

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Patologia

Camila Gabriela Xavier de Brito

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO FATOR INIBIDOR DA
MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS E SUA RELAÇÃO COM A LESÃO DE
ISQUEMIA-REPERFUSÃO E EVENTOS ADVERSOS PÓS TRANSPLANTE
HEPÁTICO**

Belo Horizonte
2022

Camila Gabriela Xavier de Brito

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO FATOR INIBIDOR DA
MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS E SUA RELAÇÃO COM A LESÃO DE
ISQUEMIA-REPERFUSÃO E EVENTOS ADVERSOS PÓS TRANSPLANTE
HEPÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal

Co-orientador: Prof. Dr. Agnaldo Soares Lima

Belo Horizonte
2022

Brito, Camila Gabriela Xavier de.
B862a Avaliação da expressão Imuno-histoquímica do fator inibidor da migração de Macrófagos e sua relação com a lesão de Isquemia-reperusão e eventos adversos pós Transplante Hepático [manuscrito]. / Camila Gabriela Xavier de Brito. -- Belo Horizonte: 2022.
95f.: il.
Orientador (a): Paula Vieira Teixeira Vidigal.
Área de concentração: Patologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Fatores Inibidores da Migração de Macrófagos. 2. Isquemia. 3. Reperusão. 4. Disfunção Primária do Enxerto. 5. Biópsia. 6. Dissertação Acadêmica. I. Vidigal, Paula Vieira Teixeira. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WH 650



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

“Avaliação da expressão imuno-histoquímica do Fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) e sua relação com a lesão de isquemia-reperfusão e eventos adversos pós transplante hepático”

CAMILA GABRIELA XAVIER BRITO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr. Nivaldo Hartung Toppa - *Laboratório Analys* – BH/MG;

Prof. Dr. Cristiano Xavier Lima - Faculdade de Medicina/UFMG

Prof. Dr. Agnaldo Soares Lima - Faculdade de Medicina/UFMG – **COORIENTADOR**

Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal

Faculdade de Medicina/UFMG - **ORIENTADORA**

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Agnaldo Soares Lima, Professor Magistério Superior - Voluntário**, em 23/02/2022, às 11:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiano Xavier Lima, Professor do Magistério Superior**, em 23/02/2022, às 12:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nivaldo Hartung Toppa, Usuário Externo**, em 25/02/2022, às 07:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Vieira Teixeira Vidigal, Secretário(a)**, em 02/03/2022, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1270286** e o código CRC **831BB74C**.

A todos os professores que fizeram parte da minha trajetória, por me inspirarem a seguir este caminho

AGRADECIMENTOS

A Prof. Paula Vidigal, agradeço pela orientação, pela amizade e pela frutífera parceria acadêmica, além de todos os conhecimentos sobre patologia hepática compartilhados ao longo dos últimos anos.

Ao Prof. Agnaldo Soares Lima agradeço pela co-orientação e pelo compartilhamento de valiosos conhecimentos sobre transplante hepático.

Ao estudante de medicina Nikolas Thomé Knupp, agradeço pela disponibilidade e pelo trabalho de coleta dos dados clínicos dos pacientes

A Dra Fernanda Maria Farage Osório, agradeço pela assistência na coleta dos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes.

Ao estudante de medicina Matheus Lavigne, agradeço pela ajuda com o software ImageJ.

A Serena Silva e a Fernanda Cesare, agradeço pela ajuda com as reações imuno-histoquímicas.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Anatomia Patológica e da Unidade de Anatomia Patológica e Necrópsia do HC-UFMG, agradeço pelo suporte à realização deste projeto e por toda a ajuda prestada.

Ao professor Eduardo Paulino, agradeço pelo suporte no escaneamento das lâminas deste trabalho.

Aos meus colegas da Residência Médica em Patologia do Hospital das Clínicas da UFMG agradeço pelo apoio e pela parceria.

A Maria Luiza Peloso, agradeço pelo companheirismo e pelo compartilhamento das angústias e alegrias vivenciadas ao longo da Pós-graduação e Residência Médica.

A Gabriela Feltrin e Lucas Gonçalves, agradeço pela amizade e por cederem gentilmente sua casa para que eu pudesse finalizar uma etapa importante do projeto.

Aos meus amigos, agradeço pelas palavras de conforto frente às dificuldades da Pós-graduação e pela torcida em todas as etapas da minha vida acadêmica.

A minha família agradeço pelo apoio incondicional a todos os meus projetos e escolhas, por vibrarem com cada conquista minha e por me proporcionarem uma educação de qualidade, o que tornou possível a realização de tantos sonhos, além da realização deste trabalho.

A Lucas Tenório, agradeço por todo o suporte emocional, por sempre acreditar e torcer por mim, além de toda ajuda computacional prestada na realização deste projeto.

Resumo

A disfunção primária do enxerto (DPE) é uma das complicações pós transplante hepático mais temidas, sendo relacionada a uma menor sobrevida do enxerto e do paciente, além de aumento do tempo de internamento e dos custos do transplante. O evento fisiopatológico relacionado à DPE é a lesão de isquemia e reperfusão (IRI), que é desencadeada pelo processo de captação e preservação do enxerto. Nesse contexto, é de extrema importância a identificação de marcadores relacionados à IRI que ajudem no entendimento desta complicação e que possam servir para preveni-la ou como alvos terapêuticos. O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) é uma citocina pró-inflamatória com atividade reguladora da ação dos glicocorticoides endógenos, expressa constitutivamente em células do sistema imune, células endoteliais e epiteliais. O MIF tem um papel na patogênese de doenças inflamatórias, autoimunes, no câncer, na rejeição a enxertos e foi relacionado à IRI nos enxertos hepáticos em alguns estudos. O objetivo do nosso estudo foi investigar a expressão do MIF nos enxertos hepáticos humanos e a sua relação com IRI e a ocorrência de eventos adversos pós transplante. 103 biópsias pós-reperfusão de pacientes que se submeteram ao transplante hepático no Hospital das Clínicas da UFMG entre 2000 e 2020 foram revisadas e classificadas quanto à presença e gravidade da IRI e esteatose e submetidas ao estudo imuno-histoquímico com anticorpo policlonal anti-MIF (ab65869). A expressão de MIF foi quantificada através do uso do plugin IHC Profiler do *software* ImageJ Fiji nas lâminas de imuno-histoquímica digitalizadas. Os prontuários dos pacientes foram revisados para coleta de dados demográficos, informações do doador e do internamento e valores de exames laboratoriais pré e pós transplante. Das 103 biópsias estudadas, 49 biópsias (47.6%) não tinham evidências de IRI, 24 biópsias (23.3%) apresentavam IRI leve, 25 (24.3%) IRI moderada e apenas 5 (4.9%) IRI grave. Em relação à esteatose, em 91 biópsias (88.3%) não havia sinais de esteatose ou esta era mínima, 10 biópsias (9.7%) exibiam esteatose leve, 1 (1.0%) exibia esteatose moderada e 1 (1.0%) esteatose acentuada. Foi verificada expressão de MIF positiva fraca em 64 casos (62.1%), 34 casos (33.0%) tiveram expressão positiva e em apenas 5 (4.9%) foi observada expressão negativa. A expressão de MIF positiva se correlacionou com o achado de IRI ausente ou leve na biópsia pós-reperfusão ($P = 0.01$, OR: 1.259, 95% CI 1.058-1.499). Nenhuma das variáveis apresentou associação significativa com a ocorrência de retransplante ou óbito nos primeiros 15 dias após o transplante. Nossos achados sugerem que uma maior gravidade da IRI está associada a uma maior liberação de MIF pelo enxerto, fazendo com que seja encontrada menor intensidade de expressão no órgão. Para esclarecer ainda mais o papel do MIF na IRI, acreditamos que seria interessante a realização de estudos comparando a expressão desta citocina nos hepatócitos, epitélio biliar e células inflamatórias, além de medindo a concentração sérica do MIF e no efluente do enxerto.

Palavras-chave: Fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), Lesão de isquemia e reperfusão, Disfunção precoce do enxerto, Biópsias pós-reperfusão.

Abstract

Primary graft dysfunction is one of the most feared complications following liver transplantation, being associated with poorer graft and patient outcomes, prolonged length of hospital stay and an increase in transplantation costs. Ischemia reperfusion injury (IRI) is thought to be the pathological event behind primary graft dysfunction, and is the result of graft procurement and preservation. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a pro-inflammatory cytokine with glucocorticoid counter regulatory activity which is constitutively expressed in inflammatory cells, endothelial cells and epithelial cells. MIF has been studied in many inflammatory and autoimmune diseases, cancer, allograft rejection and, recently, in IRI in liver allografts. The aim of this study was to investigate MIF expression in post-reperfusion biopsies from human liver allografts and correlate with presence and severity of IRI and with clinical perioperative data. 103 liver allograft post-reperfusion biopsies from patients who underwent liver transplantation between 2000 and 2020 at Hospital das Clínicas from Federal University of Minas Gerais were reviewed and categorized regarding the presence and severity of IRI and steatosis and submitted to single immunostaining to MIF (ab65869). MIF immunohistochemical expression was quantified by applying the IHC Profiler plugin on the ImageJ Fiji software on the digitized slides. Medical records from the patients were revised to collect perioperative and clinical data. The histopathological assessment of IRI severity was as follows: no IRI (N = 49 biopsies, 47.6%), mild IRI (N = 24, 23.3%), moderate IRI (N = 25, 24.3%), severe IRI (N = 5, 4.9%). Most biopsies did not have significant steatosis (N = 91, 88.3%), while 10 biopsies (9.7%) presented mild steatosis, 1 (1.0%) had moderate and 1 (1%) had severe steatosis. MIF expression was categorized as low positive in 64 cases (62.1%), positive in 34 cases (33.0%) and negative in 5 cases (4.9%). MIF positive expression was correlated with no IRI or mild IRI on the histological assessment ((P = 0.01, OR: 1.259, 95% CI 1.058-1.499). None of the studied variables was associated with retransplantation or death within 15 days of the transplant. Our findings suggest that moderate to severe IRI is related to a rapid MIF release into the circulation, which results in a weaker intensity of the immunostain on the tissue. To further clarify MIF's role in IRI, we believe that more studies are warranted comparing MIF expression in the hepatocytes, biliary epithelium and immune cells, as well as measuring MIF serum and effluent concentrations.

Keywords: Macrophage migration inhibitory factor (MIF), Ischemia/reperfusion injury, Primary allograft dysfunction, Post-reperfusion liver biopsies.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Seleção das biópsias pós-reperfusão para estudo imuno-histoquímico e revisão de prontuário.

Figura 2 – Classificação histológica da IRI nas biópsias pós-reperfusão

Figura 3 - Expressão imuno-histoquímica do MIF nas biópsias pós-reperfusão

Lista de tabelas

Tabela 1 - Classificação histológica da IRI segundo Ali *et al.* (2015)

Tabela 2 - Características demográficas dos receptores e dos doadores

Tabela 3 - Análise univariada com o desfecho presença de IRI moderada ou grave

Tabela 4 - Análise univariada com as informações dos doadores, receptores e dados operacionais do transplante e a expressão de MIF

Tabela 5 - Análise univariada com os valores de exames laboratoriais pré e pós transplante e a expressão de MIF

Tabela 6 - Análise univariada com o desfecho retransplante ou óbito em 15 dias pós transplante

Lista de abreviaturas e siglas

ALT, Alanina-aminotransferase

AST, Aspartato-aminotransferase

ATP, Adenosina trifosfato

CHC, Carcinoma hepatocelular

DAMPs, Padrões moleculares associados a danos (do inglês *Damage-associated molecular patterns*)

DPE, Disfunção primária do enxerto

EAD, Disfunção precoce do enxerto (do inglês, *Early Allograft Dysfunction*)

EUA, Estados Unidos da América

ERK1/ERK2, Quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/ERK2)

EROs, Espécies reativas de oxigênio

FA, Fosfatase alcalina

HIV, Vírus da imunodeficiência humana

IMC, Índice de massa corpórea

IRI, Lesão de isquemia-reperfusão (do inglês, *Ischemia-reperfusion injury*)

GGT, Gama-Glutamil transferase

MELD, Modelo para Doença Hepática Terminal (do inglês *Model for End-stage Liver Disease*)

MIF, Fator inibidor da migração de macrófagos (do inglês *Macrophage Migration Inhibitory Factor*)

PNF, Não funcionamento do enxerto (do inglês *Primary nonfunction*)

RNI, Razão Normalizada Internacional

RRP, Receptores de reconhecimento de padrões

TP, Tempo de protrombina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Transplante hepático: complicações e sobrevida pós-transplante	14
2.2 A utilização de doadores com critérios expandidos e disfunção primária do enxerto	15
2.3 Lesão de isquemia-reperfusão	20
2.4 Fator inibidor da migração de macrófagos	23
2.5 Justificativa	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Análise histopatológica das biópsias pós-reperfusão, seleção dos casos e revisão de prontuários	30
4.2 Critérios de exclusão	31
4.3 Estudo imuno-histoquímico	31
4.4 Análise estatística e aspectos éticos	32
5. RESULTADOS	34
5.1 Características demográficas dos pacientes	34
5.2 Relação entre a expressão de MIF e dados do receptor, do doador e operacionais do transplante	38
5.3 Relação entre a expressão de MIF na biópsia pós-reperfusão e exames laboratoriais	41
5.4 Relação entre o desfecho retransplante ou óbito em 15 dias e as características do doador, do receptor, achados histológicos e expressão de MIF	43
7. CONCLUSÃO	54
8. PERSPECTIVAS	55
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
10. ANEXOS	64

1. INTRODUÇÃO

O transplante hepático ortotópico é o tratamento de escolha para os pacientes com doença hepática crônica em estágio terminal e com hepatite fulminante. Em todo o mundo existe uma grande demanda para transplantes hepáticos que não consegue ser suprida com a atual oferta de órgãos, o que leva a aumento do número de pacientes na fila de transplantes. Em alguns casos, faz-se necessária a utilização de órgãos limítrofes, resultado da flexibilização dos critérios para doação, prática que está associada a maior risco de complicações pós-transplante.

Uma das complicações mais temidas do período pós-transplante precoce é a disfunção primária do enxerto (DPE), que pode se manifestar como disfunção precoce do enxerto (EAD, do inglês *Early allograft dysfunction*), sua forma mais leve; ou não funcionamento primário (PNF, do inglês *Primary nonfunction*) a forma mais grave, cujo tratamento é o retransplante imediato. Ambas as formas estão associadas a menor sobrevida do enxerto e do paciente, além de aumento do tempo de internamento e dos gastos hospitalares.

O evento fisiopatológico relacionado à DPE é a lesão de isquemia-reperfusão (IRI, do inglês *Ischemia/reperfusion injury*), que é desencadeada pelo processo de captação e preservação do enxerto. A IRI tem duas fases: a fase isquêmica, onde a falta de oxigenação do tecido causa um desequilíbrio metabólico que leva à um dano a microcirculação e morte celular, e a fase de reperfusão, onde o dano à microcirculação e a alteração metabólica continuam e são agravados pela resposta imune. O método mais preciso para diagnóstico da IRI é através da realização da biópsia hepática, através da qual também é possível classificar a lesão quanto à sua gravidade.

Embora muitos fatores de risco para DPE tenham sido identificados na literatura, nem sempre é possível intervir ou minimizar todos eles, pois alguns estão relacionados ao próprio receptor do

transplante ou a características do procedimento cirúrgico. Nesse contexto, é de extrema importância a identificação de marcadores relacionados à IRI com a finalidade de prever DPE.

O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF, do inglês *Macrophage migration inhibitory factor*) é uma citocina pró-inflamatória com atividade reguladora da ação dos glicocorticoides endógenos, expressa constitutivamente em vários tipos celulares incluindo células do sistema imune, células endoteliais e epiteliais. O MIF tem um papel na patogênese de doenças inflamatórias, autoimunes, no câncer, na rejeição a enxertos e foi relacionado à IRI nos enxertos hepáticos em alguns estudos.

Considerando a repercussão negativa da DPE na sobrevivência dos enxertos e dos pacientes, o objetivo deste estudo é investigar a expressão do MIF nos enxertos hepáticos humanos e a sua relação com IRI e a ocorrência de eventos adversos pós-transplante a fim de aprimorar o conhecimento na área.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Transplante hepático: complicações e sobrevida pós-transplante

O transplante hepático ortotópico é o tratamento de escolha para a maioria dos pacientes com doença hepática terminal. Desde a primeira cirurgia de transplante hepático em 1968, mais de 20000 transplantes hepáticos foram realizados no Brasil (BITTENCOURT; FARIAS; COUTO, 2016). Segundo dados do Registro Brasileiro de Transplantes, no ano de 2019 o Brasil foi o segundo país a realizar mais transplantes hepáticos em números absolutos (2245 transplantes) (GARCIA, PACHECO; 2020). Já no ano de 2020, foram realizados 2.050 transplantes hepáticos no país, correspondendo a uma taxa de 9.8 transplantes por milhão de população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Atualmente, o transplante hepático é um procedimento bem estabelecido com bons resultados graças ao aprimoramento das soluções de preservação, melhora na técnica cirúrgica, melhora no manejo perioperatório e desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras. Segundo o estudo de Nascimento *et al.* (2020) realizado no Brasil, a taxa de sobrevida em um ano é de 72.6% e em 5 anos é de 63.3%. Os dados dos Estados Unidos da América (EUA) mostram que a taxa de sobrevida em 3 anos de um paciente pós-transplante hepático é de 80%, e em 10 anos é de 50% (CHARLTON, 2014).

As causas de morte mais frequentes após o primeiro ano do transplante são consideradas causas hepáticas, correspondendo a 28% dos casos, seguidas de malignidades (22%), causas cardiovasculares (11%), infecciosas (9%) e renais (6%) (CHARLTON, 2014).

São inúmeros os fatores que impactam na sobrevida pós-transplante, incluindo características do receptor, do doador e parâmetros peri e pós-operatórios. Em relação às características do receptor,

estudos mostram que idade é um fator que influencia a sobrevida, sendo visto que pacientes pediátricos têm sobrevida maior que os adultos e que adultos acima dos 55 anos têm piores resultados comparados com receptores mais jovens. Outras características que podem interferir na sobrevida são doença hepática de base, tipo do enxerto, idade do doador, número de transplantes e o regime imunossupressor utilizado (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

A ocorrência de complicações pós-transplante também impacta na sobrevida dos pacientes. Complicações pós-operatórias que ocorrem dentro dos primeiros 30 dias após cirurgias de grande porte (como o transplante hepático) estão associadas a menor sobrevida a longo prazo. No estudo de Daugaard *et al.* (2018) 92.1% dos pacientes apresentaram alguma complicação pós-transplante e as mais frequentes foram anemia, sangramento, derrame pleural, ascite, desequilíbrio hidroeletrólítico e rejeição. Outras complicações comuns na literatura são trombose de artéria hepática, trombose de veia porta, congestão venosa, complicações biliares e disfunção precoce do enxerto/falha primária do enxerto (KOK *et al.*, 2019).

2.2 A utilização de doadores com critérios expandidos e disfunção primária do enxerto

No Brasil, o doador falecido de morte encefálica é a principal fonte de órgãos e tecidos para transplante. De acordo com a portaria número 2.600 de 21 de setembro de 2009 do Ministério da Saúde, os órgãos que podem ser doados para fins de transplante são coração, pulmões, rins, fígado, pâncreas e intestino (WESTPHAL *et al.*, 2016).

A alocação de fígados para transplante segue a lógica da priorização pela gravidade, definida pelo escore Modelo para Doença Hepática Terminal (MELD, do inglês *Model for End-stage Liver Disease*) desde 2006, com influência do tempo em lista e a identidade ou compatibilidade ABO dos grupos sanguíneos. O cálculo do escore MELD utiliza dados laboratoriais objetivos e facilmente disponíveis: o valor da bilirrubina sérica, a Razão Normalizada Internacional (RNI) e

a creatinina sérica. O valor do MELD vai de 6 (menor gravidade) a 40 (maior gravidade), sendo o seu objetivo prever o risco de mortalidade em hepatopatas crônicos dentro de 3 meses. O valor mínimo aceito para inscrição na lista de transplante é 11 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS, 2017).

Além disso, existem situações clínicas (como o carcinoma hepatocelular) que podem levar rapidamente ao óbito sem elevar o MELD e portanto recebem pontos extras quando entram na lista de espera. Outros critérios de urgência para priorização de receptores de fígado são insuficiência hepática aguda grave, não funcionamento primário do enxerto notificado até o sétimo dia pós-transplante e pacientes anepáticos por trauma (RODRIGUES-FILHO; FRANKE; JUNGE, 2018).

A contraindicação absoluta para a doação de órgãos para transplantes é quando o risco de transmissão de alguma doença supera a possibilidade de benefício dos potenciais receptores dos órgãos, como no caso da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) no potencial doador ou de história recente de neoplasia maligna. Porém, quando a expectativa de vida do receptor com o transplante for superior à obtida com o tratamento clínico convencional é justificável a utilização de doadores limítrofes ou com critérios expandidos (WESTPHAL *et al.*, 2016).

Não existe uma definição padrão do que se considera um órgão "limítrofe", porém a presença de determinadas condições que podem levar a risco de menor sobrevida ou diminuição da função do enxerto tem sido utilizada para caracterizar esta situação. Algumas dessas condições são órgãos que foram submetidos a longo tempo de isquemia fria e quente, provenientes de doadores com idade avançada ou com alterações do nível sérico de marcadores laboratoriais, com história de uso de drogas ou esteatose hepática (WESTPHAL *et al.*, 2016; BOLONDI *et al.*, 2018).

Como existe um grande desequilíbrio entre a demanda e a quantidade de órgãos disponíveis, tem sido cada vez mais comum a utilização de órgãos de doadores com critérios expandidos na tentativa de diminuir as listas de espera para o transplante. Essa prática tem obtido resultados satisfatórios, no entanto com maior potencial de complicações pós-transplante (MOOSBURNER *et al.*, 2021).

Uma dessas complicações é a disfunção primária do enxerto (DPE), que pode ser dividida em disfunção precoce do enxerto (EAD, do inglês, *Early Allograft Dysfunction*) e em não funcionamento primário do enxerto (PNF, do inglês *Primary nonfunction*), sua forma mais grave. A DPE ocorre em até 38.7% dos transplantes hepáticos, sendo a incidência de PNF entre 0.9% e 8.5% (NEVES *et al.*, 2016). Porém, essas incidências podem variar dependendo da nomenclatura e do critério diagnóstico utilizado pelo estudo (DESCHENES, 2013).

A EAD e a PNF refletem etapas diferentes da mesma síndrome, sendo que a EAD se caracteriza por alterações clínicas e laboratoriais temporárias que indicam o mau funcionamento do enxerto, enquanto a PNF se manifesta de maneira catastrófica, evoluindo para a perda do enxerto e necessidade de retransplante de urgência (NEVES *et al.*, 2016).

Vários trabalhos procuraram criar definições padronizadas para EAD e PNF, seus fatores de risco e seus critérios diagnósticos, no entanto as diversas nomenclaturas e parâmetros utilizados dificultam a adoção de uma linguagem universal entre os centros de pesquisa e centros transplantadores (DESCHENES *et al.*, 1998; OLTHOFF *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2016).

A maior parte dos estudos se utiliza de parâmetros laboratoriais tais como níveis de aminotransferases, bilirrubina, tempo de protrombina (TP) e RNI como critérios para EAD. Uma das definições mais importantes foi estabelecida por Deschenes *et al.* (1998), que estudou 710 transplantes de fígado em três centros dos EUA e encontrou uma incidência de EAD de 23%.

Neste estudo, EAD era definida pela presença de pelo menos um dos seguintes critérios entre os dias 2 e 7 pós-transplante: (1) bilirrubina sérica maior que 10 mg/ml; (2) TP maior ou igual a 17 segundos; (3) encefalopatia hepática.

No entanto, a definição utilizada por Olthoff *et al.* (2010) é uma das mais utilizadas atualmente por ter sido feita na era MELD, validada em três centros dos EUA e por utilizar parâmetros laboratoriais comuns: (1) bilirrubina maior que 10 mg/dL no dia 7 pós-transplante; (2) RNI maior ou igual a 1.6 no dia 7 pós-transplante; ou (3) aspartato-aminotransferase (AST) ou alanina-aminotransferase (ALT) maior que 2000 dentro dos primeiros 7 dias pós-transplante. Um ou mais desses critérios precisa estar presente para o diagnóstico de EAD. Neste estudo, a incidência de EAD foi de 23.2% e EAD foi associada a maior mortalidade pós-transplante ou perda do enxerto.

Em relação à PNF, também não existe uma definição universalmente aceita na literatura. Alguns pesquisadores se utilizam de termos vagos para descrever a PNF, como "função hepática incompatível com a vida" ou "falha do enxerto" e outros se utilizam de dados clínicos para diagnosticar esta condição (CHEN; XU, 2014). Um dado que aponta para a ocorrência de PNF é o aumento progressivo das enzimas hepáticas dentro de 48h pós-transplante. Durante esse mesmo período ocorre diminuição da produção de bile e de urina, aumento da bilirrubina sérica, coagulopatia grave, acidose láctica, hipoglicemia e falência múltipla de órgãos. O único tratamento para a PNF é o retransplante imediato (KOK *et al.*, 2019).

Vários trabalhos procuraram identificar fatores de risco para EAD e PNF. Fatores relacionados ao doador, ao processo de captação, ao transplante e ao receptor afetam a função inicial do enxerto após o transplante hepático (SIRIVATANAUKSORN *et al.*, 2012; CHEN, XU, 2014; CHU *et al.*, 2015; MAZILESCU *et al.*, 2021).

Em decorrência da escassez de oferta, a idade dos doadores tem aumentado recentemente, levando à utilização de enxertos que previamente eram considerados inadequados em muitos centros. Existe uma controvérsia em relação à idade do doador ser um fator de risco para DPE, especialmente em relação à adoção de um ponto de corte. Alguns estudos associaram idade do doador acima de 49 anos como fator de risco para DPE, enquanto outros consideraram que a idade acima de 65 anos seria um fator de risco (LUÉ *et al.*, 2016; CHEN; XU, 2014).

Em relação ao tipo de doador, a utilização de enxertos hepáticos pós parada cardíaca foi apontada em diversos estudos como fator de risco para DPE (SALVIANO *et al.*, 2019). No estudo de Mazilescu *et al.* (2021) houve uma maior incidência de EAD nos enxertos de doadores após parada cardíaca. Porém, esse tipo de doador não é utilizado no Brasil por razões legais, éticas, logísticas e médicas (CHAIB; MASSAB, 2008).

A esteatose hepática também já foi relacionada à EAD em diversos estudos. Enxertos com mais de 30% de esteatose macrovesicular apresentam menor sobrevida em 1 ano, além de risco aumentado para EAD e PNF. Algumas razões que podem explicar a menor sobrevida em enxertos esteatóticos são maior dificuldade na técnica cirúrgica, maior sangramento durante a cirurgia, complicações pós-operatórias e recuperação mais devagar da função de síntese hepática do enxerto. Apesar disso, enxertos com mais de 30% de esteatose podem ser utilizados em determinadas circunstâncias, por exemplo, se não existirem outros fatores de risco para PNF (CHEN; XU, 2014). Enxertos com esteatose acentuada (maior que 60%) não são utilizados para transplante pela maioria dos grupos (CHU *et al.*, 2015).

O tempo de isquemia fria e quente são relacionados à EAD e PNF em vários trabalhos, tendo sido visto na literatura que tempos de isquemia fria maiores que 10 horas estão associados a complicações biliares a longo prazo além de EAD e PNF (NEVES *et al.*, 2016; SALVIANO *et al.*, 2019).

Srivatanauksorn *et al.* (2012) fez uma análise retrospectiva de 97 transplantes hepáticos entre janeiro de 2002 a dezembro de 2009, encontrando incidência de PNF de 7.2% e de EAD de 24.7%. Nesse estudo foi identificada diferença significativa nos tempos de isquemia quente, tempo da cirurgia e tempo de internamento entre os grupos com disfunção do enxerto e sem disfunção do enxerto.

Já no estudo de Moosburner *et al.* (2021), EAD ocorreu em 38% dos casos e se associou a uma taxa de sobrevivência de 70% comparado com 86.3% do grupo de pacientes sem EAD ($P < 0.001$). EAD teve uma associação significativa com maior índice de massa corpórea (IMC) do receptor ou do doador e maiores níveis de gama-glutamil transferase (GGT) do doador, além de esteatose no enxerto. O tempo de isquemia fria foi aproximadamente 45 minutos maior nos pacientes que desenvolveram EAD. O custo total hospitalar aumentou para o grupo dos pacientes com EAD, por uma média de 26229 euros e mediana de 21845 euros.

Em relação aos fatores de risco para EAD ligados ao receptor, o escore de MELD e outros fatores relacionados à cirurgia já foram citados na literatura (OLTHOFF *et al.*, 2010). O estudo de Silberhumer *et al.* (2007) verificou a relação entre utilização de doadores com critérios expandidos e mudanças no escore de MELD entre a inclusão na lista de transplante e a cirurgia e a ocorrência de EAD. Foi visto que piora no MELD associada a pelo menos dois critérios expandidos estava associada a maior risco de DPE e morte. Já o estudo de Lee *et al.* (2016) encontrou que EAD estava associada a necessidade de suporte ventilatório no pré-operatório, ao tempo da cirurgia e necessidade de transfusão sanguínea durante o transplante.

2.3 Lesão de isquemia-reperfusão

O motivo pelo qual a utilização de órgãos de doadores com critérios expandidos está associada a aumento nas taxas de retransplante e de DPE provavelmente se deve ao fato de esses órgãos serem particularmente suscetíveis a lesão de isquemia-reperfusão (IRI, do inglês *Ischemia-reperfusion injury*) como resultado do processo de captação, preservação e da própria cirurgia (KOK *et al.*, 2019).

A IRI ocorre em aproximadamente 17% a 50% dos transplantes, segundo a literatura. Existem duas formas de IRI: IRI quente, que ocorre durante a captação e transplante com interrupção e restauração da circulação hepática; e IRI fria, que acontece durante o armazenamento/transporte. A primeira resulta em dano aos hepatócitos mediado pelas células de Kupffer, já a segunda lesiona as células endoteliais dos sinusoides e prejudica a microcirculação hepática. Embora as células afetadas sejam diferentes nas duas formas, um mecanismo comum entre elas é a ativação local do sistema imune inato. A ativação de células de Kupffer, neutrófilos, produção de citocinas e quimiocinas, geração de espécies reativas de oxigênio e infiltração do órgão por linfócitos e monócitos circulantes está presente tanto na IRI quente como na IRI fria (ZHAI *et al.*, 2013).

Dois estágios de IRI no fígado foram identificados: a lesão isquêmica e a lesão de reperfusão. A lesão isquêmica resulta de uma série de desequilíbrios metabólicos, levando à morte das células do parênquima. A lesão de reperfusão que acontece após a lesão isquêmica resulta não só da perturbação metabólica como também de uma resposta imune que envolve mecanismos citotóxicos diretos e indiretos (ZHAI *et al.*, 2013).

Durante a fase de isquemia há diminuição no aporte sanguíneo e no suprimento de oxigênio, levando a uma deficiência na produção de adenosina trifosfato (ATP) pelos hepatócitos, células de Kupffer e células endoteliais dos sinusoides. Isso causa uma alteração na concentração citosólica de vários íons importantes e faz com que a membrana plasmática dos hepatócitos fique instável. Há também acúmulo de sódio intracelular, o que leva ao aumento de volume dos

hepatócitos, células endoteliais dos sinusoides e células de Kupffer, que pode levar ao estreitamento da luz vascular dos sinusoides (WEIGAND *et al.*, 2012).

Logo após a reperfusão, há aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) associado a diminuição nos níveis de óxido nítrico, agravando o estreitamento dos sinusoides. Esse ambiente mais oxidante leva a apoptose e necrose de hepatócitos e das células endoteliais dos sinusoides. Além disso, há aumento na concentração de vasoconstritores como endotelina e tromboxane A2 e da adesão e agregação de plaquetas, o que contribui para prejudicar a microcirculação, potencializando os efeitos da diminuição do aporte de oxigênio (WEIGAND *et al.*, 2012).

As células em estresse oxidativo liberam seus constituintes para o meio extracelular e estes, em contato com o sistema imune, desencadeiam a resposta inflamatória. Esses constituintes funcionam como padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *Damage-associated molecular patterns*) e são reconhecidos pelas células de Kupffer, células dendríticas e células endoteliais dos sinusoides, por meio de receptores de reconhecimento de padrões (RRP). Estas células, por sua vez, liberam quimiocinas, citocinas e mais EROs, que agem atraindo e ativando células T, monócitos e neutrófilos para o tecido. Os neutrófilos são os principais causadores da destruição tecidual através da liberação de EROs e enzimas proteolíticas, sendo considerados uma ameaça à função do órgão e sua viabilidade (VAN GOLEN; VAN GULIK; HEGGER, 2012).

Um dos métodos mais precisos para avaliar a presença de IRI é a realização de uma biópsia no momento intra-operatório após a revascularização completa do enxerto, no chamado "tempo zero" do transplante. A vantagem da realização da biópsia é que esta pode mostrar a presença de condições pré-existentes que poderiam influenciar o desfecho do transplante (CHEN; XU, 2014).

Porém, as características morfológicas encontradas nos pacientes com IRI não são específicas e o patologista deve excluir outros diagnósticos como sepse e rejeição. Alguns dos achados que podem ser vistos na IRI são a presença um infiltrado inflamatório agudo no enxerto além de sinais de dano hepatocelular vistos como necrose de coagulação e degeneração baloniforme (DESCHENES et al., 1999).

Apesar disso, a presença de IRI grave diagnosticada na biópsia hepática do tempo zero foi vista em alguns estudos como um fator relacionado a piores desfechos pós-transplante. Ali *et al.* (2015) avaliaram 476 biópsias pós-reperusão de acordo com a presença de lesão de isquemia-reperusão e esteatose. Os critérios utilizados para o diagnóstico morfológico da IRI foram o infiltrado neutrofílico e a necrose de hepatócitos. Os resultados sugerem que a avaliação histológica e classificação da gravidade IRI são úteis para identificar os pacientes com maior risco de perda precoce do enxerto em que poderia ser considerado um retransplante. Um outro dado importante foi que embora apenas uma pequena porcentagem dos pacientes tenha apresentado IRI acentuada, cerca de 50% desses pacientes evoluíram para perda do enxerto em um ano. O autor sugere que quando a IRI é grave o suficiente, causa um dano irreversível ao parênquima hepático e à árvore biliar, levando à falha do enxerto (ALI *et al.*, 2015).

Além disso, a IRI já foi associada em outros estudos à rejeição crônica e ao desenvolvimento de insuficiência renal aguda pós-transplante levando a maior tempo de internamento (KOK et al., 2019).

2.4 Fator inibidor da migração de macrófagos

O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) é uma proteína que foi inicialmente descrita como um fator solúvel liberado por linfócitos T que inibia a migração de macrófagos *in vitro* (BLOOM; BENNETT, 1966). Atualmente sabe-se que esta molécula tem funções variadas, mas é

principalmente uma citocina pró inflamatória que é expressa constitutivamente por vários tipos celulares incluindo monócitos/macrófagos, eosinófilos, linfócitos, e células epiteliais e endoteliais de vários órgãos (HOI; ISKANDER; MORAND, 2007). Além disso, o MIF é um componente do sistema neuroendócrino, tendo sido detectado em neurônios corticais, hipotalâmicos, do cerebelo, ponte e nervos periféricos e órgãos que estão envolvidos na resposta ao estresse (hipófise e supra-renal) (AEBERLI; LEECH; MORAND, 2006; CALANDRA; ROGER, 2003).

Os primeiros relatos sobre o MIF surgiram na década de 30, quando se viu que a migração de células inflamatórias do tecido linfóide de um animal sensibilizado com *Mycobacterium* estava prejudicada por causa da ação dessa citocina. Estudos explorando essa propriedade do MIF ficaram populares na década de 60 como um modelo in vitro para hipersensibilidade tardia. A clonagem do MIF ocorreu após a descoberta de que esta proteína funciona como reguladora da imunossupressão mediada por glicocorticoides. Em 1997, foi descrito o segundo membro da família do MIF, o D-DT (KANG; BUCALA, 2019).

O MIF é armazenado em *pools* intracelulares que são rapidamente depletadas quando há um estímulo para a sua liberação, como produtos microbianos, citocinas pró-inflamatórias ou durante a ativação do sistema imune por antígenos específicos. Estudos mostram que o MIF estimula a produção ou expressão de várias moléculas pró-inflamatórias, incluindo citocinas (como fator de necrose tumoral, interleucina 2, interleucina 6, interleucina 8, interferon γ), óxido nítrico, ciclooxigenase 2, produtos da via do ácido araquidônico, metaloproteinases e seus inibidores (CALANDRA; ROGER, 2003).

O MIF pode exercer suas ações através de diferentes vias de sinalização. A ligação ao receptor CD74 na presença de um complexo de sinalização composto por CD44 e uma tirosina-quinase desencadeia uma cascata de eventos que leva à fosforilação das quinases reguladas por sinal

extracelular (ERK1/ERK2). A ativação das ERK1/ERK2 está associada a aumento na atividade citoplasmática da fosfolipase A2, que é uma enzima importante no acionamento da cascata pró inflamatória, levando à produção de mediadores como ácido araquidônico, prostaglandinas e leucotrienos. O MIF também faz regulação positiva de receptores de reconhecimento de padrões, como o TLR4. Outras vias de sinalização, incluindo as vias do fator nuclear kappa-beta, proteína quinase B, fosfatidilinositol 3-quinase e proteína quinase ativada por AMP podem ser estimuladas pelo MIF em outros tipos celulares para induzir outras funções de sobrevivência (KANG; BUCALA, 2019). MIF também é um ligante não cognato dos receptores de quimiocinas CXCR, e a formação dos complexos de sinalização envolvendo CXCR2 e CD74 estimula a quimiotaxia dos leucócitos (NOBRE *et al.*, 2017).

Uma característica única do MIF em relação a outras citocinas é a sua capacidade de fazer contrarregulação dos glicocorticóides endógenos, que aumentam sua concentração na circulação em resposta à liberação de ACTH pela hipófise. O MIF antagoniza os efeitos imunossupressores dos corticóides agindo em várias etapas importantes para a regulação da resposta inflamatória (KANG; BUCALA, 2019). Uma delas é a inibição da fosfolipase A2 mediada por corticóides, culminando na liberação do ácido araquidônico, que por sua vez é importante para a tradução de várias citocinas pró inflamatórias. A importância dessa característica é a necessidade de maiores doses de corticoide para o tratamento de certas doenças autoimunes em pacientes que expressam mais MIF (ASSIS *et al.*, 2016).

Levando em consideração as ações do MIF na ativação da cascata inflamatória, não é surpreendente que este represente uma peça-chave em diferentes doenças inflamatórias agudas e crônicas, no câncer e na rejeição a enxertos (JAVEED; ZHAO; ZHAO, 2008; GRIEB *et al.*, 2010; LAN *et al.*, 1997). O MIF já foi implicado na patogênese de doenças como artrite reumatoide (LEECH *et al.*, 1999), sepse (CALANDRA; ROGER, 2003; JAVEED; ZHAO; ZHAO, 2008), aterosclerose, glomerulonefrite, síndrome do desconforto respiratório agudo (LUE

et al. 2002), asma (LEECH *et al.*, 1999), lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória intestinal, entre outras (KANG; BUCALA, 2019).

Em relação às doenças hepáticas, o papel do MIF foi investigado na hepatite autoimune, colangite biliar primária, hepatite induzida por drogas, na doença hepática alcoólica e no carcinoma hepatocelular (CHC) (AKBAR *et al.*, 2001). Concentrações séricas elevadas de MIF foram encontradas no soro de pacientes com hepatite autoimune e colangite biliar primária, na hepatite alcoólica e cirrose etanólica (ASSIS *et al.* 2014; KUMAGI *et al.*, 2001). Já Bourdi *et al.* (2002) encontraram associação entre níveis séricos elevados de MIF e a lesão hepática induzida por halotano em cobaias. A expressão imuno-histoquímica do MIF também foi identificada nos hepatócitos próximos aos focos de infiltração de neutrófilos e balonização na hepatite alcoólica e na hepatite autoimune (MARIN *et al.*, 2017).

Alguns estudos sugerem que o MIF também é um mediador importante na lesão de isquemia-reperfusão no fígado. Liu *et al.* (2012) viram que havia aumento da expressão da proteína MIF no fígado em 6h e 24h após reperfusão num modelo animal de isquemia quente, e após 24h da reperfusão pós-transplante hepático, além de aumento da concentração sérica de MIF nos ratos submetidos à isquemia quente e ao transplante hepático.

Um dos estudos mais importantes sobre a relação de MIF e a IRI foi realizado por Baron-Stefaniak *et al.* (2017). Os autores demonstraram que havia uma correlação positiva entre a concentração de MIF e de ALT, AST, lactato-desidrogenase e creatina-quinase no efluente do enxerto hepático, sugerindo que os enxertos hepáticos humanos liberam MIF proporcionalmente ao grau de dano hepatocelular. Além disso, foi observado que concentrações maiores de MIF no efluente e no soro estavam associadas à ocorrência de EAD após o transplante.

2.5 Justificativa

Considerando o impacto da DPE na sobrevida do enxerto e do paciente e nos custos hospitalares, faz-se necessário estudar marcadores relacionados a IRI a fim de identificar os pacientes com maior risco de desenvolver DPE para que a intervenção possa ser feita de forma precoce. Com base na observação de que o MIF é um mediador importante nas doenças hepáticas e na IRI no transplante hepático, o objetivo do nosso estudo é estudar a expressão imuno-histoquímica dessa proteína em biópsias hepáticas pós-reperfusão com diagnóstico histológico de IRI. Esperamos assim contribuir para esclarecer qual o papel que o MIF desempenha na patogênese da IRI e qual a relação entre IRI e a ocorrência de DPE. A nossa expectativa é que no futuro o MIF possa ser utilizado como um marcador preditivo desta condição, ajudando a prevenir resultados adversos e melhorando a sobrevida dos enxertos e dos pacientes transplantados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a expressão imuno-histoquímica do MIF em biópsias hepáticas de pacientes transplantados e correlacionar a sua intensidade com características do doador, dados clínicos e laboratoriais do receptor, dados operacionais do transplante, diagnóstico histopatológico de lesão de isquemia-reperfusão e desfecho pós-transplante.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar a expressão imuno-histoquímica do MIF em biópsias hepáticas no tempo zero do transplante (pós-reperfusão);

3.2.2 Classificar a intensidade da expressão imuno-histoquímica do MIF em biópsias hepáticas no tempo zero do transplante (pós-reperfusão);

3.2.3 Correlacionar a intensidade da expressão imuno-histoquímica do MIF nas biópsias hepáticas pós-reperfusão com dados clínicos e laboratoriais do receptor e doador e com dados operacionais do pré e pós-transplante;

3.2.4 Correlacionar a intensidade da expressão imuno-histoquímica do MIF nas biópsias hepáticas pós-reperfusão com a presença e gravidade da esteatose e da IRI na análise morfológica;

3.2.5 Identificar as variáveis que estão relacionadas à ocorrência de retransplante ou óbito nos primeiros 15 dias pós-transplante.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análise histopatológica das biópsias pós-reperfusão, seleção dos casos e revisão de prontuários

153 biópsias pós-reperfusão arquivadas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), provenientes de pacientes que se submeteram a transplante hepático no mesmo hospital entre os anos 2000 e 2020 foram revisadas e classificadas quanto à presença ou ausência de IRI e esteatose.

Os parâmetros utilizados para o diagnóstico e classificação da IRI em leve, moderada ou acentuada foram a presença de infiltrado neutrofílico (formando ou não agrupamentos nos sinusoides), apoptose e necrose de hepatócitos, como descrito na Tabela 1 (ALI *et al.*, 2015).

Tabela 1 - Classificação histológica da IRI segundo Ali *et al.* (2015).

Categoria	Critérios histopatológicos
IRI ausente	Raros neutrófilos intra sinusoidais isolados
IRI leve	Infiltrado neutrofílico intra sinusoidal mais proeminente, mas sem agrupamentos de neutrófilos ou necrose de hepatócitos
IRI moderada	Vários agrupamentos de neutrófilos associados a dano hepatocelular
IRI acentuada	Vários agrupamentos de neutrófilos associados a necrose confluyente de hepatócitos

A esteatose foi classificada em ausente ou mínima (identificada em menos de 5% dos hepatócitos), leve (identificada em até 33% dos hepatócitos), moderada (de 33 a 66% dos hepatócitos) e acentuada (em mais de 66% dos hepatócitos) (KLEINER *et al.*, 2005).

Os pacientes cujas biópsias foram selecionadas tiveram seus prontuários revistos para a coleta de dados demográficos e clínicos tais como resultados de exames laboratoriais pré e pós-transplante, tempo de isquemia fria, etiologia da doença hepática de base, informações do doador, tempo de internamento e ocorrência de morte ou retransplante nos primeiros 15 dias após o transplante. O escore MELD foi calculado a partir dos últimos exames laboratoriais disponíveis antes do transplante, sem a correção para diálise ou presença de carcinoma hepatocelular (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

4.2 Critérios de exclusão

Os casos em cujos blocos de parafina foi detectado material insuficiente para confecção de novos cortes ou com outros diagnósticos histopatológicos (por exemplo, granulomas) foram excluídos do estudo.

Após a revisão dos prontuários médicos, os pacientes cujos dados clínicos foram considerados insuficientes, os menores de 18 anos e os retransplantados foram excluídos do estudo.

4.3 Estudo imuno-histoquímico

Imuno-histoquímica indireta foi realizada nas biópsias hepáticas pós-reperfusão utilizando anticorpo policlonal para anti-MIF (ab65869, Abcam, Cambridge, Reino Unido) em cortes de 4- μ m de tecido embebido em parafina. Brevemente, os cortes foram desparafinizados e hidratados, em seguida foram submetidos à recuperação antigênica através do método de calor úmido utilizando o tampão EDTA (pH 8.0) na temperatura de 90 graus. Bloqueio da peroxidase (Novolink™, Leica Biosystems) foi feito durante 10 minutos, seguido de bloqueio de proteína (Novolink™, Leica Biosystems). Incubação com o anticorpo primário anti-MIF pAb na diluição 1:100 foi feita por 2h, seguida do bloqueio pós primário e revelação com polímero (Novolink™, Leica Biosystems) por 30 minutos. Finalmente, os cortes foram tratados com o cromógeno

3,3-diaminobenzidina para produzir um precipitado de cor marrom no sítio antigênico (LEICA BIOSYSTEMS, 2020). As amostras foram contracoradas com hematoxilina (Novolink™, Leica Biosystems) por 3 minutos e digitalizadas utilizando um scanner de lâminas (3DHitech Ltd., Budapeste, Hungria).

A expressão imuno-histoquímica do MIF foi quantificada através da utilização do plugin IHC Profiler do software ImageJ Fiji (version 1.2; WS Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD). Cinco áreas representativas de cada lâmina foram selecionadas e fotografadas pela patologista orientanda deste trabalho, de acordo com a presença de achados de IRI e esteatose. As imagens foram analisadas pelo software, que classificou a expressão do marcador como negativa, positiva fraca, positiva ou fortemente positiva, de acordo com uma fórmula algébrica que utiliza como parâmetros o número de pixels numa zona, o escore da zona e o número total de pixels na imagem (VARGUESE *et al.*, 2014). A moda para cada caso foi calculada para unificar as expressões das cinco áreas de interesse. Nos casos onde não foi possível calcular a moda, a patologista decidiu entre os dois escores mais frequentes.

4.4 Análise estatística e aspectos éticos

A análise estatística foi feita através do programa SPSS Statistics (IBM Corp., 2015, Version 23.0. Armonk, NY, EUA). Os valores das variáveis quantitativas foram descritos nas tabelas como medianas e intervalos interquartílicos. Os valores das variáveis categóricas foram descritos como frequências relativas e absolutas. As variáveis quantitativas foram submetidas ao teste de Mann-Whitney. Foi realizado o teste de Qui quadrado ou o teste de Fisher, quando necessário, para identificar a associação entre as variáveis categóricas. As variáveis que apresentaram valor de $P < 0.20$ na análise univariada foram selecionadas para a análise multivariada utilizando o modelo de regressão de Poisson e regressão logística para verificar a correlação com o desfecho expressão de MIF positiva e retransplante ou óbito em 15 dias, respectivamente. O valor de $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG sob o número de parecer CAAE 42157120.3.0000.5149.

5. RESULTADOS

5.1 Características demográficas dos pacientes

Um total de 103 pacientes foram selecionados para o estudo e tiveram suas biópsias e prontuários revistos e suas amostras submetidas ao estudo imuno-histoquímico (Figura 1).

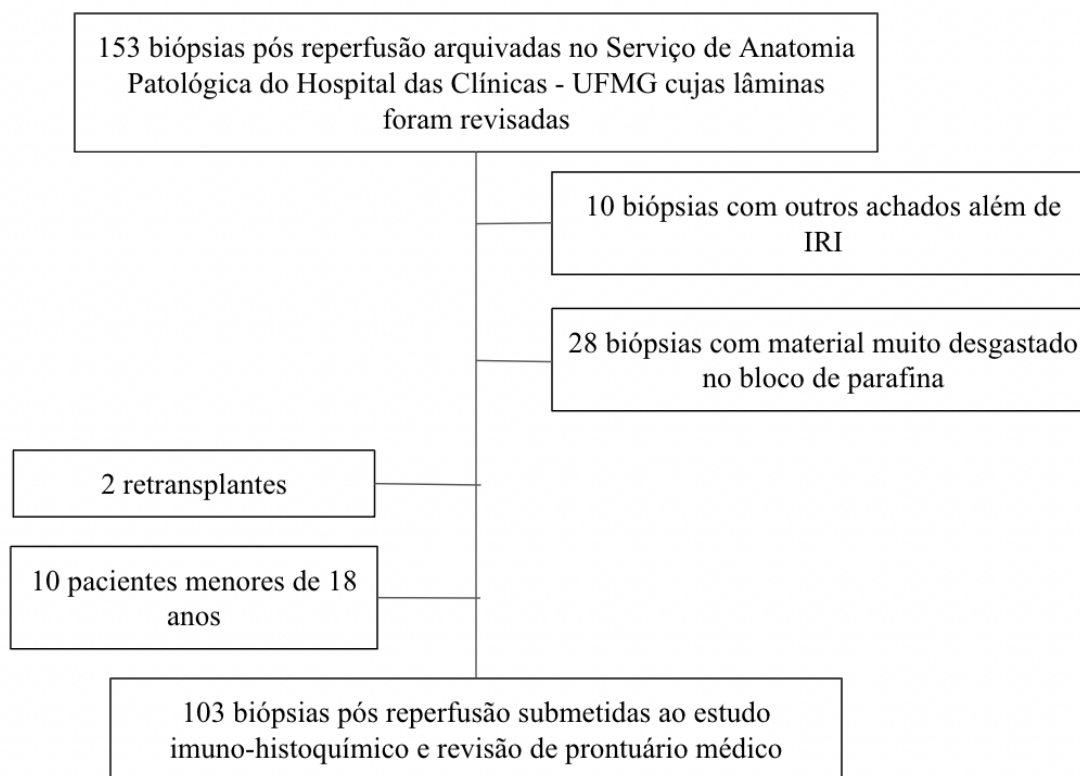


Figura 1 - Seleção das biópsias pós-reperfusão para estudo imuno-histoquímico e revisão de prontuário

As características demográficas dos receptores e doadores estão descritas na Tabela 2. Dos 103 pacientes, 67 (65.0%) eram do sexo masculino e 36 (35.0%) do sexo feminino. As doenças hepáticas de base mais frequentes na amostra foram a cirrose etanólica (31, 30.1%), as hepatites

virais (30 pacientes, 29.1%), seguidas de cirrose criptogênica (18, 17.5%), outras etiologias incluindo doenças colestáticas e vasculares (15, 14.6%) e hepatite autoimune (9, 8.7%). Apenas 12 pacientes (11.7%) tinham diagnóstico concomitante de carcinoma hepatocelular.

Tabela 2 - Características demográficas dos receptores e dos doadores

Variável	Média	Mediana
Idade do receptor (anos)	49.47 (19-69)	51.0 (18)
Escore MELD	20.62 (10-40)	18.00 (9)
Idade do doador (anos)	34.86 (11-62)	34.0 (24)
Creatinina sérica do doador (mg/dL)	1.10 (0.30-3.70)	1.0 (0.60)
IMC do doador (kg/m ²)	24.12 (15.78-42.86)	23.88 (23.68)
Tempo de isquemia fria (min)	512.91(260-1296)	480.0 (190.94)
Tempo de internamento (dias)	18.80 (4-94)	15.0 (16.0)

Os resultados da análise histopatológica mostraram que 49 biópsias (47.6%) não tinham evidências de IRI, 24 biópsias (23.3%) foram classificadas como apresentando IRI leve, 25 (24.3%) como moderada e apenas 5 (4.9%) como acentuada (Figura 2). Em relação à esteatose, em 91 biópsias (88.3%) não havia sinais de esteatose ou esta era mínima, 10 biópsias (9.7%) exibiam esteatose leve, 1 (1.0%) exibia esteatose moderada e 1 (1.0%) esteatose acentuada. Nenhuma das variáveis apresentou associação significativa com a presença de IRI na análise univariada (Tabela 3).

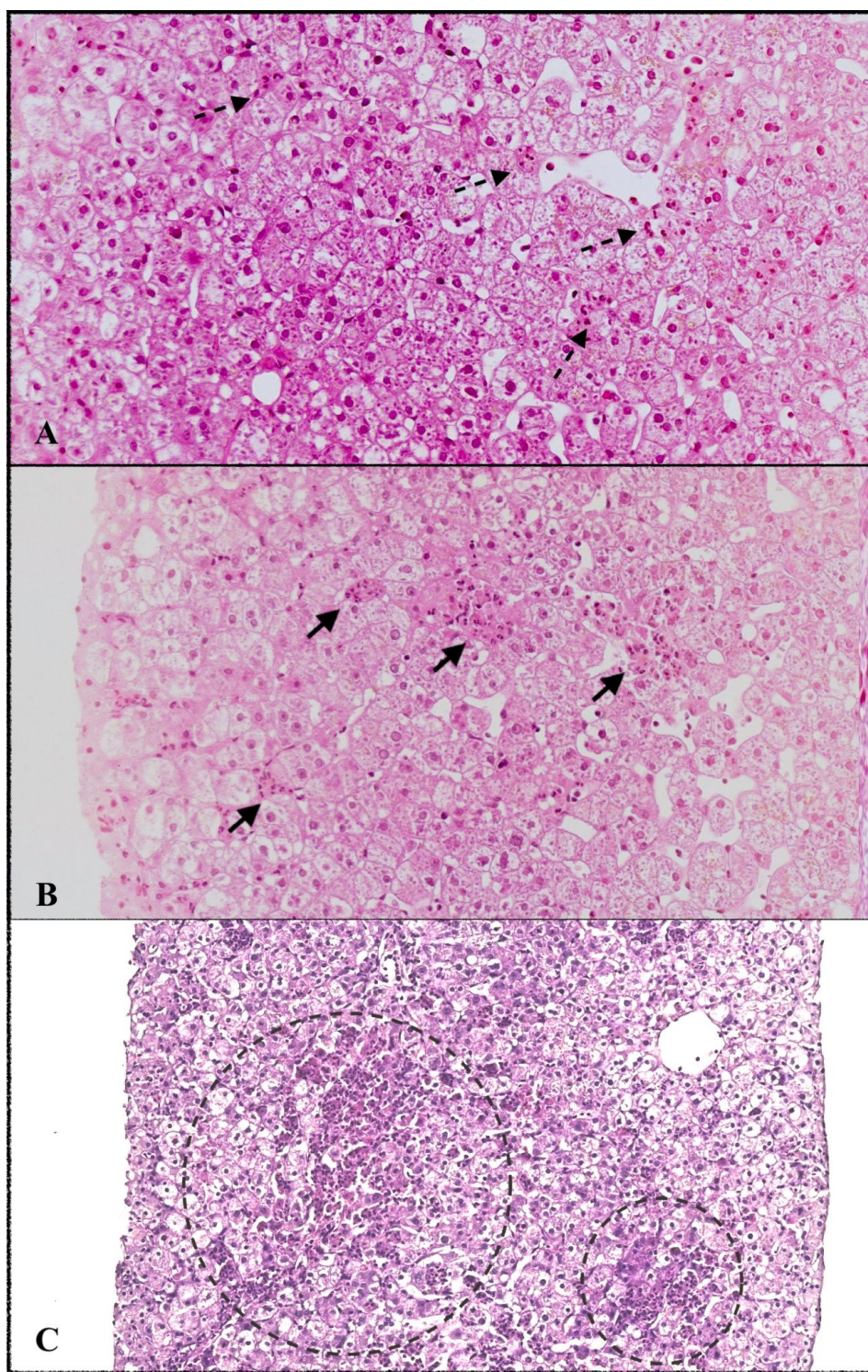


Figura 2 - Classificação histológica da IRI nas biópsias pós-reperfusão. Em (A) nota-se a presença de esparsos neutrófilos nos sinusoides, sem necrose de hepatócitos (seta pontilhada), correspondendo a IRI leve. Em (B) observam-se os frequentes agrupamentos de neutrófilos com necrose focal de hepatócitos

(seta cheia). Em (C) são vistas as áreas de necrose confluyente de hepatócitos (áreas tracejadas), correspondendo a IRI grave.

Tabela 3 - Análise univariada com o desfecho presença de IRI moderada ou grave

Variável	IRI ausente ou leve	IRI moderada ou grave	Valor P
Idade do receptor (anos)	52 (18)	48.5 (18)	0.882
Sexo			0.253
Masculino, n (%)	50 (68.5)	17 (56.5)	
Feminino, n (%)	23 (31.5)	13 (43.3)	
Doença hepática de base			0.743
Cirrose etanólica, n (%)	23 (31.5)	8 (26.7)	
Hepatite autoimune, n (%)	5 (6.8)	4 (13.3)	
Hepatite virais, n (%)	23 (31.5)	7 (23.3)	
Cirrose criptogênica, n (%)	12 (16.4)	6 (20.0)	
Outras*, n (%)	10 (13.7)	5 (16.7)	
Escore MELD**	18 (8)	20.50 (11)	0.284
Presença de CHC			0.501
Sim, n (%)	10 (13.7)	2 (6.7)	
Não, n (%)	63 (86.3)	28 (93.3)	
Esteatose			0.739
Ausente ou mínima, n (%)	65 (89.0)	26 (86.7)	
Leve, n (%)	6 (8.2)	4 (13.3)	
Moderada, n (%)	1 (1.4)	0 (0)	
Acentuada, n (%)	1 (1.4)	0 (0)	
Idade do doador (anos)	33 (26)	35 (23)	0.786
Creatinina sérica do doador (mg/dL)	1.00 (0.5)	0.85 (0.70)	0.150
IMC do doador (kg/m ²)	23.4 (3.35)	24.49 (2.96)	0.066
Tempo de isquemia fria (min)***	485 (203)	474.45(209.48)	0.672
Tempo de internamento (dias)	14.5 (16)	15.5 (17)	0.768

*Outras: doenças hepáticas colestáticas, doenças vasculares, doenças genéticas.

**Informação disponível para 66 pacientes

***Informação disponível para 50 pacientes

5.2 Relação entre a expressão de MIF e dados do receptor, do doador e operacionais do transplante

Em relação à expressão imuno-histoquímica do MIF, esta foi vista em maior intensidade nos hepatócitos, mas também no epitélio dos ductos biliares e células do infiltrado inflamatório, como visto na Figura 3. A maioria dos casos ($n = 64$, 62.1%) teve expressão classificada pelo como positiva fraca, 34 casos (33.0%) apresentaram expressão positiva e apenas 5 (4.9%) tiveram expressão negativa. Nenhum caso teve expressão de MIF classificada como positiva forte.

Devido ao reduzido número de casos que apresentaram expressão negativa, estes foram agrupados com os casos que tiveram expressão positiva fraca para a realização da análise univariada e multivariada. A análise univariada para identificar as possíveis variáveis relacionadas à expressão de MIF mostrou associação entre esta e a presença de IRI moderada ou acentuada ($P = 0.024$). Não houve associação entre esteatose e a expressão de MIF ($P = 0.784$). Também não houve diferença significativa entre o tempo de internamento dos pacientes com expressão de MIF positiva e dos pacientes com expressão de MIF negativa ou positiva fraca ($P = 0.432$). Os resultados da análise univariada estão contidos na Tabela 4.

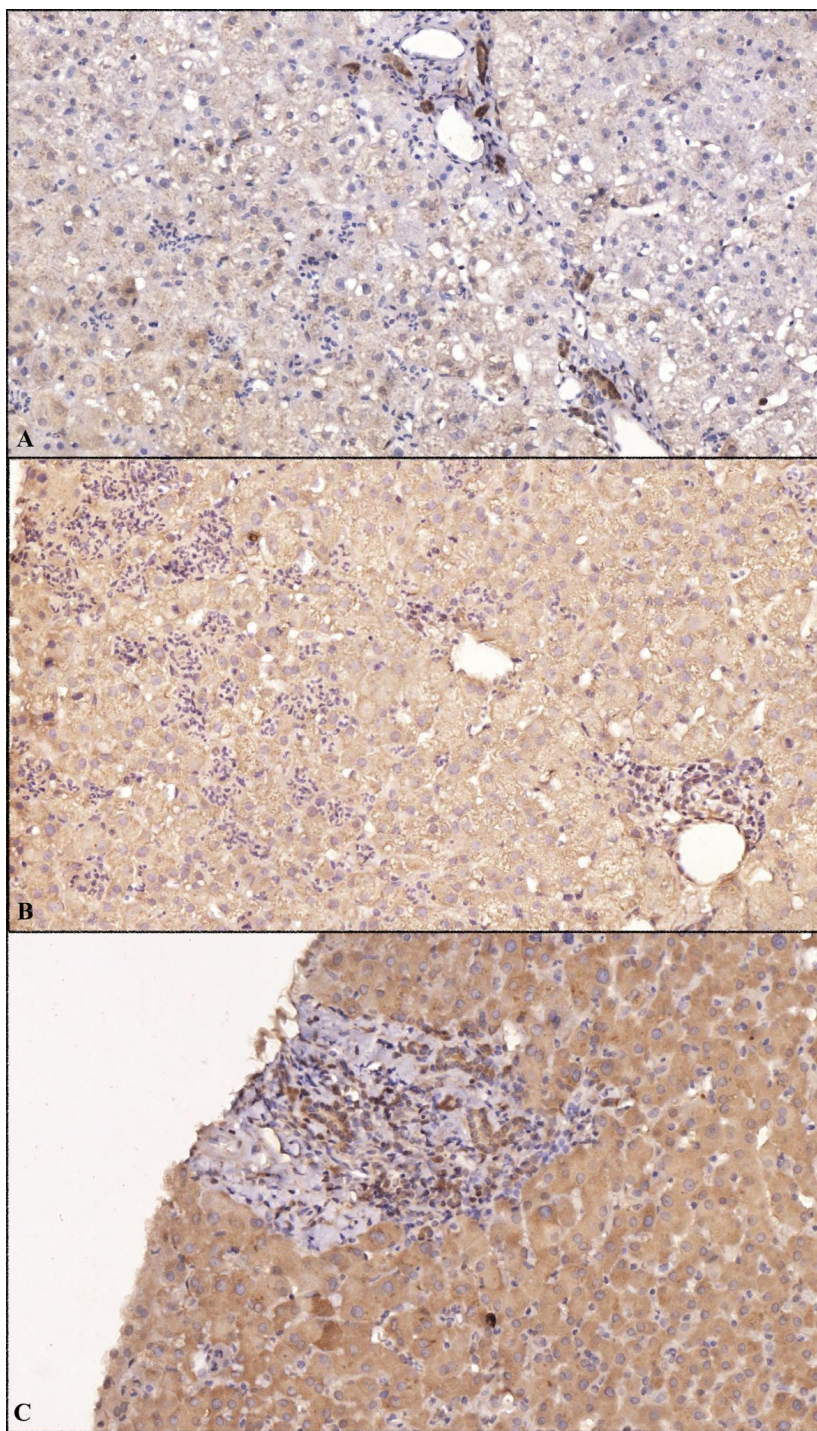


Figura 3 - Expressão imuno-histoquímica do MIF nas biópsias pós-reperusão. (A) Expressão classificada como negativa. (B) Expressão classificada como positiva fraca. (C) Expressão classificada como positiva.

Tabela 4 - Análise univariada com as informações dos doadores, receptores e dados operacionais do transplante e a expressão de MIF

Variável	Expressão de MIF negativa ou positiva fraca	Expressão de MIF positiva	Valor <i>P</i>
Idade do receptor (anos)	53 (19)	48.5 (16)	0.358
Sexo			0.624
Masculino, n (%)	46 (66.7)	21 (61.8)	
Feminino, n (%)	23 (33.3)	13 (38.2)	
Doença hepática de base			0.875
Cirrose etanólica, n (%)	21 (30.4)	10 (29.4)	
Hepatite autoimune, n (%)	7 (10.1)	2 (5.9)	
Hepatite virais, n (%)	19 (27.5)	11 (32.4)	
Cirrose criptogênica, n (%)	13 (18.5)	5 (14.7)	
Outras*, n (%)	9 (13)	6 (17.6)	
Escore MELD**	18 (6)	20 (12)	0.198
Presença de CHC			1.0
Sim, n (%)	8 (11.6)	4 (11.8)	
Não, n (%)	61 (88.4)	30 (88.2)	
IRI			0.024
Ausente ou leve, n (%)	44 (63.8)	29 (85.4)	
Moderada ou grave, n (%)	25 (36.2)	5 (14.7)	
Esteatose			1.0
Ausente ou mínima, n (%)	60 (87.0)	31 (91.2)	
Leve, n (%)	7 (10.1)	3 (8.8)	
Moderada, n (%)	1 (1.4)	0 (0)	
Acentuada, n (%)	1 (1.4)	0 (0)	
Idade do doador (anos)	37 (24)	30.50 (21.8)	0.201
Creatinina sérica do doador (mg/dL)	1.0 (0.68)	0.9 (0.45)	0.892
IMC do doador (kg/m ²)	23.44 (3.58)	24.06 (3.54)	0.469
Tempo de isquemia fria (min)***	492.81 (168.31)	444.54 (229.72)	0.184
Tempo de internamento (dias)	14 (14)	15.5 (16)	0.432

*Outras: doenças hepáticas colestáticas, doenças vasculares, doenças genéticas.

**Informação disponível para 66 pacientes

***Informação disponível para 50 pacientes

Foi realizada uma análise multivariada através do modelo de regressão de Poisson para verificar a correlação entre as variáveis com $P < 0.20$ e a expressão de MIF. Devido à grande quantidade de dados ausentes, as variáveis MELD score e tempo de isquemia fria não foram incluídas nesta etapa, embora fossem elegíveis por terem apresentado $P < 0.20$.

O modelo multivariado mostrou que o achado de IRI ausente ou leve na biópsia pós-reperusão se correlacionou com maior chance de apresentar expressão de MIF positiva ($P = 0.01$, OR: 1.259, 95% CI 1.058-1.499).

5.3 Relação entre a expressão de MIF na biópsia pós-reperusão e exames laboratoriais

Uma análise univariada foi realizada para identificar possíveis associações entre a expressão de MIF e os exames laboratoriais pré e pós-transplante (Tabela 5). Apenas 82 pacientes apresentavam dados completos de exames laboratoriais e foram incluídos nesta análise. As variáveis que apresentaram associação com a expressão de MIF foram o valor da albumina sérica antes do transplante ($P = 0.013$), ALT antes do transplante ($P = 0.018$) e AST antes do transplante ($P = 0.010$). Não foi realizada a análise multivariada com estas variáveis devido ao número reduzido de pacientes nesta amostra ($n = 82$) em relação à amostra total ($n = 103$).

Tabela 5 – Análise univariada com os valores de exames laboratoriais pré e pós-transplante e a expressão de MIF

Variável	Expressão de MIF negativa ou positiva fraca	Expressão de MIF positiva	Valor <i>P</i>
Pré transplante			
Uréia (mg/dL)	28.0 (19.5)	25 (14)	0.205
Creatinina (mg/dL)	1.1 (0.61)	0.9 (0.5)	0.524
Bilirrubina total (mg/dL)	3.0 (2.7)	2.9 (4.95)	0.523
Bilirrubina direta (mg/dL)	0.8 (1.84)	1.07 (3.54)	0.055
RNI	1.79 (0.82)	2.0 (1.21)	0.227
Albumina (g/L)	2.9 (0.68)	2.7 (0.86)	0.013
FA (U/L)	135 (99)	164 (137)	0.982
GGT (U/L)	77.3 (149.8)	78 (78.5)	0.942
AST (U/L)	56 (61)	89 (143)	0.010
ALT (U/L)	44 (33)	67 (68)	0.018
Pós-transplante			
Uréia (mg/dL)	33 (25)	31 (31.3)	0.419
Creatinina (mg/dL)	0.9 (0.4)	0.8 (0.4)	0.557
Bilirrubina total (mg/dL)	3.5 (3.15)	3.95 (3.07)	0.515
Bilirrubina direta (mg/dL)	2.1 (2.65)	3.0 (3.23)	0.373
RNI	2.46 (1.85)	2.3 (1.72)	0.628
Albumina (g/dL)	2.25 (0.8)	1.9 (0.9)	0.179
FA (U/L)	55 (52.8)	66 (66.3)	0.152
GGT (U/L)	76 (72.2)	77.5 (65.3)	0.861
AST (U/L)	662.5 (1114)	456.5 (478)	0.411
ALT (U/L)	406 (529)	366.5 (385)	0.987

5.4 Relação entre o desfecho retransplante ou óbito em 15 dias e as características do doador, do receptor, achados histológicos e expressão de MIF

Dos 103 pacientes estudados, apenas 10 (9.7%) evoluíram para retransplante ou óbito nos primeiros 15 dias pós-transplante hepático. Foi testada a associação entre a ocorrência de retransplante ou óbito nos primeiros 15 dias pós-transplante com as características dos receptores, dos doadores, dados operacionais do transplante, expressão de MIF, esteatose e IRI. Nenhuma das variáveis apresentou associação significativa (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise univariada com o desfecho retransplante ou óbito em 15 dias pós-transplante

Variável	Retransplante ou óbito em 15 dias		Valor <i>P</i>
	Não	Sim	
Idade do receptor (anos)	50.50 (18.0)	49 (27.0)	0.930
Sexo			0.729
Masculino, n (%)	59 (67.0)	6 (60.0)	
Feminino, n (%)	29 (33.0)	4 (40.0)	
Doença hepática de base			0.532
Cirrose etanólica, n (%)	25 (28.4)	5 (50.0)	
Hepatite autoimune, n (%)	8 (9.1)	1 (10.0)	
Hepatite virais, n (%)	25 (28.4)	1 (10.0)	
Cirrose criptogênica, n (%)	17 (19.3)	1 (10.0)	
Outras*, n (%)	13 (14.8)	2 (20.0)	
Escore MELD**	18 (9.0)	18 (7.0)	0.322
Presença de CHC			1.0
Sim, n (%)	11 (12.5)	1 (10.0)	
Não, n (%)	77 (87.5)	9 (90.0)	
IRI			0.273
Ausente ou leve, n (%)	61 (69.3)	9 (90.0)	
Moderada ou grave, n (%)	27 (30.7)	1 (10.0)	
Esteatose			0.672
Ausente ou mínima, n (%)	76 (76.4)	10 (100.0)	
Leve, n (%)	10 (11.4)	0 (0)	
Moderada, n (%)	1 (1.1)	0 (0)	
Acentuada, n (%)	1 (1.1)	0 (0)	
Expressão de MIF			0.491
Negativa ou positiva fraca, n (%)	58 (65.9)	8 (80.0)	
Positiva, n (%)	30 (34.1)	2 (20.0)	
Idade do doador (anos)	32 (25)	44.5 (18.3)	0.056
Creatinina sérica do doador (mg/dL)	1.0 (0.6)	1.0 (0.63)	0.893
IMC do doador (kg/m ²)	23.99 (3.58)	22.76 (3.18)	0.252
Tempo de isquemia fria (min)***	482.5 (175.19)	409.5 (788.25)	0.411

*Outras: doenças hepáticas colestáticas, doenças vasculares, doenças genéticas.

**Informação disponível para 64 pacientes

***Informação disponível para 50 pacientes

6. DISCUSSÃO

Embora a sua incidência e até a sua nomenclatura varie entre os estudos, é inquestionável que a DPE é uma causa importante de morbidade e mortalidade para os pacientes transplantados hepáticos. A IRI é uma consequência inevitável do transplante hepático, sendo intimamente associada à DPE, porém os seus mecanismos fisiopatológicos não foram completamente elucidados. Desta forma, a realização de estudos que ajudam a esclarecer o papel da IRI no desenvolvimento da DPE não só contribuem para melhorar o entendimento dos seus mecanismos fisiopatológicos como também possibilitam identificar alvos terapêuticos ou marcadores preditivos dessa condição.

Nesse sentido, Sosa *et al.* (2016) pesquisaram a expressão de 38 citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no sangue portal e sistêmico no pré transplante e no pós-transplante e correlacionaram com IRI na biópsia pós-reperfusão, encontrando um perfil específico de citocinas relacionado à IRI. Esse perfil consistia em níveis aumentados de TNF- α ; interleucinas 5, 13 e 2; CXCL8; interleucina 7, interleucina 1Ra e fator de crescimento epidérmico (EGF).

Já Cortes *et al.* (2014) estudaram se existe um perfil metabólico do doador que poderia diferenciar entre função imediata do enxerto e EAD e encontraram que biomarcadores como ácidos biliares, lisofosfolípidios, fosfolípidios, esfingomielinas e produtos do metabolismo da histidina estavam associados à disfunção do enxerto.

Algumas estratégias como o pré-condicionamento isquêmico, o pós-condicionamento isquêmico e a perfusão hepática por máquina *ex situ* também estão sendo investigadas na tentativa de diminuir o dano causado pela reperfusion (YANG *et al.*, 2018).

O pré-condicionamento isquêmico consiste em submeter o enxerto a pequenos períodos de isquemia para prepará-lo para um período de reperfusão longo. Porém, submeter o órgão a um período de isquemia antes da preservação pode causar dano vascular ou até piorar a função pós-transplante. Já o pós-condicionamento consiste em expor o enxerto a pequenos ciclos de reperfusão após o período isquêmico (FOLEY; CARI, 2007).

A perfusão hepática por máquina ex situ proporciona ao enxerto um fluxo contínuo de solução oxigenada por meio da vasculatura, preservando a microcirculação hepática, oferecendo nutrientes e oxigênio para o metabolismo celular e removendo os metabólitos tóxicos residuais. Essa estratégia beneficia principalmente os órgãos limítrofes, pois diminui o tempo de isquemia fria. A perfusão pode ser feita com o líquido de preservação a 37°C (perfusão hepática normotérmica) ou a 10°C (perfusão hepática hipotérmica), porém outras modalidades de perfusão combinando as duas técnicas já estão sendo estudadas. No entanto, esse método tem limitações quanto à sua aplicabilidade principalmente relacionadas ao custo da máquina de perfusão e do perfusato e ao transporte do dispositivo entre o hospital da captação e o centro transplantador (BONTEON; BONTEON, 2020).

Embora alguns desses métodos sejam eficazes em reduzir ou controlar a IRI no fígado, alguns deles são caros e difíceis de realizar no contexto clínico (YANG et al., 2018).

Nesse contexto, o nosso estudo se propôs a estudar uma citocina com possível papel na patogênese da IRI, com potencial de se tornar um biomarcador para essa condição. Nossa amostra corresponde a uma coorte de pacientes transplantados hepáticos em um hospital escola na região Sudeste do Brasil entre os anos 2000 e 2020. Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais coletados foram selecionados de acordo com a sua associação na literatura com a sobrevida pós-transplante e com a ocorrência de DPE.

A mediana de idade dos receptores foi de 51 anos, similar ao encontrado no estudo de Freitas *et al.* (2010) tanto na era pré MELD quanto na era pós MELD. As duas etiologias mais frequentes de doença hepática de base foram a cirrose etanólica (30.1%) e as hepatites virais (29.1%). Segundo Bittencourt, Farias e Couto (2016), a principal indicação para o transplante hepático no Brasil é a hepatite viral, seguida da cirrose etanólica. Já na coorte completa do estudo de Nascimento *et al.* (2020), outras etiologias excluindo hepatites virais, cirrose etanólica, câncer e toxinas foram responsáveis por 65.07% dos transplantes, enquanto que hepatites virais foram responsáveis por 24.27% dos transplantes.

O tempo de isquemia fria pode ser definido como o período entre o clampeamento dos vasos do doador até o momento em que o órgão é colocado na cavidade abdominal do receptor. Durante este período o órgão é perfundido por uma solução de preservação gelada para diminuir os efeitos deletérios da isquemia. A importância desta variável no transplante hepático se dá pelo fato de que esta é uma das características que está associada ao prognóstico do transplante e que pode potencialmente ser modificada pela equipe de transplante (FREITAS *et al.*, 2017). As causas de prolongamento do tempo de isquemia fria são multifatoriais, incluindo tempo de transporte do órgão, variações inerentes ao centro de transplante e do processo de captação de órgãos (PAN *et al.*, 2018).

A mediana do tempo de isquemia fria encontrado no nosso trabalho foi 480 minutos (8 horas). Não existe um limite na literatura para o que seria um tempo de isquemia fria seguro até o momento e a associação com os resultados adversos pós-transplante tem sido inconsistente entre os estudos (CHEN; XU, 2014).

No estudo de Freitas *et al.* (2017), a média do tempo de isquemia fria dos enxertos captados à distância (500 ± 145 minutos) foi maior do que a dos enxertos captados localmente na cidade de Curitiba (317.85 ± 105 minutos), porém essa diferença não se refletiu em uma maior gravidade

na análise histológica de isquemia quando comparados aos captados localmente. Já o estudo de Pan *et al.* (2018) encontrou que tempos de isquemia fria entre 11 e 14 horas e entre 9 e 16 horas foram associados a maior risco de mortalidade e perda do enxerto, respectivamente, se comparados com a faixa de referência de 6-7 horas. Um outro achado deste estudo foi a correlação entre o tempo de isquemia maior que 7 horas e o aumento do tempo de internamento do paciente. Por outro lado, Sibulesky *et al.* (2016), não encontraram diferença estatisticamente significativa entre o tempo de isquemia fria e a sobrevivência do paciente ou do enxerto, embora tenha sido vista associação entre o tempo de isquemia fria maior que 12 horas e as taxas de disfunção precoce do enxerto.

O tempo de internamento é uma variável que mede indiretamente a ocorrência de complicações durante o período pós-transplante e os custos associados ao transplante. A mediana do tempo de internamento no nosso estudo foi de 15 dias, não diferindo do encontrado na literatura. O tempo de internamento prolongado foi definido em muitos estudos como internamento que dura mais de 30 dias após o transplante. Smith *et al.* (2009) encontraram que o tempo de internamento prolongado estava associado ao internamento na Unidade de Terapia Intensiva na ocasião do transplante, a realização do transplante na era pré-MELD, infecção bacteriana pós-transplante, sangramento gastrointestinal, insuficiência renal e rejeição ao enxerto. No estudo realizado por Souza *et al.* (2019) em um centro no sul do Brasil com dados de 2013 e 2014, a média de duração do internamento foi 25 ± 19 dias. Já Amiri *et al.* (2020) viram um tempo de internamento de 17.07 ± 9.19 dias. IMC, escore MELD, duração da cirurgia, infecção bacteriana, derrame pleural, reoperação e problemas psiquiátricos foram preditores independentes de tempo de internamento prolongado.

A IRI é um fator que contribui enormemente para DPE. Vários testes bioquímicos e hematológicos são utilizados na prática clínica para monitorar a função do enxerto e assim detectar DPE, contudo esses testes não são específicos e é incerto como eles se relacionam à IRI (SOSA *et al.*, 2018). Nesse contexto, a avaliação histopatológica das biópsias pós-reperusão

ajuda a identificar doenças pré-existentes e alterações como esteatose e IRI. (FUENTES-VALENZUELA *et al.*, 2022).

De acordo com Shahbazi *et al.* (2015), a presença de esteatose macrovesicular, corpos apoptóticos e infiltrado neutrofílico são os achados mais importantes que podem refletir testes de função hepática alterados. Neste estudo, a presença e a densidade de corpos apoptóticos se correlacionou com o aumento das transaminases no período pós-transplante precoce, refletindo o dano causado pela isquemia quente; já a presença de agregados de neutrófilos acompanhada de lesão endotelial foi associada ao aumento precoce da bilirrubina total e ao dano causado pela isquemia fria (GAFFEY *et al.*, 1997; SHAHBAZI *et al.*, 2015).

Em relação à proporção de biópsias pós-reperfusão com achados histológicos de IRI, nós encontramos que na maioria das biópsias (70.9%) não havia sinais de IRI ou estes eram leves e em 29.1% havia IRI moderada ou grave. Busquets *et al.* (2001) acharam resultados parecidos quando avaliaram a presença de sinais de lesão de preservação e sua relação com o aparecimento de complicações biliares pós-transplante: cerca de 80% das biópsias tinha um infiltrado neutrofílico ausente ou leve e mais de 90% não tinha necrose hepatocitária. Ali *et al.* (2015) encontraram IRI moderada a grave em 30.9% das biópsias pós-reperfusão que estudaram. No estudo de Zanchet *et al.* (2016), a maioria das biópsias apresentava leve infiltrado neutrofílico e leves alterações isquêmicas.

Ito *et al.* (2020), por outro lado, encontraram sinais histológicos de IRI na maioria (87.9%) dos pacientes no maior estudo unicêntrico investigando o impacto da IRI histológica e a sobrevida dos enxertos, porém IRI moderada a grave correspondia a apenas 13.8% das biópsias. Neste estudo os critérios para definir IRI moderada ou grave também foram o grau do infiltrado neutrofílico e necrose de hepatócitos.

No nosso estudo não encontramos associações entre a presença de IRI moderada a grave e características demográficas dos receptores, dados dos doadores e dados do transplante como tempo de isquemia fria e tempo de internamento. Na literatura, o tempo de isquemia fria (BUSQUETS *et al.*, 2001; FUENTES-VALENZUELA *et al.*, 2022, ITO *et al.*, 2020), a idade do doador, o IMC do doador, a presença de esteatose (ALI *et al.*, 2015), hipertensão do receptor e do doador, tempo de isquemia quente e enxerto proveniente de doador do sexo masculino (ITO *et al.*, 2020) foram relacionados à gravidade da IRI.

Algumas possíveis explicações para o nosso achado são o tamanho reduzido da amostra, principalmente no que concerne a quantidade de pacientes com informação do tempo de isquemia fria disponível (n = 50) ou diferença entre a nossa população e as populações americana, espanhola e britânica.

No presente trabalho, a porcentagem de casos com achado de esteatose moderada a grave na biópsia foi comparável à do estudo de Fuentes-Valenzuela *et al.* (2022) (2% versus 4%), e pode ser explicada pelo IMC dos doadores encontrada no nosso estudo, que foi 23.88 kg/m². No estudo de Rinella *et al.* (2001), nenhum dos pacientes com IMC menor que 25 kg/m² apresentou esteatose na biópsia hepática e houve uma correlação significativa entre o IMC e o achado de esteatose.

Em relação à expressão de MIF, foi verificado aumento desta nos hepatócitos, células do epitélio biliar e células do infiltrado inflamatório na hepatite autoimune e na colangite biliar primária (ASSIS *et al.*, 2014) e também foi identificada nos hepatócitos próximos aos focos de infiltração de neutrófilos e balonização em pacientes com hepatite alcoólica (KUMAGI *et al.*, 2001).

Poucos estudos até o momento relacionam MIF e IRI no transplante hepático. O estudo de Liu *et al.* (2012) foi o primeiro a investigar o papel do MIF como um marcador de lesão hepática na

isquemia quente e fria. Os autores flagraram uma expressão de MIF mais forte no grupo de ratos 6h e 24h após a reperfusão. No entanto, no grupo de ratos que foi estudado após 30 minutos da reperfusão não havia ainda um aumento significativo da expressão da proteína MIF, embora já houvesse aumento do mRNA.

Já Baron-Stefaniak *et al.* (2017) realizaram o primeiro estudo que mediu a concentração de MIF no efluente dos enxertos hepáticos humanos. Esta se correlacionou diretamente com a concentração de marcadores de lesão hepatocelular, sugerindo que enxertos hepáticos humanos liberam MIF proporcionalmente ao grau de dano hepatocelular.

O nosso estudo, nesse contexto, é pioneiro na avaliação da expressão da proteína MIF nas biópsias pós-reperfusão de humanos e correlação com IRI histológica. Os nossos achados indicam uma correlação negativa entre a expressão de MIF e a intensidade da IRI na biópsia pós-reperfusão, o que significa que pacientes com IRI mais grave na biópsia apresentaram expressão mais fraca do que os pacientes com IRI ausente ou leve. Essa relação pode ser explicada pela característica do MIF ser armazenado em *pools* intracelulares que são rapidamente depletadas após estímulo (LIU *et al.*, 2012). A nossa hipótese é que em resposta a uma maior intensidade da IRI há uma liberação mais rápida de MIF dos hepatócitos para o efluente do enxerto, fazendo com que seja verificada menor intensidade da expressão da proteína por imuno-histoquímica imediatamente após essa liberação (quando é realizada a biópsia pós-reperfusão).

Na análise univariada, a expressão de MIF se associou com os valores séricos de albumina, AST e ALT pré transplante. Embora não tenha sido realizada uma análise multivariada, o grupo que apresentou expressão de MIF positiva teve valores menores de albumina e valores maiores de AST e ALT. Valores de albumina menores, por sua vez, podem estar ligados a um maior escore de MELD, implicando numa maior gravidade do receptor pré transplante. Uma das etapas do processo de alocação de órgãos no Brasil é a avaliação dos critérios de risco de disfunção no

pós-operatório pelo cirurgião transplantador, o que pode resultar em descarte do órgão se houver alta probabilidade de resultado insatisfatório resultante da combinação de doador e receptor (BONTEON, BONTEON, 2020). É possível então que nesta avaliação esses receptores tenham recebido órgãos com menos fatores de risco para IRI moderada a grave.

Finalmente, a ocorrência de retransplante ou óbito em 15 dias é um dado que pode apontar indiretamente para a PNF. Baron-Stefaniak *et al.* (2017) encontraram uma associação entre o desenvolvimento de DPE e concentrações mais elevadas de MIF no efluente e no soro dos pacientes, o que nos levou a pesquisar a relação entre a expressão de MIF e a ocorrência desse desfecho.

O nosso estudo não encontrou associação entre retransplante ou óbito em 15 dias e as outras variáveis estudadas, incluindo a presença de IRI moderada ou grave na biópsia e a expressão de MIF positiva. Isso pode ser atribuído à pequena incidência de PNF e ao fato de esta complicação ser a manifestação mais grave do espectro da DPE. Segundo Ito *et al.* (2020), é possível que a presença de IRI isoladamente não seja suficiente para causar EAD, mas sim a interação da IRI grave com outros fatores de risco do enxerto.

As limitações do nosso estudo são inerentes principalmente à sua natureza retrospectiva, que não permite a investigação de causalidade, ao tamanho da amostra, a problemas operacionais da coleta de dados clínicos em prontuários físicos e à irregularidade do preenchimento de determinadas informações do transplante antes da implementação dos prontuários eletrônicos do Serviço de Transplante Hepático no Hospital das Clínicas.

Devido a problemas técnicos relacionados ao arquivamento dos prontuários físicos, não foi possível coletar dados de exames laboratoriais de toda a amostra do estudo, como também não foi possível coletar dados suficientes para estudar a relação entre EAD e a expressão de MIF. Além

disso, embora tenha sido utilizada no estudo, sabemos que a ocorrência de retransplante ou óbito nos primeiros 15 dias após o transplante não é a melhor maneira de estudar a PNF, pois esta definição abrange outras complicações clínicas e cirúrgicas que podem levar ao óbito no período pós-transplante precoce.

Uma outra limitação do presente trabalho foi o fato de não ter sido avaliado o impacto da utilização do escore MELD para a alocação dos fígados para transplante, visto que a maioria dos pacientes da nossa coorte foi transplantado entre os anos 2000 e 2004.

Finalmente, tendo em vista o comportamento observado da expressão do MIF em relação à IRI diagnosticada na biópsia pós-reperfusão, acreditamos que seria interessante a realização de estudos prospectivos comparando a expressão imuno-histoquímica com a concentração da proteína no soro e no efluente do enxerto, se possível com realização de nova biópsia algumas horas ou dias pós-reperfusão. Uma outra perspectiva para estudos futuros seria comparar a intensidade da expressão de MIF entre os hepatócitos, epitélio biliar e células do infiltrado inflamatório.

7. CONCLUSÃO

- A maioria dos pacientes incluídos no estudo apresentou expressão positiva fraca de MIF. A expressão do MIF foi localizada nos hepatócitos, colangiócitos e células do infiltrado inflamatório.
- Dentre os dados clínicos do paciente, dados operacionais do transplante e achados histológicos, a única variável que teve associação com a expressão de MIF foi a presença de IRI. A IRI moderada ou grave diagnosticada na biópsia pós-reperusão se correlacionou com uma menor intensidade da expressão imuno-histoquímica do MIF.
- Dentre os dados de exames laboratoriais pré e pós-transplante os únicos que apresentaram associação significativa com a expressão de MIF foram valores séricos de albumina, AST e ALT pré transplante.
- Não foi encontrada nenhuma variável que se associou significativamente com a ocorrência de retransplante ou óbito em 15 dias, o que pode ser explicado pela raridade da ocorrência desse desfecho e o número relativamente pequeno de pacientes na amostra.

8. PERSPECTIVAS

Os achados deste estudo quanto à correlação entre a expressão de MIF e a gravidade da IRI diagnosticada na biópsia pós-reperfusão apontam para a necessidade de mais trabalhos na área com o objetivo de esclarecer o papel dessa citocina na patogênese da IRI, especialmente comparando a expressão imuno-histoquímica no enxerto com a concentração do MIF no soro dos pacientes e no efluente do enxerto. Além disso, uma outra possibilidade de estudo identificada no nosso trabalho é a investigação da diferença de intensidade da expressão do MIF entre hepatócitos, colangiócitos e células do infiltrado inflamatório.

Por fim, acreditamos que a relação entre a ocorrência de EAD e PNF e o MIF precisa ser melhor esclarecida em estudos com um maior número de pacientes, bem como a relação entre os exames laboratoriais pré e pós-transplante, os diferentes fatores de risco para DPE e a expressão dessa citocina.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERLI, D.; LEECH, E.; MORAND, E. F. Macrophage migration inhibitory factor and glucocorticoid sensitivity. **Rheumatology**, v. 45, n. 8, p. 937-943, ago, 2006.

AKBAR, S. M. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis; relevance to pathogenesis. **Cancer Letters**, v. 171, n. 2, p. 125-132, out, 2001.

ALI, Jason M. *et al.* Analysis of ischemia/reperfusion injury in time-zero biopsies predicts liver allograft outcomes. **Liver Transpl.**, v. 21, n. 4, p. 487-499, abr; 2015.

AMIRI, Mahmoud *et al.* Factors Associated With Length of Hospital Stay Following Liver Transplant Surgery. **Experimental and Clinical Transplantation**, v. 18, n. 3, p. 313-319, jun, 2020.

ASSIS, David N. *et al.* The Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Autoimmune Liver Disease. **Hepatology**, v. 59, n. 2, p. 580-591, fev, 2014.

ASSIS, David N. *et al.* A macrophage migration inhibitory factor polymorphism is associated with autoimmune hepatitis severity in US and Japanese patients. **Dig Dis Sci.**, v. 61, n. 12, p. 3506-3512, dez, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS - ABTO. Manual de doação e transplantes: Informações práticas sobre todas as etapas do processo de doação de órgãos e transplante. Organizado por Clotilde Druck Garcia. Porto Alegre: Libretos, 2017.

BARON-STEFANIAK, Joanna *et al.* Graft-derived macrophage migration inhibitory factor correlates with hepatocellular injury in patients undergoing liver transplantation. **Clin Transplant.**, v. 31, n. 6, p.1-7, abr, 2017.

BITTENCOURT, Paulo L.; FARIAS, Alberto Q.; COUTO, Claudia A. Liver Transplantation in Brazil. **Liver Transpl**, v. 22, p. 1254-1258, maio, 2016.

BLOOM, Barry R.; BENNETT, Boyce. Mechanism of a Reaction in Vitro Associated with Delayed-Type Hypersensitivity. **Science**, v. 153, n. 3731, p. 80-82, jul, 1966.

CHEN, Xiao-BO e XU, Ming-Qing. Primary graft dysfunction after liver transplantation. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 13, v. 2, p. 125-137, abr, 2014.

BOLONDI, Federico *et al.* Predictive factors of short term outcome after liver transplantation: a review. **World J Gastroenterol**, v. 22, p. 26, p. 5936-5949, jul, 2016.

BOURDI, Mohammed *et al.* Macrophage migration inhibitory factor in drug-induced liver injury: a role in susceptibility and stress responsiveness. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 294, n. 2, p. 225-230, jun, 2002.

BONTEON, Yuri L.; BONTEON, Amanda P. C. S. Perspectivas para a máquina de perfusão hepática ex situ no Brasil. **Rev Col Bras Cir**, v. 47, e20202610, out, 2020.

BUSQUETS, Juli *et al.* Postreperfusion Biopsies Are Useful in Predicting Complications After Liver Transplantation. **Liver Transplantation**, v. 7, n. 5, p. 432-435, maio, 2001.

CALANDRA, Thierry; ROGER, Thierry. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nat Rev Immunol.**, v. 3, n. 10, 791-800, out, 2003.

CALANDRA, Thierry; BUCALA, Richard. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): A Glucocorticoid Counter-Regulator within the Immune System. **Crit Rev Immunol.**, v. 37, n. 2-6, p. 359-370, 2017.

CHAIB, Eleazar; MASSAB, Eduardo. The Potential Impact of Using Donations After Cardiac Death on the Liver Transplantation Program and Waiting List in the State of Sao Paulo, Brazil. **Liver transplantation**, v. 14, n. 12, p. 1732-1736, dez, 2008.

CHU, Michael J. J. *et al.* Donor Hepatic Steatosis and Outcome After Liver Transplantation: a Systematic Review. **J Gastrointest Surg**, v. 19, n. 9, p. 1713–1724, abr, 2015.

CORTES, Miriam *et al.* Metabolomics discloses donor liver biomarkers associated with early allograft dysfunction. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 3, p. 564-574, set, 2014.

DAUGAARD, Thomas R. *et al.* Postoperative complications as a predictor for survival after liver transplantation – proposition of a prognostic score. **HPB (Oxford)**, v. 20, n. 9, p. 815-822, set, 2018.

DESCHENES, Marc *et al.* Early allograft dysfunction after liver transplantation: a definition and predictors of outcome. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. **Transplantation**, v. 66, n. 3, p. 302-310, ago, 1998.

DESCHENES, Marc *et al.* Use of Older Donor Livers Is Associated With More Extensive Ischemic Damage on Intraoperative Biopsies During Liver Transplantation. **Liver Transplantation and Surgery**, v. 5, n. 5, p. 357-361, set, 1999.

DESCHENES, Marc. Early Allograft Dysfunction: Causes, Recognition, and Management. *Liver Transpl.*, 19 Suppl 2:S6-8, nov, 2013.

FREITAS, Alexandre C. T. *et al.* The impact of the model for end-stage liver disease (MELD) on liver transplantation in one center in Brazil. **Arq Gastroenterol.**, v. 47, n. 3, p. 233-237, jul-set, 2010.

FREITAS, Alexandre C. T. *et al.* Efeitos do tempo de isquemia fria sobre os enxertos hepáticos. **Arq Bras Cir Dig.**, v. 30, n. 4, p. 239-243, out-dez, 2017.

FOLEY, David; CARI, Ravi. Ischemia-reperfusion injury in transplantation: novel mechanisms and protective strategies. **Transplantation Reviews**, v. 21, p. 43-53, 2007.

GAFFEY, Michael *et al.* Predictive Value of Intraoperative Biopsies and Liver Function Tests for Preservation Injury in Orthotopic Liver Transplantation. **Hepatology**, v. 25, n. 1, p. 184-189, jan, 1997.

GRIEB, Gerrit *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a promising biomarker. **Drug News Perspect.**, v. 23, n. 4, p. 257-264, mai, 2010.

HOI, Alberta Y.; ISKANDER, Madgy N.; MORAND, Eric F. Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Therapeutic Target Across Inflammatory Diseases. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 6, n. 3, p. 183-190, abr, 2007.

ITO, Takahiro *et al.* Ischemia-reperfusion injury and its relationship with early allograft dysfunction in liver transplant patients. **Am J Transplant.**, v. 21, n. 2, p. 614-625, fev, 2021.

JAVEED, A.; ZHAO, Y.; ZHAO, Y. Macrophage-migration inhibitory factor: role in inflammatory diseases and graft rejection. **Inflamm Res.**, v. 57, n. 2, p. 45-50, fev, 2008.

KANG, Insoo; BUCALA, Richard. The immunobiology of MIF: function, genetics and prospects for precision medicine. **Nature Reviews Rheumatology**, v.15, p. 427–437, jun, 2019.

KLEINER, David E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p.1313-132, jun, 2005.

KOK, Beverley; DONG, Victor; KARVELLAS, Constantine J. Graft Dysfunction and Management in Liver Transplantation. **Crit Care Clin.**, v. 35, n. 1, p. 117-133, jan, 2019.

KUMAGI, Teru *et al.* Increased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in alcoholic liver diseases and their expression in liver tissues. **Clin Biochem.**, v. 34, n. 3, p. 189-193, mai, 2001.

LAN, Hui Y *et al.* Macrophage migration inhibitory factor expression in human renal allograft rejection. **Transplantation**, v. 66, n. 11, p. 1465-1471, dez, 1998.

LEE, David *et al.* Early allograft dysfunction after liver transplantation: an intermediate outcome measure for targeted improvements. **Annals of hepatology**, v. 15, n. 1, p. 53-60, jan-fev, 2016.

LEECH, Michelle *et al.* Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. **Arthritis Rheum.**, v. 42, n. 8, p. 1601-1608, ago, 1999.

LEICA BIOSYSTEMS. Novolink polymer detection systems - instruções de utilização. Disponível em: <https://shop.leicabiosystems.com/en-gb/ihc-ish/detection-systems/pid-novolink-polymer-detection-systems>. Acesso em 30/01/2022.

LUE, Hongqi *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. **Microbes Infect.**, v. 4, n. 4, p. 449-460, abr, 2002.

LUÉ, Alberto *et al.* How important is donor age? **World J Gastroenterol.**, v. 22, n. 21, p. 4966-4976, jun, 2016.

LIU, Anding *et al.* Early release of macrophage migration inhibitory factor after liver ischemia and reperfusion injury in rats. **Cytokine**, v. 57, n. 1, p. 150-157, jan, 2012.

MARIN, Veronica *et al.* Hepatocyte-derived macrophage migration inhibitory factor mediates alcohol-induced liver injury in mice and patients. **J Hepatol.**, v. 67, n. 5, p. 1018-1025, nov, 2017.

MAZILESCU, Laura I. *et al.* Early Allograft Dysfunction After Liver Transplantation With Donation After Circulatory Death and Brain Death Grafts: Does the Donor Type Matter? **Transplantation Direct**, v. 7, n. 8, p. e727, jul, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.600, de 21 de outubro de 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes. Diário Oficial da União 2009; 30 out.

MOOSBURNER *et al.* Early Allograft Dysfunction Increases Hospital Associated Costs After Liver Transplantation—A Propensity Score–Matched Analysis. **Hepatology Communications**, v. 5, n. 3, p. 526-537, 2021.

NASCIMENTO Guilherme F. *et al.* Sixteen-Year Cohort of Liver Transplantation in the National Health System in Brazil: Analysis of Immunosuppression Maintenance Therapies. **Front. Pharmacol.**, v. 11, n. 572043, out, 2020.

NEVES, DOUGLAS B. *et al.* Disfunção primária do enxerto hepático: definições, critérios diagnósticos e fatores de risco. **Einstein.**, v. 14, n. 4, p. 567-572, 2016.

NOBRE, Camila C. G. *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Biological Activities and Relation with Cancer. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 23, n.2, p. 235–244, abr, 2017.

OLTHOFF, Kim M. *et al.* Validation of a Current Definition of Early Allograft Dysfunction in Liver Transplant Recipients and Analysis of Risk Factors. **Liver transplantation**, v. 16, n. 8, p. 943-949, ago, 2010.

PAN, Evelyn T. *et al.* Cold Ischemia Time Is an Important Risk Factor for Post–Liver Transplant Prolonged Length of Stay. **Liver Transplantation**, v. 24 , n. 6, p. 762–768, jun, 2018.

REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES. Dimensionamento dos transplantes no Brasil e em cada estado (2013-2020) [internet]. São Paulo: Associação Brasileira de Transplante de Órgãos; 2020. Disponível em: https://site.abto.org.br/wp-content/uploads/2020/08/2020_populacao_1.pdf - Acesso em 28/12/2021.

RINELLA, Mary E. *et al.* Body Mass Index as a Predictor of Hepatic Steatosis in Living Liver Donors. **Liver Transplantation**, v. 7, n. 5, p. 409-414, maio, 2001.

RODRIGUES-FILHO, Edison M.; FRANKE, Cristiano A.; JUNGES, José R. Transplante de fígado e alocação dos órgãos no Brasil: entre Rawls e o utilitarismo. **Cad. Saúde Pública**, v. 34, n. 11, e00155817, nov, 2018.

SALVIANO, Marcia E. *et al.* Disfunção e não função primária do enxerto hepático: revisão integrativa. **Rev Col Bras Cir.**, v. 46, n.1, p. e2039, 2019.

SHAHBAZI, Narges. *et al.* Preservation/Reperfusion Injury in Time-Zero Liver Needle Biopsies With Short-Term Post-transplantation Laboratory Alterations. **Hepat Mon.**, v. 15, n. 6, p. e30008, jun, 2015.

SIBULESKY, Lena *et al.* Impact of Cold Ischemia Time on Outcomes of Liver Transplantation: A Single Center Experience. **Ann Transplant**, v. 21, p.145-151, abr, 2015.

SILBERHUMER, Gerd R. Combination of Extended Donor Criteria and Changes in the Model for End-Stage Liver Disease Score Predict Patient Survival and Primary Dysfunction in Liver Transplantation: A Retrospective Analysis. **Transplantation**, v. 83, p. 588-592, 2007.

SOSA, Rebecca *et al.* Early cytokine signatures of ischemia/ reperfusion injury in human orthotopic liver transplantation. **JCI Insight.**, v. 1, n. 20, p. e89679, dez, 2016.

SOUZA, Adriane B. *et al.* The cost of adult liver transplantation in a referral center in Southern Brazil. **Arq Gastroenterol**, v. 56, n. 2, p. 165-171, abr/jun, 2019.

SIRIVATANAUKSORN, Y. *et al.* Recipient and Perioperative Risk Factors Associated With Liver Transplant Graft Outcomes. **Transplantation Proceedings**, v. 44, n. 2, p. 505–508, mar, 2012.

VAN GOLEN, Rowan F.; VAN GULIK, Thomas M.; HEGER, Michal. The sterile immune response during hepatic ischemia/reperfusion. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 23, n. 3, p. 69–84, jun, 2012.

VARGUESE, F.; BUKHARI, A. B., MALHOTRA, R. D. A. IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. **PLoS ONE**, v. 9, n.5, e96801, maio, 2014.

WEIGAND, Kilian *et al.* Ischemia/Reperfusion Injury in Liver Surgery and Transplantation: Pathophysiology. **HPB Surg.**, p. 176723, maio, 2012.

WESTPHAL, Glauco A. *et al.* Diretrizes para avaliação e validação do potencial doador de órgãos em morte encefálica. v. 28, n. 3, p. 220-255, 2016.

YANG, Weili. *et al.* Novel Targets for Treating Ischemia-Reperfusion Injury in the Liver. **Int. J. Mol. Sci.**, v.19, n. 5, p. 1302, abr, 2018.

ZANCHET, Marcus V. *et al.* Post-reperfusion liver biopsy and its value in predicting mortality and graft dysfunction after liver transplantation. **ABCD Arq Bras Cir Dig.**, v. 29, n. 3, p. 189-193, jul-set, 2016.

ZHAI, Yuan *et al.* Ischaemia–reperfusion injury in liver transplantation—from bench to bedside. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.** v. 10, n. 2, p. 79–89, fev, 2013.

10. ANEXOS

Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO FATOR DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) E SUA RELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA PÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO

Pesquisador: Paula Vieira Teixeira Vidigal

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42157120.3.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.576.453

Apresentação do Projeto:

O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) é uma citocina com papel chave na resposta inflamatória do hospedeiro. Estudos mostram que o aumento da sua expressão tem relação com várias doenças inflamatórias agudas e crônicas, incluindo doenças hepáticas como hepatite autoimune, cirrose biliar primária, hepatite induzida por drogas e hepatite alcoólica. Estas doenças têm potencial de evolução para insuficiência hepática aguda ou doença hepática terminal, situações para as quais o transplante hepático muitas vezes é o único tratamento curativo disponível. Os pacientes transplantados hepáticos têm alto risco de desenvolverem complicações, incluindo rejeição ao enxerto. A literatura tem mostrado que o MIF também pode estar relacionado ao processo de rejeição pós transplante no rim e tranqüeia e também à doença do enxerto versus hospedeiro. Apesar de não terem sido encontrados estudos que investigam a relação do MIF com a ocorrência de rejeição ao enxerto hepático, um estudo sugere que o MIF pode ser um mediador importante no dano de isquemia/reperfusão. Diante do exposto, a hipótese do projeto é de que o tempo de isquemia a frio pré-transplante estaria associado com aumento na expressão hepática do MIF e, por consequência, com o aumento dos episódios de rejeição ao enxerto e/ou resistência ao tratamento imunossupressor convencional. Assim, o presente projeto visa estudar a expressão imuno-histoquímica do MIF em biópsias hepáticas de pacientes com diagnóstico de rejeição celular aguda e correlacionar com o tempo de isquemia fria do enxerto e com dados da evolução

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 4.576.453

clínica pós transplante. Pata tanto, serão analisadas amostras de fígado provenientes de biópsias com diagnóstico de rejeição celular aguda ao exame histológico convencional (H & E) e biópsias realizadas imediatamente após o transplante hepático (após reperusão) realizados no Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e na Santa Casa de Misericórdia de Minas Gerais e arquivadas nos Serviços de Anatomia Patológica dos respectivos hospitais, no período que compreende os anos de 2000 a 2020. A expressão imuno-histoquímica do MIF também será avaliada para comparação em amostras de fígados normais provenientes de hepatectomia parcial realizada nestes mesmos serviços. Os resultados da execução do projeto poderão contribuir na elucidação do papel do MIF no transplante hepático, que poderá ter implicações prognósticas e que têm relevância epidemiológica, tendo em vista a alta frequência de rejeição celular aguda em pacientes submetidos ao transplante hepático.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário da Pesquisa

Estudar a expressão imuno-histoquímica do MIF em biópsias hepáticas de pacientes transplantados com diagnóstico de rejeição celular aguda e correlacionar com o tempo de isquemia fria do enxerto e com dados da evolução clínica pré e pós transplante.

Os objetivos secundários estabelecidos no projeto são:

1. Identificar a expressão do MIF em biópsias hepáticas de pacientes com diagnóstico de rejeição celular aguda ao exame histológico convencional corado em hematoxilina-eosina (H & E) através de reação imuno-histoquímica.
2. Comparar a expressão imuno-histoquímica do MIF nas biópsias de pacientes com diagnóstico de rejeição celular aguda com a expressão em fígados normais e em biópsias hepáticas de pacientes recém transplantados.
3. Correlacionar a intensidade da expressão imuno-histoquímica do MIF com dados clínicos do paciente transplantado, tais como dados demográficos, marcadores de lesão hepática, etiologia da doença hepática de base e tempo de isquemia fria do enxerto.
4. Correlacionar a expressão imuno-histoquímica do MIF com a classificação de BANFF atribuída no exame histológico convencional corado em hematoxilina-eosina (H & E).
5. Correlacionar a expressão imuno-histoquímica do MIF com a evolução clínica do paciente e resposta ao tratamento da rejeição.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 4.576.453

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os pesquisadores apontam que os riscos para o paciente são mínimos tendo em vista que serão analisadas, de forma retrospectiva, amostras já arquivadas nos Serviços de Anatomia Patológica, e estão relacionados principalmente ao desgaste dos blocos de parafina. Todo o material utilizado será proveniente do tratamento usual do paciente, não será feito nenhum procedimento extra em função da pesquisa. No TCLE ficou evidenciado “os riscos mínimos” e foi esclarecido que “A sua participação na pesquisa é completamente voluntária e trará riscos mínimos, que estão relacionados à utilização do material arquivado, como desgaste dos blocos de parafina. No entanto, serão feitas poucas lâminas adicionais e faremos o possível para não desgastar o material completamente, caso o Sr.(a) venha a precisar dele futuramente”. Neste também foi informado os objetivos da pesquisa, detalhamento de qual material será coletado. Ainda no TCLE foi indicado que a participação no projeto não gera custo ou vantagem financeira, que o mesmo poderá desistir em qualquer momento e também que é assegurado direito a indenização caso ocorra algum dano diretamente causado pela execução do projeto.

Benefícios descritos em Informações Básicas do projeto: Decorridos mais de 50 anos do primeiro transplante de fígado, realizam-se mais de 10 mil transplantes de fígado ao ano no mundo. No entanto, os pacientes transplantados hepáticos têm alto risco de desenvolverem complicações, incluindo complicações arteriais, venosas, biliares, disfunção precoce do enxerto e rejeição. Apesar dos avanços na pesquisa de agentes imunossupressores e do fígado ser considerado “imunotolerante”, a rejeição é uma complicação comum que pode estar associada com a perda do enxerto mas que ainda não tem fatores predisponentes conhecidos. O conhecimento dos mecanismos envolvidos ou os fatores predisponentes da rejeição celular aguda pode ser de grande ajuda na prevenção da mesma, ou desenvolvimento de terapêutica mais eficiente. No TCLE foi destacado a importância na participação no presente projeto, “A sua participação na pesquisa pode trazer benefícios para a comunidade de pacientes com doenças hepáticas e os submetidos à transplante, ajudando a identificar as pessoas que tem mais risco de rejeitar o órgão transplantado antes que este processo aconteça e podendo melhorar o tratamento e o acompanhamento destes pacientes”.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória

Os seguintes termos estão adequados.

- 1) Folha de rosto preenchida e assinada;

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.576.453

- 2) Aprovação da Câmara Departamental Câmara Departamental de Cirurgia da Faculdade de Medicina - UFMG.
- 3) Projeto completo;
- 4) TCLE;
- 5) Anuência de participação da Santa Casa;
- 6) Parecer favorável da Gerência e de Viabilidade Econômica e Logística do Hospital das Clínicas;
- 7) Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD) assinado por todos os integrantes do projeto.

Todos os demais documentos obrigatórios foram apresentados e estão adequados.

O tamanho da amostra foi determinado em 190, sendo 60 para transplantes hepáticos com rejeição celular aguda e 130 recém transplantados hepáticos. O cronograma de execução apresentado é coerente e exequível. A metodologia e análises estabelecidas estão em acordo com a proposta estabelecida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados o TCLE e TCDU. O primeiro atende as normas vigentes e informações que devem estar contidas no documento. O segundo documento anexado foi assinado por todos os integrantes do projeto e estabelece o sigilo em relação às informações coletadas.

Recomendações:

Adequações no TCLE:

- retirar a identificação do pesquisador e instituição do início do TCLE, para que ele comece como carta-convite;
- inserir os riscos relacionados a eventual quebra de sigilo;
- informar onde e por quanto tempo os dados gerados serão armazenados (armazenamento de 05 anos dos dados, salvaguardando a sua consulta);
- numerar as páginas do TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto foi bem detalhado, todos os aspectos éticos foram atendidos. Os possíveis riscos inerentes a participação no projeto foram esclarecidos, bem como ações que os minimizem.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.576.453

emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1578730.pdf	17/01/2021 08:22:27		Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoAssinada.pdf	17/01/2021 08:21:54	Camila Gabriela Xavier de Brito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MIF_novo.docx	14/01/2021 07:47:46	Camila Gabriela Xavier de Brito	Aceito
Outros	Parecer_APM.pdf	14/01/2021 07:46:38	Camila Gabriela Xavier de Brito	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	28/12/2020 07:57:26	Camila Gabriela Xavier de Brito	Aceito
Outros	Anuencia_Santa_Casa.pdf	21/12/2020 08:01:11	Camila Gabriela Xavier de Brito	Aceito
Outros	TCUD.pdf	21/10/2020 10:14:38	Camila Gabriela Xavier de Brito	Aceito
Outros	ULAPN.pdf	14/09/2020 19:47:02	Camila Gabriela Xavier de Brito	Aceito
Outros	GEP.pdf	14/09/2020 19:45:09	Camila Gabriela Xavier de Brito	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_MIF_e_transplante.docx	24/06/2020 16:17:54	Paula Vieira Teixeira Vidigal	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.576.453

BELO HORIZONTE, 06 de Março de 2021

Assinado por:
Críssia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Anexo 2 - Artigo referente ao projeto de pesquisa e seus resultados (em fase de correções ortográficas).

ANALYSIS OF MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR EXPRESSION AND ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY IN POST-REPERFUSION LIVER BIOPSIES

Camila Gabriela X. de Brito, 1

Nikolas K. Thome, 2

Fernanda Maria F. Osório, 3

Paula V. T. Vidigal, 1

Agnaldo S. Lima, 4

1 Department of Pathology, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

2 School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

3 Hepatology Service, Hospital das Clínicas da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

4 Department of Surgery, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Keywords: Liver transplantation, early allograft dysfunction, primary nonfunction, time-zero biopsies, immunohistochemistry.

Abbreviations

ALP, Alkaline Phosphatase

ALT, Alanine Aminotransferase

AST, Aspartate Aminotransferase

BMI, Body Mass Index

GGT, Gamma-glutamyl Transferase

HCC, Hepatocellular Carcinoma

INR, International Normalised Ratio

IRI, Ischemia/reperfusion Injury

pAb, Polyclonal Antibody

MELD, Model for End-Stage Liver Disease

MIF, Macrophage Migration Inhibitory Factor

The authors declare no conflicts of interest.

Corresponding author:

Camila Gabriela X. de Brito, MD

Department of Pathology, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Av. Prof. Alfredo Balena, 190 - Santa Efigênia, Belo Horizonte - MG, 30130-100, Brasil

T: +44 07737774713

camila.xbrito@gmail.com

Abstract

Primary graft dysfunction is one of the most feared complications following liver transplantation, being associated with poorer graft and patient outcomes, prolonged length of hospital stay and an increase in transplantation costs. Ischemia/reperfusion injury (IRI) is thought to be the pathological event behind primary graft dysfunction. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a pro-inflammatory cytokine which has been studied in many inflammatory and autoimmune diseases, cancer, allograft rejection and in IRI in liver allografts. The aim of this study was to investigate MIF expression in post-reperfusion biopsies from human liver allografts and correlate with presence and severity of IRI and with clinical perioperative data. 103 liver allograft post-reperfusion biopsies from patients who underwent liver transplantation between 2000 and 2020 at Hospital das Clínicas from Federal University of Minas Gerais were reviewed and categorised regarding the presence and severity of IRI and steatosis and submitted to single immunostaining to MIF (ab65869). Immunohistochemical expression for MIF was quantified by applying the IHC Profiler plugin on the ImageJ Fiji software on the digitised slides. Medical records from the patients were revised to collect perioperative and clinical data. MIF positive expression was correlated with no IRI or mild IRI on the histological assessment ($P = 0.01$, OR: 1.259, 95% CI 1.058-1.499). None of the studied variables was associated with retransplantation or death within 15 days of the transplant. Our findings suggest that moderate to severe IRI is related to a rapid MIF release into the circulation or allograft effluent, which results in a weaker intensity of the immunostain on the tissue.

Introduction

The great imbalance between the number of available livers and the increasing transplant waiting lists all over the world has led to the utilisation of grafts from extended criteria donors. Although the outcomes are mostly encouraging, there is an increased risk of complications, including primary allograft dysfunction, leading to longer stay in the hospital, increased transplantation costs and retransplantation in rare cases (1).

Ischemia reperfusion injury (IRI), caused by graft procurement and storage, is thought to be the primary event behind primary allograft dysfunction. One of the most precise methods to evaluate IRI in the liver allografts is through a post-reperfusion biopsy, which shows an acute inflammatory infiltrate, hepatocyte dropout, coagulation necrosis and ballooning (2, 3)

Some studies have found an association between the presence of severe IRI in the post-reperfusion liver biopsy and worse transplant outcomes. The presence of severe IRI was correlated with increased rates of early allograft dysfunction, primary nonfunction and retransplantation and with poorer short term and long term graft survival rates (4, 5, 6).

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a pro-inflammatory cytokine with counter-regulatory steroid activity (7) which has been studied in liver diseases, such as autoimmune hepatitis, primary biliary cholangitis (8), alcoholic liver disease (9) and nonalcoholic fatty liver disease (10) and has also been implicated in the pathogenesis of many inflammatory diseases and allograft rejection (11).

MIF was also found to be released by human and rat liver allografts into the circulation and the effluent in response to IRI. In a study by Baron-Stefaniak *et al.* (2017) it was also found that grafts release MIF proportionally to the degree of hepatocellular damage (12, 13).

Considering the association of IRI and primary graft dysfunction with worse outcomes post liver transplantation and the potential of MIF as an useful biomarker of these conditions, we performed this study. Our aim was to investigate MIF expression in post-reperfusion biopsies from human liver allografts and correlate with presence and severity of IRI and with clinical perioperative data.

Materials and methods

153 archived post-reperfusion biopsies from patients who underwent liver transplantation between 2000 and 2020 at Clinics Hospital from Federal University of Minas Gerais were assessed according to the presence of IRI. The parameters used to diagnose and grade IRI were the neutrophilic infiltrate (as single cell in sinusoids or in clusters), apoptosis, and hepatocyte cell dropout, as described by Ali *et al.* (2015). The biopsies were also categorised regarding the presence and degree of steatosis as follows: 0-5% absent or minimal steatosis, 6% to 33% mild steatosis, 33% to 66% moderate steatosis and more than 66% severe steatosis.

Biopsies with insufficient material to be submitted to immunohistochemical study, with additional histopathological findings.

Medical records from the selected patients were reviewed to collect demographic and clinical data, including cold ischemia time, aetiology of liver disease, donor information, hospital length of stay and retransplantation or death within 15 days post transplant. MELD score was calculated from the last set of laboratory data available, without correction for dialysis or exception points for tumour size. Patients younger than 18 years old, with more than one transplant or with insufficient clinical data were excluded from the study.

Single immunostaining using a rabbit polyclonal antibody (pAb) to MIF (ab65869, Abcam, Cambridge, UK) was performed on 4- μ m paraffin sections of formalin-fixed tissue. Briefly, sections were dewaxed and hydrated. Next, antigen retrieval was performed by heating the sections at 90°C in the EDTA buffer (pH 8.0) using a steamer. Then, sections were treated for 10 minutes with a peroxide block (Novolink™, Leica Biosystems) followed by a protein block (Novolink™, Leica Biosystems). Sections were incubated with anti-MIF polyclonal antibody (1:100 dilution) for 2h and then were submitted to a post-primary block, followed by incubation with the polymer (Novolink™, Leica Biosystems) for 30 minutes and finally developed with 3,3-diaminobenzidine substrate-chromogen to produce a brown-colored precipitate at the antigen site. Samples were counterstained with hematoxylin (Novolink™, Leica Biosystems) for 3 minutes. Slides were visualised and digitised using a slide scanner (3DHitech Ltd., Budapest, Hungary).

Immunohistochemical expression of MIF was quantified by using the IHC Profiler plugin on the ImageJ Fiji software (version 1.2; WS Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD). Five areas of interest from each slide were photographed by a histopathologist to be analysed by the software, which classified the expression as negative, low positive, positive or high positive, according to an algebraic formula that takes into account the number of pixels in a zone, the score of the zone and the total number of pixels in an image (14). The mode for each slide score was calculated to yield

a final expression score. In the case it was not possible to calculate a mode, a histopathologist selected between the two most frequent scores given by the software. The statistical analysis was performed using SPSS Statistics (IBM Corp., Version 23.0, Armonk, NY.). Continuous variables are expressed as medians and interquartile ranges. Categorical variables are expressed as absolute and relative frequencies. The Mann-Whitney test and Chi-square or Fisher's test were performed in the univariate analysis. The variables which presented $P < 0.20$ were tested in the multivariate analysis by the Poisson regression model or logistic regression. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

This retrospective observational study was approved by the institutional ethics committee (reference number CAAE 42157120.3.0000.5149).

Results

103 patients were selected and had their biopsies analysed and submitted to the immunohistochemical study.

The demographic characteristics of receptors and donors are illustrated in Table 1.

Table 1 - Demographic data of the study population

Variable	N	Value
Receptor age (years)	103	51.0 (18)
Sex	103	
M, n (%)		67 (65%)
F, n (%)		36 (35%)
MELD score	66	18.0 (9)
Aetiology of liver disease	103	
Alcoholic cirrhosis, n (%)		31 (30.1%)
Autoimmune hepatitis, n (%)		9 (8.7%)
Viral hepatitis, n (%)		30 (29.1%)
Cryptogenic, n (%)		18 (17.5%)
Other*, n (%)		15 (14.6%)
Hepatocellular carcinoma	103	
No, n (%)		91 (88.3%)
Yes, n (%)		12 (11.7%)
Donor age (years)	99	34.0 (24)
Donor serum creatinine (mg/dL)	89	1.0 (0.60)
Donor BMI (kg/m ²)	89	23.88 (3.68)
Cold ischemic time (min)	50	480.0 (190.94)
Length of hospital stay (days)	84	15.0 (16.0)

*Other etiologies include cholangiopathies, vascular and genetic diseases.

The results of the IRI assessment on post-reperfusion biopsies were as follows: no IRI (N = 49, 47.6%) mild IRI (N = 24, 23.3%), moderate IRI (N = 25, 24.3%), severe IRI (N = 5, 4.9%). The biopsies were categorised regarding the presence of steatosis as follows: steatosis absent or minimal (N = 91, 88.3%), mild steatosis (N = 10, 9.7%), moderate steatosis (N = 1, 1.0%), severe steatosis (N = 1, 1.0%). Univariate analyses were used to assess the relationship between the severity of IRI and donor or recipient features. The categories moderate IRI and severe IRI were grouped for this purpose. The results of the univariate analyses are displayed on Table 2.

Table 2 - Relationship between severity of IRI and donor and recipient features

Variable	N	Absent or mild IRI	Moderate or severe IRI	P value
Receptor age (years)	103	52 (18)	48.5 (18)	0.882
Sex	103			0.253
M, n (%)		50 (68.5)	17 (56.5)	
F, n (%)		23 (31.5)	13 (43.3)	
Aetiology of liver disease	103			0.743
Alcoholic cirrhosis, n (%)		23 (31.5)	8 (26.7)	
Autoimmune hepatitis, n (%)		5 (6.8)	4 (13.3)	
Viral hepatitis, n (%)		23 (31.5)	7 (23.3)	
Cryptogenic, n (%)		12 (16.4)	6 (20.0)	
Others*, n (%)		10 (13.7)	5 (16.7)	
MELD score	66	18 (8)	20.50 (11)	0.284
Hepatocellular carcinoma	103			0.501
No, n (%)		63 (86.3)	28 (93.3)	
Yes, n (%)		10 (13.7)	2 (6.7)	
Steatosis	103			0.739
Absent or minimal, n (%)		65 (89.0)	26 (86.7)	
Mild, n (%)		6 (8.2)	4 (13.3)	
Moderate, n (%)		1 (1.4)	0 (0)	
Severe, n (%)		1 (1.4)	0 (0)	
Donor age (years)	99	33 (26)	35 (23)	0.786

Variable	N	Absent or mild IRI	Moderate or severe IRI	P value
Donor serum creatinine (mg/dL)	89	1.00 (0.5)	0.85 (0.70)	0.150
Donor BMI (kg/m ²)	89	23.4 (3.35)	24.49 (2.96)	0.066
Cold ischemic time (min)	50	485 (203)	474.45(209.4)	0.672
Hospital length of stay (days)	84	14.5 (16)	15.5 (17)	0.768

*Other etiologies include cholangiopathies, vascular and genetic diseases.

MIF expression was more intense in the hepatocytes, but could be seen in the biliary epithelium and inflammatory cell infiltrate (Figure 1). Most cases were categorised as low positive expression (N = 64, 62.1%), 34 cases (33.0%) had a positive expression and only 5 (4.9%) were negative. No cases had a high positive expression categorised by the software. Univariate and multivariate analyses were performed to assess the relationship between the intensity of MIF expression and donor features, recipient features and the presence and severity of IRI and steatosis. The negative cases were grouped with the low positive cases for this purpose. The results of the univariate analyses are depicted on Table 3.

Table 3 - Relationship between MIF expression and donor and recipient features and presence and severity of IRI

Variable	N	MIF expression negative or low positive	MIF expression positive	P value
Receptor age (years)	103	53 (19)	48.5 (16)	0.358
Sex	103			0.624
M, n (%)		46 (66.7%)	21 (38.2%)	
F, n (%)		23 (33.3%)	13 (61.8%)	
Aetiology of liver disease	103			0.875
Alcoholic cirrhosis, n (%)		21 (30.4)	10 (29.4)	
Autoimmune hepatitis, n (%)		7 (10.1)	2 (5.9)	
Viral hepatitis, n (%)		19 (27.5)	11 (32.4)	
Cryptogenic, n (%)		13 (18.5)	5 (14.7)	
Others*, n (%)		9 (13)	6 (17.6)	
MELD score	66	18 (6)	20 (12)	0.198
Hepatocellular carcinoma	103			1.0
No, n (%)		61 (88.4)	30 (88.2)	
Yes, n (%)		8 (11.6)	4 (11.8)	
IRI	103			0.024
Absent to mild, n (%)		44 (63.8)	29 (85.3)	
Moderate to severe, n (%)		25 (36.2)	5 (14.7)	
Steatosis	103			1.0

Variable	N	MIF expression negative or low positive	MIF expression positive	P value
Absent or minimal, n (%)		60 (87.0)	31 (91.2)	
Mild, n (%)		7 (10.1)	3 (8.8)	
Moderate, n (%)		1 (1.4)	0 (0)	
Severe, n (%)		1 (1.4)	0 (0)	
Donor age (years)	99	37 (24)	30.50 (21.8)	0.201
Donor serum creatinine (mg/dL)	89	1.0 (0.68)	0.9 (0.45)	0.892
Donor BMI (kg/m ²)	89	23.44 (3.58)	24.06 (3.54)	0.469
Cold ischemic time (min)	50	492.81 (168.31)	444.54 (229.72)	0.184
Hospital length of stay (days)	84	14 (14)	15.5 (16)	0.432

*Other etiologies include cholangiopathies, vascular and genetic diseases.

The Poisson regression model was used to study the correlation between the variables which had $P < 0.20$ and MIF expression. The variables MELD score and cold ischemic time were excluded from this step because of their high number of missing observations. The multivariate analysis showed that absent or mild IRI were significantly correlated with positive MIF expression ($P = 0.01$, OR: 1.259, 95% CI 1.058-1.499).

Regarding the event of death or retransplantation within 15 days of the transplant, this was observed in only 10 patients (9.7%). Univariate and multivariate analyses were performed to identify the relationship between this outcome and donor and recipient features, histological findings and MIF expression. None of the studied variables showed a significant association, as seen on Table 4.

Table 4 - Relationship between the occurrence of death or retransplantation within 15 days post transplant and donor and recipient features, histological findings and MIF expression

Variable	N	Death or retransplantation within 15 days		P value
		No	Yes	
Receptor age (years)	98	50.50 (18.0)	49 (27.0)	0.930
Sex	98			0.729
M, n (%)		59 (67.0)	6 (60.0)	
F, n (%)		29 (33.0)	4 (40.0)	
Aetiology of liver disease	98			0.532
Alcoholic cirrhosis, n (%)		25 (28.4)	5 (50.0)	
Autoimmune hepatitis, n (%)		8 (9.1)	1 (10.0)	
Viral hepatitis, n (%)		25 (28.4)	1 (10.0)	
Cryptogenic, n (%)		17 (19.3)	1 (10.0)	
Others*, n (%)		13 (14.8)	2 (20.0)	
MELD score	64	18 (9.0)	18 (7.0)	0.322
Hepatocellular carcinoma	98			1.0
No, n (%)		77 (87.5)	9 (90.0)	
Yes, n (%)		11 (12.5)	1 (10.0)	
IRI	98			0.273
Absent to mild, n (%)		61 (69.3)	9 (90.0)	

Variable	N	Death or retransplantation within 15 days		P value
		No	Yes	
Moderate to severe, n (%)		27 (30.7)	1 (10.0)	
Steatosis	98			0.672
Absent or minimal, n (%)		76 (76.4)	10 (100.0)	
Mild, n (%)		10 (11.4)	0	
Moderate, n (%)		1 (1.1)	0	
Severe, n (%)		1 (1.1)	0	
MIF expression	98			0.491
Negative or low positive, n (%)		58 (65.9)	8 (80.0)	
Positive, n (%)		30 (34.1)	2 (20.0)	
Donor age (years)	95	32 (25)	44.5 (18.3)	0.056
Donor serum creatinine (mg/dL)	86	1.0 (0.6)	1.0 (0.63)	0.893
Donor BMI (kg/m ²)	86	23.99 (3.58)	22.76 (3.18)	0.252
Cold ischemic time (min)	50	482.5 (175.19)	409.5 (788.25)	0.411

*Other etiologies include cholangiopathies, vascular and genetic diseases.

Discussion

Although MIF expression has been reported to be increased in many inflammatory and autoimmune diseases, such as autoimmune hepatitis, primary biliary cholangitis and alcoholic hepatitis, few studies have investigated MIF expression in IRI (8, 9).

Liu *et al.* (2012) performed a study to investigate MIF's role as a marker of hepatocellular damage in cold and warm ischemia in rats. They found an increased expression in the grafts 6 hours and 24 hours after reperfusion. Interestingly, there was not a significant increase in MIF protein expression 30 minutes after reperfusion (13).

Baron-Stefaniak *et al.* (2017) measured the concentration of MIF in the effluents of liver grafts and in the serum of recipients. Concentrations of MIF were directly correlated to the concentrations of hepatocellular injury markers, suggesting that human grafts release MIF proportionally to the degree of hepatocellular damage. MIF concentrations in the effluent and serum 10 minutes after reperfusion were also greater in patients who developed EAD (12).

Our study sought to examine the relationship between MIF expression and histological IRI in post reperfusion biopsies of human liver grafts. Our findings point to a negative correlation between MIF expression and IRI severity on the post reperfusion biopsy, meaning that biopsies who presented moderate to severe IRI histologically showed weaker MIF staining. This could be related to the fact that MIF is stored in intracellular pools which are rapidly depleted after a stimulus. Our hypothesis is that moderate to severe IRI is a trigger to a rapid MIF release from the allograft to the effluent and the circulation, resulting in less expression identified on the tissue biopsied after this phenomenon. To further clarify MIF's role in IRI, we believe that more studies comparing its concentration in both the allograft and circulation and on the tissue are warranted.

Regarding the clinical and perioperative data collected in our study, we selected the variables according to their relationship with IRI and primary graft dysfunction (PGD) reported in the literature. PGD was measured indirectly in our sample as the occurrence of retransplantation or death within 15 days post transplantation.

Primary graft dysfunction can manifest clinically as two different conditions: early allograft dysfunction (EAD), which is defined in the literature by temporary clinical and biochemical derangements that point to a poorly functioning graft, and primary nonfunction (PNF), which is defined in most studies as "graft failure" or "graft function incompatible with life" and requires immediate retransplantation (15).

Many studies have sought to identify risk factors for these clinical entities. Those risk factors identified so far include donor and recipient features and conditions related to the removal and storage of the graft and to the surgery (16, 3, 17, 18).

One of the most controversial risk factors is donor age. Due to the scarce number of donors, grafts that were previously considered inadequate because of donor age are now being transplanted. Although it is generally accepted that donor age is a risk factor for primary graft dysfunction, probably because of impaired liver regeneration that comes with age, there is no clear age threshold established in the literature (19, 3).

Cold ischemia time and graft steatosis have also been associated with primary graft dysfunction in many studies. Sibulesky *et al.* (2016) encountered that cold ischemic time longer than 12 hours was linked to EAD (20), while Moosburner *et al.* (2021) found that the group of patients who presented EAD experienced a cold ischemic time 45 minutes longer on average than the group who had acceptable graft function (1). Graft steatosis greater than 30% is a risk factor for EAD and PNF, but is not an absolute contraindication for transplantation, whilst severely steatotic grafts (more than 60%) are deemed unacceptable (3, 21).

Other risk factors for EAD and PNF cited in the literature are MELD score, donor BMI, duration of the surgery and need for respiratory support before transplantation. Our study did not find an association between the studied variables and IRI severity in post-reperfusion biopsies or retransplantation or death within 15 days post transplantation. This could be related to the small size of our sample and to the fact that this outcome is rare and is more related to PNF than EAD. In addition, the median BMI of the donors in our study was 23.88 kg/m², which could explain the low incidence of moderate or severe steatosis in our sample (22)

The limitations of our study are related to its retrospective nature, the sample size, operational difficulties regarding the clinical data collection and irregularities in the annotation of some of the data on the medical records before the implementation of electronic medical records in our Hospital.

Due to technical problems related to storage of paper based medical records, some perioperative data such as MELD score and cold ischemic time was not available for all the patients in our sample. This may have affected our ability to find a correlation between these two variables and IRI severity and also made it difficult to investigate EAD in our sample because the most used definition by Olthoff *et al.* (1999) is mostly

based on laboratory parameters (23). Therefore, we chose to evaluate PNF by using an indirect measurement (death or retransplantation within 15 days), which might not be the most adequate PNF definition.

Another limitation of our work is that we did not analyse the impact of the adoption of MELD score as the primary waiting list criteria for liver allocation in Brazil. Since the adoption of MELD for organ allocation occurred in Brazil in 2006 and the majority of the patients in our study were transplanted between the years 2000 and 2004, this might have influenced the incidence of adverse outcomes of our study.

In summary, our study investigated the relationship between IRI severity in post reperfusion biopsies, MIF expression and the event of retransplantation or death within 15 days of the transplant. Our results show that moderate to severe IRI was correlated with weaker immunohistochemical staining intensity, which might suggest a rapid and proportional release of MIF from the graft in response to IRI severity. This finding points to the need of more studies to clarify this cytokine's role in IRI in liver transplantation, specially comparing MIF tissue expression and concentrations in the serum and graft effluent.

References

1. Moosburner S, Sauer IM, Förster F, Winklmann T, Gassner JMGV, Ritschl PV et al. Early Allograft Dysfunction Increases Hospital Associated Costs After Liver Transplantation—A Propensity Score–Matched Analysis. *Hepatol. Commun.* 2021, 5: 526-537.
2. Deschênes M, Belle SH, Krom RA, Zetterman RK, Lake JR. Early allograft dysfunction after liver transplantation: a definition and predictors of outcome. *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. Transplantation.* 1998 Aug 15;66(3):302-10. doi: 10.1097/00007890-199808150-00005. PMID: 9721797.
3. Chen XB, Xu MQ. Primary graft dysfunction after liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2014 Apr;13(2):125-37. doi: 10.1016/s1499-3872(14)60023-0. PMID: 24686540.
4. Ito T, Naini BV, Markovic D, Aziz A, Younan S, Lu M et al. Ischemia-reperfusion injury and its relationship with early allograft dysfunction in liver transplant patients. *Am J Transplant.* 2021 Feb; 21(2):614-625. doi: 10.1111/ajt.16219. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32713098.
5. Ali JM, Davies SE, Brais RJ, Randle LV, Klinck JR, Allison MED et al. Analysis of ischemia/reperfusion injury in time-zero biopsies predicts liver allograft outcomes. *Liver Transpl* 2015, 21: 487-499. <https://doi.org/10.1002/lt.24072>
6. Fuentes-Valenzuela E, Tejedor-Tejada J, García-Pajares F, Rubiales BM, Nájera-Muñoz R, Maroto-Martín C et al. Postreperfusion liver biopsy as predictor of early graft dysfunction and survival after orthotopic liver transplantation, *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 2022.
7. Calandra T, Bucala R. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): A Glucocorticoid Counter-Regulator within the Immune System. *Crit Rev Immunol.* 2017; 37(2-6): 359-370.
8. Assis DN, Leng L, Du X, Zhang CK, Grieb G, Merk M et al. The role of macrophage migration inhibitory factor in autoimmune liver disease. *Hepatology.* 2014 Feb;59(2):580-91. doi: 10.1002/hep.26664.
9. Kumagi T, Akbar F, Horiike N, Onji M. Increased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in alcoholic liver diseases and their expression in liver tissues. *Clin Biochem.* 2001; 34(3): 189-93.
10. Akyildiz M, Gunsar F, Nart D, Sahin O, Yilmaz F, Akay S et al. Macrophage migration inhibitory factor expression and MIF gene -173 G/C polymorphism in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010 Feb;22(2):192-8. doi: 10.1097/MEG.0b013e328331a596.

11. Javeed A, Zhao Y, Zhao Y. Macrophage-migration inhibitory factor: role in inflammatory diseases and graft rejection. *Inflamm Res*. 2008; 57(2): 45-50.
12. Baron-Stefaniak J, Schiefer J, Miller EJ, Plöchl W, Krenn CG, Berlakovich GA et al. Graft-derived macrophage migration inhibitory factor correlates with hepatocellular injury in patients undergoing liver transplantation. *Clin Transplant*. 2017 Jun;31(6). doi: 10.1111/ctr.12982.
13. Liu A, Fang H, Dirsch O, Jin H, Dahmen U. Early release of macrophage migration inhibitory factor after liver ischemia and reperfusion injury in rats. *Cytokine*. 2012 Jan;57(1):150-7. doi: 10.1016/j.cyto.2011.11.009.
14. Varguese F, Bukhari, AB., Malhotra R, De A. IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. *PLoS ONE*. 2014; 9(5): e96801.
15. Neves DB, Rusi MB, Diaz LG, Salvalaggio P. Primary graft dysfunction of the liver: definitions, diagnostic criteria and risk factors. *Einstein (Sao Paulo)*. 2016;14(4):567-572. English, Portuguese. doi: 10.1590/S1679-45082016RW3585.
16. Sirivatanauksorn Y, Taweerutchana V, Limsrichamrern S, Kositamongkol P, Mahawithitwong P, Asavakarn S, Tovikkai C. Recipient and perioperative risk factors associated with liver transplant graft outcomes. *Transplant Proc*. 2012 Mar;44(2):505-8. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.01.065.
17. Chu MJ, Dare AJ, Phillips AR, Bartlett AS. Donor Hepatic Steatosis and Outcome After Liver Transplantation: a Systematic Review. *J Gastrointest Surg*. 2015 Sep;19(9):1713-24. doi: 10.1007/s11605-015-2832-1.
18. Mazilescu LI, Kotha S, Ghanekar A, Lilly L, Reichman TW, Galvin Z et al. Early Allograft Dysfunction After Liver Transplantation With Donation After Circulatory Death and Brain Death Grafts: Does the Donor Type Matter? *Transplant Direct*. 2021 Jul 16;7(8):e727. doi: 10.1097/TXD.0000000000001182.
19. Lué A, Solanas E, Baptista P, Lorente S, Araiz JJ, Garcia-Gil A, Serrano MT. How important is donor age in liver transplantation? *World Journal of Gastroenterology* 2016. 22(21), 4966–4976. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i21.4966>
20. Sibulesky L, Li M, Hansen RN, Dick AA, Montenegro MI, Rayhill SC et al. Impact of Cold Ischemia Time on Outcomes of Liver Transplantation: A Single Center Experience. *Ann Transplant*. 2016 Mar 8;21:145-51. doi: 10.12659/aot.896190.
21. Salviano MEM, Lima AS, Tonelli IS, Correa HP, Chianca TCM. Primary liver graft dysfunction and non-function: integrative literature review. *Rev Col Bras Cir*. 2019;46(1):e2039. Portuguese, English. doi: 10.1590/0100-6991e-20192039.
22. Rinella ME, Alonso E, Rao S, Whittington P, Fryer J, Abecassis M et al. Body mass index as a predictor of hepatic steatosis in living liver donors. *Liver Transpl*. 2001 May;7(5):409-14. doi: 10.1053/jlts.2001.23787.

23. Olthoff KM, Kulik L, Samstein B, Kaminski M, Abecassis M, Emond J, Shaked A, et al. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver Transplantation* 2010; 16: 943-9.