar as associações entre o diagnóstico dos pacientes pediátricos com CN e cada uma das alterações histológicas observadas no tecido hepático destes pacientes, incluídas neste estudo. Em seguida, recorreu-se a regressão logística para se encontrar um modelo múltiplo entre o diagnóstico dos pacientes e as alterações histopatológicas que se mostraram significativamente associadas.

Tabela 4 - Nomes e atribuições de variáveis de fatores histopatológicos para o diagnóstico em pacientes com colestase neonatal

Fatores histopatológicos	Atribuições
Reação ductular no tecido hepático	0 – ausente; 1- presente
Reação ductular nos espaços porta	0 – ausente; 1- presente
Reação ductular na interface portal-lobular	0 – ausente; 1- presente
Reação ductular nas pontes fibrosas porta-porta	0 – ausente; 1- presente
Estruturas semelhantes à malformação de placa ductal	0 – ausente; 1- presente
Mini placa ductal	0 – ausente; 1- presente
Pontes fibrosas porta-porta	0 – ausente; 1- presente
Expansão portal	0 – ausente; 1- presente
Plugs biliares em ductulos	0 – ausente; 1- presente
Pigmento biliar em hepatócito	0 – ausente; 1- presente
Artéria/arteríola com aparente espessamento de túnica média	0 – ausente; 1- presente
Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas	0 – ausente; 1- presente
Agregados vasculares subcapsular	0 – ausente; 1- presente
Padrão histológico obstrutivo	0 – ausente; 1- presente
Escore de fibrose	0 – sem fibrose; 1 – leve; 2 – moderada; 3 - cirrose

4. Resultados

4.1 Caracterização da amostra

Foram avaliados 47 pacientes portadores de CN de causa intra- e extra-hepática. A associação do tipo de colestase às várias patologias que constituíram esta amostra está representada na tabela 5.

A tabela 6 mostra o número de pacientes portadores de cada patologia em específico que constituiu a nossa amostra, bem como a relação destas patologias com o tipo de biópsia utilizado.

Tabela 5 – Classificação do tipo de colestase das diferentes patologias de colestase neonatal que incluíram a amostra.

Tipo de Colestase	Diagnóstico
Extra-hepática	AB isolada
Extra-hepática	BASM
Intra-hepática	Cirrose
Extra-hepática	Cisto de colédoco
Intra-hepática	Colestase neonatal multifatorial ou transitória
Intra-hepática	Colestase neonatal idiopática
Intra-hepática	Colestase transitória do recém-nascido
Intra-hepática	Colestase associada a Nutrição Parentérica
Intra-hepática	Deficiência de Alfa-1-antitripsina
Intra-hepática	Doença hepática aloimune gestacional
Intra-hepática	Hepatite neonatal associada à estomatocitose hereditária desidratada
Intra-hepática	Hepatite neonatal
Intra-hepática	Sífilis congênita
Intra-hepática	Síndrome de Alagille
Intra-hepática	Colestase neonatal + Trombose da veia porta
Intra-hepática	Pan-hipopituítarismo

Tabela 6 - Características dos grupos de pacientes quanto à etiologia da colestase neonatal e quanto ao tipo de biópsia.

Diagnóstico	Nº e % de pacientes	Tipo de Biópsia n (%)	
		Cunha	Percutânea
AB isolada	19 (40.42)	16 (84.2)	3 (15.8)
BASM	1 (2.13)	1 (100.0)	
Cirrose	3 (6.39)		3 (100.0)
Cisto de colédoco	2 (4.25)	2 (100.0)	
Colestase neonatal multifatorial ou transitória	3 (6.39)	1 (33.3)	2 (66.7)
Colestase neonatal idiopática	2 (4.25)	2 (100.0)	
Colestase transitória do recém-nascido	3 (6.39)		3 (100.0)
Colestase Associada a Nutrição Parentérica	1 (2.13)	1 (100.0)	
Deficiência de Alfa-1-antitripsina	3 (6.39)	2 (66.7)	1 (33.3)
Doença hepática aloimune gestacional	2 (4.25)	1 (50.0)	1 (50.0)
Hepatite neonatal associada à estomatocitose hereditária	1 (2.13)		1 (100.0)
Hepatite neonatal	1 (2.13)		1 (100.0)
Pan-hipopituítarismo	2 (4.25)		2 (100.0)
Sífilis congênita	2 (4.25)		2 (100.0)
Síndrome de Alagille	1 (2.13)		1 (100.0)
Trombose da veia porta	1 (2.13)	1 (100.0)	
Total	47 (100.0)	27 (57.4)	20 (42.6)

4.2 Resultado teste do qui-quadrado de Pearson e teste exato de Fisher

A tabela 7 mostra os resultados da análise do teste do qui-quadrado de Pearson e o teste exato de Fisher nas frequências de observações cada alterações histopatológicas nos de tecido de hepático de paciente pediátricos com CN (n=47). Foram retirados da análise os padrões histopatológicos Pigmento biliar em ductos maiores, Infarto biliar, Corpúsculo de Mallory, Esteatose microvesicular, e Inclusões virais, por apresentarem frequência igual a zero. A partir dos resultados estatísticos, os padrões histopatológicos cuja frequência foram diferentes estatisticamente entre as categorias de diagnóstico foram reação ductular no tecido hepático ($p=0.01$), reação ductular em espaços porta ($p<0.01$), reação ductular em interface portal-lobular ($p<0.01$), reação ductular em pontes fibrosas porta-porta ($p<0.01$), estruturas semelhantes à malformação de placa ductal ($p=0.014$) (figura 7), mini placas ductais ($p=0.043$), pontes fibrosas porta-porta ($p<0.01$), expansão portal ($p<0.01$) (figura 8), plugs biliares em ductulos ($p=0.02$) (figura 8), pigmento biliar em hepatócito ($p<0.01$), artérias/arteríolas com aparente espessamento de túnica média ($p=0.015$), proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas ($p<0.01$) (figura 9), aglomerados vasculares subcapsular (0.014) (figura 10) e padrão histológico obstrutivo ($p<0.01$) (figura 8).

O resíduo padronizado das frequências de observação dos padrões histopatológicos mostra o peso de cada frequência na determinação do valor significativo no teste do qui-quadrado. Todas as alterações histopatológicas significativas na análise estatística para a distinção do diagnóstico foram observadas com maior frequência em pacientes cujo diagnóstico foi AB, com valores de resíduo padronizado positivo nas observações “presente” (tabela 8).

Os padrões histológicos Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas e Padrão histológico obstrutivo apresentaram os maiores valores de χ^2 , 16.127 e 15.572 respectivamente, e menores valores de p para o teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher. Estes padrões e a presença de Pigmento biliar em hepatócitos apresentam valores de resíduo padronizado ≥ 2.0 na observação de presença da alteração em tecido hepático de pacientes diagnosticados com AB.

Tabela 7 – Análise estatística da frequência de observação dos padrões histopatológicos entre pacientes diagnosticados com atresia biliar e outras colestatas neonatais.

Padrões histopatológicos	χ^2 de Pearson	p-value	Teste Exato de Fisher^b
Reação ductular no tecido hepático	10.260	0.01*	0.01*
Reação ductular em espaços porta	13.015	<0.001**	<0.001**
Reação ductular em interface portal-lobular	9.947	0.002*	0.002*
Reação ductular em focos no lóbulo	0.864	0.353	0.436
Reação ductular em pontes fibrosas porta-porta	8.065	0.005*	0.008*
Reação ductular em pontes fibrosas porta-centro	0.011	0.916	1.0
Estruturas semelhantes à malformação de placa ductal	7.232	0.007*	0.014*
Mini placas ductais	4.570	0.033*	0.043*
Pontes fibrosas porta-porta	10.091	0.001*	0.003*
Pontes fibrosas porta-centro	0.358	0.549	0.678
Nódulo cirrótico	1.206	0.272	0.306
Expansão portal	8.991	0.003*	0.003*
Plugs biliares nos canaliculos	2.525	0.112	0.179
Plugs biliares em ductulos	6.300	0.012*	0.019*
Focos de metaplasia mioide	0.911	0.340	0.388
Pseudoácinos	0.911	0.340	0.388
Células Gigantes	1.320	0.251	0.374
Pigmento biliar em hepatócito	13.125	<0.001**	<0.001**
Pigmento biliar em células de Kupffer	0.627	0.429	0.579
Degeneração balonizante	0.035	0.851	1.00
Esteatose macrovesicular	1.687	0.194	0.495
Necrose hepatocelular grave	1.687	0.194	0.495
Rarefação biliar	0.167	0.683	1.0
Artérias/arteríolas com aparente espessamento de túnica média	7.152	0.007*	0.015*
Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas	16.127	<0.001**	<0.001**
Score de fibrose	2.953	0.399	-
Agregados vasculares subcapsular^c	7.556	0.006*	0.015*
Padrão histológico obstrutivo	15.572	<0.001**	<0.001**

a Os padrões histológicos Pigmento biliar em ductos maiores, Infarto biliar, Corpúsculo de Mallory, Esteatose microvesicular, e Inclusões virais foram excluídos da análise por apresentarem frequência igual a zero.

b Valores significantes para $p < 0.05$. (*) valores de p entre 0.05 e 0.001 (**) valores de $p < 0.001$.

c Apenas 34 amostras de fígado tinham a estrutura capsular presente.

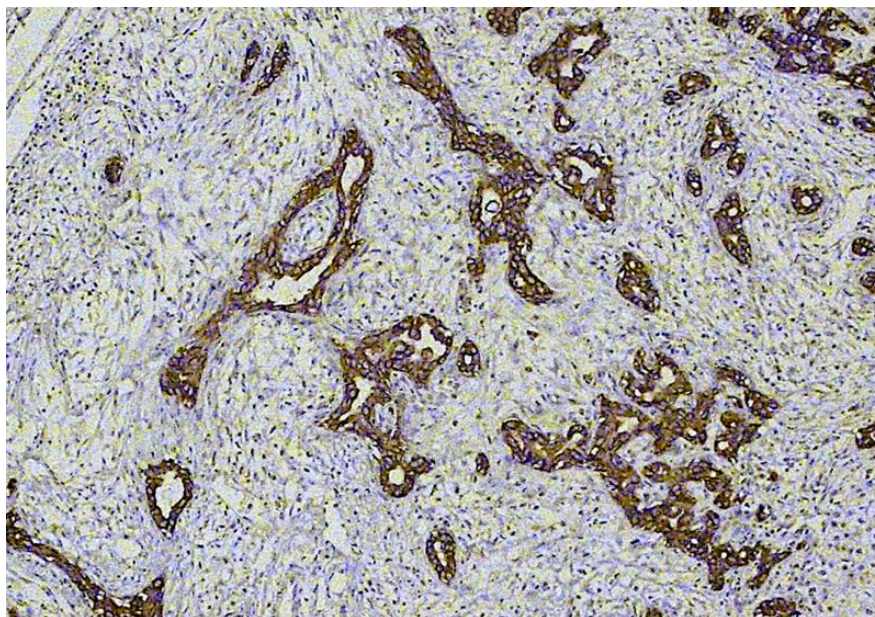


Figura 7 - Reação ductular com características semelhantes a malformação de placa ductal em paciente com atresia biliar. Marcação imunohistoquímica: CK19 (100x).

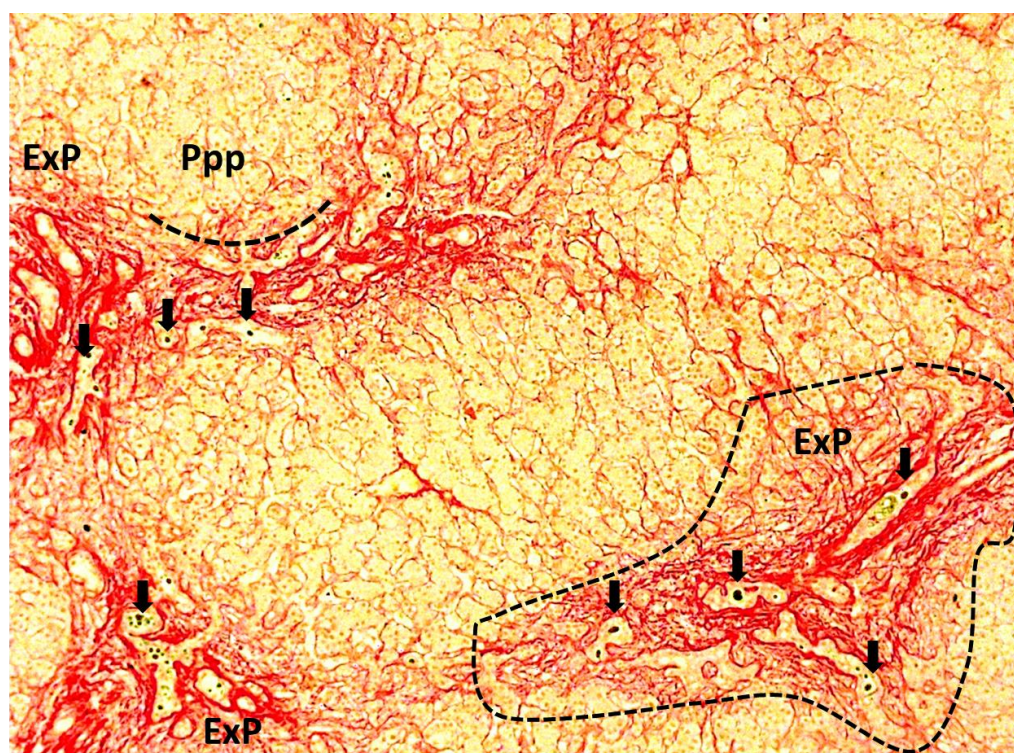


Figura 8 - Padrão Obstrutivo. Exp: expansão portal; Ppp: Ponte porta-porta; Setas: abundantes tampões biliares em ductulos proliferados; Área tracejada: reação ductular. Marcação: Picrosirius (100x.)

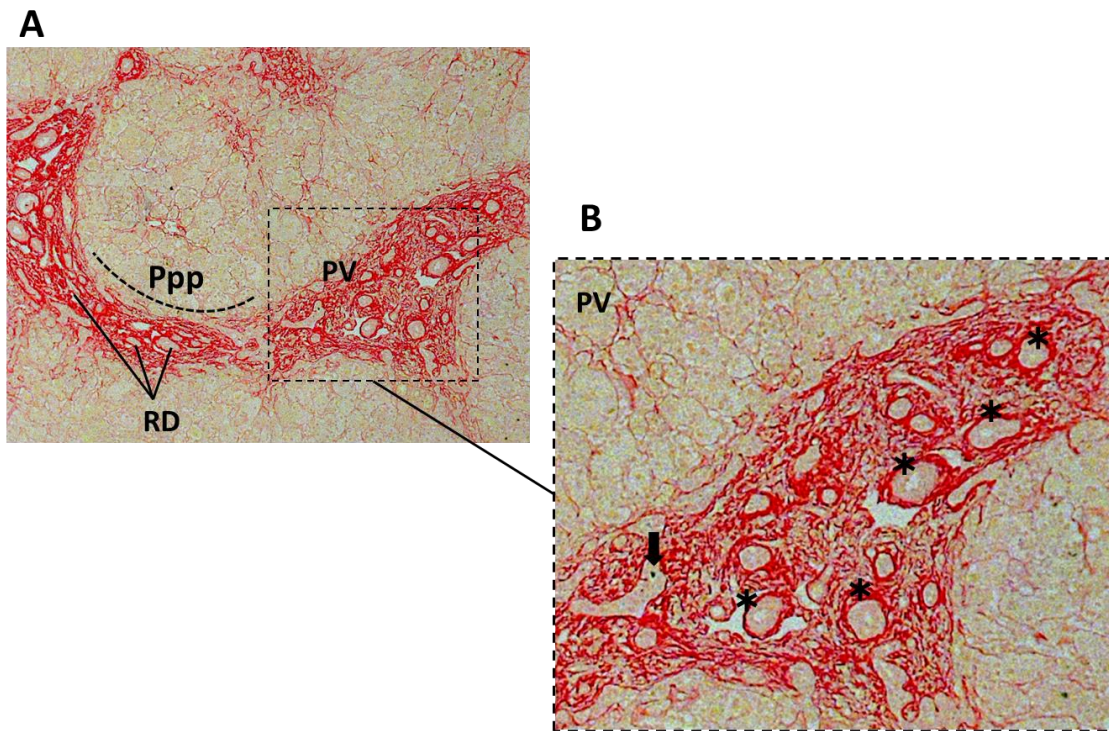


Figura 9 - Padrão obstrutivo com evidente proliferação vascular no espaço porta e ponte porta-porta. A: Espaços porta ligados por ponte fibrosa porta-porta (Ppp) apresentando abundante reação ductular (RD); no espaço porta, presença de proliferação vascular (PV); B: Detalhe do retângulo da figura A, demonstrando a presença de aglomerados vasculares, principalmente arteriolas. Arteriolas apresentam túnica média proeminente (asterisco). Seta: tampão biliar em duto. Marcação: Picrosirius (100x).

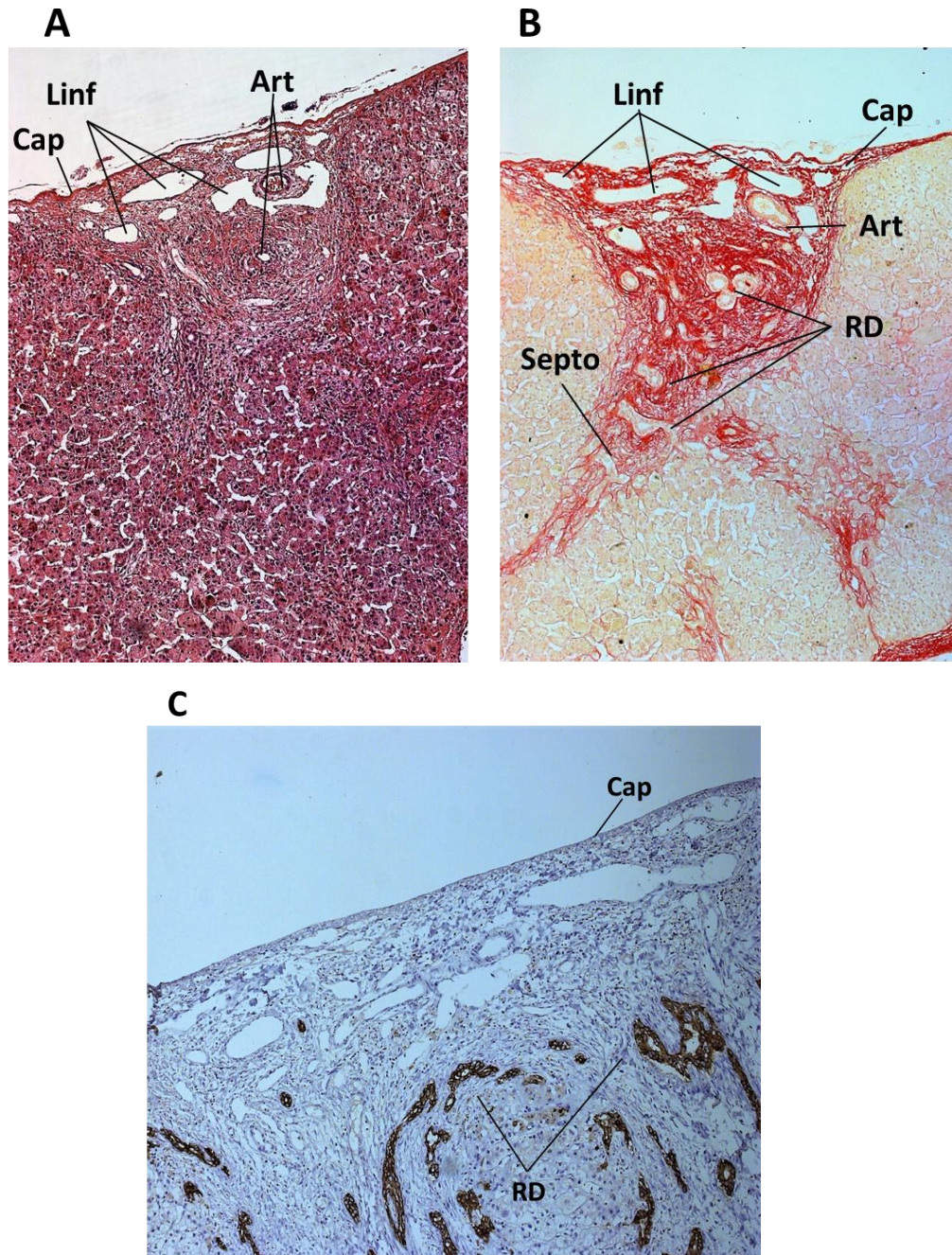


Figura 10 - Aglomerados vasculares subcapsulares. A: Aglomerado vascular sob a cápsula de Glisson (Cap), formado preferencialmente de linfáticos (Linf), além de arteríolas (Art). Marcação: Hematoxilina-eosina (100x); B: Espaço porta subcapsular com aglomerado vascular composto principalmente de linfáticos (Linf), além de arteríolas (Art). Observe a reação ductular portal, estendendo-se por um septo fibroso. Marcação: picrossírius (100x); C: Aglomerado subcapsular, apresentando reação ductular (RD) na interface entre o estroma fibroso que engloba os vasos e o parênquima hepático. Marcação: CK19 (100x).

Tabela 8 – Resíduo padronizado das alterações histopatológicas que são significativas no teste do qui-quadrado de Pearson e no teste exato de Fisher.

Padrão histopatológicos	Condição	Diagnóstico ^a	
		AB	Não AB
Reação ductular no tecido hepático	Presente	1.1	-1.0
	Ausente	-2.1	1.9
Reação ductular em espaços porta	Presente	1.4	-1.2
	Ausente	-2.3	2.1
Reação ductular em interface portal-lobular	Presente	1.2	-1.1
	Ausente	-2.0	1.8
Reação ductular em pontes fibrosas porta-porta	Presente	1.4	-1.3
	Ausente	-1.5	1.4
Estruturas semelhantes à malformação de placa ductal	Presente	1.6	-1.4
	Ausente	-1.2	1.1
Mini placas ductais	Presente	1.4	-1.3
	Ausente	-0.8	0.7
Pontes fibrosas porta-porta	Presente	1.6	-1.4
	Ausente	-1.8	1.6
Expansão portal	Presente	0.6	-0.5
	Ausente	-1.0	0.9
Plugs biliares em ductulos	Presente	1.3	-1.2
	Ausente	-1.3	1.2
Pigmento biliar em hepatócito	Presente	2.2	-2.0
	Ausente	-1.6	1.4
Artérias/arteríolas com aparente espessamento de túnica média	Presente	1.8	-1.6
	Ausente	-0.8	0.7
Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas	Presente	2.0	-1.8
	Ausente	-2.2	1.9
Agregados vasculares subcapsular ^b	Presente	1.5	-1.3
	Ausente	-1.4	1.2
Padrão histológico obstrutivo	Presente	2.1	-1.9
	Ausente	-2.0	1.8

a Valores positivos indicam que as alterações observadas foram maiores que as esperadas, valores negativos, que as alterações observadas são menores do que as esperadas.

b Apenas 34 amostras de fígado tinham a estrutura capsular presente.

4.3 Resultado da análise de regressão logística binária

As alterações histopatológicas Pontes fibrosas porta-porta ($p < 0.01$), Pigmento biliar em hepatócitos ($p < 0.01$), Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas ($p < 0.001$), Aglomerados vasculares subcapsular (< 0.01) e Padrão histológico obstrutivo ($p < 0.001$) são fatores de risco no diagnóstico de AB (tabela 9). Entretanto, a presença de aglomerados vasculares subcapsular foi avaliada em somente 34 amostras de fígado que possuíam a estrutura capsular íntegra.

De acordo com a tabela 9, a razão de chance de ocorrência de presença de pontes fibrosas porta-porta 5.3% ($p < 0.01$), presença de pigmentos biliares em hepatócitos 12.5% ($p < 0.01$), presença de proliferação de vasos no espaço porta 16.3% ($p < 0.001$), presença de aglomerados subcapsulares 7.8% ($p < 0.01$) e presença de padrão histológico obstrutivo 14.2% ($p < 0.001$), em pacientes diagnosticados com AB.

O modelo logístico binário para predição de diagnóstico foi montado com os fatores de risco Padrão histológico obstrutivo e Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas, uma vez que ambas alterações não perdem a significância de contribuição para o modelo quando adicionadas a este (tabela 10). O modelo contendo as alterações Padrão obstrutivo e Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas, foi significativo [$\chi^2(2) = 21.233$; $p < .001$; $R^2_{\text{Nagelkerke}} = 0.487$].

O Padrão obstrutivo é um fator de risco significante (OR=6.498; $p=0.05$, IC 95%=1.002-28.070), em conjunto com a Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas (OR=5.303; $p=0.03$; IC 95% = 1.172-37.146) (tabela 10) no modelo preditor de diagnóstico de AB com 76.6% de acerto.

Tabela 9 – Resultado de predição de diagnóstico em pacientes com colestase neonatal por análise de regressão logística binária.

Padrão histopatológico	Coefficiente	Desvio padrão	Wald	Odds ratio	CI 95% para Odds ratio	P-value
Pontes fibrosas porta-porta	2.083	0.692	9.062	8.028	2.068-31.157	0.003*
Pigmento biliar em hepatócito	2.522	0.761	10.994	12.458	2.805-55.336	0.001*
Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas	2.790	0.764	13.323	16.286	3.640-72.833	<0.001**
Aglomerados vasculares subcapsular^a	2.054	0.781	6.914	7.800	1687-36.062	0.009*
Padrão histológico obstrutivo	2.651	0.725	13.373	14.167	3.422-58.656	<0.001**

a Apenas 34 amostras de fígado tinham a estrutura capsular presente.

b Valores significantes para $p < 0.05$. (*) valores de p entre 0.05 e 0.001 (**) valores de $p < 0.001$.

Tabela 10 - Resultado de predição de diagnóstico em pacientes com colestase neonatal por análise de regressão logística binária, com 2 padrões.

Padrão histopatológico	Coefficiente	Desvio padrão	Wald	Odds ratio	CI 95% para Odds ratio	P-value
Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas	1.887	0.882	3.850	5.303	1.172-37.146	0.03*
Padrão histológico obstrutivo	1.668	0.850	4.579	6.598	1.002-28.070	0.05*

a Valores significantes para $p < 0.05$. (*) valores de p entre 0.05 e 0.001 (**) valores de $p < 0.001$.

4.4 Resultado da Análise da Curva ROC

Foi realizado uma análise de Curva ROC com o objetivo de avaliar a sensibilidade e a especificidade dos fatores de risco que compõe o modelo de regressão logística binária para o diagnóstico de pacientes com AB. Fazem parte desta análise 21 pacientes diagnosticados com AB e 26 pacientes diagnosticados com outras causas de CN.

Os resultados demonstram uma curva estatisticamente significativa (AUC = 0.840, EP = 0.060, $p < 0.001$. 95% CI = 0.721 – 0.958), o que significa que, ao escolher pacientes de forma aleatória, 84.0% dos casos diagnosticados com AB apresentam maior frequência dos fatores de risco nas amostras de tecido de fígado (figura 11).

O ponto de corte que maximizou a sensibilidade e a especificidade foi o valor positivo maior ou igual à 0.396 no modelo de regressão binário, com sensibilidade de 85.7% e especificidade de 73.1% (tabela 11). O modelo de regressão logística binária apresentou maior capacidade de classificar corretamente pacientes que tem como diagnóstico AB (85.7% dos casos) quando comparado com os pacientes diagnosticados com outras causas de CN (73.1%).

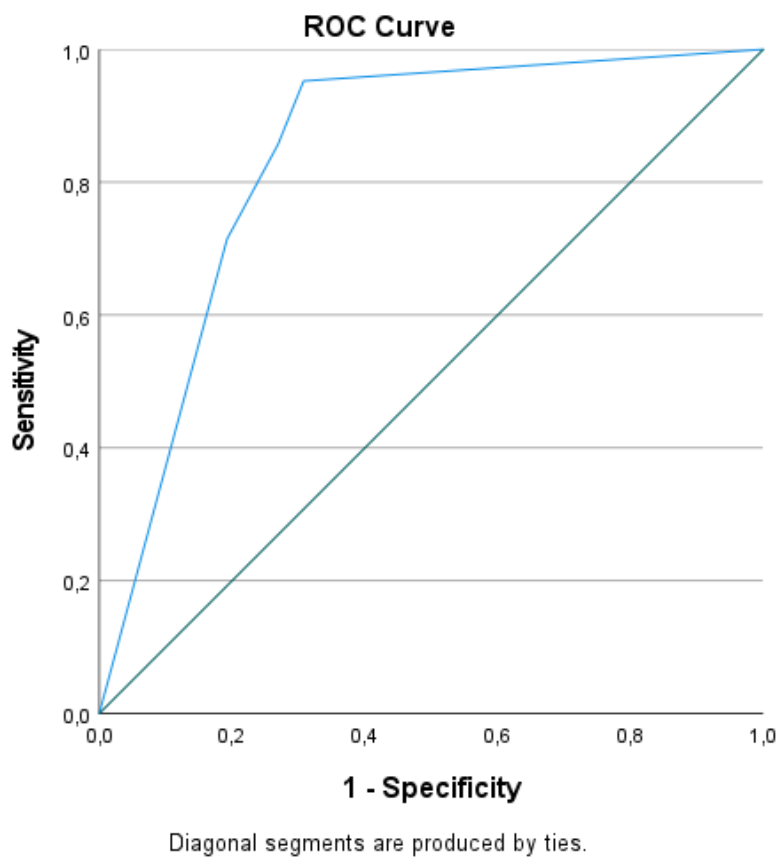


Figura 11 - Curva ROC que avalia a sensibilidade e a especificidade dos fatores de risco para o diagnóstico de Atresia Biliar (Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas e Padrão histológico obstrutivo).

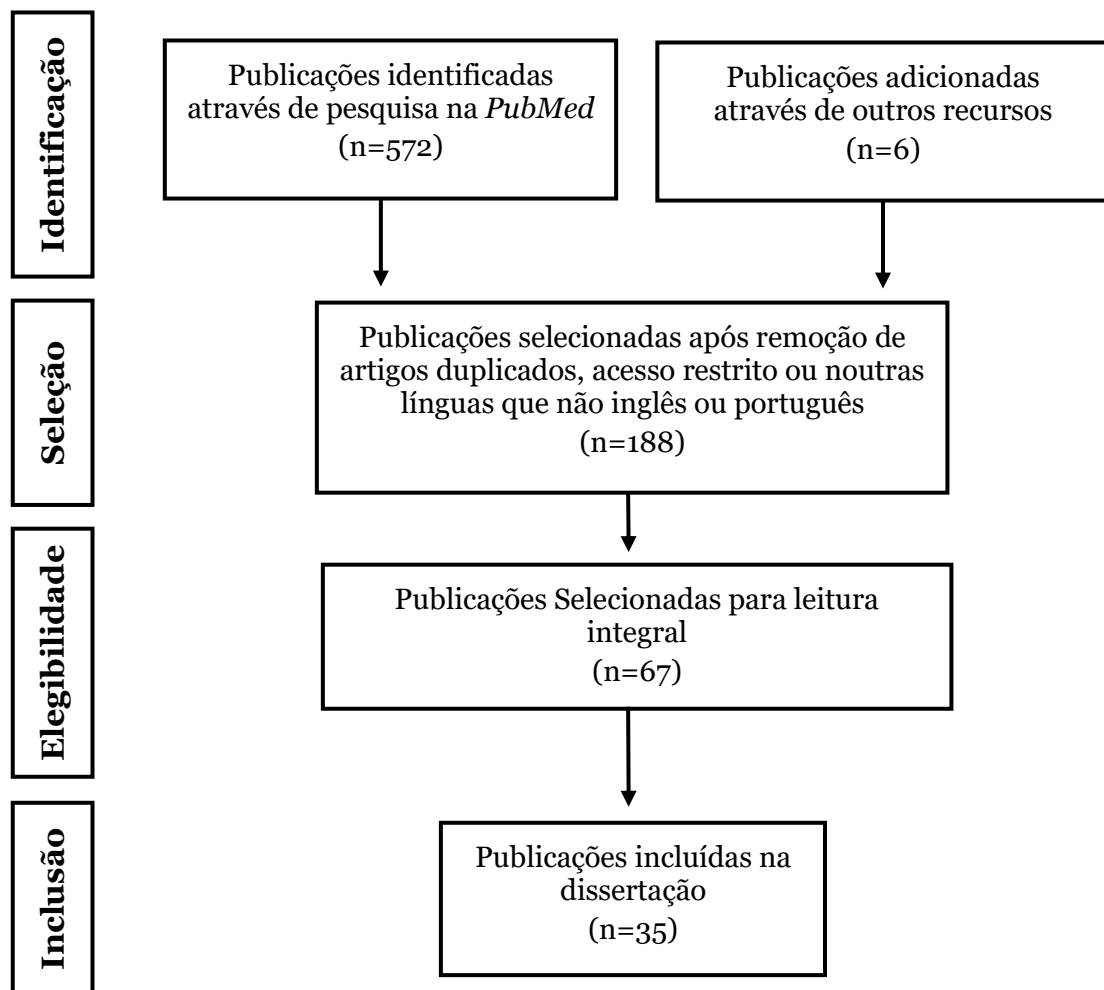
Tabela 11 - Coordenadas da Curva Roc.

Positivo se maior ou igual a	Sensibilidade	1-Especificidade
0.000	1.000	1.000
0.234	0.952	0.308
0.396	0.857	0.269
0.608	0.714	0.192
1.000	0.000	0.000

4.5 Resultado da Pesquisa Bibliográfica

Recorrendo ao motor de busca *PubMed*, fez-se a pesquisa de artigos científicos através da sequência apresentada nos Materiais e Métodos. Os artigos obtidos foram analisados tendo em conta os respetivos critérios de inclusão e exclusão. Após esta cuidada análise, foram incluídas na dissertação 35 publicações sobre a temática da CN (figura 12).

Figura 12 – Fluxograma para a seleção da literatura revista.



5. Discussão

O diagnóstico diferencial entre as causas extra e intra-hepáticas da CN continua a ser um desafio urgente, não só pelos riscos de uma AB não ser diagnosticada a tempo de ser tratada, o que implica um agravamento do prognóstico da doença, mas também pela necessidade de identificação das causas intra-hepáticas que exigem tratamentos médicos específicos precoces, quando disponíveis. A portoenterostomia é o tratamento paliativo da AB e, embora não cure a doença, possibilita um aumento do tempo de sobrevivência do fígado nativo, com o objetivo de que o tratamento definitivo, o transplante hepático, ocorra em idade mais tardia, que implica melhores resultados cirúrgicos. Apresenta melhor prognóstico quando é realizado antes das 8 semanas de vida. Foi relatado que o fluxo da biliar é restabelecido em aproximadamente 80% dos bebês que foram encaminhados para cirurgia dentro de 60 dias após o nascimento.(18,23) Por sua vez, a ausência de tratamento no caso de AB leva a insuficiência hepática em um período de 2 anos, resultando em óbito ou necessidade de transplante hepático. Desta forma, a biópsia percutânea em doentes com CN é valiosa para a abordagem diagnóstica da CN, e as variáveis a ser estudadas devem ser cuidadosamente selecionadas.(18)

As diretrizes da “*North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*” para a Avaliação da CN no recém-nascido recomendam que se deve fazer uma biópsia hepática na maioria dos bebês com colestase. De forma imediata, esta biópsia deve ser interpretada por um patologista com experiência em doença hepática pediátrica. É recomendada a realização de uma biópsia hepática percutânea antes de se realizar uma laparotomia exploratória associada a colangiografia transoperatória, que irá confirmar o diagnóstico de AB. Se a biópsia for realizada no início do curso da doença (antes das 6 semanas de idade), esta deve ser repetida se os resultados forem ambíguos.(30)

Neste estudo, procuramos identificar quais as características histopatológicas que melhor caracterizam a AB e que dessa forma nos permitam fazer uma distinção adequada entre colestase intra- e extra-hepática. Todas as biópsias hepáticas dos 47 pacientes foram analisadas tendo em conta um conjunto características histológicas bem definidas acoplados a um score do grau de fibrose.(25)

Da análise das biópsias dos 47 pacientes com CN incluídos na análise, concluímos que a acurácia da biópsia hepática foi de 76,6%. Dos 21 pacientes com AB, o modelo classificou 15 pacientes com o diagnóstico correto, e dos 26 pacientes não-AB, o modelo classificou 21 pacientes forma correta. O modelo que utilizamos foi capaz de detetar os pacientes com AB com uma sensibilidade de 71,4% e com uma especificidade de 80,8%. Este grau de acurácia, de sensibilidade e de especificidade é inferior à percentagem demonstrada em estudo anteriores(9,18,32) mas apresenta uma maior especificidade relativamente ao modelo utilizado por *Zerbini et al* (acurácia de 90,5%, sensibilidade de 100% e especificidade de 75,9%).(15) Acreditamos que a menor acurácia no diagnóstico de AB se deve ao facto de, a amostra por nós utilizada, por ser uma amostra de conveniência, ter sido inferior à amostra utilizada nos estudos anteriores, e ao facto de existir um grande número de variáveis histopatológicas atribuídas à AB, bem como uma grande sobreposição entre as variáveis histopatológicas intra- e extra-hepáticas. Por outro lado, tendo em vista que a análise de *Zerbini et al* se baseou principalmente nas características do “Padrão Obstrutivo” previamente descrito, a maior especificidade observada em nosso estudo pode decorrer de termos considerado uma variável adicional que demonstrou elevada especificidade, a proliferação de vasos em espaços porta e septos.(15)

Por exemplo, o estudo desenvolvido por *Santos et al*(27) indica que os melhores preditores da AB são a reação ductular portal e periportal, a expansão portal, a colestase portal e em neodúctulos e as pontes porta-porta, semelhante ao mencionado por *Zerbini et al*.(15) Por sua vez, *Rastogi et al* definiu a reação ductular, os tampões biliares em ductos e em dúctulos, e a fibrose portal como os melhores indicadores de AB.(18) Em 2016, um estudo multicêntrico realizado nos Estados Unidos da América por *Russo et al*(9) confirmou os resultados obtidos por Rastogi. *Lee et al* define a reação ductular como o melhor indicador, mas os tampões biliares em dúctulos e as pontes fibrosas porta-porta como variáveis histopatológicas inconsistentes no diagnóstico de AB.(32)

Este estudo revelou que as variáveis histopatológicas Reação Ductular em espaço porta ($p < 0.001$), Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas ($p < 0.001$), e Padrão histológico obstrutivo ($p < 0.001$) são os melhores indicadores de AB. Ou seja, demonstrou que a associação entre o diagnóstico por patologista de um padrão histológico obstrutivo e a presença de um número aumentado de vasos nos espaços portas e pontes fibrosas tem uma boa acurácia para o diagnóstico de AB (76,6%).

Tal como referido nos materiais e métodos deste estudo, considera-se um Padrão Obstrutivo quando se observa Reação ductular envolvendo o ducto interlobular e ao longo da interface portal-lobular, Expansão Portal por infiltrado inflamatório, edema, fibrose, Tampões Biliares em ductulos, e Pontes Fibrosas porta-porta e porta-centro.(27) Na figura 1 encontra-se uma representação esquemática das alterações histopatológicas indicativas de CN obstrutiva de causa extra-hepática. De acordo com *Russo et al* o Padrão Obstrutivo atinge uma acurácia superiores a 90% para o diagnóstico de AB.(9) De igual forma, no nosso estudo, o Padrão histológico obstrutivo é uma variável significativa para o diagnóstico de AB (OR=6.498; p=0.05, IC 95%=1.002-28.070) e em conjunto com a Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas (OR=5.303; p=0.03; IC 95% = 1.172-37.146) formam um modelo preditor do diagnóstico de AB com uma acurácia de 76.6%.

A variável histopatológica Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas apresentou um grande destaque neste estudo, tendo apresentado uma razão de chance de ocorrência em pacientes com o diagnóstico de AB de 16,3% (p<0.001). Este achado remete-nos para um estudo desenvolvido por *Uflacker et al*(22) os quais realizaram arteriografias no fígado de 46 pacientes com AB e, em todos eles, observaram a presença de oclusão dos ramos da artéria hepática periférica intra-hepática, comprometendo desta forma o padrão de irrigação do fígado (portal x arterial). A artéria hepática fornece ao fígado sangue com níveis sistêmicos de oxigênio e pressão, e garante o suprimento sanguíneo: 1) dos sinusoides, e portanto dos hepatócitos, quando misturados com o sangue portal; 2) das estruturas biliares, através do plexo vascular peribiliar, sendo a única fonte de irrigação desta estruturas em humanos, o que faz com que situações de lesão vascular arterial possam conduzir a colangiopatia isquêmica; 3) do interstício do espaço porta; 4) da cápsula hepática; e 5) dos vasa vasorum dos vasos principais.(21) Em 40 dos pacientes com AB, encontraram também a formação de "tufos de pequenos vasos" ruborizado em torno dos segmentos arteriais periféricos obstruídos. Um fenómeno histopatológico deste tipo poderá estar relacionado com o agravamento da reação ductular e com a angiogénese secundária, que se desenvolve para irrigar as estruturas biliares neoformadas. Do ponto de vista histopatológico, sugerimos que a Proliferação de vasos no espaço porta seja expressão histológica deste fenómeno de "tufos de pequenos vasos" descrito por *Uflacker et al*, mostrando-se dessa forma uma variável adicional ao que atualmente se propõe como padrão histológico obstrutivo.(22)

A partir do estudo de *Santos et al*(33) que analisaram por morfometria os ramos intra-hepáticos da artéria hepática e observaram um espessamento da túnica média

progressivo desde a portoenterostomia até ao transplante, associado à rarefação dos ductos interlobulares, vários grupos de investigadores realizaram estudos de imagem onde observaram alterações da artéria hepática. Destas alterações, fazem parte a dilatação da artéria hepática na vizinhança do porta-hepatis, e o aumento da vasculatura na região subcapsular, com características de telangiectasia encontradas especificamente em pacientes com AB. Este achado seria importante para o diagnóstico diferencial entre AB e casos de colestase intra-hepática.(13,24) Recentemente, um estudo muito interessante realizado por um grupo de pesquisadores chineses na qual utilizou laparoscopia e avaliações histológicas, observou que os aglomerados vasculares subcapsulares foram encontrados em todos os 72 pacientes com AB aliados e estavam ausentes em 98,1% dos 54 pacientes com colestase não-AB. A presença destes aglomerados nesse estudo mostrou uma sensibilidade e uma especificidade consensuais de 100% e 98,1%, respetivamente. De acordo com seus achados, os aglomerados vasculares subcapsulares são um sinal característico de AB, e a exploração laparoscópica de tal sinal é valiosa no diagnóstico de AB.(24) No presente estudo, avaliamos os vasos subcapsulares nas 34 amostras de fígado que apresentavam estrutura capsular disponível para estudo. Estes complexos vasculares são constituídos maioritariamente por vasos linfáticos, e apresentam adicionalmente algumas arteríolas incorporadas nas grandes áreas de tecido fibroso situado sob a face interna da cápsula de Glisson. Acredita-se que na fibrinogénese hepática observada na AB, as necessidades metabólicas e funcionais do mesênquima portal aumentam e, por sua vez, aumenta o aporte sanguíneo e linfático para os vasos subcapsulares que leva ao aparecimento de aglomerados vasculares dilatados nesta zona.(34) Alguns desses aglomerados são, de forma evidente, componentes dos tratos portais subcapsulares, com abundantes vasos linfáticos aderidos à cápsula, associados a artérias, arteríolas e estruturas biliares portais. Contudo, para efeitos de diagnóstico consideramos aglomerados vasculares os conjuntos de vasos linfáticos e arteríolas sem relação a estruturas portais subcapsulares. Assim, obtivemos uma razão de chance de ocorrência de Aglomerados Vasculares Subcapsulares em pacientes com diagnóstico de AB de 7,8% ($p < 0.01$), inferior à razão de chance de ocorrência de outras variáveis que se mostraram mais específicas para o diagnóstico de AB como a Proliferação de vasos no espaço porta e o Padrão histológica obstrutivo. Ou seja, a presença de Aglomerados Vasculares Subcapsulares apresentam uma menor acurácia para o diagnóstico da AB por biopsia hepática quando comparamos com o Padrão histológico obstrutivo e a Proliferação de vasos no espaço porta. Acreditamos que os achados do presente estudo se devam à dificuldade de uniformizar os diferentes casos das amostras hepáticas em relação à presença e às dimensões das áreas subcapsulares disponíveis para análise. As biópsias

dos pacientes com CN intra-hepática que avaliamos, por serem na sua maioria biópsias percutâneas, demonstraram um menor número de espaços subcapsulares no momento da análise, diminuindo dessa forma a probabilidade de encontrar aglomerados vasculares subcapsulares. Mesmo nas biópsias em cunha, o número de áreas com espaço subcapsular varia de caso para caso afetando dessa forma a frequência deste achado. Dessa forma, consideramos que os aglomerados vasculares subcapsulares ou telangiectasias subcapsulares, devem ser analisados preferencialmente por exame laparoscópico. Para isso consideramos importante que se realizem mais estudos que permitam confirmar a acurácia do exame laparoscópico no diagnóstico de AB.

Importa também referir que a amostra de controlo incluiu 3 casos de A1ATd. Nesta patologia, a variante PiZ induz a formação de moléculas de A1AT anómalas que se polimerizam dentro do retículo endoplasmático hepatocelular, causando doença hepática.(28) Do ponto de vista histopatológico é reconhecido que os casos de colestase neonatal causadas por A1ATd podem ser indistinguíveis de AB, incluindo a presença de tampões biliares em ductulos. Aquando da análise das biópsias hepáticas devemos ter noção deste fenómeno de forma a evitar o diagnóstico de falso-positivos para a AB. Outros padrões histopatológicos observados na CN causada por A1ATd incluem esteatose, rarefação biliar, sugestiva de síndrome de Alagille, e padrão hepatítico inespecífico. Na A1ATd, a partir da 12^a semana de vida, é possível observar-se a presença de glóbulos PAS-positivo. Estes são constituídos pelos depósitos citoplasmáticos da proteína A1AT polimerizada nos hepatócitos e quando detetados na biópsia hepática sugerem o diagnóstico etiológico de CN associado a A1ATd.(35)

A amostra de controlo contou também com 1 caso de Síndrome de Alagille. Durante o primeiro ano de vida, do ponto de vista histopatológico, a Síndrome de Alagille pode mostrar um padrão obstrutivo e um padrão inflamatório que inclui transformação de células gigantes sem degeneração hepatocelular significativa. O padrão ductopénico pode desenvolver-se apenas com o tempo, sendo encontrado em apenas 60% dos fígados de bebés de 6 meses e em até 95% dos fígados de pacientes afetados além dessa idade. A Síndrome de Alagille constitui outra causa de CN intra-hepática que pode mimetizar AB na avaliação histológica e mesmo na avaliação da colangiografia transoperatória, pelo facto de desencadear hipoplasia de ductos extra-hepáticos. Além disso, mais tarde na vida, os achados microscópicos podem ser heterogêneos evidenciando a coexistência de áreas de rarefação biliar e de áreas com espaços porta normais ou apenas uma ligeira reação ductular.(17,29) Dentro do espectro de patologias causadoras de CN que podem apresentar um padrão obstrutivo e mimetizar

a AB encontram-se também a fibrose quística e a colangite esclerosante neonatal isolada.

6. Conclusão

O diagnóstico etiológico da CN através da histopatologia da biópsia hepática pode favorecer a realização de uma portoenterostomia precoce, mas como em cerca de 10% dos casos é impossível estabelecer com certeza o diagnóstico, há necessidade de realizar uma laparotomia exploradora com colangiografia transoperatória para confirmação diagnóstica. Este estudo demonstrou que a avaliação histopatológica da biópsia hepática, embora seja uma ferramenta fundamental, é insuficiente para estabelecer um diagnóstico etiológico definitivo da CN e dessa forma evitar diagnósticos falsos-positivos de AB. O nosso estudo demonstra também que a identificação da Proliferação de vasos no espaço porta e pontes fibrosas pode constituir uma variável adicional às variáveis atualmente consideradas como de “Padrão Obstrutivo”, acrescentando acurácia em termos de especificidade ao diagnóstico histopatológico de uma AB.

Dessa forma, o diagnóstico etiológico da colestase neonatal abrange uma grande variedade de entidades. A avaliação histológica é uma ferramenta fundamental para sugerir uma classificação da doença e uma estratificação do paciente. Contudo, para o padrão obstrutivo biliar, esta técnica não representa um diagnóstico conclusivo de AB, e a investigação etiológica deve ser complementada com técnicas de histoquímica e com anticorpos imunohistoquímicos adequados, bem como uma cuidada correlação clínica com estudos genéticos. Os testes genéticos apresentam especial importância na exclusão de outras doenças causadoras do padrão histopatológico obstrutivo, como a A1ATd, a fibrose quística, a Síndrome de Alagille e a colangite esclerosante neonatal isolada. A combinação de todos estes métodos é necessária para fornecer o diagnóstico etiológico correto da colestase neonatal.

7. Referências Bibliográficas

1. Dos Santos JL, De Carvalho E, Seixas RBPM. “Colestase Neonatal” and Dos Santos JL, Silveira TR. “Atesia Biliar” In Silva LR, Ferreira CT, De Carvalho E. *Hepatologia em Pediatria – Série Gastroenterologia e Hepatologia em Pediatria*. 1º Edição, Editora Mano.
2. Santos JL, Choquette M, Bezerra JA. Cholestatic Liver Disease in Children. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010 Feb;12(1):30–9. doi:10.1007/s11894-009-0081-8
3. Götze T, Blessing H, Grillhösl C, Gerner P, Hoerning A. Neonatal Cholestasis - Differential Diagnoses, Current Diagnostic Procedures, and Treatment. *Front Pediatr*. 2015;3:43. doi:10.3389/fped.2015.00043
4. Carvalho E, Santos JL, Silveira TR, Kieling CO, Silva LR, Porta G, et al. Atresia biliar: a experiência Brasileira. *J Pediatr (Rio J)*. 2010 Dec;86(6):473–9. doi: 10.1590/s0021-75572010000600005
5. Bezerra JA. Biliary atresia in Brazil: where we are and where we are going. *J Pediatr (Rio J)*. 2010;86(6):445–7. doi: 10.1590/s0021-75572010000600001
6. Asai A, Miethke A, Bezerra JA. Pathogenesis of biliary atresia: defining biology to understand clinical phenotypes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jun;12(6):342–52. doi: 10.1038/nrgastro.2015.74
7. Lertudomphonwanit C, Mourya R, Fei L, Zhang Y, Gutta S, Yang L, et al. Large-scale proteomics identifies MMP-7 as a sentinel of epithelial injury and of biliary atresia. *Sci Transl Med*. 2017 Nov;9(417):eaan8462. doi:10.1126/scitranslmed.aan8462
8. dos Santos JL, da Silveira TR, Almeida H, Carvalho PA, Cerski CT. Neonatal cholestasis: the delay in referring patients for differential diagnosis. *J Pediatr (Rio J)*. 1997;73(1):32–6. doi: 10.2223/jped.499
9. Russo P, Magee JC, Anders RA, Bove KE, Chung C, Cummings OW, et al. Key Histopathologic Features of Liver Biopsies That Distinguish Biliary Atresia From Other Causes of Infantile Cholestasis and Their Correlation With Outcome: A Multicenter Study. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(12):1601–15. doi: 10.1097/PAS.0000000000000755

10. Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia. Vol. 374, The Lancet. Lancet; 2009. p. 1704–13. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60946-6
11. Fontenele JPU, Schenka AA, Hessel G, Jarry VM, Escanhoela CAF. Clinical and pathological challenges in the diagnosis of late-onset biliary atresia: four case studies. *Brazilian J Med Biol Res.* 2016 Mar;49(3). doi: 10.1590/1414-431X20154808
12. Andrianov MG, Azzam RK. Cholestasis in Infancy. *Pediatr Ann.* 2016 Dec;45(12):e414–9. doi: 10.3928/19382359-20161118-01
13. Cho H-H, Kim WS, Choi YH, Cheon J-E, Lee SM, Kim I-O, et al. Ultrasonography evaluation of infants with Alagille syndrome: In comparison with biliary atresia and neonatal hepatitis. *Eur J Radiol.* 2016 Jun;85(6):1045–52. doi: 10.1016/j.ejrad.2016.03.023
14. Shneider BL, Moore J, Kerkar N, Magee JC, Ye W, Karpen SJ, et al. Initial assessment of the infant with neonatal cholestasis—Is this biliary atresia? Alpini GD, editor. *PLoS One.* 2017 May;12(5):e0176275. doi: 10.1371/journal.pone.0176275
15. Zerbini MC, Gallucci SD, Maezono R, Ueno CM, Porta G, Maksoud JG, et al. Liver biopsy in neonatal cholestasis: a review on statistical grounds. *Mod Pathol.* 1997;
16. Saxena R. “Chapter 1: Microscopic Anatomy, Basic Terms, and Elemental Lesions” in Saxena R. “Practical Hepatic Pathology: A Diagnostic Approach”. 1ª Edição, Editora Elsevier by Saunders, 2011. Pág. 3-27.
17. Sinha J, Magid MS, Vanhuse C, Thung SN, Suchy F, Kerkar N. Bile Duct Paucity in Infancy. 2007;1(212):319–23. doi: 10.1055/s-2007-985076
18. Rastogi A, Krishnani N, Yachha SK, Khanna V, Poddar U, Lal R. Histopathological features and accuracy for diagnosing biliary atresia by prelaparotomy liver biopsy in developing countries. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Jan;24(1):97–102. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05737.x
19. Jevon G, Dimmick JE. *Histopathologic Approach to Metabolic Liver Disease : Part 1 and 2.* 1998;
20. “Sistema Cardiovascular” In Kierszenbaum AL, Tres LL. “Histologia e Biologia Celular – Uma introdução à patologia”. 3ª Edição, Elsevier Editora Ltda, 2012. Pág. 355-374.

21. Arias I. *The liver: Biology and Pathobiology*. 6th ed. John Wiley & Sons Ltd; 2020.
22. Uflacker R, Pariente DM. Angiographic findings in biliary atresia. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2004 Sep;27(5):486–90. doi: 10.1007/s00270-004-2636-2
23. Desmet VJ. Ductal plates in hepatic ductular reactions. Hypothesis and implications. I. Types of ductular reaction reconsidered. *Virchows Arch*. 2011 Mar;458(3):251–9. doi: 10.1007/s00428-011-1048-3
24. Zhou Y, Jiang M, Tang ST, Yang L, Zhang X, Yang DH, et al. Laparoscopic finding of a hepatic subcapsular spider-like telangiectasis sign in biliary atresia. *World J Gastroenterol*. 2017;23(39):7119–28. doi: 10.3748/wjg.v23.i39.7119
25. Weerasooriya VS, White FV, Shepherd RW. Hepatic fibrosis and survival in biliary atresia. *J Pediatr* 2004; 144(1):123-5. doi: 10.1016/j.jpeds.2003.09.042.
26. Li MK, Crawford JM. The Pathology of Cholestasis. *Semin Liver Dis*. 2004 Feb;24(1):21-42. doi: 10.1055/s-2004-823099
27. Santos JL, Almeida H, Cerski CT, Silveira TR. Histopathological diagnosis of intra- and extrahepatic neonatal cholestasis. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol*. 1998 Jul;31(7):911–9. doi: 10.1590/s0100879x1998000700005.
28. Teckman J. α_1 -Antitrypsin Deficiency in Childhood. *Semin Liver Dis*. 2007 Aug;27(3):274–81. doi: 10.1055/s-2007-985072
29. Alagille D, Odièvre M, Gautier M, Dommergues JP. Hepatic ductular hypoplasia associated with characteristic facies, vertebral malformations, retarded physical, mental, and sexual development, and cardiac murmur. *J Pediatr*. 1975 Jan; 86(1):63-71. doi: 10.1016/s0022-3476(75)80706-2.
30. Moyer V, Freese DK, Whittington PF, et al. Guideline for the evaluation of cholestatic jaundice in infants: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004 Aug; 39(2):115-28. doi: 10.1097/00005176-200408000-00001.
31. Nassir F, Rector RS, Hammoud GM, et al. Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis. *Gastroenterol Hepatol*. 2015;11(3):167-175.
32. Lee WS, Looi LM. Usefulness of a scoring system in the interpretation of histology in neonatal cholestasis. 2009;15(42):5326–33. doi: 10.3748/wjg.15.5326

33. Santos JL, Reverbel T, Cerski CT, Wagner MB. Medial thickening of hepatic artery branches in biliary atresia . A morphometric study. 2005;637-42. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2004.12.002
34. Torbenson MS. "Hamartomas and malformations of the liver". Semin Diagn Pathol. 2019 Jan; 36(1):39-47. doi: 10.1053/j.semdp.2018.11.005
35. Hussain M, Mieli-Vergani G, Mowat AP. α 1-Antitrypsin Deficiency and Liver Disease: Clinical Presentation, Diagnosis and Treatment. Journal of Inherited Metabolic Disease. Springer Netherlands; 1991;14(4):497-511. doi: 10.1007/BF01797920.

Anexo I - Termo de Consentimento Informado para Armazenagem de Material Biológico

Você / seu filho coletará a(s) seguinte(s) amostra(s) para investigação / diagnóstico no Serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (assinale o tipo de amostra coletada):

Material

Soro

Tecido hepático

Tecido de porta hepatis

Tecido de vias biliares

sim	não

Você concorda que esta amostra seja armazenada neste serviço para os seguintes fins:

1. Futuros estudos sobre a doença:

Caso sua resposta seja sim, a amostra permanece identificada e você será avisado sobre qualquer informação obtida.

sim	não

2. Outras pesquisas que não envolvem a doença que você está investigando e são realizadas sem identificação da amostra, sem nenhum benefício direto para você ou seus familiares, mas com potencial benefício para o progresso médico e científico:

sim	não

3. Envio para outros centros para eventual realização de exames com potencial benefício direto para você ou seus familiares (amostra identificada):

sim	não

4. Envio para outros centros de pesquisa em que não há benefício direto para você ou seus familiares (amostra enviada sem identificação):

sim	não

O armazenamento da amostra não implica em qualquer custo adicional nem interferirá na realização normal do exame. O período de armazenamento é indeterminado, mas seu consentimento pode ser retirado a qualquer momento se você mudar de idéia e, neste caso, a amostra será descartada. Este documento não torna obrigatória a realização de nenhum dos procedimentos acima mencionados. Em nenhuma hipótese haverá quebra de sigilo quanto aos seus dados ou à liberação da amostra identificada para terceiros sem sua autorização.

Avaliação Histopatológica da Colestase Neonatal

Declaro que li e compreendi as informações acima e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas

por: _____.

Local: _____.

Data: _____.

Assinatura: _____.

Endereço e telefone para contato: _____.

Anexo II – Compromisso para Uso de Dados


COMPROMISSO PARA USO DE DADOS

Os autores comprometem-se a manter o sigilo dos dados coletados em prontuários e banco de dados referentes a pacientes atendidos no Setor de Gastroenterologia e Hepatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil cujo material histológico estava armazenado no Serviço de Anatomia Patológica da instituição anteriormente referida, bem como os que têm seu material histológico no Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Concordam que estas informações serão utilizadas somente com finalidade científica, preservando-se integralmente o anonimato dos pacientes. Declaram que cumprirão todos os termos das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos previstas na Lei n.º. 59/2019 publicada no Diário da República n.º 151/2019, Série I de 2019-08-08.

Covilhã, 03 de fevereiro de 2020



(Jorge Luiz dos Santos, Coordenador do Projeto)



(Paulo Jorge Tavares de Castro, Autor do Projeto)

Anexo III - Parecer da Comissão de Ética da Universidade da Beira Interior



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

Parecer relativo ao processo n.º CE-UBI-Pj-2020-019:ID1838

Na sua reunião de 18 de fevereiro 2020 a Comissão de Ética apreciou a documentação científica submetida referente ao pedido de parecer do projeto "**Avaliação Histopatológica da Colestase Neonatal: Aspetos de Diagnóstico e Prognóstico**" da proponente **Paulo Jorge Tavares de Castro**, a que atribuiu o código n.º CE-UBI-Pj-2020-019.

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

Covilhã e UBI, 03 de março de 2020

O Presidente da Comissão de Ética



Professor Doutor José António Martinez Souto de Oliveira
Professor Catedrático

Anexo IV - Comprovativo de submissão de um artigo de revisão no Jornal de Pediatria baseado neste trabalho de investigação

Jornal de Pediatria Histopathological Evaluation Of Neonatal Cholestasis --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JPEDIATRIA-D-21-00108
Article Type:	Review Article
Keywords:	neonatal cholestasis; biliary atresia; differential diagnosis; histopathology; liver biopsy.
Corresponding Author:	Paulo Jorge Tavares de Castro, M.D Universidade da Beira Interior Faculdade de Ciencias da Saude Covilhã, Castelo Branco PORTUGAL
First Author:	Paulo Jorge Tavares de Castro, M.D
Order of Authors:	Paulo Jorge Tavares de Castro, M.D Rui Pedro Caetano de Oliveira, M.D and Ph.D Elisa de Carvalho, M.D and Ph.D Carlos Thadeu Schmidt Cerski, M.D and Ph.D Carlos Oscar Kieling, M.D and Ph.D Jorge Luiz dos Santos, M.D and Ph.D
Abstract:	Neonatal cholestasis, despite having low incidence worldwide, presents a health burden with elevated mortality rate if not early identified and treated. Cholestasis is considered neonatal when occurs in the first three months of life. The main clinical findings are jaundice, hypocholic to acholic stools, pruritus and xanthomas. From the histopathological point of view, there is an accumulation of bile pigment in hepatocytes, canaliculi and bile ducts. Neonatal cholestasis is broadly classified in two etiological groups: extrahepatic mechanical obstructive and intrahepatic cholestasis. This is a crucial distinction since it has therapeutic and prognostic implications. The analysis of a percutaneous liver biopsy is a main important diagnostic tool in the initial evaluation of a cholestatic infant, presenting the highest levels of accuracy among the diagnostic methods employed for this purpose. The differential diagnosis of NC is extensive and encompasses a wide variety of entities. The histopathological evaluation in of utmost importance, and clinical and genetic correlation is mandatory, usually with good results. In this article, we perform a review of the histopathological evaluation of NC, with a focus on the etiological diagnosis of NC.
Suggested Reviewers:	Paloma Jara Vega Hospital Universitario La Paz Hospital Infantil paloma.jara@transplantchild.eu Carolina Fischinger Moura de Souza Hospital de Clínicas de Porto Alegre cfsouza@hcpa.edu.br Lorenzo D'Antiga Papa Giovanni XXIII Hospital: Aziende Socio Sanitarie Territoriale Papa Giovanni XXIII ldantiga@hpg23.it
Opposed Reviewers:	

Anexo V - Autorização para ultrapassagem dos limites estabelecidos para a dissertação

Informação importante sobre ultrapassagem dos limites estabelecidos para a dissertação

Caixa de entrada x



gem

23:12 (há 20 minutos)



para Bcc:mim ▾

Caro(a) aluno(a)

na sequência da mensagem que enviou, com informação sobre a necessidade de ultrapassagem do limite de palavras fixado para elaboração da Dissertação informo que, a título excepcional no presente ano letivo, e tendo em conta a proximidade da data de entrega do trabalho, não será aplicada penalização específica sobre este aspecto na secção Documentação da Grelha de Classificação que será utilizada pelo Júri no dia da Prova Pública.

Realço, no entanto, a importância da capacidade de síntese e a delimitação do campo de investigação de um determinado tema, pois será uma situação com a qual poderá vir a ser confrontado no futuro, quer em trabalhos no âmbito da realização do internato médico, quer em Comunicações Científicas em congressos ou até mesmo na realização de Doutoramento.

Melhores cumprimentos

O Diretor de Curso e
Responsável pela UC Dissertação

Miguel Castelo-Branco Sousa

MD PhD

