



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ANA PAULA HITOMI YOKOYAMA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE NETS(NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS),
DESFECOS CLÍNICOS E TRANSFUSÃO DE HEMOCOMPONENTES EM
TRANSPLANTE HEPÁTICO**

CAMPINAS, 2022

ANA PAULA HITOMI YOKOYAMA

ASSOCIAÇÃO ENTRE NETS (NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS),
DESFECHOS CLÍNICOS E TRANSFUSÃO DE HEMOCOMPONENTES EM
TRANSPLANTE HEPÁTICO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, na área de concentração Clínica Médica.

ORIENTADORA: PROFESSORA DOUTORA FERNANDA LOUREIRO ANDRADE ORSI
COORIENTADOR: DOUTOR JOSÉ MAURO KUTNER

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANA PAULA HITOMI YOKOYAMA, E ORIENTADA PELA PROF DRA FERNANDA LOUREIRO ANDRADE ORSI E COORIENTADA PELO DR JOSÉ MAURO KUTNER

CAMPINAS
2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos – CRB 8/8402

Yokoyama, Ana Paula Hitomi, 2022
Y77a Associação entre NETS (neutrophil extracellular traps), desfechos clínicos e transfusão de hemocomponentes em transplante hepático./ Ana Paula Hitomi Yokoyama. – Campinas, SP : [s.n.], 2023

Orientadora: Fernanda Loureiro Andrade Orsi.
Coorientador: José Mauro Kutner
Tese (doutorado)- Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Armadilhas extracelulares. 2. Fígado – Transplante . 3. Sangue - Transfusão. 4. Neutrófilos. 5. Marcadores biológicos. I. Orsi, Fernanda Loureiro de Andrade, 1975. II. Kutner, José Mauro. III. Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Associations between NETs (neutrophil extracellular traps), clinical outcomes and blood transfusion in liver transplantation

Palavras-chave em inglês:

Extracellular traps
Liver transplantation
Blood transfusion
Neutrophils
Biomarkers

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Membros titulares:
Fernanda Loureiro Andrade Orsi [Orientador]
Margareth Castro Ozelo
Paula Ribeiro Villaça
Marina Pereira Colella
Maria Carolina Tostes Pintão

Data de defesa: 24/01/2023

Programa de Pós Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas da aluna:

- ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1310-8275>
- Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1692554026742090>

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

ANA PAULA HITOMI YOKOYAMA

ORIENTADORA: PROFA DRA FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI

MEMBROS

1. Profa Dra Fernanda Loureiro de Andrade Orsi

2. Profa Dra Paula Ribeiro Villaça

3. Profa Dra Margareth Castro Ozelo

4. Dra Marina Pereira Colella

5. Dra Maria Carolina Tostes Pintão

Programa de Pós Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema
de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade

Data da defesa: 24/01/2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos pacientes e seus familiares, que consentiram em participar deste estudo e permitiram que fizéssemos essas análises; à toda a equipe de Transplante hepático do Hospital Gilson de Cássia Marques de Carvalho – Hospital Municipal Vila Santa Catarina (Dra Pamella Tung Pedroso, Dr Sergio Paiva Meira Filho, enfermeiras Jéssica Martins Lanzoni e Cleuma Silva); à toda a equipe de Anestesiologia do transplante hepático (Dr Raffael Zamper e Dr Alexandre Pereira); à equipe do Banco de Sangue do Hospital Municipal Vila Santa Catarina (Dra Cristiane Nakazawa, Tatiane Omura, Patrícia Batista); a todos do Laboratório de Hemostasia da Dra Fernanda Orsi (Bruna Fonseca, Gabriella Mesquita, Ana Paula Rosa); a todos os meus colegas do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein, ao meu co-orientador Dr José Mauro Kutner; à minha orientadora Prof Dra Fernanda Loureiro Andrade Orsi; à minha família (minha mãe Elizabeth – in memoriam-, meu pai Tadashi, minhas irmãs Neima e Lúgia) e a meu filho Arthur Yukio, sem os quais não poderia ter concluído este trabalho. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Auxílio Regular: 2020/12630-2; e Projeto Temático 2016/14172-6 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Universal 2021 406990/2021-2.

Resumo

A participação dos neutrófilos como mediadores inflamatórios em processos infecciosos, trombóticos e neoplásicos tem sido descrita nos últimos anos. Além de seu papel primário na imunidade inata através da fagocitose de patógenos e degranulação, os neutrófilos contribuem para inflamação e hemostasia através da liberação de redes extracelulares (NETs -*neutrophil extracellular traps*) em resposta a diversos estímulos antigênicos. O transplante hepático (TH) é uma situação de manejo clínico complexo, caracterizada por um estado inflamatório persistente cujo mecanismo fisiopatológico não está elucidado. Nesse contexto, é possível que haja envolvimento de NETs e que estes tenham impacto no prognóstico após o TH. O objetivo deste estudo é avaliar a evolução da liberação de NETs durante o TH e seu impacto nos desfechos clínicos e necessidades transfusionais em uma coorte prospectiva. Em pacientes submetidos a TH, foram quantificados H3 citrulinado (cit-H3) e DNA livre (cf-DNA) em três períodos: pré-transplante, imediatamente após reperfusão do enxerto e pré-alta. Para as análises estatísticas utilizamos os testes de ANOVA com medidas repetidas e modelos de regressão ajustados para idade, sexo e escore MELD (Model for end-stage liver disease) corrigido. Noventa e três pacientes foram incluídos. Observamos uma elevação significativa dos marcadores de NETose após a reperfusão do enxerto, evidenciado por níveis de cf-DNA muito superiores às dosagens do pré-operatório (mediana de cf-DNA no pré-transplante: 45,4 ng/mL, após a reperfusão: 595,4 ng/mL, pré-alta: 66,7 ng/mL, $p < 0.001$). Os níveis de cit-H3 duplicaram no pós-reperfusão (mediana de cit-H3 dosados no pré transplante: 0,5 ng/mL, após reperfusão: 1,2 ng/mL e pré alta 0,5 ng/mL, $p < 0.0001$). A liberação de NETs no intraoperatório foi preditora de óbito intra-hospitalar (OR=1,17, CI 95%= 1,02-1,34, $p=0,02$). Não se observou associação entre NETose e transfusão de hemocomponentes ou outros desfechos clínicos negativos (rejeição, trombose, infecção ou disfunção de órgãos). Em conclusão, demonstramos haver liberação exacerbada de NETs após a reperfusão no TH, bem como a associação entre NETs e óbito intra-hospitalar. Dada a relevância da associação entre NETose e óbito, e o papel central dos NETs na inflamação do transplante hepático, consideramos que NETs são potenciais biomarcadores de inflamação nestes pacientes. Ainda, o desenvolvimento de terapêuticas focando na inibição de NETose poderia ser uma estratégia plausível para redução de efeitos deletérios da inflamação exacerbada inerente ao transplante.

Palavras-chave: NETs, transplante hepático, transfusão de hemocomponentes, neutrófilos, desfechos clínicos.

Abstract: The role of neutrophils as key mediators in infection, thrombosis and cancer has been widely described in the past few years. Besides their role in innate immunity through phagocytosis and degranulation processes, neutrophils also contribute to hemostasis and other inflammation processes: they are able to assemble a scaffold of decondensed chromatin, forming a web-like structure called neutrophil extracellular traps (NETs) in response to several antigenic stimuli. Liver transplantation (LT) is a complex situation, characterized by persistent inflammatory status, whose physiopathology is not completely elucidated. In this context, NETs might play a role in the prognosis after LT. The aim of this study is to evaluate NETs release during OLT and the effect of NETosis on transfusion requirements and adverse outcomes in a prospective cohort of patients submitted to OLT. In patients submitted to LT, we quantified citrullinated histones (cit-H3) and circulating-free DNA (cfDNA) in three periods: pre-transplant, immediately after graft reperfusion and before discharge. NETs markers were compared between these periods using ANOVA test. The association of NETosis and adverse outcomes was evaluated using regression models adjusted for age, sex and corrected MELD. Ninety-three patients were included. We observed a peak of circulating NETs following reperfusion, evidenced by an increase in cf-DNA (median levels of cf-DNA pre-transplant: 45,4 ng/mL, post reperfusion: 595,4 ng/mL, pre-discharge: 66,7 ng/mL, $p < 0.001$) and a 2-fold increase in cit-H3 levels in the post-graft reperfusion period (median levels of cit-H3 pre transplant: 0,5 ng/mL, after reperfusion: 1,2 ng/mL and at discharge 0,5 ng/mL, $p < 0.0001$). We observed an association between increased levels of cit-H3 and in-hospital death (OR=1.17, 95%CI 1.02-1.34, $p = 0.02$). No association was found between NETs markers and transfusion requirements. Conclusions: There is a prompt release of NETs after reperfusion that is associated with poorer outcomes and death. Intraoperative NETs release seems to be independent of transfusion requirements. These findings highlight the relevance of inflammation promoted by NETs and its impact on OLT adverse clinical outcomes. The development of therapeutics focusing on NETosis inhibition might be a plausible strategy to reduce deleterious effects in OLT.

Keywords: neutrophil extracellular traps, blood transfusion, NETosis, liver transplantation, clinical outcomes.

Relação de figuras

Figura 1 -Mecanismos moleculares de NETose	15
Figura 2 – Recrutamento de pacientes	25
Figura 3- Associações entre os níveis de Cit-H3 (incrementos do tempo A→B) e desfechos clínicos ajustados para idade, sexo e MELD corrigido	34
Figura 4-Associações entre os níveis de Cit-H3(incrementos do tempo A→B), transfusão de hemocomponentes e antifibrinolítico	36
Figura 5- Sobrevida após transplante até o último seguimento e associação com cfDNA mensurado no tempo B	38
Figura 6- Sobrevida após transplante até o último seguimento e associação com cf DNA (tempo B-A)	39
Figura 7- Sobrevida após transplante até o último seguimento e associação com Cit-H3 mensurado no tempo B	40
Figura 8- Sobrevida após transplante até o último seguimento e associação com Cit-H3 (incrementos tempo A→B)	41

Relação de tabelas:

Tabela 1- Dados demográficos	26
Tabela 2- Dados clínicos	27
Tabela 3- Dados intraoperatórios de tempos cirúrgicos	28
Tabela 4- ransfusão de hemocomponentes, uso de hemoderivados e agente antifibrinolítico	28
Tabela 5- Dados laboratoriais do perioperatório	29
Tabela 6- Dados de internação e desfechos clínicos dos pacientes submetidos ao transplante hepático	30
Tabela 7- Marcadores de NETose nos tempos A, B e C	31
Tabela 8- Determinação dos fatores de risco para NETose no pré-operatório de TOF	32
Tabela 9- Fatores associados à liberação de Cit-H3 no intraoperatório	33
Tabela 10- Análises de regressão para determinar a associação entre o incremento de CitH3 no intraoperatório (diferença entre os tempos A e B) e a necessidade de transfusão de hemocomponentes, hemoderivados e ácido tranexâmico	34
Tabela 11- Associações entre parâmetros tromboelastográficos ao término do TOF e Cit H3 pós reperfusão (momento B)	35
Tabela 12- Associações entre parâmetros tromboelastográficos ao término do TOF e incremento de Cit-H3 entre os tempos A e B	36
Tabela 13 – Análises de regressão para determinar a associação entre o incremento de Cit-H3 no intraoperatório (diferença entre os tempos A e B) e os desfechos negativos do TOF	37

Relação de abreviaturas

ANOVA	Do inglês: <i>analysis of variance</i> , análises de variância
cf-DNA	Do inglês: <i>cell free DNA</i> , DNA livre
CFT	Do inglês, <i>clot formation time</i> , tempo de formação do coágulo
Cit-H3	H3 citrulinado
CMV	Citomegalovírus
CT	Do inglês, <i>clotting time</i> , tempo de coagulação
CXCL-1	Do inglês: <i>chemokine motif ligand 1</i>
DAMPs	Do inglês: <i>damage-associated molecular patterns</i> , padrões moleculares associados a danos
DNA	Do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
EAD	Do inglês, <i>early allograft dysfunction</i> , disfunção precoce do enxerto
EROs	Espécies reativas de oxigênio
H3	Histona 3
HCC	Carcinoma hepatocelular
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein
HMGB1	Do inglês, <i>high mobility group box-1</i> , proteína 1 do grupo de alta mobilidade
I/R	Injúria e reperfusão
ICS	Infecção de corrente sanguínea
IL	Interleucina
IQR	Do inglês <i>interquartile range</i> , range interquartil
ITU	Infecção de trato urinário,
MEK	Do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MELD	Do inglês: <i>Model for end-stage liver disease</i> , modelo para doença hepática terminal
NADPH	Do inglês: <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> , fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NASH	Do inglês: <i>nonalcoholic steatohepatitis</i> , esteatohepatite não alcoólica
NETs	Do inglês: <i>Neutrophil extracellular traps</i> , redes extracelulares de neutrófilos
NK	Do inglês, <i>natural killer</i> , exterminadoras naturais
PAD4	Peptidilargininadeaminase 4
PAI-I	Do inglês, <i>plasminogen activator inhibitor</i> , inibidor do ativador do plasminogênio
RCA	Rejeição celular aguda
TAH	Trombose de artéria hepática
Tb	Tuberculose
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFPI	Do inglês: <i>tissue factor inhibitor pathway</i> , inibidor da via de fator tecidual
TH	Transplante hepático
TIF	Tempo de isquemia fria
TIQ	Tempos de isquemia quente
TLR	Do inglês, <i>toll-like receptor</i> , receptor do tipo toll
TNF	Do inglês, <i>tissue necrosis factor</i> , fator de necrose tumoral
TOF	Transplante ortotópico de fígado

tPA	Do inglês, <i>tissue plasminogen activator</i> , ativador de plasminogênio tecidual
Treg	Células T regulatórias
TRIM	Do inglês, <i>transfusion related immune-modulation</i> , imunomodulação relacionada à transfusão
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VEGF	<i>Do inglês, Vascular endothelial growth factor</i> , fator de crescimento endotelial vascular
VWF	Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

1. RESUMO	6
2. INTRODUÇÃO	14
2.1 Neutrófilos e NETs neutrophil extracellular traps	14
2.2 NETs como mecanismo de defesa contra infecções	16
2.3 NETs, doenças hepáticas e NETose no transplante hepático	16
2.4 Inflamação e transplante hepático	17
2.4.1 Inflamação induzida por transfusão sanguínea no TOF e desfechos clínicos	18
3. JUSTIFICATIVA	20
4. OBJETIVOS	21
5. METODOLOGIA	21
5.1 Aspectos éticos da pesquisa	21
5.2 Seleção de pacientes	22
5.3 Coleta de dados clínicos dos pacientes durante e pós TH	22
5.4 Coleta de material biológico	22
5.5 Quantificação de DNA livre no plasma pela técnica de PicoGreen	23
5.6 Quantificação da concentração de H3 citrulinado por ELISA	23
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
6. RESULTADOS	24
6.1 Características da população estudada	24
6.2 Evolução da concentração plasmática de NETs durante internação para o TOF	31
6.3 Fatores associados a Cit H3 no pré-operatório	31
6.4 Fatores associados a liberação de CitH3 no intraoperatório	32
6.5 Relação entre a liberação de Cit-H3 durante o intraoperatório e a necessidade de uso de hemocomponentes, hemoderivados e ácido tranexâmico no transplante	33
6.6 Relação entre a liberação de Cit-H3 e parâmetros tromboelastográficos	35
6.7 Relação entre a liberação de Cit-H3 e desfechos clínicos negativos	36
6.8 Relação entre a liberação de NETs durante o intraoperatório e mortalidade a longo prazo	37
7. DISCUSSÃO	42
7.1 NETose durante o transplante hepático	42
7.2 NETose e transfusão	43
7.3 NETose e desfechos clínicos do TOF	44
7.4 Limitações	45
8. CONCLUSÃO	46
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

Anexo 1 – Manejo hemostático e transfusão de hemocomponentes no transplante hepático

Anexo 2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 3- Parecer final consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 4- Artigo publicado Risk factors for transfusion after orthotopic liver transplantation

Anexo 5- Artigo em processo de submissão: NETs (Neutrophil extracellular traps, transfusion requirements and clinical outcomes in orthotopic liver transplantation

2. Introdução

2.1- Neutrófilos e *Neutrophil extracellular traps* – arcabouços extracelulares de neutrófilos

Os neutrófilos são as células de defesa mais abundantes do sistema imune inato, correspondendo a 50-70% dos leucócitos circulantes (1,2). Em adultos saudáveis, a produção de neutrófilos é estimada em cerca de 2×10^{11} células por dia. A granulocitopoese se inicia a partir de mieloblastos onipotentes na medula, que darão origem em última instância a polimorfonucleares maduros com diâmetro de 7-10 μm , núcleo segmentado e citoplasma rico em: 1- grânulos enzimáticos primários (peroxidase-positivos, azurofílicos, que contêm mieloperoxidase, elastase neutrofílica, proteinase 3, catepsina G); 2- grânulos secundários (peroxidase negativos, carreadores de lactoferrina, proteína 3 secretora rica em cisteína, lipocalina, catelicidina LL-37) e 3- grânulos terciários (ricos em arginase 1 e gelatinases) (3-5).

Além de grânulos, os neutrófilos possuem também vesículas secretoras, essenciais para o transporte de proteínas para a superfície da célula (integrinas, envolvidas na adesão celular) e proteases, que facilitam a transmigração (6).

Sabe-se que em resposta a estímulos inflamatórios, os neutrófilos são capazes de migrar ao sítio de injúria; e, se ativados, atuar contra agentes infecciosos através de três mecanismos principais: fagocitose, degranulação e formação de redes extracelulares de neutrófilos, ou *Neutrophil extracellular traps (NETs)*, através de um fenômeno chamado NETose (7). NETs é a denominação dada às estruturas extracelulares originadas dos neutrófilos, formadas por cromatina descondensada, associada a grânulos citoplasmáticos em resposta a vários estímulos. Brinkmann et al. foi o primeiro autor a demonstrar que neutrófilos ativados são capazes de formar redes extracelulares de DNA em resposta a infecções patogênicas e à liberação de DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) (8). Demonstrou-se que NETs são arcabouços extracelulares formados por DNA integrado a histonas e proteínas granulares com propriedades antimicrobianas. Sua formação decorre de um processo de 4 etapas (figura 1), em que ocorre:

- 1- Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) via NADPH oxidase(9,10);
- 2- Deslocamento de enzimas proteolíticas citoplasmáticas para o núcleo do neutrófilo (11), auxiliando na descondensação da cromatina através da clivagem das histonas;

- 3- Degradação e modificação das histonas, processo pelo qual a peptidilargininadeaminase 4 (PAD4) citrulina resíduos de arginina da histona H3 e a elastase neutrofílica degrada a histona H1 para descondensação da cromatina (12);
- 4- Quebra das membranas nuclear e citoplasmática e liberação da cromatina para o meio extracelular (9).

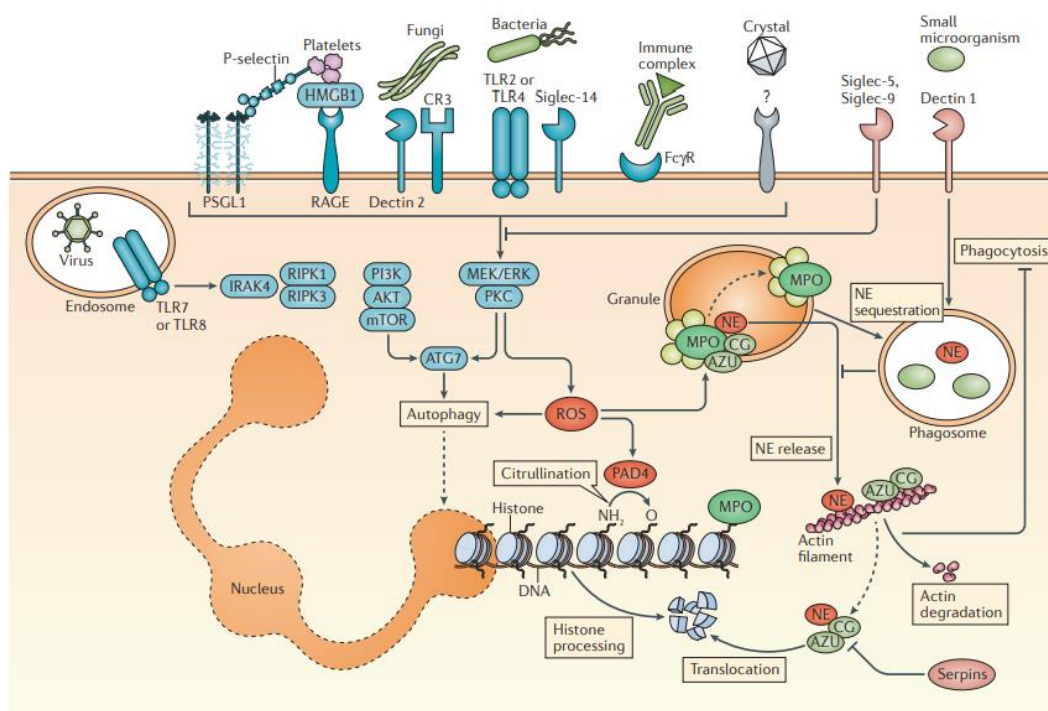


Figura 1-Adaptado de Papayannopoulos, 2018- Mecanismos moleculares de NETose

A formação de NETs pode ser desencadeada tanto por estímulos estéreis endógenos quanto por microorganismos. Todas as vias culminam na formação de espécies reativas de oxigênio, via MEK kinases, desencadeando a via da MPO. Ocorre oxidação da NE, que degrada o citoesqueleto e bloqueia a fagocitose. A NE então se desloca para o núcleo e direciona a descondensação da cromatina processando a histona H1. A descondensação da cromatina também é promovida pela MPO e pela ativação de PAD4, que citruliniza o resíduo de arginina da Histona H3. Abreviações: NETs= redes extracelulares de neutrófilos, do inglês *neutrophil extracellular traps*; MEK= proteína quinase ativada por mitógeno, do inglês *mitogen-activated protein kinase*; MPO=mieloperoxidase; NE= elastase neutrofílica, do inglês *neutrophil elastase*; HMGB1= proteína 1 do grupo de alta mobilidade, do inglês *high mobility group box-1*; TLR= receptor do tipo toll-like, do inglês *toll-like receptor*; IRAK4=proteína quinase do receptor associado à interleucina 1, do inglês *interleukin 1 receptor-associated kinase*; RIPK= proteína quinase que interage com o receptor de treonina/serina, do inglês *receptor-interacting serine/threonine protein kinase*; PAD4=deaminase proteína -arginina do tipo 4, do inglês *protein-arginine deaminase type 4*; PI3K=fosfoinosítido quinase 3, do inglês *Phosphoinositide 3 kinase*; PSGL1= ligante 1 da glicoproteína P-selectina, do inglês *P-selectin glycoprotein ligand-1*; AKT=o mesmo que PKB =proteína quinase B; ATG7= gene autofágico 7, do inglês *autophagy gene 7*; PKC= proteína quinase C, do inglês *protein kinase C*; ROS=espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*; CG= catepsina G, CR3 =receptor de complemento3, RAGE= receptor de produtos de glicação avançada, do inglês *receptor for advanced glycated end products*; MEK=proteína quinase ativada por mitógeno, do inglês *mitogen-activated protein kinase*; AZU=grânulo azurofílico; m-TOR= alvo mecanístico de rapamicina, do inglês *mechanistic target of rapamycin*

2.2- NETs como mecanismo de defesa contra infecções

Inicialmente, os NETs foram descritos como um mecanismo de defesa contra patógenos, atuando na captura e destruição de bactérias, fungos e protozoários (13-16). Entretanto, hoje em dia, sabe-se que NETose pode ser desencadeada por inúmeros estímulos, infecciosos ou estéreis.

Um dos mecanismos que parece desencadear a formação de NETs em infecções é o tamanho do microorganismo (17). O direcionamento de fagocitose versus NETose em uma infecção deve-se à disponibilidade ou não da elastase neutrofílica. Microorganismos pequenos englobados por fagossomos se fundem a grânulos azurófilos, sequestrando a elastase neutrofílica do núcleo e bloqueando a descondensação da cromatina. Na ausência de fagossomos, microorganismos que são grandes demais para serem “ingeridos” permitem que a elastase neutrofílica transloque para o núcleo, permitindo a NETose. Ainda, a liberação de elastase neutrofílica no citoplasma promove a degradação da actina do citoesqueleto, bloqueando a fagocitose e direcionando o comprometimento da célula para a NETose (17). A liberação de NETs também já foi reportada em infecções por HIV (15), vírus sincicial respiratório (18) e SARS-CoV2 (19).

2.3- NETs, doenças hepáticas e NETose no transplante hepático

Mais recentemente, NETs também foram implicados na patogênese de algumas hepatopatias crônicas, tais como doença hepática alcoólica, hipertensão portal (20) e esteatohepatite não alcoólica (NASH) (21,22). Na doença hepática alcoólica, sabe-se que a exposição ao álcool reduz a capacidade dos macrófagos hepáticos realizarem o clearance de NETs, e tal mecanismo propagaria inflamação hepática e injúria tecidual (23,24). Na hipertensão portal, sabe-se que células endoteliais dos sinusóides hepáticos são capazes de secretar o fator quimiotático de neutrófilos (*CXC motif-ligand*, CXCL1) em resposta à distensão mecânica imposta pela congestão. Hilscher et al (20) demonstraram que NETs propagam a hipertensão portal ao promover trombose ao longo dos sinusóides microvasculares.

Além da participação dos NETs nas hepatopatias, sabe-se que durante o transplante hepático, ocorre intensa NETose (25). Huang et al. analisou a formação de NETs em modelos murinos de injúria e reperfusão (I/R) hepáticos, simulando o que ocorreria durante o transplante ortotópico de fígado. Demonstrou-se que no modelo de I/R hepática em camundongos há

formação de uma quantidade de DNA livre e nucleossomos significativamente maior do que em camundongos com cirurgia placebo. Ainda, demonstrou-se que citocinas inflamatórias aumentam de maneira significativa nas células de Kupffer em meios de cultura com NETs, se comparados a meios de cultura controles. O mesmo estudo demonstrou que histonas e HMGB1, os principais DAMPs (do inglês *damage associated molecular patterns*) liberados dos hepatócitos sob stress I/R, induzem a formação de NETs pela via de sinalização TLR4 (*toll-like receptor 4*) ou TLR9 (25). Foi comprovada a via TLR4 na patogênese da NETose, pois modelos murinos com depleção de neutrófilos ou modelos geneticamente modificados *TLR4- knockout* tinham menos danos de I/R se comparados a modelos animais convencionais. Al-Khafajii (26) avaliou camundongos tratados com alopurinol e N-acetilcisteína, evidenciando menores níveis de superóxido, com menor formação de NETs e menos dano I/R, corroborando a participação da via de formação de superóxido via NADPH- neutrófilos da NETose, (26)

2.4- Inflamação e transplante hepático

Todo transplante hepático pressupõe produção elevada de citocinas no intraoperatório. Os fenômenos de I/R promovem um estado inflamatório exacerbado, com dano hepatocelular. Estes ocorrem em função da interrupção temporária de fluxo sanguíneo durante a confecção de anastomoses ou por choque hipovolêmico (25). Tais fenômenos resultam em dano hepatocelular por isquemia, seguido por uma resposta inflamatória rápida durante a reperfusão. (27)

Após a reperfusão, Huang et al e Tsung et al (28,29) demonstraram que os hepatócitos lesados liberam partículas denominadas DAMPs, tais como a proteína HMGB1 e histonas extracelulares. Isto exacerba a injúria hepática através da ativação de receptores TLR-4 eTLR-9 (28,29), criando um meio que incita o influxo de células inflamatórias, incluindo os neutrófilos do sistema imune inato. Os neutrófilos são recrutados ao local de injúria hepática logo após o início da isquemia, mediando, portanto, as respostas inflamatórias precoces no processo de injúria tecidual. O acúmulo e infiltração de neutrófilos no fígado faz com que haja liberação de espécies reativas de oxigênio, enzimas proteolíticas e uma variedade de mediadores inflamatórios. (30)

Esta inflamação inerente ao transplante hepático está associada a piores desfechos clínicos. Estados inflamatórios persistentes foram reconhecidos como deflagradores de complicações no pós-operatório do transplante ortotópico de fígado (TOF), tais como transfusão de

hemocomponentes (39), que foi preditor independente de mortalidade. Vários autores demonstraram correlação entre elevação da produção de citocinas no perioperatório de transplante hepático e índices elevados de complicações como infecção e rejeição no transplante hepático. (31,32). Hassan et al (31) evidenciaram níveis séricos de IL-6 quatro vezes superior em pacientes de TOF com complicações no pós-operatório se comparados a pacientes sem complicações. Miki et al (32) demonstraram que picos de IL6 e IL-1 β estão independentemente relacionados com o nível de bilirrubina à admissão e o consumo de hemocomponentes no intraoperatório.

Mais recentemente, Friedman et al (33) demonstraram que a mediana de níveis pós-operatórios de IL6 era superior em pacientes pós TOF com disfunção precoce do enxerto, EAD (*do inglês, early allograft dysfunction*) se comparado a pacientes sem EAD, porém, sem significância estatística. O mesmo autor demonstrou níveis de MCP-1, RANTES e IL-8 significativamente superior em pacientes com EAD se comparados a pacientes sem EAD. (33).

2.4.1- Inflamação induzida por transfusão sanguínea no TOF e desfechos clínicos

A transfusão de hemocomponentes é comum no TOF, sendo frequente a ocorrência de coagulopatia e transfusão maciça (34). A coagulopatia própria do procedimento cirúrgico (hemodiluição, acidose, hipotermia, hipocalcemia) é exacerbada pelos distúrbios típicos do hepatopata crônico, com desbalanço entre drives pró-coagulantes e anticoagulantes (35).

Peculiaridades das fases cirúrgicas do TOF também contribuem para o sangramento e elevação das necessidades transfusionais. Observa-se: I- Fase anepática: redução da síntese dos fatores de coagulação e do *clearance* de tPA (*tissue plasminogen activator*), com hipocoagulabilidade e atividade fibrinolítica aumentada; II- Reperfusão: liberação de heparinóides endógenos (36), sequestro de plaquetas nos sinusóides do enxerto, redução global dos fatores de coagulação, fatores antifibrinolíticos e inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), com produção simultânea de tPA; III- Pós- perfusão: liberação de tPA do endotélio do enxerto, com ocorrência de hiperfibrinólise (37). Tais alterações provocam distúrbios de hemostasia complexos, com ocorrência de sangramento profuso; e conseqüentemente, necessidade de transfusão de hemocomponentes. Os tempos de isquemia também podem repercutir nas necessidades transfusionais no TOF (38).

Apesar de atualmente a transfusão ser bastante segura e capaz de restabelecer a hemodinâmica

e hemostasia em situações críticas irreversíveis, não é isenta de riscos (39). Houve grandes avanços em segurança transfusional, tanto com relação à redução de risco infeccioso quanto à segurança do processamento do sangue. Entretanto, a transfusão ainda representa riscos adicionais em diversos cenários. Especificamente no TOF, alguns autores correlacionam transfusão à redução de sobrevida (40), à ocorrência de injúria respiratória aguda e aumento de risco infeccioso dose dependente (41). Associado a isso, outros trabalhos mostram que a redução do uso de hemocomponentes no TOF claramente se destaca como um dos fatores relacionados à melhora da sobrevida e de desfechos clínicos (42).

Assim, o manejo hemoterápico dos pacientes submetidos a TOF vem sofrendo mudanças importantes ao longo das décadas, com especial destaque à redução do uso de hemocomponentes (43). Na década de 90, era frequente a ocorrência de sangramento profuso com evolução para transfusão maciça (44). Hoje, são reportadas taxas de surpreendentes 79,6% de transplantes hepáticos realizados sem nenhum tipo de transfusão em alguns serviços (42). Os mecanismos através dos quais se estabelece a ligação entre transfusão e piores desfechos do TOF não são completamente conhecidos, uma vez que necessidades transfusionais elevadas também podem ser consequência de pacientes mais graves, cirurgias mais complexas, com potenciais fatores confundidores nos desfechos analisados (43).

Entretanto, acredita-se que a transfusão possa causar efeitos imunomodulatórios (TRIM, *transfusion related immune-modulation*) como a supressão de células citotóxicas e da atividade de monócitos, liberação de prostaglandinas imunossupressoras, aumento na atividade supressora de células T e inibição da produção de interleucina 2 (IL-2) (45).

Estudos “in vitro” demonstraram que a exposição do sangue total ao sobrenadante de hemácias leucodepletadas é capaz de desencadear a liberação de IL-6, IL-10 e fator de necrose tumoral α (TNF α), e induzir a ativação das células T regulatórias (Treg) (46). A ativação das células Treg é do tipo não antígeno específica, uma vez que podem ser ativadas por lipopolissacárides através da via dos receptores do tipo *Toll* (TLR) -4, e se tornar imunossupressoras (47). Estes achados explicam o porquê da ocorrência de inflamação e imunossupressão após a infusão de hemácias, a despeito da leucodepleção.

Além dos leucócitos residuais biologicamente ativos, as hemácias também contêm lípides não polares e lisofosfatidilcolinas (Liso PC) pró-inflamatórias. (48). Liso- PC são capazes de

modular a atividade de células NK e T, atuando como quimiotáticas para NK, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias e induzindo maturação dendrítica. (49).

Demonstrou-se também que plaquetas coletadas por aférese são capazes de liberar lípides bioativos, fatores de crescimento, quimiocinas e micropartículas (50) após transfusão. Ocorre ainda a liberação de CD 40L, que induz proliferação de linfócitos B e funções na cascata inflamatória (51). Fatores de crescimento incluindo VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), fator de crescimento derivado de plaquetas, fator 2 de crescimento dos fibroblastos, fator neurotrópico derivado do cérebro, fator de crescimento epidermal e fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) estão presentes em plaquetas leucodepletadas após 6 dias de armazenamento (52).

Com relação à transfusão de plasma, a despeito de se tratar de um produto acelular, a adição de plasma ao sangue periférico de indivíduos saudáveis induziu “in vitro” a liberação espontânea e dose-dependente de TNF α e IL 10. (53).

Em resumo, a transfusão de produtos alogênicos é sabidamente associada com um estímulo pró-inflamatório no receptor. Muitos destes fatores biológicos potencialmente afetam a imunidade inata.

Desta forma, sendo a transfusão de hemocomponentes evento extremamente comum no TOF, associada a estímulos pro inflamatórios e imunossupressores, acredita-se também estar envolvida e contribuir para a fisiopatologia da inflamação e das complicações do transplante hepático.

3- Justificativa

A função clássica dos neutrófilos como protagonistas da imunidade inata baseia-se na fagocitose e resposta inflamatória que protege o hospedeiro contra infecções. Entretanto, novos aspectos relacionados à biologia dos neutrófilos e à NETose podem contribuir para os danos de injúria inflamatória e estímulo.

Clinicamente, já foi descrito o papel dos NETs na inflamação, infecção e trombose em vários cenários. Em estudos com animais, foi demonstrada a participação dos NETs nos fenômenos de I/R inerentes a todo transplante hepático.

Apesar de NETs estarem presentes em diversas doenças com perfil inflamatório grave e terem sido relacionados a complicações pós TOF em murinos, a correlação entre NETs e desfechos clínicos no TOF é um assunto pouco explorado.

Desta forma, o presente estudo visa a descrever o papel dos NETs como preditores de complicações em TOF e estabelecer uma correlação entre estes biomarcadores e transfusão. A identificação de novos marcadores preditivos de desfechos clínicos poderá auxiliar na identificação precoce de algumas complicações, otimizando o manejo deste grupo de pacientes.

4- Objetivos

O objetivo geral deste estudo é determinar a evolução da concentração plasmática de NETs durante o TOF e correlacioná-la com desfechos clínicos negativos.

Os objetivos específicos são avaliar nos pacientes submetidos a TOF:

- 1- Presença de NETs circulantes no pré transplante, após reperfusão do enxerto e pré alta-hospitalar
- 2- Quantidade de hemocomponentes transfundidos no intraoperatório e pós-operatório imediato
- 3- Ocorrência dos desfechos clínicos: eventos trombóticos no pós-operatório imediato; infecções no pós-operatório imediato; ocorrência de EAD; tempo de internação hospitalar; rejeição aguda, trombose.
- 4- Correlacionar a presença de NETs com o consumo de hemocomponentes e os desfechos clínicos.

5. Metodologia

5.1. Aspectos éticos da pesquisa

Os pacientes elegíveis foram convidados a participar do estudo, sendo-lhes reservado o direito de recusa de participação. Foi explicado que não haveria qualquer prejuízo de seu tratamento, ou modificação de sua assistência médica independentemente do aceite ou recusa na participação do estudo.

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE) e inscrito na Plataforma Brasil sob o CAAE 65116317.7.0000.0071. A inclusão dos pacientes foi feita através do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) datado e assinado. Após a assinatura do termo, foram realizadas as coletas de amostras.

Durante o processo de análise dos dados, a identificação dos pacientes foi substituída pelo

número do caso correspondente, assegurando o direito do sigilo pré-estabelecido nas determinações do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 466/2012 e suas complementares).

5.2- Seleção de pacientes

Foram incluídos todos os pacientes com idade superior a 18 anos com doença hepática crônica candidatos a TOF abril de 2017 a janeiro de 2020, recrutados dentre os pacientes do Ambulatório de Transplantes do Programa de Transplantes do HIAE. A estimativa de inclusão prevista era de 70 a 100 pacientes.

O histórico e aspectos clínicos dos pacientes foram obtidos através do prontuário médico e por meio de uma entrevista com formulário padronizado.

Os pacientes incluídos no estudo foram seguidos prospectivamente desde o momento da assinatura do TCLE até a alta hospitalar. Foram coletados os seguintes dados demográficos e da evolução clínica: idade, sexo, diagnóstico, comorbidades, histórico de trombozes, classificação Child, escore MELD (*Model for End Stage Liver Disease*, modelo para doença hepática terminal), tempo cirúrgico, dados tromboelastográficos pré transplante, pós reperfusão e ao término da cirurgia, quantidade e tipos de hemocomponentes e hemoderivados utilizados no intraoperatório e durante toda a internação hospitalar, tempo de internação em UTI (Unidade de Terapia Intensiva), tempo de internação e ocorrência dos desfechos clínicos: eventos trombóticos no pós operatório imediato; infecções no pós operatório imediato; ocorrência de EAD; rejeição aguda.

5.3 –Coleta de dados clínicos dos pacientes durante e pós TOF

A coleta de dados clínicos foi feita mediante análise diária do prontuário de todos os pacientes durante toda a internação hospitalar, bem como contato com a equipe médica de transplantes responsável. No período pós transplante, todos os pacientes foram acompanhados para seguimento de sobrevida, sendo o tempo mínimo de seguimento de 02 dias (óbito no 2º dia de pós operatório) e um tempo máximo de 1223 dias após o transplante (data de último retorno ambulatorial realizado até a conclusão de seguimento pós alta hospitalar deste estudo).

5.4- Coleta de material biológico

A coleta de amostras foi feita na admissão do paciente para transplante hepático (tempo A: pré-operatório imediato: intervalo de tempo estimado até o início da indução anestésica: 2 horas), nos pós reperfusão (tempo B: tempo máximo estimado de coleta após a reperfusão: 10 minutos) e no momento da alta (tempo C). Os tempos para coleta de amostra foram padronizados durante

o ato cirúrgico tanto para avaliação hemostática quanto para os propósitos deste estudo.

A coleta foi realizada por punção venosa periférica, e o sangue distribuído em 2 tubos (1 tubo de citrato e 1 tubo seco). Após a coleta, os tubos com citrato permaneceram na posição vertical e foram transportados até o laboratório dentro de racks para tubos. As amostras de tubo seco e citrato foram centrifugadas, em centrífuga refrigerada por 15 min a 1500 G, para a obtenção de plasma e soro. Tempo máximo para centrifugação após a coleta da amostra: 2 horas. Amostras que não pudessem ser processadas dentro deste limite de tempo foram descartadas para evitar erros pré-analíticos. O controle do tempos de coleta era realizado por meio de impresso com registro contendo horário de coleta. O soro e o plasma obtidos por centrifugação foram imediatamente separados em alíquotas, de 100 a 500 µl e armazenados em freezer a -80°C até a realização dos ensaios. Apenas foram incluídos os pacientes com amostras adequadas para análise dos tempos A e B. Quaisquer extravios de amostras dos tempos A e/ou B, falhas de processamento dos tempos A e/ou B implicaram exclusão do estudo. Após o término de todos os ensaios as amostras foram descartadas.

5.5- Quantificação de DNA livre no plasma pela técnica de PicoGreen

A quantificação de DNA livre no plasma foi realizada pelo kit comercial QuantiT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (ThermoFisherScientific, EUA), de acordo com instruções do fabricante. A leitura da amostra foi realizada pelo leitor de fluorescência de microplacas nos seguintes comprimentos de ondas: 480nm de excitação e 520nm de emissão. A quantificação de DNA livre se deu pelo fato de que este poderia ser um marcador indireto de NETose, podendo o DNA livre mensurado refletir, de maneira inespecífica, o DNA liberado pelos neutrófilos. Trata-se de um ensaio de fácil realização, porém inespecífico para NETose.

5.6- Quantificação da concentração de H3 citrulinado por ELISA

A quantificação da concentração de H3 citrulinado no plasma foi avaliada pelo kit comercial Citrullinated histone H3 (cit-H3) (Clone 11 D3; Cayman, Inc). 100 µL de plasma foram pipetados em cada poço e deixados sob incubação em temperatura ambiente por 2 horas em um agitador orbital. Após, foram realizadas 5 lavagens com tampão de lavagem e adicionados 100 µL de solução de conjugado H3 HRP, seguido por um período de 30 minutos de incubação no escuro, em agitador orbital. Então, adicionou-se 100 µL de solução stop e a placa foi lida a frequências de 450 nm. O Cit-H3 é um marcador bastante específico e fidedigno da NETose, discriminando exatamente a etapa de citrulinização das histonas H3.

5.7- Quantificação da concentração de MPO por ELISA

A quantificação da concentração de MPO no soro foi avaliada pelo kit comercial Cell Death detection ELISAPLUS (Roche Diagnostic Mannheim, Germany). 75 μL de anticorpo anti-MPO ($5\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) foram pipetados em cada poço e feita incubação durante a noite (12 horas) a 4 graus Celsius. A placa foi lavada por 3 vezes com 200 μL com tampão de lavagem (PBS). Adicionou-se a cada poço 150 μL de solução de tampão de bloqueio a 1% e incubado por 60 min a 37 graus Celsius. Procedeu-se então com lavagem da placa por 4 vezes com 200 μL de tampão de lavagem. Foram pipetados 76 μL de amostra e/ou reagentes comerciais da curva de calibração e após, adicionados 4 μL de anticorpo anti-DNA. Esta reação foi incubada por 2 horas a 37 graus Celsius, sob agitação a 320 rpm. A seguir, as amostras foram lavadas com 200 μL de solução tampão de lavagem (PBS) por 3 vezes. Adicionou-se então 100 μL de substrato peroxidase (reagente ABTS do kit Cell Death) a cada poço e deixado em incubação a 37 graus Celsius por 40 minutos, protegido da luz, sob agitação a 250 rpm. Foram pipetadas 100 μL de solução de bloqueio e feita leitura a 405 nm.

5.8- Análise Estatística

Foi feita análise descritiva através de tabelas de frequências para variáveis categóricas e medidas de posição e dispersão para variáveis numéricas. Comparamos os marcadores de NETose (CitH3 e cfDNA) entre todos os tempos (pré transplante, imediatamente após reperfusão e pré alta) ao longo da internação hospitalar utilizando o teste de ANOVA. Para as associações entre os marcadores de NETose e os desfechos contínuos, foram feitas regressões lineares. Para as associações entre os marcadores de NETose e desfechos binários, foram feitas regressões logísticas. Essas análises foram ajustadas para sexo, idade e MELD corrigido. Para associação entre os marcadores de NETose e sobrevida, foram feitos testes log-rank e curvas Kaplan Meier de acordo com os tercís de PicoGreen e Cit-H3 e dias de sobrevida após o transplante. Para associação entre os marcadores tromboelastográficos e níveis de CitH3 foram feitas correlações de Spearman. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi 5% ($P < 0.05$).

6 - Resultados

6.1- Características da população estudada

De 20 de abril de 2017 a 24 de janeiro de 2020, foram realizados 158 transplantes hepáticos. Cento e vinte e quatro pacientes elegíveis foram abordados para obtenção de consentimento.

Destes, noventa e três efetivamente participaram do projeto, com inclusão de pelo menos coleta de amostras dos tempos A e B. Trinta e um pacientes foram excluídos, por falha de coleta de amostras dos tempos A ou B e/ou impossibilidade de aplicação de TCLE, o que inviabilizaria as análises (Figura 2). Tais exclusões ocorreram de maneira totalmente aleatória. O estudo foi realizado então com noventa e três pacientes elegíveis para análise de cf-DNA, cit-H3 e MPO coletados nos tempos A, B e C. Todos os pacientes foram seguidos durante toda a internação hospitalar até alta ou óbito, diariamente. No pós-operatório tardio, todos os pacientes foram seguidos por um período mínimo de 2 dias (óbito no 2º dia de pós-operatório) e um máximo de 1223 dias após o transplante (data de último retorno ambulatorial realizado até a conclusão de seguimento pós alta hospitalar deste estudo).

Figura 2- Recrutamento de pacientes



De um total de 158 transplantes, foram abordados 124 pacientes para participação na pesquisa. Houve 14 recusas de participação e não foi possível abordar 20 pacientes por impossibilidade de aplicação de termo de consentimento. Dos 124 pacientes incluídos, houve 31 exclusões, por falha de coleta e/ou impossibilidade de processamento das amostras dos tempos A e/ou B.

Não houve perda de follow-up neste período. A tabela 1 traz os dados demográficos dos pacientes. Houve um predomínio (62.4%) de pacientes do sexo masculino, sendo a maioria (69.2%) com idade superior a 51 anos e de raça branca (66.3%). A tabela 2 traz dados clínicos basais, da fase pré-transplante. O diagnóstico etiológico mais frequente dos pacientes foi cirrose viral (24.7%), e o mais raro a hepatite fulminante (4.3%). Setenta e um por cento dos pacientes tinha situação especial, sendo o motivo mais frequente o carcinoma hepatocelular (HCC) (38%), seguido da ascite refratária (32.7%). A grande maioria (95.3%) dos pacientes tinha status funcional de Karnofsky entre 80-100 %.

Tabela 1- Dados demográficos

	Pacientes submetidos a transplante ortotópico de fígado) (n=93)
Sexo masculino, n (%)	58 (62.4)
Idade (min-máx.)	21-72
20-30	9(9.6)
31-40	10 (10.6)
41-50	10 (10.6)
51-60	28 (29.8)
>61	37 (39.4)
Idade Min- Max	21-72
Etnia (n=89)	
Branco, n (%)	59 (66.3)
Preto, n (%)	8 (9)
Pardo, n (%)	21 (23.6)
Amarelo, n (%)	1(1.1)
IMC, mediana (IQR) n=77	27.16 (23.9-31.1)

IMC= Índice de massa corpórea, IQR= intervalo interquartil, *do inglês interquartil range*

Tabela 2- Dados clínicos

	Pacientes submetidos a transplante ortotópico de fígado) (n=93)
Diagnóstico Etiológico (n=93)	
Cirrose viral, n (%)	23 (24.7)
Cirrose biliar primária/ Hepatite autoimune/	11 (11.8)
Colangite esclerosante, n (%)	
Cirrose alcoólica+ vírus, n (%)	6 (6.5)
Hepatite fulminante, n (%)	4 (4.3)
Alcoólica, n (%)	22 (23.6)
PAF/ Budd Chiari/NASH/Criptogênica/Tu neuroendócrino, n (%)	27 (29)
Score MELD, mediana (IQR)	16 (11-25.5)
Score MELD corrigido, mediana (IQR)	29 (25.5-29)
Situação especial, n (%)	71 (76.3)
Situação especial motivo	
HCC, n (%)	27 (38)
HCC sem downstaging, n (%)	2 (2.8)
HCC com downstaging, n (%)	1 (1.4)
PAF, n (%)	5 (7)
Ascite refratária, n (%)	23 (32.7)
Miscelânea (Colangite de repetição, tu neuroendócrino, hemangioendotelioma, doença policística, Budd Chiari), n (%)	13(11.3)
Score Child-Pugh (n=83)	
A, n (%)	14 (16.9)
B, n (%)	31 (37.3)
C, n (%)	30 (36.2)
Nódulo ou Tumor Hepático, n (%)	32 (34.4)
Hemorragias prévias, n (%)	12 (12.9)
Cirurgias prévias abdominais, n (%)	38 (40.9)
Trombose veia porta, n (%)	12 (12.9)
Varizes esofágicas, n (%)	15 (16.1)
Ascite, n (%)	42 (45.2)
Hipertensão portal, n (%)	43 (46.2)
Comorbidades, n (%)	47 (50.5)
Insuf renal dialítica pré transplante, n (%)	2 (2.1)
DM, n (%)	21 (22.6)
HAS, n (%)	22 (23.6)
Tabagismo, n (%)	13 (14)
Obesidade, n (%)	68 (73.1)
Tireoidopatia	5 (5.3)
Karnofsky (n=86)	
80 - 100, n (%)	82 (95.3)
40 - 60, n (%)	4 (4.7)

Tabela 2 – Dados clínicos da população estudada. HCC= hepatocarcinoma, PAF=poliamiloidose familiar, DM=diabetes mellitus, HAS=hipertensão arterial sistêmica, , IQR= intervalo interquartil, *do inglês interquartil range*

A tabela 3 traz dados de tempos cirúrgicos. Os tempos de isquemia quente (TIQ= isquemia durante a implantação do órgão, desde a remoção do gelo até a reperusão) e os tempos de isquemia fria (TIF= período que vai do início da preservação fria in vivo no doador até a remoção do armazenamento a 4 graus Celsius). Ambos os tempos influenciam no consumo de hemocomponentes e estão reportados abaixo. A tabela 4 mostra o consumo de transfusão, hemoderivados e antifibrinolítico no intraoperatório. O hemocomponente mais transfundido no intraoperatório foi o concentrado de hemácias, com uma mediana de 1 unidade (mín :0, máx: 5). Cerca de metade (51.6%) dos pacientes usou *cell saver*, com mediana de volume de sangue recuperado de 916 ml (IQR 502-1286).

Tabela 3- Dados intraoperatórios de tempos cirúrgicos

	Pacientes submetidos a transplante ortotópico de fígado) (n=93)
TIQ (min), mediana (IQR)	30 (25-38)
TIF (min), mediana (IQR)	371 (326-454)
Tempo total de cirurgia (min), mediana (IQR)	287 (240-360)
Tempo total de anestesia (min), mediana (IQR)	367 (301-455)
Intercorrências cirurgia, n (%)	35 (37.6)
Trombectomia no intraoperatório, n (%)	10 (3.3)

Dados de tempos cirúrgicos. TIQ= tempo de isquemia quente; TIF= tempo de isquemia fria, IQR= intervalo interquartil, do inglês *interquartil range*

Tabela 4- Transfusão de hemocomponentes, uso de hemoderivados e agente antifibrinolítico no intraoperatório:

Concentrados hemácias transfundidos, mediana (min-máx.)	1 (0-5)
Unidades de plaquetas transfundidas, mediana (min-máx.) Dose = 1 aférese ou 6 plaquetas randômicas (3×10^{11})	0 (0-6)
Unidades de PFC transfundidas, mediana (min-máx.)	0 (0-4)
Unidades de crioprecipitado transfundidas, mediana (min-máx.)	0 (0-8)
Volume recuperado no cell saver (n= 48), mediana (IQR)	916 (502-1286)
Complexo protrombínico, n (%)	20 (22,2)
Uso de ácido tranexâmico, n (%)	7 (7,5)
Uso de concentrado de fibrinogênio, n (%)	36 (38,7)

PFC= plasma fresco congelado, IQR= intervalo interquartil, do inglês *interquartil range*

Na tabela 5, encontramos dados laboratoriais do pré-transplante e pós reperfusão. Dados de tromboelastografia mostram de maneira geral discreto comprometimento hemostático, com alargamento de CT (*clotting time*) (mediana 67, IQR 61-82) e CFT (*clot formation time*) (mediana 138, IQR 96-237) no EXTEM, acompanhado de plaquetopenia, que se exacerbam nos pós reperfusão, CT (mediana 69, IQR 57-83), CFT (mediana 160 IQR 155-243).

Tabela 5- Dados laboratoriais do perioperatório

	Pacientes submetidos a transplante ortotópico de fígado (n=93)	
	Pré - transplante	Pós - transplante
Hb (g/dL), mediana (IQR)	11.1 (8.7-12.8)	9.5 (8.2-10.3)
PLAQUETAS (/mm ³), mediana (IQR)	70 000 (48000-113 000)	60 000 (44 000-104 000)
INR, mediana (IQR)	1.6 (1.4-2.0)	NA
pH (n=79), mediana (IQR)	7.4 (7.3-7.4)	7.3 (7.3-7.4)
HCO ₃ (n=78), mediana (IQR)	23.6 (20.9-26.6)	NA
BE (n=77), mediana (IQR)	1.1 (-1.1, -4.85)	NA
Lactato (n=76), mediana (IQR)	13 (9-18.5)	23 (14.5-32)
CT EX, mediana (IQR)	67 (61-82)	69 (57-83)
CFT, mediana (IQR)	138 (96-237)	160 (155-243)
ALFA, mediana (IQR)	66(56-74)	63 (52.7-72)
A5, mediana (IQR)	32 (23-40)	29.5 (22-34.2)
A10, mediana (IQR)	43 (33-51)	39 (31-43)
MCF, mediana (IQR)	51 (41-58)	49 (41-43.2)
A10FIB, mediana (IQR)	11 (7-16)	9 (6-11)
A5 FIB, mediana (IQR)	10 (6-15)	9 (6-11)
MCF FIB, mediana (IQR)	12 (7.5-17)	NA
A20 FIB, mediana (IQR)	12 (7.7-17.2)	10 (7-13.5)

Hb: hemoglobina; IQR: *interquartile range*; INR= *International normalized ratio*; BE=*base excess*; EX= ensaios no EXTEM, FIB= ensaios no FIBTEM, CT= *clotting time*, CFT= *clot formation time*; MCF=*maximum clot firmness*, NA=*não aplicável*

Os pacientes apresentaram mediana de internação em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de 4 dias (IQR 3-8) e 11 dias (IQR 8-17) de internação hospitalar total. A mediana de dias sob ventilação mecânica foi de 1 (IQR 1-2). Quarenta pacientes apresentaram infecção, sendo a etiologia bacteriana a mais comum (58.1%). Cerca de metade (47.3%) dos pacientes apresentaram disfunção orgânica. Destes, um terço evoluiu com necessidade de diálise. Quinze por cento dos pacientes evoluiu com rejeição. Sete pacientes apresentaram trombose nova no pós-operatório (desde o pós operatório imediato até a alta hospitalar). Nove pacientes evoluíram a óbito. Estes dados estão apresentados na tabela 6 abaixo:

Tabela 6- Dados de internação e desfechos clínicos dos pacientes submetidos ao transplante hepático

	Pacientes submetidos a transplante (n=93)
Dias de UTI, mediana (IQR)	4 (3-8)
Dias de internação, mediana (IQR)	11(8-17)
Dias em ventilação mecânica, mediana (IQR)	1(1-2)
Infecção, n (%)	43 (46.2)
Sítio de infecção	
pulmão, n (%)	6 (13.9)
hemocultura do doador, n (%)	8 (18.6)
ICS, n (%)	11 (25.6)
ascite, n (%)	4 (9.3)
ITU	8 (18.6)
Miscelânea* (líquor, cateter, TGI)	6 (13.9)
Agente	
Bactéria, n (%)	25 (58.1)
Fungo (Candida e Trichosporon), n (%)	4 (9.3)
CMV, n (%)	6 (13.9)
Tb, n (%)	1 (2.3)
Enxerto com Tb em AP, n (%)	1 (2.3)
miscelânea, n (%)	3 (7)
Disfunção orgânica, n (%)	44 (47.3)
Hemodiálise, n (%)	31 (33.3)
Trombose durante o pós-operatório, n (%)	10 (5.4)
Rejeição, n (%)	14 (15)
Biopsia / causa da rejeição	
RCA moderada, n (%)	8 (57.1)
RCA grave, n (%)	5 (35.7)
outros, n (%)	2 (14.2)
Reabordagem, n (%)	11 (11.8)
Motivo da reabordagem	
<i>Second look</i> , n (%)	3 (27.3)
sangramento, n (%)	7 (63.6)
outros, n (%)	1 (9.1)
Retransplante, n (%)	4 (1.3)
Causa do retransplante	
Primary nonfunction, n (%)	2 (50)
TAH, n (%)	2 (50)
Óbito na internação, n (%)	9 (9.7)
Causa do óbito	
Choque distributivo, n (%)	3(33,3)
Choque séptico, n (%)	5 (55,5)
Choque hemorrágico, n (%)	1 (11.1)

Legendas: IQR: *interquartile range*, ICS= infecção de corrente sanguínea, ITU=infecção de trato urinário, * líquido, infecção de cateter, trato gastrointestinal, CMV=Citomegalovírus, Tb= Tuberculose, AP=Anátomo patológico, RCA= Rejeição celular aguda, TAH= trombose de artéria hepática.

6.2- Evolução da concentração plasmática de NETs durante a internação para TOF

A fim de documentar os níveis circulantes de NETs nos três momentos analisados (momento A: pré transplante imediato; momento B= pós reperfusão e momento C= alta), realizamos ensaios de PicoGreen para quantificação de DNA livre e Cit-H3 circulante com as amostras dos tempos A, B e C (Tabela 7)

Observamos uma ascensão dos níveis de DNA livre e Cit-H3 do momento A para o momento B, com posterior declínio do momento B para o momento C, de maneira estatisticamente significativa. Os valores de DNA livre nos 03 tempos foram: tempo A: mediana:45,4 ng/ml (IQR 17,0-117,8) , tempo B: mediana 595,4 ng/ml (IQR 155,3-1230,6) , e tempo C mediana: 66,7 ng/ml (IQR = 42,7-123,3) ($p < 0.001$). Os valores de Cit-H3 nos 03 tempos foram: tempo A: mediana 0,5 ng/ ml (IQR 0,2-1,0 ng/ml), tempo B: mediana 1,2 ng/ml (IQR 0,7-3,0) e tempo C: mediana: 0,5 (IQR 0,2-0,8 ng/ml, ($P < 0.0001$)). Estes dados estão registrados na tabela 7 abaixo:

Tabela 7 – Marcadores de NETose nos tempos A, B C –

	A	B	C	
Cit-H3 (ng/mL) (mediana, IQR)	0,5 (0,2-1,0)	1,2 (0,7-3,0)	0,5 (0,2-0,8)	$P < 0.0001$
DNA livre (ng/mL) (mediana, IQR)	45,4 (17,0-117,8)	595,4 (155,3-1230,6)	66,7 (42,7-123,3)	$P < 0.001$

Marcadores de NETose ao longo do transplante hepático. Essa tabela demonstra a evolução da NETose no pré-operatório do transplante (tempo A), no pós reperfusão (tempo B) e no pré alta (tempo C).IQR: interquartil; A: pré-transplante ; B= após reperfusão ; C= pré alta

6.3- Fatores associados a NETose no pré-operatório

A tabela 8 demonstra os fatores relacionados aos níveis de H3 citrulinado do momento A, no pré-operatório imediato. Consideramos idade, sexo, diagnóstico etiológico, MELD corrigido, presença de HCC, hemorragias prévias, trombose de veia porta, hipertensão portal e presença de comorbidades como possíveis fatores associados a NETose basal pré transplante.

Apenas o diagnóstico etiológico foi independentemente correlacionado ao aumento dos níveis de Cit-H3 encontrados antes do TOF. Dentre os diagnósticos etiológicos, os valores de Cit-H3

estavam particularmente elevados nas hepatites fulminantes (média 10,2; DP=14,1), seguido das doenças autoimunes (média 1,4; DP=3,3). Os menores valores de H3 citrulinado foram observados nas doenças virais (média 0,3, DP=0,2) e na cirrose alcoólica (média 0,6, DP=0,6).

Tabela 8. Determinação dos fatores de risco para NETose no pré-operatório de TOF.

Parâmetros basais	Beta (coeficiente de regressão linear)	Intervalo de confiança de 95%	P
Sexo	-0,124	(-3,910 a 1,431)	0,358
Idade	0,027	(-0,089 a 0,108)	0,847
Diagnóstico Etiológico	0,263	(-0,004 a 1,525)	0,051
Score MELD corrigido	-0,073	(-0,313 a 0,166)	0,543
Nódulo ou Tumor Hepático	0,125	(-1,711 a 4,176)	0,407
Hemorragias prévias	-0,197	(-5,966 a 0,558)	0,103
Trombose veia porta	-0,086	(-4,350 a 2,057)	0,478
Hipertensão portal	0,049	(-2,143 a 3,077)	0,722
Cirurgias prévias	0,138	(-1,143 a 3,795)	0,288
Comorbidades	-0,127	(-3,513 a 1,124)	0,308

Fatores de risco para NETose basal - Nesta tabela demonstramos resultados da análise multivariada da associação entre fatores clínicos basais associados e níveis de H3 citrulinado no pré-operatório (momento A).

6.4– Fatores associados a liberação de NETs no intraoperatório

Posteriormente, analisamos se fatores relacionados ao intraoperatório, como tempos de isquemia quente (TIQ), tempo de isquemia fria (TIF), tempo de clampeamento vascular, tempo total de cirurgia, trombectomia ou intercorrências na cirurgia (lesões vasculares, lesões de árvore biliar, intercorrências clínicas, dificuldades anastomóticas) estavam associados à excessiva liberação de NETs no período de pós-reperusão, representados pelos valores de Cit-H3. As análises foram ajustadas para sexo e idade. Intercorrências durante a cirurgia e necessidade de trombectomia foram os fatores de risco independentemente associados à liberação de Cit-H3 durante o intraoperatório de TOF. As intercorrências durante a cirurgia foram associadas ao aumento da liberação de Cit-H3 no intraoperatório enquanto a necessidade de trombectomia foi associada a menor liberação de Cit-H3 no intraoperatório. Esses dados estão demonstrados na tabela 9.

Tabela 9. Fatores associados à liberação de Cit-H3 no intraoperatório

Ocorrências do intraoperatório	Beta (coeficiente de regressão linear)	Intervalo de confiança de 95%	P
Tempo de isquemia quente	-0,009	(-0,108 a 0,090)	0,861
Tempo de isquemia fria	0,000	(-0,007 a 0,008)	0,902
Tempo de clampeamento	0,261	(-3,499 a 4,021)	0,891
Tempo total de cirurgia	0,001	(-0,011 a 0,013)	0,870
Intercorrências na cirurgia	2,469	(0,423 a 4,515)	0,019
Trombectomia no intraoperatório	- 2,991	(-6,089 a 0,107)	0,058

Fatores associados à liberação de NETs no intraoperatório- Essa tabela demonstra os resultados da análise multivariada para a determinação de fatores do intraoperatório associados à excessiva liberação de CitH3 no período de reperusão, sendo que os resultados foram ajustados para idade e sexo.

6.5 – Relação entre a liberação de CitH3 durante o intraoperatório e a necessidade de uso de hemocomponentes, hemoderivados e ácido tranexâmico no TOF

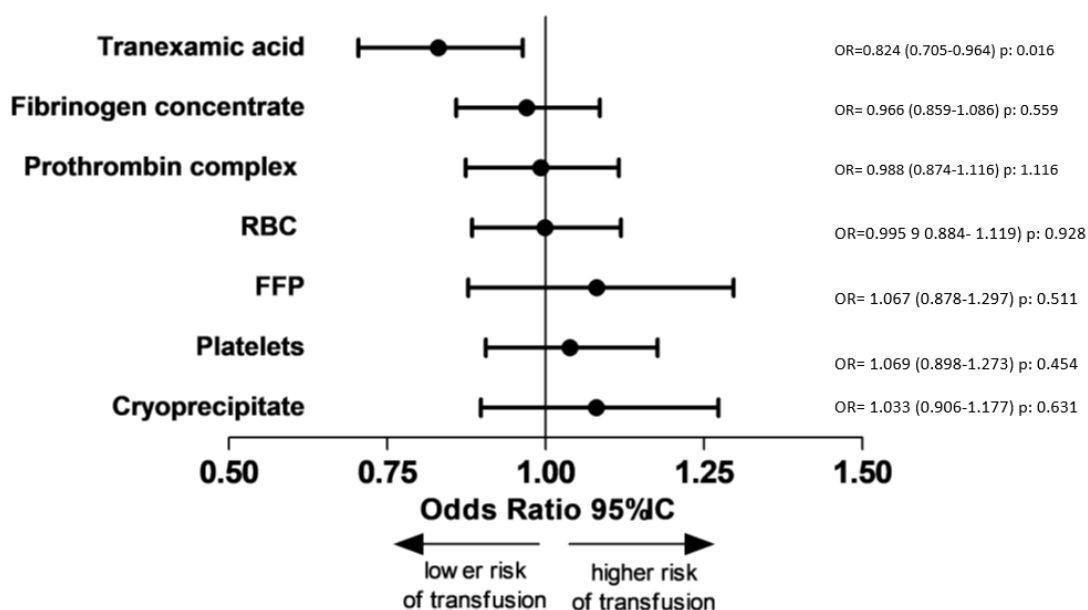
Avaliamos se a ocorrência de NETose do intraoperatório (representada pelos valores de CitH3) teria impacto sobre a necessidade transfusional no TOF. Foram realizadas análises multivariadas, ajustadas para sexo, idade e MELD corrigido, para avaliar a associação entre o incremento de NETs entre os tempos A e B do TOF e o uso de hemocomponentes, hemoderivados ou ácido tranexâmico. Observou-se que o aumento dos níveis de Cit H3 durante o intraoperatório esteve associado a menor uso de ácido tranexâmico. Entretanto, a liberação de NETs não foi associada a nenhum outro desfecho transfusional. Esses dados estão demonstrados na tabela 10 e figura 3.

Tabela 10. Análises de regressão para determinar a associação entre o incremento de CitH3 no intraoperatório (diferença entre os tempos A e B) e a necessidade de transfusão de hemocomponentes, hemoderivados e ácido tranexâmico

Uso de hemoderivados /ácido tranexâmico	Odds Ratio	Intervalo de confiança de 95%	P
Ácido tranexâmico	0,824	(0,705 a 0,964)	0,016
Concentrado de fibrinogênio	0,966	(0,859 a 1,086)	0,559
Complexo protrombínico	0,988	(0,874 a 1,116)	1,116
Unidades de hemocomponentes	Beta (coeficiente de regressão linear)	Intervalo de confiança de 95%	P
Concentrado de hemácias	-0,004	(-0,280 a 0,271)	0,975
Plasma fresco congelado	-0,020	(-0,074 a 0,034)	0,467
Crioprecipitado	0,005	(-0,015 a 0,026)	0,621
Concentrado de fibrinogênio	0,032	(-0,038 a 0,102)	0,366

Associações entre incremento de H3 citrulinado e uso de transfusão, hemoderivados e ácido tranexâmico. As análises foram ajustadas para sexo, idade, MELD corrigido. Quanto maior a liberação de H3 citrulinado após a reperfusão, menores foram as necessidades de ácido tranexâmico. Não houve associação entre H3 citrulinado após a reperfusão e necessidade de transfusão.

Figura 3- Associações entre os níveis de Cit H3 (incrementos do tempo A→B), transfusão de hemocomponentes e ácido tranexâmico.



Associações entre os níveis de Cit H3 (incrementos do tempo A→B), transfusão de hemocomponentes e ácido tranexâmico – Os níveis de H3 citrulinado após a reperfusão estão associados com menor uso de ácido tranexâmico. Não houve associação entre H3 citrulinado após a reperfusão e necessidade de transfusão

6.6- Relação entre a liberação de Cit-H3 e parâmetros tromboelastográficos

Analizamos se a liberação de Cit-H3 teria associações com parâmetros tromboelastográficos do ROTEM coletado ao término do TOF, que refletiria a hemostasia ao final do transplante. Foram feitas correlações de Spearman com parâmetros de coagulabilidade cinética e estrutural do INTEM, EXTEM e FIBTEM e o nível de CitH3 mensurado no pós reperfusão (tempo B) na tabela 11. Observamos uma associação indireta, sugerindo maiores valores de CitH3 e hipocoagulabilidade. Entretanto, ao analisarmos associações entre os parâmetros tromboelastográficos do ROTEM e o incremento de Cit-H3 entre os tempos A e B, essa associação se perdeu (Tabela 12)

Tabela 11- Associações entre parâmetros tromboelastográficos ao término do TOF e Cit H3 pós reperfusão (momento B)

		INTEM						EXTEM						FIBTEM		
		CT	CFT	alfa	A5	A10	MCF	CT ex	CFT	alfa	A5	A10	MCF	FIB a10	FIB A5	A20
R Spearman	P	0,23	,29*	-,42**	-	-,363**	-,307*	0,103	,335**	-,268*	-	-,300*	-,283*	-	-	-
	P	0,092	0,031	0,001	0,005	0,007	0,024	0,388	0,004	0,023	0,001	0,010	0,016	0,083	0,131	0,232
	Número de indivíduos avaliados	54	53	54	54	54	54	72	72	72	72	72	72	71	71	71

Correlações de Spearman entre os níveis de Cit-H3 no pós reperfusão (momento B) e os parâmetros tromboelastográficos ao término do TOF.

Observamos uma associação indireta entre os níveis de Cit-H3 e hipocoagulabilidade. Quanto maiores os valores de Cit-H3, maior a hipocoagulabilidade. Acreditamos ser esta uma concomitância de fenômenos e não uma associação causal. EX= ensaios no EXTEM, FIB= ensaios no FIBTEM, CT= *clotting time*, CFT= *clot formation time*; MCF=*maximum clot firmness*,

Tabela 12- Associações entre parâmetros tromboelastográficos ao término do TOF e incremento de Cit H3 entre os tempos A e B

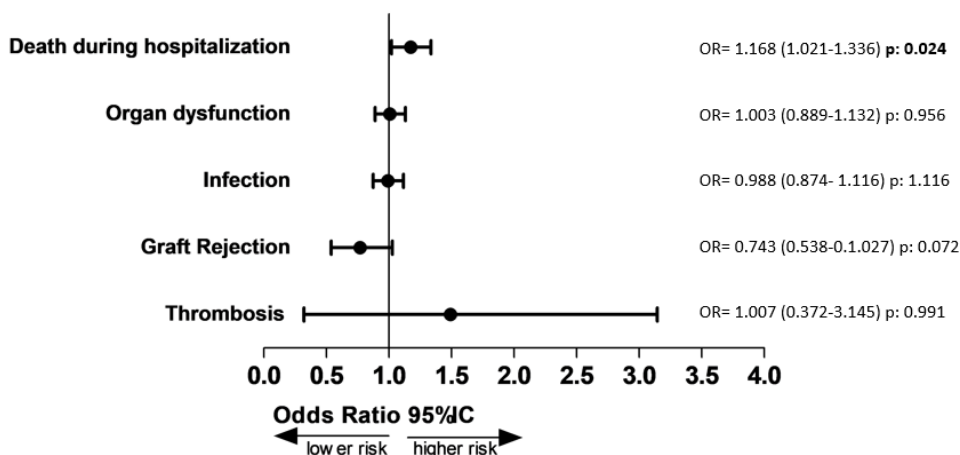
		INTEM						EXTEM						FIBTEM		
		CT in	CFT	alfa	A5	A10	MCF	CT ex	CFT	alfa	A5	A10	MCF	FIB a10	FIB A5	A20
R Spearman	P	0,053	0,164	-	-	-0,136	-0,094	0,114	0,313	-	-	-	-	-	-0,073	-
	P	0,703	0,240	0,184	0,340	0,326	0,497	0,339	0,007	0,096	0,076	0,152	0,289	0,481	0,544	0,704
	número de indivíduos	54	53	54	54	54	54	72	72	72	72	72	72	71	71	71

Correlações de Spearman entre o incremento dos níveis de Cit-H3 de A para B e os parâmetros tromboelastográficos ao término do TOF. Não se observou qualquer associação. Quanto maiores os valores de Cit-H3, maior a hipocoagulabilidade. Acreditamos ser esta uma concomitância de fenômenos e não uma associação causal. EX= ensaios no EXTEM, FIB= ensaios no FIBTEM, CT= *clotting time*, CFT= *clot formation time*; MCF=*maximum clot firmness*,

6.7 – Relação entre a liberação de NETs durante o intraoperatório e a ocorrência de desfechos clínicos negativos

Analizamos se a ocorrência de NETose do intraoperatório teria impacto sobre os seguintes desfechos clínicos negativos do transplante hepático: óbito na internação, disfunção de órgãos, infecção, rejeição e ocorrência de trombose. Foram realizadas análises multivariadas, ajustadas para sexo, idade, MELD corrigido e transfusão de hemácias, para avaliar a associação entre o incremento de NETs entre os tempos A e B do TOF e os desfechos negativos. Observou-se que o aumento dos níveis de Cit-H3 durante o intraoperatório estava independentemente associado ao risco de óbito durante a internação. Não foram observadas quaisquer outras associações entre o aumento dos níveis de Cit-H3 durante o intraoperatório e demais desfechos clínicos negativos. Esses dados estão demonstrados na figura 4 e na tabela 13.

Figura 4 – Associações entre os níveis de Cit-H3 (incrementos do tempo A→B) e desfechos clínicos



Associações entre os níveis de Cit H3 (incrementos do tempo A→B) e desfechos clínicos ajustados para idade, sexo e MELD corrigido. Observamos que os níveis de Cit-H3 estão associados a maior risco de óbitos intra-hospitalar.

Tabela 13. Análises de regressão para determinar a associação entre o incremento de Cit-H3 no intraoperatório (diferença entre os tempos A e B) e os desfechos negativos do TOF

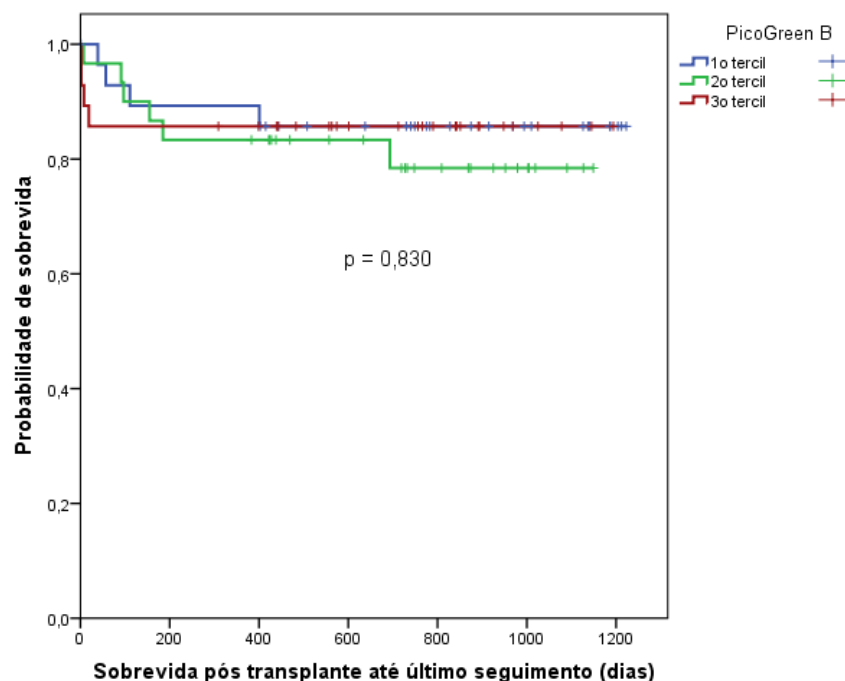
Desfechos negativos	Odds Ratio	Intervalo de confiança de 95%	P
Óbito durante a internação	1,168	(1,021 a 1,336)	0,024
Disfunção orgânica	1,003	(0,889 a 1,132)	0,956
Infecção	0,988	(0,874 a 1,116)	1,116
Rejeição do enxerto	0,743	(0,538 a 1,027)	0,072
Trombose	1,007	(0,322 a 3,145)	0,991

Análises de regressão para determinar a associação entre o incremento de Cit-H3 no intraoperatório (diferença entre os tempos A e B) e os desfechos negativos do TOF. As análises foram ajustadas para sexo, idade, MELD corrigido e transfusão de hemácias. Quanto maior a liberação de CitH3, maior o risco de óbito.

6.8- Relação entre a liberação de NETs durante o intraoperatório e mortalidade a longo prazo.

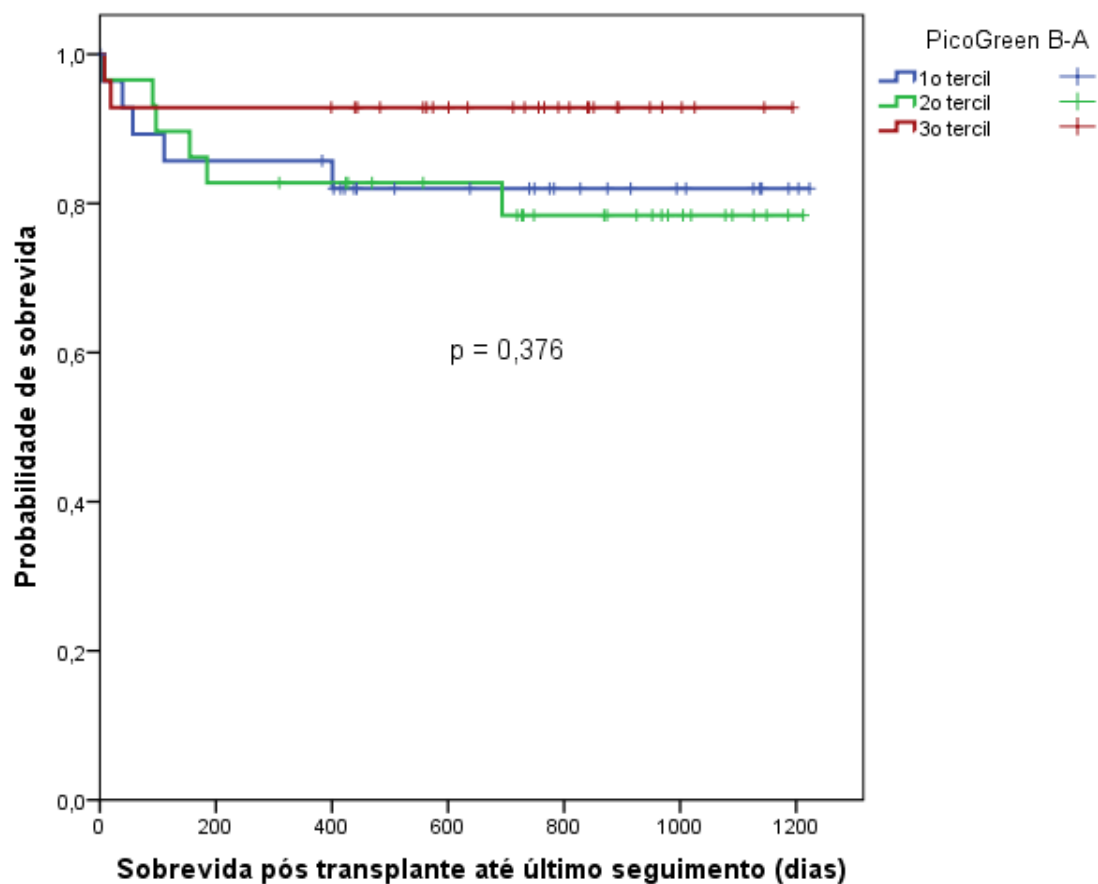
Analizamos se a ocorrência de NETose do intraoperatório teria impacto também sobre a mortalidade a longo prazo. Foram analisadas as sobrevidas dos pacientes no longo prazo, num período mínimo de 1 até o período máximo de 1223 dias após o transplante. Foram feitas curvas de sobrevida correlacionando os valores de DNA livre e Cit-H3 mensurados no momento B, bem como a diferença entre os níveis de DNA livre e Cit-H3 nos pós reperusão e pré-operatório (momento B – A). Esses dados estão demonstrados nas figuras 5 a 8.

Figura 5- Sobrevida após transplante até o último seguimento e associação com DNA livre mensurado no tempo B:



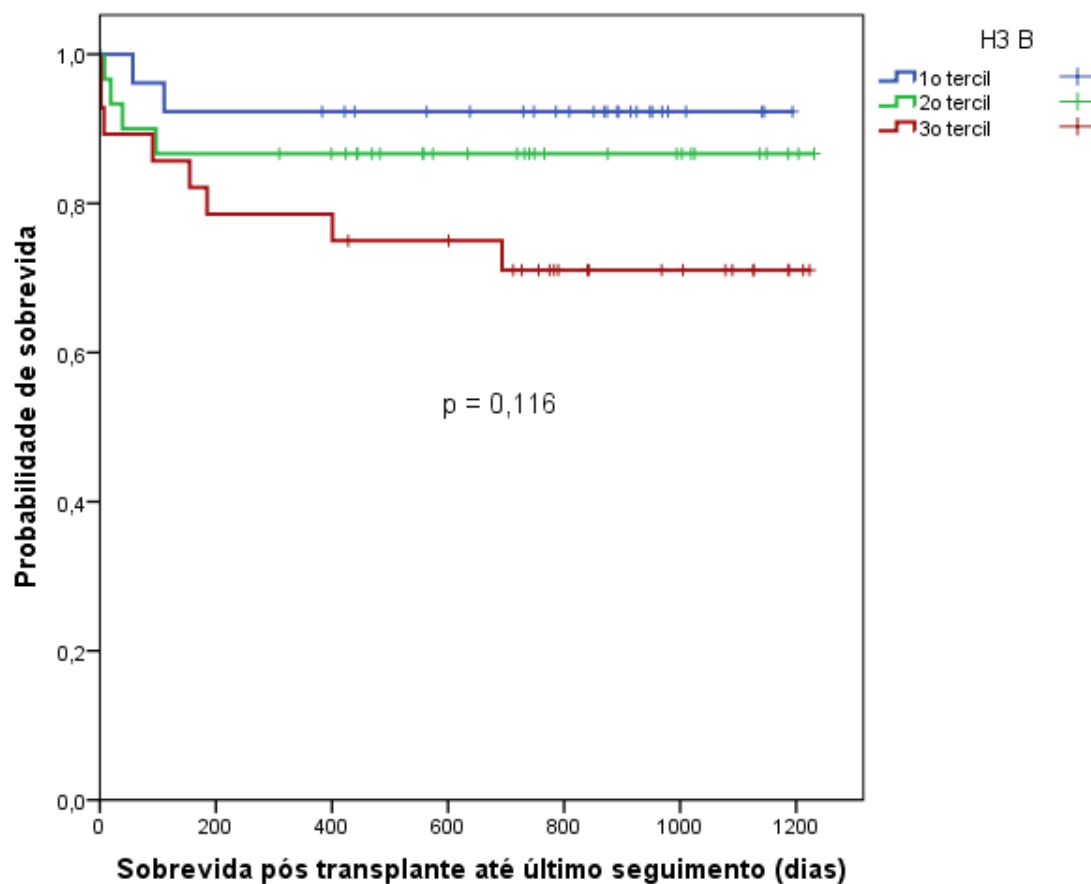
Esta figura avalia a sobrevida em dias no pós transplante, de acordo com os níveis de DNA livre mensurados no tempo B (pós reperfusão). No 1º tercil, estão representados os pacientes com níveis de DNA livre mensurado após a reperfusão entre 0-226,6 ng/ ml; no 2º tercil estão representados os pacientes com DNA livre entre 226,6ng/mL e 1008,1ng/mL no 3º tercil estão representados os pacientes com DNA livre > 1008,1ng/mL. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,830$) entre os níveis de DNA livre mensurados no tempo B e sobrevida no pós transplante.

Figura 6- Sobrevida após transplante até o último seguimento e associação com DNA livre tempo B-A:



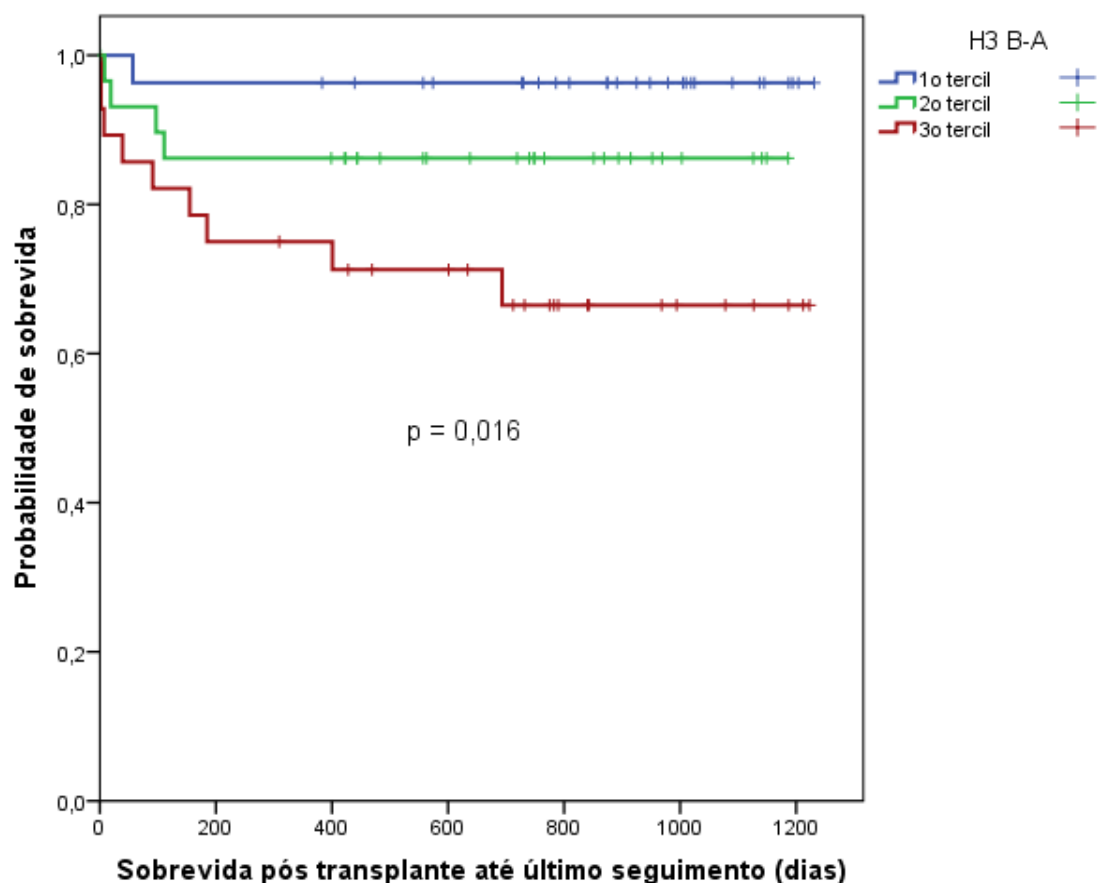
Esta figura avalia a sobrevida em dias no pós transplante, de acordo com o incremento de DNA livre entre os tempos A e B, ou seja, quantidade de DNA livre após a reperusão (tempo B) subtraída do DNA livre basal (tempo A)..No 1º tercil, estão representados os pacientes com incremento de DNA livre entre os tempos A e B entre 0 a 145,8 ng/ ml; no 2º tercil estão representados os pacientes com incremento de DNA livre entre 145,8 ng/mL e 750,1 ng/mL e no 3º tercil estão representados os pacientes com incremento de DNA livre > 750,1 ng/mL. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,376$) entre os níveis de DNA livre mensurados no tempo B e sobrevida no pós transplante.

Figura 7- Sobrevida após transplante até o último seguimento e associação com Cit-H3 tempo B:



Esta figura avalia a sobrevida em dias no pós transplante, de acordo com os níveis de CitH3 mensurados no tempo B (pós reperfusão). No 1º tercil, estão representados os pacientes com níveis de citH3 mensurado após a reperfusão entre 0-0,84 ng/ml; no 2º tercil estão representados os pacientes com citH3 entre 0,84 ng/mL e 2,01/mL e no 3º tercil estão representados os pacientes com citH3 > 2,01 /mL. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,116$) entre os níveis de Cit-H3 mensurados no tempo B e sobrevida no pós transplante.

Figura 8- Sobrevida após transplante até o último seguimento e associação com Cit-H3 no tempo B-A:



Esta figura avalia a sobrevida em dias no pós transplante, de acordo com o incremento de CitH3 entre os tempos A e B, ou seja, quantidade de CitH3 após a reperfusão (tempo B) subtraída do Cit H3 basal (tempo A, ou seja, no pré transplante imediato). No 1º tercil, estão representados os pacientes com incremento de CitH3 entre os tempos A e B entre 0 a 0,18 ng/ ml; no 2º tercil estão representados os pacientes com incremento de Cit H3 entre 0,18 ng/mL e 0,94 ng/mL e no 3º tercil estão representados os pacientes com incremento de CitH3 >0,94 ng/mL. **O incremento dos níveis de CitH3 entre os tempos A e B está associado à sobrevida no pós transplante (p=0,016)**

7. Discussão

7.1 – NETose durante o transplante hepático

Sabe-se que a inflamação é um fenômeno inerente ao TOF. As lesões de hepatócitos provocadas pelo fenômeno de I/R foram previamente demonstradas (25,27), via ativação das vias TLR-4 e TLR-9 (28-30), sendo a NETose protagonista deste cenário pró-inflamatório. Alguns autores correlacionaram esse status de inflamação exacerbada no perioperatório do TOF a transfusão e piores desfechos clínicos do transplante (31-32). NETs também contribuiriam para a morte celular e distúrbios da coagulação. Nossa hipótese é a de que a NETose estaria correlacionada a piores desfechos clínicos, necessidades transfusionais e portando, atuar como biomarcador de inflamação e necessidades transfusionais.

Demonstramos que durante o TOF, há uma elevação nos níveis circulantes de NETs após a reperfusão, seguida de posterior queda observada no momento da alta, conforme demonstrado pelas técnicas de PicoGreen (DNA livre) e ELISA (Cit-H3) no pré transplante, pós reperfusão e pré alta de pacientes submetidos a TOF. De maneira semelhante, von Meijenfeldt (54) demonstrou marcadores de NETose já presentes no pré-operatório de TOF, com picos de DNA livre (cell free DNA-cfDNA) e nucleossomos após a reperfusão e mieloperoxidase durante a fase anepática. Os autores atribuem os níveis elevados de NETs observados no pré-operatório ao contexto de doença hepática crônica de base (20). Além do impacto dos NETs na fisiopatologia da hepatite associada ao álcool e da hipertensão portal previamente citados, sabe-se que os NETs têm papel tumorigênico importante. Vários estudos sugerem o envolvimento dos neutrófilos na disseminação metastática de tumores para o fígado, através de captura de células neoplásicas na rede de neutrófilos e interação com DNA extracelular, promovendo adesão, migração e invasão de células cancerígenas na microcirculação hepática. A formação de NETs no meio intravascular também comprometeria a integridade endotelial, com subsequente extravasamento de células tumorigênicas para a circulação (55). De maneira semelhante, a NETose induzida por infecção ou inflamação promoveria ativação plaquetária, com adesão e invasão de células neoplásicas, em sinergia com os neutrófilos ativados (56). Ainda, demonstrou-se que a inibição genética e farmacológica de NETs reduz de maneira significativa a infiltração macrófagica, além do tamanho e número de HCCs formados em modelos de NASH, sugerindo que a NETose teria papel pró tumorigênico neste cenário (57). Tais achados são coerentes com nossos resultados, que evidenciam já no pré-operatório DNA livre circulante e H3 citrulinado, em decorrência da hepatopatia de base.

Ainda, observamos elevação de cf-DNA e Cit-H3 pós reperfusão, corroborando para a hipótese de que de fato há NETose decorrente da injúria I/R. A isquemia temporária provoca danos às

células endoteliais dos sinusóides, levando à supra regulação de P-selectina e adesão plaquetária, com redução de fluxo sanguíneo na rede sinusoidal e exacerbação da isquemia. Esse fenômeno é seguido de resposta inflamatória profusa acompanhando a reperfusão. Há infiltrado neutrofílico logo após a reperfusão, com a liberação de citocinas e espécies reativas de oxigênio. (58), além da liberação de DAMP's e HMGB-1, induzindo NETose via TLR4 e TLR9 (25). Nossos achados foram consistentes com as evidências citadas, uma vez que também demonstramos elevação de Cit-H3 e cf-DNA na fase de reperfusão.

7.2- NETose e transfusão

A hemostasia do paciente hepatopata terminal é bastante complexa, havendo tanto comprometimento da hemostasia primária quanto secundária. Os hepatopatas apresentam plaquetopenia e disfunção plaquetária, baixos níveis de fatores pro-coagulantes e anticoagulantes, bem como redução de fatores profibrinolíticos e anti-fibrinolíticos (59). No TOF, além das intervenções intrínsecas ao procedimento (hemodiluição, hipotermia, consumo, redução de clearance e síntese de fatores de coagulação na fase anepática), ainda ocorrem as alterações hemostáticas decorrentes da lesão I/R. Curiosamente, esses pacientes apresentam geração de trombina normal. Isto é explicado em parte pela redução concomitante de fatores pró e anticoagulantes e mecanismos compensatórios como aumento de fator de von Willebrand e redução da atividade de ADAMTS13 (35). Porém, durante a fase anepática, os pacientes podem se tornar hiperfibrinolíticos em função do clearance reduzido de tPA (*tissue plasminogen activator*), com posterior liberação de tPA do enxerto após a reperfusão, o que poderia culminar em sangramento. Avaliamos se a NETose seria capaz de prever esse status e correlacionar NETs com consumo de transfusão.

Não observamos nenhuma correlação entre consumo de transfusão e NETose. Estudos recentes correlacionaram cfDNA e geração de trombina de maneira dose- dependente, bem como ativação dos fatores XI e XII da via intrínseca (60-61). Ainda, demonstrou-se que cfDNA diminui a fibrinólise, inibindo a ativação do plasminogênio e a plasmina, corroborando a hipótese de que os NETs têm papel potencialmente trombogênico (62). Curiosamente, nossos resultados mostraram que o aumento de NETs estava associado a menor necessidade de uso de ácido tranexâmico, um agente antifibrinolítico indicado para tratar a hiperfibrinólise decorrente do processo de reperfusão hepática.

O recrutamento e ativação de neutrófilos fazem com que os NETs se transformem em um arcabouço de ancoragem de plaquetas, hemácias, fibrina e fatores de coagulação, promovendo trombose (63). Ainda, os neutrófilos também aumentam a produção de tromboxano A2 e

aumentam a NETose por vias que envolvem as integrinas, espécies reativas de oxigênio e liberação de HMGB-1, bem como ativa o fator XII e mobiliza os corpúsculos de Weibel-Palade (64).

Frente aos estímulos pró-coagulantes dos NETs, uma explicação potencial para a ausência de associação entre NETs e redução de uso de transfusão nesta análise está na possibilidade de termos subestimado os NETs circulantes do momento da reperfusão, uma vez que NETs liberados pelo fígado aderem ao endotélio e ao fator de von Willebrand (65) e poderiam ter seus níveis circulantes subestimados por essa limitação do método.

Observamos ainda uma associação entre valores de Cit-H3 no momento pós reperfusão e maior tendência à hipocoagulabilidade ao ROTEM. Acreditamos ser esta apenas uma concomitância de fenômenos, sem associação causa-efeito, no sentido de que pacientes com mais NETose estariam mais graves e tendendo à maior hipocoagulabilidade.

7.3- NETose e desfechos clínicos do TOF

Frente às evidências de que estados de inflamação exacerbada estariam relacionados a piores desfechos no TOF, avaliamos se os marcadores de NETose teriam associação com óbito, disfunção orgânica, rejeição celular, infecção e trombose. Observamos associação entre maiores valores de Cit-H3 e óbito de maneira estatisticamente significativa. Apesar do pequeno número de eventos ocorrido (nove), foi possível estabelecer esta associação, evidenciando o impacto da NETose e inflamação nos desfechos clínicos negativos do transplante. Ainda, observamos que a liberação de NETs, evidenciada pela mensuração de Cit-H3 no pós reperfusão tem impacto direto na mortalidade também a longo prazo, de maneira estatisticamente significativa. Tal achado não se reproduziu na mensuração de cf-DNA, marcador mais inespecífico, nem nos valores absolutos de Cit-H3 e cf-DNA do momento B (pós reperfusão). Frente a esses achados, temos indícios de que é a NETose do intraoperatório (ou os NETs formados no intraoperatório) que teria maior impacto na sobrevida, independentemente dos NETs de base, presentes no pré transplante (momento A).

NETs já foram associados a complicações clínicas em outros cenários, como no transplante pulmonar, em que se demonstrou a liberação de citocinas por macrófagos alveolares mediada por NETs. Tal resposta inflamatória mediou ativação de TCD4+, com aumento do risco de rejeição do enxerto (66). Na nossa casuística, não observamos outras associações de NETs e desfechos clínicos negativos.

Dada a relevância da associação entre NETose e óbito e o papel central dos NETs na inflamação

do TOF aqui demonstrado, consideramos que terapêuticas focando na inibição de NETose poderiam ser estudadas, a fim de minimizar os efeitos deletérios da inflamação exacerbada inerente ao TOF. Terapias alternativas incluindo inibição de interações neutrófilos-plaquetas ou deoxirribonucleases poderiam ser estudadas a fim de minimizar o status pró inflamatório deste cenário. Mais estudos são necessários a fim de confirmar esta hipótese

7.4- Limitações

Sabe-se que NETs têm associação com potencial pró-hemostático e fenômenos trombóticos, o que em um primeiro momento nos levou ao raciocínio de que a NETose seria protetora para fenômenos hemorrágicos e fator de risco para eventos trombóticos. Não conseguimos observar tal associação. Como potenciais justificativas, citamos algumas limitações dos métodos utilizados. Apesar de o ensaio de Cit-H3 refletir de maneira bastante específica a ocorrência de NETose, sendo um marcador de uma etapa crucial na via de formação de NETs, ele reflete NETs circulantes e não NETs observados diretamente no tecido hepático, o que pode levar a uma subestimativa da real quantidade de NETs. O Pico Green, por sua vez, é um marcador menos específico, uma vez que o cf-DNA quantificado pode ser originário da NETose, mas também de morte celular de hepatócitos lesados na reperusão. Ainda, o desenho original do estudo previa a realização de mais um marcador específico de NETose, a quantificação de mieloperoxidase (MPO). Entretanto, houve dificuldades na validação do método, que inviabilizaram a análise de tal marcador, o que pode ter comprometido em parte os resultados. Também não demonstramos associação entre NETose e trombose, por eventual subestimativa da real quantidade de NETs gerada no TOF ou devido ao pequeno número de eventos de trombose detectados na população de interesse.

Outras limitações estão relacionadas ao desenho do estudo, unicêntrico e observacional. Houve um número reduzido de eventos desfecho (óbito, rejeição, infecção e disfunção de órgãos), o que pode ter dificultado a demonstração das associações. Mesmo assim, foi possível demonstrar a associação entre NETose no intraoperatório e mortalidade intra-hospitalar e a longo prazo. Ainda, os achados podem refletir apenas as características da população estudada e não serem generalizáveis para outros centros. Também citamos o fato de que houve algumas exclusões relacionadas a falhas de coletas de amostras dos tempos A e B. Devido ao desenho do estudo de análise sequencial de NETs durante o TOF, quaisquer falhas de coleta dos tempos A e/ou B resultaria na exclusão do estudo. Esta metodologia nos permitiria avaliar a NETose verdadeiramente induzida pelo TOF, independentemente da presença de NETose basal, que

sofria variações consideráveis a depender da doença de base. Este foi o motivo que nos permitiu incluir pacientes com situações pró-inflamatórias de base (pacientes com doenças autoimunes, trombose pré TOF, presença de lesões carcinomatosas), uma vez que o que foi considerado para as análises foi o delta de NETs (NETs produzidos no momento pós reperfusão subtraídos dos NETs basais). Tal desenho de análise sequencial dos NETs permitiu a avaliação de NETose, considerando variações interpessoais.

8-Conclusão

Neste trabalho, observamos uma associação entre NETs e risco de óbito nos pacientes transplantados, mesmo frente ao pequeno número de eventos observado, reforçando a hipótese de que a NETose representa um impacto significativo nos desfechos do TOF. Não se observou associação entre NETose e transfusão. Ainda, observamos que a liberação de NETs no intraoperatório tem impacto direto com a sobrevida a longo prazo, de maneira estatisticamente significativa.

9- Referências bibliográficas

- 1- Rosales, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front. Physiol.* 2018, 9, 113
- 2- Hidalgo, A.; Chilvers, E.R.; Summers, C.; Koenderman, L. The Neutrophil Life Cycle. *Trends Immunol.* 2019, 40, 584–597.
- 3- Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010, 33, 657–670
- 4- Hager, M.; Cowland, J.B.; Borregaard, N. Neutrophil granules in health and disease. *J. Intern. Med.* 2010, 268, 25–34
- 5- Kolaczowska, E.; Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2013, 13, 159–175.
- 6- Borregaard, N.; Christensen, L.; Bejerrum, O.W.; Birgens, H.S.; Clemmensen, I. Identification of a highly mobilizable subset of human neutrophil intracellular vesicles that contains tetranectin and latent alkaline phosphatase. *J. Clin. Investig.* 1990, 85, 408–416
- 7- Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018 Feb;18(2):134-147.
- 8- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.
- 9- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007 Jan 15;176(2):231-41
- 10- Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, Wahn V, Papayannopoulos V, Zychlinsky A. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 2011 Jan 20;117(3):953-9.
- 11- Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010 Nov 1;191(3):677-91.
- 12- Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 2009 Jan 26;184(2):205-13
- 13- Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* 2012; 198:773–783.
- 14- Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps

- capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* 8, 668–676 (2006).
- 15-Saitoh, T. et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* 12, 109–116 (2012).
- 16- Abi Abdallah DS, Lin C, Ball CJ, King MR, Duhamel GE, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect Immun.* 2012 Feb;80(2):768-77
- 17- Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A. & Papayannopoulos, V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* 8, 883–896 (2014)
- 18- Funchal GA, Jaeger N, Czepielewski RS, Machado MS, Muraro SP, Stein RT, Bonorino CB, Porto BN. Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils. *PLoS One.* 2015 Apr 9;10(4):e0124082
- 19- Zuo Y, Zuo M, Yalavarthi S, Gockman K, Madison JA, Shi H, Woodard W, Lezak SP, Lugogo NL, Knight JS, Kanthi Y. Neutrophil extracellular traps and thrombosis in COVID-19. *J Thromb Thrombolysis.* 2021 Feb;51(2):446-453.
- 20-Hilscher MR, Shah VH. Neutrophil extracellular traps and liver disease. *Semin Liver Dis.* 2020 May; 40(2): 171–179. doi:10.1055/s-0039-3399562
- 21-Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med* 2012;18(09):1407–1412
- 22-Fujii M, Shibazaki Y, Wakamatsu K, et al. A murine model for nonalcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol* 2013;46(03):141–152
- 23-Bukong TN, Cho Y, Iracheta-Vellve A, et al. Abnormal neutrophil traps and impaired efferocytosis contribute to liver injury and sepsis severity after binge alcohol use. *J Hepatol* 2018;69(05): 1145– 1154 [PubMed: 30030149] 60.
- 24-Jin L, Batra S, Jeyaseelan S. Diminished neutrophil extracellular trap (NET) formation is a novel innate immune deficiency induced by acute ethanol exposure in polymicrobial sepsis, which can be rescued by CXCL1. *PLoS Pathog* 2017;13(09): e1006637
- 25-Huang H, Tohme S, Al-Khafaji AB, Tai S, Loughran P, Chen L, Wang S, Kim J, Billiar T, Wang Y, Tsung A. Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. *Hepatology.* 2015 Aug;62(2):600-14.

- 26- Al-Khafaji AB, Tohme S, Yazdani HO, Miller D, Huang H, Tsung A. Superoxide induces Neutrophil Extracellular Trap Formation in a TLR-4 and NOX-dependent mechanism. *Mol Med*. 2016 Oct;22:621-631.
- 27- Kubes P, Mehal WZ. Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology*. 2012; 143:1158–1172.
- 28- Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, Liao X, Billiar T, Xu J, Esmon CT, Tsung A. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):999-1008..
- 29- Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J.Exp.Med*. 2005; 201:1135–1143.
- 30- Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013; 10:79–89
- 31-Hassan L, Bueno P, Ferron-Celma I, Ramia JM, Garrote D, Muffak K, et al. Early postoperative response of cytokines in liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 2006; 38:2488–249
- 32-Miki C, McMaster P, Mayer AD, Iriyama K, Suzuki H, Buckels JA. Factors predicting perioperative cytokine response in patients undergoing liver transplantation. *Critical care medicine*.2000; 28:351–354.
- 33-Friedman BH¹, Wolf JH, Wang L, Putt ME, Shaked A, Christie JD, Hancock WW, Olthoff KM. Serum cytokine profiles associated with early allograft dysfunction in patients undergoing liver transplantation. *Liver Transpl*. 2012 Feb;18(2):166-76
- 34-Clevenger B, Mallet SV. Transfusion and coagulation management in liver transplantation. *World Journal of Gastroenterology* 2014 May 28; 20 (20): 6146-6158
- 35- Tripodi, A, Mannucci P M. The Coagulopathy of Chronic LiverDisease. *New England Journal of Medicine* 2011; 365:147-56
- 36- Agarwal A, Sharma N, Vij V. Point-of-care coagulation monitoring during liver transplantation. *Trends in Anaesth and Crit Care* 2013; 3: 42–48
- 37- Porte RJ, Bontempo FA, Knot EA, Lewis JH, Kang YG, Starzl TE. Systemic effects of tissue plasminogen activator-associated fibrinolysis and its relation to thrombin generation in orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1989; 47: 978-984
- 38- Yokoyama A, P, H, Kutner J, M, Sakashita A et al: Risk Factors for Transfusion after Orthotopic Liver Transplantation. *Transfus Med Hemother* 2019;46:431-439

- 38- Delaney M, Wendel S, Bercovitz RS, Cid J, Cohn C, Dunbar NM, Apolseth TO, Popovsky M, Stanworth SJ, Tinmouth A, Van De Watering L, Waters JH, Yazer M, Ziman A; Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. Transfusion reactions: prevention, diagnosis, and treatment. *Lancet*. 2016 Dec 3;388(10061):2825-2836.
- 39-Rana A, Petrowsky H, Hong JC, Agopian VG, Kaldas FM, Farmer D, Yersiz H, Hiatt JR, Busuttil RW. Blood transfusion requirement during liver transplantation is an important risk factor for mortality. *J Am Coll Surg* 2013; 216: 902-907
- 40- Benson AB, Burton JR, Austin GL, Biggins SW, Zimmerman [SEP] MA, Kam I, Mandell S, Silliman CC, Rosen H, Moss M. Differential effects of plasma and red blood cell transfusions on acute lung injury and infection risk following liver transplantation. *Liver Transpl* 2011; 17: 149-158
- 41- Massicotte L, Denault A Y, Beaulieu D, Thibeault L, Hevesi Z, Nozza A, Lapointe R, Roy A. Transfusion rate for 500 consecutive liver transplantations: experience of one liver transplantation center. *Transplantation* 2012; 93: 1276-1281
- 42 -de Boer MT, Molenaar IQ, Hendriks HG, Slooff MJ, Porte RJ. Minimizing blood loss in liver transplantation: progress through research and evolution of techniques. *Dig Surg* 2005; 22:265-75.
- 43- Carton EG, Rettke SR, Plevak DJ, Geiger HJ, KrannerPW, Coursin DB. Perioperative care of the liver transplant patient: part 1-2. *Anesth Analg* 1994; 78: 120–33
- 44- vanTwuyver E, Mooijaart RJ, ten Berge IJ, et al. Pretransplantation blood transfusion revisited. *N Engl J Med* 1991; 325: 1210–3
- 45- Karam O, Tucci M, Toledano BJ, et al. Length of storage and in vitro immunomodulation induced by prestorage leukoreduced red blood cells. *Transfusion* 2009; 49: 2326–34
- 46- Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 2003; 197: 403–11
- 47- Silliman CC, Clay KL, Thurman GW, Johnson CA, Ambruso DR. Partial characterization of lipids that develop during the routine storage of blood and prime the neutrophil NADPH oxidase. *J Lab Clin Med* 1994; 124: 684–9
- 48- Olofsson KE, Andersson L, Nilsson J, Bjorkbacka H. Nanomolar concentrations of lysophosphatidylcholine recruit monocytes and induce pro-inflammatory cytokine production in macro- phages. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 370: 348–52
- 49- Vlaar AP, Hofstra JJ, Kulik W, et al. Supernatant of stored platelets causes lung inflammation and coagulopathy in a novel invivo transfusion model. *Blood* 2010; 116: 1360–

8^{SEP}47

- 50- Cognasse F, Osselaer JC, Payrat JM, Chavarin P, Corash L, Garraud O. Release of immune modulation factors from platelet concentrates during storage after photochemical pathogen inactivation treatment. *Transfusion* 2008; 48: 809–13
- 51- Kanter J, Khan SY, Kelher M, Gore L, Silliman CC. Oncogenic and angiogenic growth factors accumulate during routine storage of apheresis platelet concentrates. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3942–7
- 52- Schneider SO, Rensing H, Graber S, et al. Impact of platelets and fresh frozen plasma in contrast to red cell concentrate on un- stimulated and stimulated cytokine release in an in vitro model of transfusion. *Scand J Immunol* 2009; 70: 101–5
- 53- von Meijenfeldt FA, Burlage LC, Bos S, Adelmeijer J, Porte RJ, Lisman T. Elevated plasma levels of cell-free DNA during liver transplantation are associated with activation of coagulation. *Liver Transpl* 2018;24(12):1716–1725
- 54- Honda M, Kubes P. Neutrophils and neutrophil extracellular traps in the liver and gastrointestinal system. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15(04):206–221
- 55- Erpenbeck L, Schön MP. Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood* 2010;115(17): 3427–3436
- 56- Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 2012;61(03):416–426
- 57- Dar WA, Sullivan E, Bynon JS, Eltzschig H, Ju C. Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: cellular and molecular mechanisms. *Liver Int* 2019;39(05):788–801
- 58- Lisman T, Leebeek FW, de Groot PG. Haemostatic abnormalities in patients with liver disease. *J Hepatol* 2002; 37:280-287
- 59- Gould TJ, Vu TT, Stafford AR, Dwivedi DJ, Kim PY, FoxRobichaud AE, et al. Cell-free DNA modulates clot structure and impairs fibrinolysis in sepsis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35:2544-2553.
- 60- Vu TT, Leslie BA, Stafford AR, Zhou J, Fredenburgh JC, Weitz JI. Histidine-rich glycoprotein binds DNA and RNA and attenuates their capacity to activate the intrinsic coagulation pathway. *Thromb Haemost* 2016; 115:89-98.
- 61- Borissoff JI, Joosen IA, Versteyle MO, Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33:2032-2040

- 62-Kimball, A.S.; Obi, A.T.; Diaz, J.A.; Henke, P.K. The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Front. Immunol.* 2016, 7, 236
- 63- von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 2012 Apr 9;209(4):819-35.
- 64- McDonald B, Davis RP, Kim SJ, Tse M, Esmon CT, Kolaczkowska E, Jenne CN. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood* 2017; 129:1357-1367.
- 65- Scozzi D, Wang X, Liao F, et al. Neutrophil extracellular trap fragments stimulate innate immune responses that prevent lung transplant tolerance. *Am J Transplant* 2019;19(04):1011–1023

Anexo 1 -Manejo hemostático e transfusão de hemocomponentes- Com relação ao protocolo transfusional, todos os hemocomponentes são leucodepletados pré-estocagem e irradiados na instituição avaliada. As hemácias são obtidas do fracionamento de sangue total ou coletadas por aférese, com conteúdo mínimo de hemoglobina de pelo menos 40g. Cada dose de plaquetas coletada por aférese contém pelo menos 3×10^{11} plaquetas, sendo no caso de pool de plaquetas randômicas, cada unidade randômica contém 5.5×10^{10} , perfazendo volume médio de 240-300 mL por dose. Cada unidade de plasma fresco contém aproximadamente 150 mL. Uma dose de crioprecipitado é preparada a partir de 7-10 unidades de crioprecipitado, com conteúdo mínimo de 150 mg de fibrinogênio em 10 mL. Não há produtos com inativação de patógenos na instituição. A política transfusional é caracterizada pelo uso restritivo, sendo a transfusão de hemocomponentes e o uso de agentes hemostáticos guiados por metas estabelecidas em protocolos. A tromboelastometria rotacional (ROTEM®), o tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, a dosagem de fibrinogênio e hemograma são feitos no pré-operatório na indução anestésica e ao final da cirurgia. Os testes viscoelásticos, dosagem de hemoglobina e contagem de plaquetas são realizados também a cada episódio hemorrágico, após a reperfusão do enxerto e a cada intervenção terapêutica para checagem de efetividade/ necessidade de medidas adicionais. No pós operatório, hemograma, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada são realizados diariamente, ao passo que os testes viscoelásticos, testes convencionais e hemograma são realizados na vigência de sangramento. A transfusão de hemácias ocorre para um alvo de hemoglobina de 7-8,0g/dL. Para diminuir as necessidades transfusionais, a recuperação intraoperatória é realizada em pacientes selecionados, sendo que neoplasia e infecção constituem contra-indicações para este procedimento. A transfusão de outros hemocomponentes, tais como plaquetas, plasma fresco e crioprecipitado são realizados quando há evidência de sangramento ativo e distúrbios hemostáticos detectáveis pela tromboelastometria rotacional e/ou testes convencionais. O ácido

tranexâmico é utilizado quando há evidência de hiperfibrinólise. O concentrado de fibrinogênio e o complexo protrombínico (Beriplex®) também são utilizados; sendo o complexo protrombínico evitado em casos de trombose ativa, trombofilia, malignidade. A transfusão terapêutica de plaquetas está normalmente indicada quando A10 EXTEM está abaixo de 43 mm e A10 FIBTEM está acima de 8 mm.

Adicionalmente, a transfusão de plaquetas está indicada quando há sangramento significativo e evidência de disfunção plaquetária, tal como uso prévio de antiagregantes ou outra trombocitopatia, não detectáveis pela tromboelastometria rotacional. Esta é uma situação comum em pacientes com doença hepática terminal, especialmente após reperfusão. Se há sangramento maciço e os testes viscoelásticos não estão disponíveis, a transfusão é realizada para manter a contagem plaquetária superior a $50 \times 10^9 /L$. Transfusão de crioprecipitado ou uso de concentrado de fibrinogênio são realizados quando A10 EXTEM está abaixo de 43 mm e A10 FIBTEM está abaixo de 8 mm. A transfusão profilática de plaquetas não é realizada no intraoperatório. No pós operatório, a transfusão profilática está indicada para manter a contagem acima de $10 \times 10^9 /L$ e antes de procedimentos invasivos, tais como biópsia hepática, reabordagens (alvo: $> 50 \times 10^9 /L$). Dosagem de cálcio, pH e temperatura são continuamente monitorados e corrigidos se necessário. A profilaxia de tromboembolismo venoso e protocolos de antiagregação plaquetária são reintroduzidos tão logo cessado o risco hemorrágico. Dupla antiagregação plaquetária é utilizada em pacientes de alto risco cardiovascular. Reabordagens no pós operatório são realizadas se sangramento ou eventos trombóticos nas anastomoses são suspeitos.

PROTOCOLO DE PESQUISA

“Papel de NETs e micropartículas como preditores de transfusão e desfechos clínicos em transplante ortotópico de fígado

Versão 4 de 20 de setembro de 2019.

Página 1 de 5

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Pacientes com idade $\geq$ 18 anos

Introdução

O(a) senhor(a) está sendo convidado a participar desse estudo porque tem uma doença crônica do fígado e tem indicação de realizar transplante hepático. Este estudo quer avaliar como ocorre a participação de um componente do sangue chamado neutrófilo na evolução do transplante. Sua participação no estudo contribuirá para o melhor entendimento da sua doença e, conseqüentemente, para a proposta de um tratamento mais eficaz para este tipo de doença no futuro.

Este documento esclarece sobre o estudo que você deseja participar. Se você tiver qualquer pergunta, por favor, sinta-se à vontade para entrar em contato com o médico responsável pela condução do estudo ou com algum profissional que participa do estudo e que possa esclarecer suas dúvidas. A decisão de fazer parte do estudo é **voluntária** e você pode recusar ou retirar-se do estudo a qualquer momento sem nenhum tipo de conseqüência para o seu tratamento.

Procedimentos realizados neste protocolo

Para tanto, coletaremos 20mL de sangue do(a) senhor(a) em três ocasiões, através da punção de veia periférica em três ocasiões: antes da realização do transplante, no pós operatório imediato e antes da alta hospitalar da internação do transplante. As coletas serão feitas em momentos em que o (a) senhor(a) já irá coletar exames de rotina. Não haverá punções adicionais para este estudo.

Riscos e inconveniências

Os riscos a que o(a) senhor(a) estará sujeito ao participar da coleta são: hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá a(o) senhor(a) nenhum outro risco importante e não alterará o seu tratamento.

Benefício do tratamento

Número: _____

Iniciais: ____ ____ ____

Rubrica: 1) Paciente/Representante Legal/Testemunha Imparcial _____ 2) Responsável pelo consentimento _____

PROTOCOLO DE PESQUISA

“Papel de NETs e micropartículas como preditores de transfusão e desfechos clínicos em transplante ortotópico de fígado

Versão 4 de 20 de setembro de 2019.

Página 2 de 5

A participação neste estudo é livre. Você não terá nenhum benefício direto com esse estudo.

Porém, sua participação poderá ajudar os pesquisadores a entender melhor a doença e melhorar o tratamento da doença no futuro.

Alternativa (s) à participação no estudo

Caso o(a) senhor(a) não queira participar deste estudo, não há problema algum. Você seguirá com a conduta clínica sem nenhum prejuízo a você.

Direitos do participante

Sua participação é voluntária e você pode retirar seu consentimento ou ainda descontinuar sua participação em qualquer momento, se o assim o preferir, sem penalização e/ou prejuízo de qualquer natureza. Não haverá nenhum custo a você proveniente deste estudo, assim como não haverá qualquer tipo de remuneração pela sua participação.

Danos à Saúde

Se uma lesão ou qualquer dano à saúde ocorrer como resultado de sua participação nesta pesquisa, assistência integral estará disponível sem que você tenha gastos.

Indenização

Caso você venha a sofrer qualquer tipo de dano, resultante de sua participação na pesquisa, dano este previsto ou não neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você terá direito a indenização.

Armazenamento de amostras

O material sanguíneo colhido neste estudo será utilizado para os objetivos propostos acima descritos. Caso você concorde, o material pode ser armazenado juntamente com outras amostras em um local chamado biorrepositório. O armazenamento das amostras permitirá a utilização em outros estudos que venham a ser desenvolvidos pelas instituições participantes. Caso suas amostras sejam utilizadas em outro estudo, você será convidado a formalizar sua autorização e um novo termo de

Número: _____

Iniciais: ____ ____ ____

Rubrica: 1) Paciente/Representante Legal/Testemunha Imparcial _____ 2) Responsável pelo consentimento _____

PROTOCOLO DE PESQUISA

“Papel de NETs e micropartículas como preditores de transfusão e desfechos clínicos em transplante ortotópico de fígado

Versão 4 de 20 de setembro de 2019.

Página 3 de 5

consentimento será aplicado. Os pesquisadores comprometem-se a manter a confidencialidade dos dados clínicos e a preservação do anonimato dos participantes.

() Concordo em participar deste estudo, mas NÃO autorizo armazenamento de minhas amostras para outros estudos.

() Concordo em participar deste estudo e SIM, autorizo armazenamento de minhas amostras para outros estudos.

Confidencialidade

A equipe do estudo e a equipe assistencial, terão acesso a seus dados, no entanto, seu anonimato é garantido e possíveis publicações científicas resultantes deste estudo não o (a) identificará em nenhuma circunstância como participante. Os dados obtidos serão tratados sob estritas condições de confidencialidade.

Os seus dados também poderão ser compartilhadas com os seguintes grupos / pessoas associadas a este estudo de pesquisa ou envolvidos na revisão de pesquisas: outros funcionários da equipe de pesquisa dos Pesquisador Responsável, equipe do Centro de Pesquisa Clínica, o Comitê de Ética em Pesquisa e o Departamento Jurídico; e também os representantes do governo ou agências federais, quando exigido por lei. Caso surjam novas informações que possam ser importantes à sua decisão de continuar na pesquisa, você ou seu representante legal serão informados assim que os dados estejam disponíveis.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), cuja função é o de aprovar os estudos envolvendo seres humanos.

Para qualquer dúvida geral e/ou relacionada a direitos do participante (direito a informação clara, relacionado a custos, acompanhamento médico e hospitalar em caso de danos decorrentes da participação na pesquisa, confidencialidade de dados, acesso a resultados), entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa no telefone 11 2151 3729/ FAX 11 2151-0273/ e-mail cep@einstein.br , horário de funcionamento: 8 às 17h, de segunda a sexta-feira. e/ou Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal da Saúde – CEP/SMS - Rua General Jardim, 36 – 8º andar - Informações/ dúvidas: Fone: 3397-2464 - E-mail: smscep@gmail.com. Para qualquer

Número: _____

Iniciais: ____ ____ ____

Rubrica: 1) Paciente/Representante Legal/Testemunha Imparcial _____ 2) Responsável pelo consentimento _____

PROTOCOLO DE PESQUISA

“Papel de NETs e micropartículas como preditores de transfusão e desfechos clínicos em transplante ortotópico de fígado

Versão 4 de 20 de setembro de 2019.

Página 4 de 5

dúvida relacionada ao estudo, por favor, sinta-se a vontade para entrar em contato com os médicos responsáveis pela condução do estudo, Dra. Fernanda Loureiro de Andrade Orsi Fone: (19) 3521-8756 ou Dra. Ana Paula Hitomi Yokoyama - Fone: (11) 2151 0444.

Reclamações, elogios e sugestões deverão ser encaminhadas ao Sistema de Atendimento ao Cliente (SAC) por meio do telefone (11) 2151-0222 ou formulário identificado como “fale conosco” disponível na página da pesquisa clínica ou pessoalmente.

Assinaturas de Consentimento

Fui informado de todos os detalhes relacionados ao estudo ao qual serei submetido. Após assinar, receberei uma via assinada e datada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Nome Completo do participante da pesquisa

Assinatura do participante da pesquisa

Data: __/__/__

Nome completo e legível do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador responsável

Data: __/__/__

Nome completo do representante legal

Assinatura do representante legal

Data: __/__/__

Relação do representante legal com o paciente

Número: _____

Iniciais: ____

Rubrica: 1) Paciente/Representante Legal/Testemunha Imparcial _____ 2) Responsável pelo consentimento _____

PROTOCOLO DE PESQUISA

“Papel de NETs e micropartículas como preditores de transfusão e desfechos clínicos em transplante ortotópico de fígado

Versão 4 de 20 de setembro de 2019.

Página 5 de 5

Nome completo da testemunha imparcial

****para casos de voluntários menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.**

Assinatura da testemunha imparcial

Data: ____/____/____

Número: _____

Iniciais: ____ ____ ____

Rubrica: 1) Paciente/Representante Legal/Testemunha Imparcial _____ 2) Responsável pelo consentimento _____



HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Papel de NETs (Neutrophil extracellular traps) e micropartículas como preditor de transfusão e desfechos clínicos em transplante hepático

Pesquisador: ANA PAULA HITOMI YOKOYAMA

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 65116317.7.0000.0071

Instituição Proponente: SOCIEDADE BENEF ISRAELITABRAS HOSPITAL ALBERT EINSTEIN

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa: Relatório final de estudos aprovados- análises encerradas, dados submetidos para

Data do Envio: 09/09/2022

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.701.999

Apresentação da Notificação:

Relatório Final do Estudo “Papel de NETs (Neutrophil extracellular traps) e micropartículas como preditor de transfusão e desfechos clínicos em transplante hepático” conforme documento anexo:

Relatorio_final_de_estudos_aprovados_2022.pdf de 09/09/2022

Objetivo da Notificação:

Submeter Relatório Final ao Sistema CEP/CONEP

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios avaliados na aprovação do Projeto de pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Relatório Final do Estudo conforme documento anexo:

Endereço: Rua Comendador Elias Jafet, 755 - Piso L4, Sala 407-G /407-F

Bairro: Morumbi

CEP: 05.653-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br



HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN-SP



Continuação do Parecer: 5.701.999

Relatorio_final_de_estudos_aprovados_2022.pdf de 09/09/2022

1. Total de participantes recrutados em cada centro e no total:

124 – estudo unicêntrico

2. Total de participantes incluídos no estudo em cada centro e no total:

93

3. Total de participantes selecionados para randomização em cada centro e no total:

Não aplicável -estudo não randomizado

4. Total de participantes excluídos na randomização em cada centro e no total:

Excluídos 31 pacientes

5. Total de participantes efetivamente incluídos no estudo (após a randomização) em cada centro e no total:

93

6. Total de participantes retirados/descontinuados em cada centro e no total:

31

7. Principais razões de retirada/descontinuação:

Falha de coleta de amostra nos tempos A (pré- transplante) e B (intraoperatório), inviabilizando a análise sequencial

8. Total de participantes que concluíram o estudo em cada centro e no total:

93

9. Total de eventos sérios ocorridos em cada um dos centros participantes e no total:

0

10. Condutas adotadas em relação aos eventos dos eventos adversos graves:

0

11. Houve pedido de indenização por danos causados por este estudo em algum dos centros participantes?

Não

- Se sim, em qual (is) centro(s)? Não aplicável
- Qual (is) foi (ram) o (os) dano(s)? Não aplicável
- Qual a conduta tomada? Não aplicável

Endereço: Rua Comendador Elias Jafet, 755 - Piso L4, Sala 407-G /407-F

Bairro: Morumbi

CEP: 05.653-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br



HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN-SP



Continuação do Parecer: 5.701.999

12) Resultados atingidos na pesquisa:

Demonstrou-se liberação de NETs após reperfusão de enxerto, evidenciada pelo aumento dos marcadores de NETose específicos (H3 citrulinado) e inespecíficos (PicoGreen). Ainda, evidenciamos que a NETose intraoperatória parece não estar associada à transfusão de hemocomponentes e hemoderivados. Porém, pacientes com NETose mais exacerbada utilizam menos agentes antifibrinolíticos, corroborando o papel trombogênico dos NETs. Com relação aos desfechos clínicos, demonstramos associação estatisticamente significativa entre NETose intraoperatória e óbito nos pacientes de transplante hepático. Os resultados foram submetidos para publicação recentemente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

vide: Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Recomendações:

vide: Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise, não foram observados óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein, de acordo com a Resolução CNS nº 466 de 2012 e Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da notificação apresentada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	Relatorio_Final_de_Estudos_Aprovados_2022.docx	09/09/2022 10:35:02	ANA PAULA HITOMI YOKOYAMA	Postado
Envio de Relatório Final	Relatorio_final_de_estudos_aprovados_2022.pdf	09/09/2022 10:35:13	ANA PAULA HITOMI YOKOYAMA	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Comendador Elias Jafet, 755 - Piso L4, Sala 407-G /407-F

Bairro: Morumbi

CEP: 05.653-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br



HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP



Continuação do Parecer: 5.701.999

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 14 de Outubro de 2022

Assinado por:

Fabio Pires de Souza Santos
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Comendador Elias Jafet, 755 - Piso L4, Sala 407-G /407-F

Bairro: Morumbi

CEP: 05.653-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br

Risk Factors for Transfusion after Orthotopic Liver Transplantation

Ana Paula Hitomi Yokoyama^a José Mauro Kutner^a Araci Massami Sakashita^a
Cristiane Yoshie Nakazawa^c Tatiana Almeida Omura de Paula^c
Raffael Perreira Cezar Zamper^d Pamella Tung Pedroso^e
Marcio Dias de Almeida^e Sergio Paiva Meira Filho^e Fernanda Andrade Orsi^b

^aHemotherapy and Cell Therapy Department, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil;

^bDepartment of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP),

Campinas, Brazil; ^cHemotherapy Department, Hospital Municipal Vila Santa Catarina, São Paulo, Brazil;

^dAnesthesiology Department, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil; ^eLiver Transplantation Unit, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil

Keywords

Transfusion · Orthotopic liver transplantation · Risk factors · MELD score

Abstract

Background: Transfusion of blood products during orthotopic liver transplantation (OLT) is associated with increased morbidity and mortality. Although risk factors associated with intraoperative transfusion requirements have been widely assessed, published data on the prediction of postoperative transfusion requirements are sparse. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate risk factors for postoperative allogeneic transfusion requirements in OLT. **Methods:** Clinical characteristics and intraoperative parameters of 645 consecutive adult patients undergoing OLT were retrospectively reviewed. Multivariate logistic regression was used to determine the main determinants for postoperative transfusion requirements. **Results:** Determinants of postoperative transfusion requirements of any blood product in the postoperative period were the number of blood products transfused in the intraoperative period (OR 1.17, 95% CI 1.08–1.28), warm ischemia time (OR 1.05, 95% CI 1.02–1.08), MELD score (OR 1.05, 95% CI 1.01–1.08) and hepatocellular carcinoma (OR 0.45, 95% CI 0.28–0.72). A dose-dependent effect between the number of units transfused in the intraopera-

tive period and transfusion requirements in the postoperative period was also observed. The relative risk of postoperative allogeneic transfusion of any blood component was 5.9 (95% CI 3.4–10.4) for patients who received 1–2 units in the intraoperative period, 7.3 (95% CI 3.6–14.7) for those who received 3–5 units in the intraoperative period, and 11.1 (95% CI 4.7–26.4) for those who received 6 or more units, when compared to no intraoperative blood transfusion. **Conclusion:** Our study demonstrated an association between intraoperative transfusion and warm ischemia time with postoperative transfusion requirements. The identification of risk factors for transfusion in the postoperative period may improve management of these patients by increasing awareness to bleeding complications in this high-risk population and by expanding hemostasis monitoring to the postoperative period.

© 2019 S. Karger AG, Basel

Introduction

Transfusion of blood products in orthotopic liver transplantation (OLT) has been related with poorer prognosis [1–3] since cohort studies consistently demonstrated that transfusion of blood products is associated with increased posttransplant morbidity and mortality [1–8].

Intraoperative transfusion of packed red blood cell units have been dose-dependently associated with several posttransplant complications, such as increase in the risk of hepatic artery thrombosis [9], early surgical re-intervention after OLT [10, 11], reoperations for hemorrhage [12], higher rate of graft loss [1, 2], development of postoperative infections [4], prolonged hospital stay [13], and with significant decrease in the 1-year survival rate [14] and in overall survival [3]. Plasma-containing blood components, such as platelets and fresh frozen plasma (FFP), were also associated with increased risk of graft loss [6], reduced posttransplant survival rate [15], transfusion-related acute lung injury (TRALI) [4], and transfusion-associated circulatory overload [16]. Particularly, transfusion of platelets was related to early mortality due to TRALI [2] and this is probably the blood component most associated with increase in morbidity and mortality during OLT [2, 17, 18].

Not only intraoperative transfusion of blood products was associated with adverse outcomes after OLT. Postoperative bleeding is a prominent risk factor for intensive care unit readmission after OLT [19] and postoperative transfusion requirement has been associated with increased length of hospital stay and lower graft and patient survivals [7, 20, 21]. Particularly, the risk for postoperative bleeding may be evaluated by preoperative thromboelastometry results [21].

Although risk factors for transfusion requirements in the intraoperative period have been largely investigated, such as Model for End Stage Liver Disease (MELD) score, age, warm ischemia times, and Child Turcotte Pugh score [13], data on postoperative transfusion requirements are sparse.

The negative impact of blood product transfusion on the posttransplant prognosis underscores the need to recognize risk factors associated with transfusion requirements and to reduce blood product use during OLT [13]. Therefore, to better understand the risk factors associated with postoperative transfusion in OLT, we evaluated whether clinical characteristics before transplantation and factors during transplantation were associated with blood transfusion requirements in the postoperative period.

Materials and Methods

Patient Population

We retrospectively reviewed the liver transplant procedures performed at Hospital Israelita Albert Einstein in São Paulo, Brazil, between January 2011 and December 2015. A total of 672 consecutive OLTs were performed in our center in that period. Patients who underwent combined organ transplantations ($n = 23$) or had relevant missing data ($n = 4$) were excluded. We considered relevant missing data: MELD at the time of transplantation, age, and unclear documentation of warm and cold ischemia times.

Characteristics of the patients and transfusion data were extracted from the medical records and the database of the Hemotherapy and Cell Therapy Department at Hospital Israelita Albert Einstein. Both registries are prospectively maintained. The study was approved by the institutional review board of Hospital Israelita Albert Einstein as secondary analysis of preexisting databases. The analysis was conducted ethically in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki, and under Brazilian legal recommendations.

Hemostasis Management and Blood Transfusion Policy Blood Components

In our institution, we perform universal irradiation and pre-storage leukoreduction, and all components are prepared according to Brazilian National Health Agency regulations. RBC units are prepared from whole blood or apheresis collection, and the hemoglobin content of each unit is above 40 g. One dose of platelet concentrates can either be obtained through apheresis collection (minimum content of platelets is 3×10^{11} per apheresis product) or platelet pooled concentrates (6 units of random donor platelets are pooled into one bag, at least 5.5×10^{10} platelets per unit), with a medium volume of 240–300 mL per dose. FFP units have approximately 150 mL. One dose of cryoprecipitate (CRYO) is prepared by pooling of 7–10 units of CRYO, with a minimum fibrinogen content per unit of 150 mg in 10 mL. No pathogen inactivation method is performed.

The transfusion policy in our hospital is characterized by restrictive use of blood products. Transfusion and hemostatic management were performed according to the institutional goal-directed perioperative protocol for OLT. Rotational thromboelastometry (ROTEM®), prothrombin time (PT), activated thromboplastin time (aPTT), fibrinogen dosage, and total blood count are performed in the preoperative phase, at anesthesia induction, and at the end of surgery. Viscoelastic assays and hemoglobin quantification are repeated at each bleeding episode, post reperfusion of graft, and after each therapeutic approach to check the effectiveness of hemostatic intervention or transfusion performed. In the postoperative period, total blood count, aPTT, and PT are performed daily, while viscoelastic assays, hemoglobin, and conventional tests are collected only when bleeding episodes occur. Transfusion of RBC is performed to a target hemoglobin of 8 g/dL. Additionally, an intraoperative cell salvage device is used in selected patients. Infection and active neoplasia are contraindications for cell salvage. Transfusion of other blood components such as platelets, FFP, and CRYO are performed when severe bleeding occurs coinciding with laboratory evidence of hemostatic derangement by rotational thromboelastometry or by conventional tests (prolonged PT or aPTT). Four-factor prothrombin complex concentrate (PCC) and fibrinogen concentrate are also used. PCC is avoided in cases of active thrombosis, thrombophilia, and malignant neoplasia because of the higher risk of thrombosis associated with those conditions [22, 23]. Therapeutic platelet transfusion is indicated when A10 EXTEM (tissue factor activated ROTEM assay), the amplitude or clot firmness obtained 10 min after coagulation time, is below 35 mm, and A10 FIBTEM (tissue factor activated ROTEM assay with elimination of platelet contribution to clot firmness by cytochalasin D) is above 8 mm. Additionally, platelets are transfused when significant bleeding occurs and there is clinical evidence of platelet dysfunction, such as prior use of antiplatelets or other thrombocytopenia. Although viscoelastic assays are superior in predicting the need for platelet transfusion [24–26], the method is not capable of detecting platelet dysfunction [27], a common situation among patients with end-stage liver disease [28], specifically after reperfusion [29]. Also, when major bleeding occurs

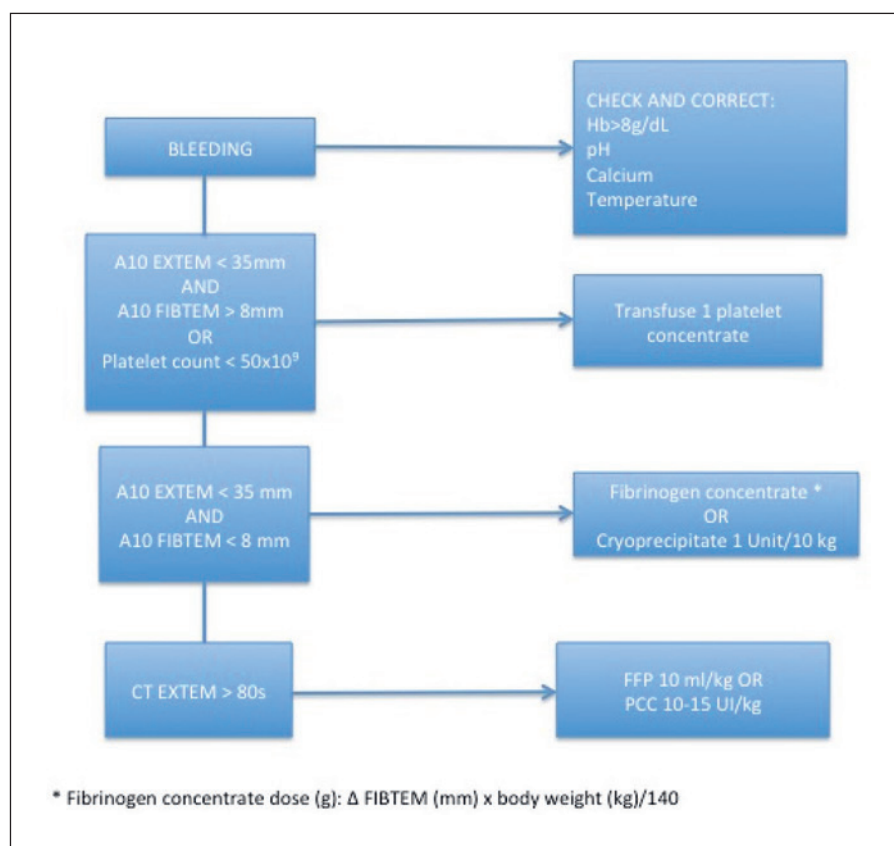


Fig. 1. Criteria for transfusion. Flow chart for transfusion indication according to clinical and laboratory criteria.

with platelet counts under $50 \times 10^9/L$, platelet transfusions are performed if ROTEM assays are not available. CRYO or fibrinogen concentrate are transfused when A10 EXTEM is below 35 mm and A10 FIBTEM is below 8 mm. Prophylactic platelet transfusion is not performed in the intraoperative period. In the postoperative period, prophylactic transfusion is performed for a platelet count of $10 \times 10^9/L$ and before invasive procedures such as insertion of central venous lines, percutaneous liver biopsy, or major surgeries [30, 31].

Calcium, pH, and temperature were monitored and corrected if necessary. Venous thromboembolic (VTE) prophylaxis and antiplatelet therapy protocols are started on cessation of hemorrhagic risk, usually 24 h post-procedure. Enoxaparin is used for VTE prophylaxis, and doses are adjusted if renal impairment is observed. Dual antiplatelet therapy is used in patients with high-risk cardiovascular disease [32]. Reassessments are performed if bleeding or thromboembolic events were suspected. Figure 1 summarizes the criteria for transfusion.

Statistical Analysis

Baseline characteristics are presented as counts and percentages if they are categorical variables or mean $\pm$ standard deviation if they are continuous variables. Median and interquartile range were used to express continuous variables that were not normally distributed.

The association between potential risk factors with postoperative transfusion requirements was assessed by the multivariable logistic regression models. In each logistic regression model, odds ratios (OR) and the 95% confidence interval (CI) were used to estimate the association of the predefined risk factors with postoperative transfusion requirement. We considered as potential determinants (or risk factors) of postoperative blood product use the

following variables: age, gender, body mass index, hepatocellular carcinoma (HCC) diagnosis, MELD score, warm and cold ischemia times, and intraoperative transfusion requirements. The primary outcome was the postoperative transfusion requirements of any allogeneic blood component. Autologous blood recovered from intraoperative cell salvage devices and coagulation factor concentrates were not considered in this analysis. The outcome was grouped into binary categories based on postoperative transfusion need: no transfusion or transfusion of at least one unit of any blood product.

Additionally, subgroup analyses were performed to determine the risk factors associated with the use of RBC, platelets, FFP, and CRYO, separately. We performed multivariable logistic regression analyses to determine the association between the predefined potential risk factors for transfusion (age, gender, body mass index, HCC diagnosis, MELD score, warm and cold ischemia times, intraoperative transfusion requirements, and duration of hospital stay) and transfusion requirements of each blood product. Blood products were grouped into binary categories based on no transfusion or transfusion of at least one unit. The association of potential risk factors with transfusion requirements was expressed as OR and 95% CI.

A dose-dependent relationship between intra- and postoperative blood product use was also assessed by logistic regression analysis. Intraoperative transfusion was grouped into 4 categories (no transfusion, 1–2 units, 3–5 units- or 6 and above 6 units), according to the cut-offs previously defined [4, 5], which were entered into the model as determinants. Postoperative blood transfusion and transfusion of RBC, platelet concentrates, FFP, and CRYO were entered as dependent variables. All analyses were performed with SPSS version 20.0 (IBM, Chicago, USA).

Table 1. Baseline characteristics of patients before OLT

Characteristics	N (%) or median (IQR)
Age	55 (46–61)
Male	452 (71)
Body mass index	26 (23–29)
MELD score	29 (24–31)
Primary diagnosis	
Virus-related liver cirrhosis ¹	236 (36.5)
Cirrhosis due to other causes ²	216 (33.5)
Metabolic diseases ³	32 (5)
Miscellaneous ⁴	32 (5)
Primary nonfunction	18 (2.8)
Autoimmune diseases ⁵	60 (9.3)
Vascular complications ⁶	36 (5.6)
Fulminant hepatitis	16 (2.5)
Hepatocellular carcinoma	195 (30.2)

OLT, orthotopic liver transplantation; IQR, interquartile range; MELD, model for end-stage liver disease. ¹ Virus-related cirrhosis: hepatitis B virus and hepatitis C virus. ² Cirrhosis due to other causes: alcoholic cirrhosis, nonalcoholic steatohepatitis, cryptogenic. ³ Metabolic diseases: hemochromatosis, alpha 1 anti-trypsin deficiency, familial amyloid polyneuropathy, Wilson's disease. ⁴ Miscellaneous: hemangioendothelioma, Caroli's disease, schistosomiasis, polycystic liver disease, adenomatosis, neuroendocrine tumor. ⁵ Autoimmune diseases: biliary atresia, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, ductopenic cholestasis, primary nonfunction. ⁶ Vascular complications: Budd-Chiari syndrome, hepatic artery thrombosis, portal vein thrombosis.

Results

Study Population

Patient baseline characteristics are shown in Table 1. Intraoperative parameters and length of hospitalization are presented in Table 2.

Transfusion of Blood Products

One hundred thirteen patients (17.5%) did not receive any blood product during the entire hospitalization period. Three hundred and twenty-six patients (50.5%) received transfusion in both intraoperative and postoperative period, whereas one hundred and sixty-seven patients (25.8%) received blood transfusions only in the postoperative period. Thirty-nine patients (6.2%) received transfusion only in the preoperative period. The total number of RBC units transfused in the intraoperative period was 1,623 units, less than half of the amount transfused in the postoperative period (3,576 RBC units). Similarly, 480 units of FFP were transfused in the intraoperative period, while almost twice as many units (798 FFP units) were transfused in the postoperative period. Transfusion requirements of all blood components was higher in the postoperative period. Transfusion require-

Table 2. Intraoperative parameters and length of hospitalization

Parameters	N (%) or median (IQR)
Warm ischemia, min	40 (35–45)
Cold ischemia, h	8 (6.8–9.4)
Total transfusion requirements	
0	225 (43)
1–2 units	144 (24)
3–5 units	102 (17)
6 or more	90 (15)
Days in hospital	12 (8–22)
IQR, interquartile range.	

ments in the intraoperative and postoperative period are shown in Table 3. Postoperative transfusion requirements per diagnosis is detailed in Table 4.

Risk Factors for Postoperative Transfusion Requirements

The determinants of blood transfusion requirements are detailed in Table 5.

The main determinants of postoperative transfusion requirements of any blood component were the number of blood units transfused in the intraoperative period (OR 1.21, 95% CI 1.10–1.34), MELD score (OR 1.05, 95% CI 1.01–1.08), and warm ischemia time (OR 1.05, 95% CI 1.02–1.08). HCC was a protective factor for postoperative transfusion (OR 0.45, 95% CI 0.28–0.72). Intraoperative transfusion was a major determinant of postoperative transfusion requirements regardless of the type of blood component used during the surgery. Age, gender, BMI, virus-related cirrhosis, and cold ischemia time were not associated with the risk of postoperative blood transfusion.

As shown in Table 5, determinants of postoperative transfusion of packed RBC were female gender, MELD score, virus-related cirrhosis, number of blood component units used in the intraoperative period, and warm ischemia time. The determinants of postoperative platelet transfusion requirements were MELD score and volume of intraoperative blood transfusion. Transfusion of FFP was related to the number of units of blood components used in the intraoperative period, while CRYO usage was determined by BMI, number of units of blood components used in the intraoperative period, and cold ischemia time. HCC was a protective factor for transfusion of RBC, FFP, and CRYO.

As volume of intraoperative transfusion per unit was a major determinant for transfusion requirements in the postoperative period, we further investigated whether there was a dose-dependent association between the number of units transfused in the intraoperative period and transfusion requirements in the postoperative period

Table 3. Overall transfusion requirements during hospitalization for OLT

Blood components	Intraoperative trans- fusion, median (range)	Total intraoperative transfusions, <i>n</i>	Postoperative, median (range)	Total postoperative transfusions, <i>n</i>
Total blood transfusion, UI	1 (0–35)	1,623	3 (0–56)	3,576
RBC, UI	1 (0–22)	906	2 (0–27)	1,962
FFP, UI	0 (0–18)	480	0 (0–25)	798
Platelets, UI	0 (0–5)	155	1 (0–25)	701
Cryoprecipitate, UI	0 (0–2)	82	0 (0–6)	115

RBC, red blood cell; FFP, fresh frozen plasma.

Table 4. Postoperative transfusion requirements per diagnosis

Diagnosis	Postoperative units of RBC transfusion		Postoperative units of FFP transfusion		Postoperative units of CRYO transfusion		Postoperative units of platelet transfusion	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Etiological diagnosis								
Virus-related liver cirrhosis	3.22	4.34	1.70	3.64	0.24	0.66	1.28	2.20
Cirrhosis due to other causes	3.00	3.79	1.25	2.85	0.15	0.46	1.01	1.50
Metabolic diseases	2.75	4.24	0.44	1.08	0.19	0.47	0.91	1.82
Miscellaneous	5.13	5.07	2.84	5.38	0.34	0.60	1.66	1.93
Primary nonfunction	10.22	6.73	6.56	7.50	0.50	0.86	2.06	2.10
Autoimmune diseases	4.93	4.73	1.92	4.32	0.20	0.82	1.38	2.01
Vascular complications	5.50	4.78	2.58	3.81	0.36	0.72	1.39	2.14
Fulminant hepatitis	4.25	5.05	2.00	2.68	0.13	0.34	2.44	6.14
Hepatocellular carcinoma								
Present	1.67	2.43	0.78	2.45	0.1	0.48	0.71	1.12
Absent	4.70	4.98	2.21	4.15	0.28	0.66	1.51	2.43

SD, standard deviation; RBC, red blood cells; FFP, fresh frozen plasma; CRYO, cryoprecipitate.

Table 5. Risk of postoperative transfusion according to the baseline characteristics and intraoperative parameters

Clinical parameters	Postoperative transfusion of any blood component (compared to no postoperative transfusion)			Postoperative RBC transfusion ≥1 U (compared to no postoperative RBC transfusion)			Postoperative platelet transfusion ≥1 U (compared to no postoperative platelet transfusion)			Postoperative FFP transfusion ≥1 U (compared to no postoperative FFP transfusion)			Postoperative cryoprecipitate transfusion ≥1 U (compared to no postoperative cryoprecipitate transfusion)		
	OR	95% CI	<i>p</i>	OR	95% CI	<i>p</i>	OR	95% CI	<i>p</i>	OR	95% CI	<i>p</i>	OR	95% CI	<i>p</i>
Age	1.00	0.98; 1.02	0.90	1.00	0.99; 1.02	0.62	1.01	0.99; 1.02	0.37	1.00	0.98; 1.01	0.90	1.02	0.99; 1.04	0.10
Gender	1.10	0.66; 1.85	0.70	1.66	1.02; 2.71	0.04	1.02	0.69; 1.52	0.92	1.21	0.81; 1.83	0.35	1.09	0.62; 1.91	0.76
BMI	1.03	0.98; 1.07	0.25	1.01	0.97; 1.05	0.76	1.04	0.99; 1.08	0.10	1.02	0.98; 1.06	0.25	1.03	1.00; 1.05	0.03
MELD score	1.05	1.01; 1.08	0.02	1.07	1.03; 1.10	<0.001	1.02	1.00; 1.04	0.05	1.00	0.98; 1.02	0.73	1.02	0.99; 1.04	0.13
Hepatocellular carcinoma	0.45	0.28; 0.72	<0.001	0.41	0.27; 0.64	<0.001	0.72	0.48; 1.08	0.12	0.39	0.24; 0.64	<0.001	0.29	0.13; 0.64	<0.001
Virus-related cirrhosis	1.72	0.86; 3.40	0.18	2.44	1.24; 4.81	0.01	1.59	0.97; 2.59	0.06	1.44	0.88; 2.38	0.43	1.26	0.69; 2.31	0.45
Volume of intraoperative blood transfusion	1.21	1.10; 1.34	<0.001	1.20	1.10; 1.31	<0.001	1.16	1.10; 1.24	<0.001	1.17	1.11; 1.23	<0.001	1.13	1.08; 1.19	<0.001
Warm ischemia time	1.05	1.02; 1.08	<0.001	1.05	1.03; 1.08	<0.001	1.01	1.00; 1.03	0.14	1.01	0.99; 1.03	0.17	1.01	0.99; 1.03	0.84
Cold ischemia time	1.02	0.97; 1.14	0.71	1.02	0.92; 1.14	0.68	1.08	0.99; 1.19	0.09	1.02	0.91; 1.13	0.77	1.17	1.02; 1.35	0.03

OR, odds ratio; CI, confidence interval; RBC, red blood cells; FFP, fresh frozen plasma.

Table 6. Risk of postoperative transfusion according intraoperative transfusions

Total intra-operative transfusion required	Postoperative transfusion (any transfusion)			Postoperative RBC transfusion			Postoperative platelet transfusion			Postoperative FFP transfusion			Postoperative CRYO transfusion		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
0	reference			reference			reference			reference			reference		
1–2 units	5.9	3.4; 10.4	<0.001	5.4	3.3; 8.9	<0.001	2.7	1.8; 4.1	<0.001	2.5	1.5; 4.2	<0.001	4.4	2.1; 9.4	<0.001
3–5 units	7.3	3.6; 14.7	<0.001	6.1	3.4; 11.1	<0.001	5.4	3.2; 8.8	<0.001	2.6	1.5; 4.6	<0.001	3.8	1.7; 8.7	0.001
6 or more	11.1	4.7; 26.4	<0.001	11.7	5.4; 25.2	<0.001	7.3	4.2; 12.8	<0.001	10.4	5.9; 18.1	<0.001	11.7	5.5; 24.5	<0.001

OR, odds ratio; CI, confidence interval; RBC, red blood cells; FFP, fresh frozen plasma; CRYO, cryoprecipitate.

(Table 6). The OR for postoperative transfusion of any blood component was 5.9 (95% CI 3.4–10.4) for patients who received 1–2 units in the intraoperative period, 7.3 (95% CI 3.6–14.7) for those who received 3–5 units in the intraoperative period, and 11.1 (95% CI 4.7–26.4) for those who received 6 or more units, when compared to no intraoperative blood transfusion. A similar dose-dependent effect was also observed regarding transfusion of platelet concentrates, FFP, and CRYO (Table 6).

Discussion/Conclusion

Several studies have demonstrated the negative impact of blood transfusion in OLT, with increased rates of morbidity and mortality, longer hospital stay, and higher costs [1, 9]. So far, most of the studies have analyzed predictors of blood transfusion only in the intraoperative period [7, 20, 33, 34].

Anemia and hemostatic derangements are also common situations in the postoperative period, contributing to transfusion requirements. Early postoperative bleeding is the most frequent life-threatening complication of OLT [12, 35]. These bleeding episodes demand reoperation in 10–15% of patients and increase costs [36]. Rotational thromboelastometry parameters, such as CFT IN-TEM, A10 FIBTEM, and MCF FIBTEM, were recently identified as predictors of postoperative nonsurgical bleeding in OLT in a retrospective analysis [21]. Standard coagulation test, such as aPTT and PT, may also predict postoperative bleeding, while fibrinogen concentration, platelet count, and other ROTEM variables failed to identify bleeding risk [21]. Although these risk factors associated with transfusion requirements in the postoperative period have been reported by previous studies [21], clinical evidence on this issue remains sparse.

In this study, we aimed to determine predictors of transfusion requirements in the postoperative period. We included a large number of severe acutely ill patients and those with mild abnormalities of liver function, which provided a wide range of transfusion requirements. We observed that the volume of blood components transfused in the postoperative period was higher than that in the intra-

operative period. The number of RBC and FFP units transfused was 2.2 times increased and the number of platelets transfused were 4.5 times increased in the postoperative period when compared with the intraoperative period. This observation suggests that the need for therapeutic transfusions was more pronounced in the postoperative period. Although it is possible to argue that the differences between intra- and postoperative platelet transfusion guidance may have had an impact on transfusion indication [37–39], that would only be true for prophylactic platelet transfusion because both post- and intraoperative therapeutic transfusion were only guided by viscoelastic tests. Furthermore, the same guidance for intra- and postoperative RBC and FFP transfusion was applied.

Posttransplant thrombocytopenia is a common situation that affects the majority (90%) of patients immediately after the procedure [40, 41]. Nadir of thrombocytopenia is expected on days 3–5, when platelet counts may drop as low as 60% of the baseline, followed by full recovery within 14 days [42]. The use of standard laboratory tests to guide prophylactic platelet transfusion in the postoperative period and the occurrence of a transient thrombocytopenia may explain our findings of increased platelet transfusion need in the postoperative period. However, they would not explain the increase in packed RBC and FFP transfusion.

We observed that the main determinants of postoperative blood transfusion requirement were volume of blood transfused in the intraoperative period, warm ischemia time, and MELD score. Besides these determinants, female gender and virus-related cirrhosis were also risk factors for the need of packed RBC transfusion, and cold ischemia time and BMI for CRYO transfusion. HCC was a protective factor for postoperative transfusions for all components, except for platelets.

We observed that the diagnosis of virus-related liver cirrhosis was a risk factor for RBC transfusion requirement in the postoperative period. This result was unexpected because hepatitis C infection is associated with increased platelet activity [43, 44], which suggests that the disease leads to a procoagulant state. Nevertheless, volumes of platelets, CRYO, or FFP transfused were not associated with virus-related cirrhosis.

Intraoperative transfusion was dose-dependently associated with postoperative transfusion requirements when considering all blood products and in subgroup analyses of each product. This observation suggests that the determinants of postoperative transfusion requirements are similar to those of intraoperative transfusion, which are age [20, 33], preoperative hemoglobin and coagulation tests results [7, 20, 33, 34], bilirubin [3, 7], previous surgery [3, 5], and MELD score [20, 34].

Besides sharing the same risk factors, it is also possible that intraoperative transfusion is directly associated with the risk of postoperative transfusion. Severe coagulopathy may occur following hepatic revascularization due to prolonged ischemia times [20], thrombocytopenia, heparin-like effect [45], hyperfibrinolysis, and coagulation factor deficiencies [8, 46]. These disorders may cause intraoperative and postoperative bleeding [11, 12], affecting the risk of both intraoperative and postoperative transfusion requirements. The association between intraoperative transfusion requirement and postoperative bleeding has been determined before [8, 11, 12, 15]. In a retrospective study, intraoperative blood transfusion was dose-dependently associated with the risk of reoperation due to bleeding [12].

In our study, warm ischemia time was also a determinant for blood transfusion requirement in the postoperative period. Warm ischemia has been described as a risk factor for intraoperative transfusion requirements [3, 5]. A previous cohort study showed that prolonged warm ischemia time affects immediate graft function, which leads to reperfusion blood loss and transfusion need [3]. The risk of receiving massive transfusion during the surgery increased by 11% for each additional minute of warm ischemia time [3].

We observed that increase in postoperative transfusions was associated with increased length of hospital stay. It is noteworthy that there is an association between post-OLT complications and longer hospitalization periods. Therefore, length of hospital stay may be regarded as a surrogate marker of post-OLT complications. From that perspective, our study suggests that post-OLT adverse outcomes are associated with the risk of postoperative transfusion.

Our subgroup analyses on the risk factors for the use of packed RBC, FFP, and CRYO in the postoperative period yielded similar results as those on the risk for blood products altogether, except for adjusted MELD, which appeared as risk factor for packed RBC transfusion and platelets, and HCC, which was a protective factor for all blood components, except for platelets.

The role of HCC in OLT prognosis is controversial and may be dependent on the stage of the disease. Although selected patients with stage 1–2 HCC may have long-term survival after OLT [47], it has also been reported that HCC patients may require more blood products than

those suffering from other pathologies [33]. In our center, most of HCC patients are prioritized for transplantation because of additional MELD points gained due to the tumor and, therefore, they spend a shorter period on the waiting list. These recipients had preserved liver function, little or no hemostatic derangements, and almost no coagulopathy. Furthermore, patients with HCC may have a hypercoagulable state due to chronic inflammation and circulating tissue factor-bearing cells [48–53], which may contribute to lower transfusion requirements. Indeed, we had a relatively elevated incidence of patients with HCC (30.2%), with elevated adjusted MELD, but mild disease and minimum impairment on liver function.

The association between MELD score and transfusion requirements is also controversial [54, 55, 47]. In our study, MELD score was only associated with packed RBC and platelet requirements. In previous studies, blood product use and reoperation due to hemorrhage was more frequent in patients with higher MELD scores [10, 12], probably due to a persistent coagulopathy. However, we had a significant proportion of patients with HCC (33%), whose adjusted MELD score were high because of the tumor and not because of a more compromised liver function. A previous study that included a high proportion of patients with HCC (16%) also reported no association between adjusted MELD score and transfusion requirements [54]. Likewise, no significant correlation between MELD score and coagulopathy measured by thromboelastometric parameters was established [56], suggesting a rebalanced hemostasis in such patients, irrespective of the extent of liver failure [56].

Our study has several limitations, which are addressed in the following paragraph. First, this is a retrospective study and some information on baseline characteristics are missing, such as blood tests before the OLT. However, we were still able to accurately evaluate the clinical conditions of the patients because this information was summarized in the adjusted MELD score. Second, as we aimed to evaluate determinants of allogeneic transfusion, we did not evaluate the use of cell salvage and the use of blood products such as PCC and fibrinogen concentrates. It is possible, however, that these therapies have an effect on transfusion requirements in the postoperative period. Third, this is a single-center study where OLT has been performed by the same team of surgeons and anesthesiologists for the last 5 years. Although single-center studies provide limited variability of practices and standardized procedures, it may also comprise the generalizability of the results. Finally, our findings suggest that blood product use in the intraoperative period increases postoperative transfusion requirements. Since blood transfusion is associated with increased short- [2, 4, 11] and long-term [5, 13, 14] morbidity and mortality, restrictive transfusion strategies and methods to decrease blood loss

[57] may potentially benefit the patients. However, these strategies have to be evaluated in further studies.

In conclusion, our study demonstrated that there is an association of intraoperative transfusion, warm ischemia time, and length of hospitalization with postoperative transfusion requirements. The identification of risk factors for transfusion in the postoperative period may improve management of these patients by increasing the awareness to bleeding complications in this high-risk population and by expanding hemostasis monitoring to the postoperative period. This may result in improved outcomes and reduced morbidity and costs.

Acknowledgement

The authors thank J.M. Lanzoni, F.F.M. Dias, and S.S. de Almeida from Hospital Municipal Vila Santa Catarina Dr. Gilson de Cássia Marques de Carvalho, who contributed with data acquisition.

References

- de Boer MT, Christensen MC, Asmussen M, van der Hilst CS, Hendriks HG, Slooff MJ, et al. The impact of intraoperative transfusion of platelets and red blood cells on survival after liver transplantation [table of contents]. *Anesth Analg*. 2008 Jan;106(1):32–44.
- Pereboom IT, de Boer MT, Haagsma EB, Hendriks HG, Lisman T, Porte RJ. Platelet transfusion during liver transplantation is associated with increased postoperative mortality due to acute lung injury. *Anesth Analg*. 2009 Apr;108(4):1083–91.
- Rana A, Petrowsky H, Hong JC, Agopian VG, Kaldas FM, Farmer D, et al. Blood transfusion requirement during liver transplantation is an important risk factor for mortality. *J Am Coll Surg*. 2013 May;216(5):902–7.
- Benson AB, Burton JR Jr, Austin GL, Biggins SW, Zimmermann MA, Kam I, et al. Differential effects of plasma and red blood cell transfusions on acute lung injury and infection risk following liver transplantation. *Liver Transpl*. 2011 Feb;17(2):149–58.
- Boin IF, Leonardi MI, Luzo AC, Cardoso AR, Caruy CA, Leonardi LS. Intraoperative massive transfusion decreases survival after liver transplantation. *Transplant Proc*. 2008 Apr;40(3):789–91.
- Cacciarelli TV, Keeffe EB, Moore DH, Burns W, Busque S, Concepcion W, et al. Effect of intraoperative blood transfusion on patient outcome in hepatic transplantation. *Arch Surg*. 1999 Jan;134(1):25–9.
- Cywinski JB, Alster JM, Miller C, Vogt DP, Parker BM. Prediction of intraoperative transfusion requirements during orthotopic liver transplantation and the influence on postoperative patient survival. *Anesth Analg*. 2014 Feb;118(2):428–37.
- Koffron A, Stein JA. Liver transplantation: indications, pretransplant evaluation, surgery, and posttransplant complications [ix.]. *Med Clin North Am*. 2008 Jul;92(4):861–88.
- Stine JG, Argo CK, Pelletier SJ, Maluf DG, Northup PG. Liver transplant recipients with portal vein thrombosis receiving an organ from a high-risk donor are at an increased risk for graft loss due to hepatic artery thrombosis. *Transpl Int*. 2016 Dec;29(12):1286–95.
- Thompson MA, Redden DT, Glueckert L, Smith AB, Crawford JH, Jones KA, et al. Risk Factors Associated with Reoperation for Bleeding following Liver Transplantation. *HPB Surg*. 2014;2014:816246.
- Hendriks HG, van der Meer J, de Wolf JT, Peeters PM, Porte RJ, de Jong K, et al. Intraoperative blood transfusion requirement is the main determinant of early surgical re-intervention after orthotopic liver transplantation. *Transpl Int*. 2005 Jan;17(11):673–9.
- Park C, Huh M, Steadman RH, Cheng R, Hu KQ, Farmer DG, et al. Extended criteria donor and severe intraoperative glucose variability: association with reoperation for hemorrhage in liver transplantation. *Transplant Proc*. 2010 Jun;42(5):1738–43.
- Ramos E, Dalmau A, Sabate A, Lama C, Llado L, Figueras J, et al. Intraoperative red blood cell transfusion in liver transplantation: influence on patient outcome, prediction of requirements, and measures to reduce them. *Liver Transpl*. 2003 Dec;9(12):1320–7.
- Massicotte L, Sassine MP, Lenis S, Seal RF, Roy A. Survival rate changes with transfusion of blood products during liver transplantation. *Can J Anaesth*. 2005 Feb;52(2):148–55.
- Kappa SF, Gorden DL, Davidson MA, Wright JK, Guillaumondegui OD. Intraoperative blood loss predicts hemorrhage-related reoperation after orthotopic liver transplantation. *Am Surg*. 2010 Sep;76(9):969–73.
- Smith NK, Kim S, Hill B, Goldberg A, De-Maria S, Zerillo J. Transfusion-Related Acute Lung Injury (TRALI) and Transfusion-Associated Circulatory Overload (TACO) in Liver Transplantation: A Case Report and Focused Review. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2018 Jun;22(2):180–90.
- Chin JL, Hisamuddin SH, O'Sullivan A, Chan G, McCormick PA. Thrombocytopenia, Platelet Transfusion, and Outcome Following Liver Transplantation. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2016 May;22(4):351–60.
- Zheng W, Zhao KM, Luo LH, Yu Y, Zhu SM. Perioperative Single-Donor Platelet Apheresis and Red Blood Cell Transfusion Impact on 90-Day and Overall Survival in Living Donor Liver Transplantation. *Chin Med J (Engl)*. 2018 Feb;131(4):426–34.
- Son YG, Lee H, Oh SY, Jung CW, Ryu HG. Risk Factors for Intensive Care Unit Readmission After Liver Transplantation: A Retrospective Cohort Study. *Ann Transplant*. 2018 Nov;23:767–74.
- Mangus RS, Kinsella SB, Nobari MM, Fridell JA, Vianna RM, Ward ES, et al. Predictors of blood product use in orthotopic liver transplantation using the piggyback hepatectomy technique. *Transplant Proc*. 2007 Dec;39(10):3207–13.
- Dötsch TM, Dirkmann D, Bezinover D, Hartmann M, Treckmann JW, Paul A, et al. Assessment of standard laboratory tests and rotational thromboelastometry for the prediction of postoperative bleeding in liver transplantation. *Br J Anaesth*. 2017 Sep;119(3):402–10.
- Timp JF, Braekkan SK, Versteeg HH, Cannegieter SC. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis [PubMed: 23908465]. *Blood*. 2013 Sep;122(10):1712–23.

Statement of Ethics

The study protocol has been approved by Hospital Israelita Albert Einstein committee on human research. The authors have no ethical conflicts to disclose.

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Author Contributions

A.P.H. Yokoyama designed the study, collected the information of patients, and drafted the manuscript. J.M. Kutner contributed to analyzing data and revised the manuscript. A.M. Sakashita, C.Y. Nakazawa, T.A.O. de Paula, R.P.C. Zamper, P.T. Pedrosa, S.P. Meira Filho, and M.D. de Almeida revised the manuscript. F.A. Orsi designed the study, designed and performed the statistical analysis, and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

- 23 Horsted F, West J, Grainge MJ. Risk of venous thromboembolism in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2012;9(7):e1001275.
- 24 Fayed NA, Abdallah AR, Khalil MK, Marwan IK. Therapeutic rather than prophylactic platelet transfusion policy for severe thrombocytopenia during liver transplantation. *Platelets.* 2014;25(8):576–86.
- 25 Debernardi Venon W, Ponzo P, Sacco M, Mengozzi G, Raso S, Valpreda A, et al. Usefulness of thromboelastometry in predicting the risk of bleeding in cirrhotics who undergo invasive procedures. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2015 Nov;27(11):1313–9.
- 26 Greene LA, Chen S, Seery C, Imahiyerobo AM, Bussell JB. Beyond the platelet count: immature platelet fraction and thromboelastometry correlate with bleeding in patients with immune thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2014 Aug;166(4):592–600.
- 27 Lang T, von Depka M. [Possibilities and limitations of thrombelastometry/-graphy]. *Hamostaseologie.* 2006 Aug;26(3 Suppl 1):S20–9.
- 28 Lisman T, Leebeek FW, de Groot PG. Haemostatic abnormalities in patients with liver disease [PMID: 12127437]. *J Hepatol.* 2002 Aug;37(2):280–7.
- 29 Himmelreich G, Hundt K, Neuhaus P, Roissant R, Riess H. Decreased platelet aggregation after reperfusion in orthotopic liver transplantation [PMID: 1549850]. *Transplantation.* 1992 Mar;53(3):582–6.
- 30 Estcourt LJ, Birchall J, Allard S, Bassey SJ, Hersey P, Kerr JP, et al.; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the use of platelet transfusions. *Br J Haematol.* 2017 Feb;176(3):365–94.
- 31 Kaufman RM, Djulbegovic B, Gernsheimer T, Kleinman S, Tinmouth AT, Capocelli KE, et al.; AABB. Platelet transfusion: a clinical practice guideline from the AABB. *Ann Intern Med.* 2015 Feb;162(3):205–13.
- 32 Capodanno D, Alfonso F, Levine GN, Valgimigli M, Angiolillo DJ. ACC/AHA Versus ESC Guidelines on Dual Antiplatelet Therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2018 Dec 11;72(23 Pt A):2915–31.
- 33 Araújo T, Cordeiro A, Proença P, Perdigoto R, Martins A, Barroso E. Predictive variables affecting transfusion requirements in orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc.* 2010 Jun;42(5):1758–9.
- 34 Sobreira Fernandes D, Pereira Real CC, Sá Couto Romão PA, Marcos Correia De Barros FB, Marques Aragão IM, Guimarães Fonseca LF, et al. Pre-operative predictors of red blood cell transfusion in liver transplantation. *Blood Transfus.* 2017 Jan;15(1):53–6.
- 35 Moreno R, Berenguer M; R.Moreno and M. Post-liver transplantation medical complications. *Ann Hepatol.* 2006 Apr-Jun;5(2):77–85.
- 36 Brown RS Jr, Ascher NL, Lake JR, Emond JC, Bacchetti P, Randall HB, et al. The impact of surgical complications after liver transplantation on resource utilization. *Arch Surg.* 1997 Oct;132(10):1098–103.
- 37 Fayed NA, Abdallah AR, Khalil MK, Marwan IK. Therapeutic rather than prophylactic platelet transfusion policy for severe thrombocytopenia during liver transplantation. *Platelets.* 2014;25(8):576–86.
- 38 Debernardi Venon W, Ponzo P, Sacco M, Mengozzi G, Raso S, Valpreda A, et al. Usefulness of thromboelastometry in predicting the risk of bleeding in cirrhotics who undergo invasive procedures. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2015 Nov;27(11):1313–9.
- 39 Greene LA, Chen S, Seery C, Imahiyerobo AM, Bussell JB. Beyond the platelet count: immature platelet fraction and thromboelastometry correlate with bleeding in patients with immune thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2014 Aug;166(4):592–600.
- 40 Munoz SJ, Carabasi AR, Moritz MJ, Jarrell BE, Maddrey WC. Postoperative thrombocytopenia in liver transplant recipients: prognostic implications and treatment with high dose of gamma-globulin [PMID: 2662521]. *Transplant Proc.* 1989 Jun;21(3):3545–6.
- 41 Plevak DJ, Halma GA, Forstrom LA, Dewanjee MK, O'Connor MK, Moore SB, et al. Thrombocytopenia after liver transplantation [PMID: 3279654]. *Transplant Proc.* 1988 Feb;20(1 Suppl 1):630–3.
- 42 McCaughan GW, Herkes R, Powers B, Rickard K, Gallagher ND, Thompson JF, Sheil AG. Thrombocytopenia post liver transplantation. Correlations with pre-operative platelet count, blood transfusion requirements, allograft function and outcome. *J Hepatol.* 1992 Sep;16(1-2):16–22.
- 43 Panasiuk A, Prokopowicz D, Zak J, Matowicka-Karna J, Osada J, Wysocka J. Activation of blood platelets in chronic hepatitis and liver cirrhosis P-selectin expression on blood platelets and secretory activity of beta-thromboglobulin and platelet factor-4 [PMID: 11462931]. *Hepatogastroenterology.* 2001 May-Jun;48(39):818–22.
- 44 Samonakis DN, Koutroubakis IE, Sfridaki A, Malliaraki N, Antoniou P, Romanos J, et al. Hypercoagulable states in patients with hepatocellular carcinoma [PMID: 15259509]. *Dig Dis Sci.* 2004 May;49(5):854–8.
- 45 Agarwal S, Senzolo M, Melikian C, Burroughs A, Mallett SV. The prevalence of a heparin-like effect shown on the thromboelastograph in patients undergoing liver transplantation. *Liver Transpl.* 2008 Jun;14(6):855–60.
- 46 Tripodi A, Mannucci PM. The coagulopathy of chronic liver disease. *N Engl J Med.* 2011 Jul;365(2):147–56.
- 47 Wiesner RH, Freeman RB, Mulligan DC. Liver transplantation for hepatocellular cancer: the impact of the MELD allocation policy. *Gastroenterology.* 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S261–7.
- 48 Zanetto A, Senzolo M, Vitale A, Cillo U, Radu C, Sartorello F, et al. Thromboelastometry hypercoagulable profiles and portal vein thrombosis in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis.* 2017 Apr;49(4):440–5.
- 49 Blasi A, Molina V, Sanchez-Cabús S, Balust J, Garcia-Valdecasas JC, Taura P. Prediction of thromboembolic complications after liver resection for cholangiocarcinoma: is there a place for thromboelastometry? *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2018 Jan;29(1):61–6.
- 50 Kamel Y, Hassanin A, Ahmed AR, Gad E, Afifi M, Khalil M, et al. Perioperative Thromboelastometry for Adult Living Donor Liver Transplant Recipients with a Tendency to Hypercoagulability: A Prospective Observational Cohort Study. *Transfus Med Hemother.* 2018 Nov;45(6):404–12.
- 51 Van Haren RM, Valle EJ, Thorson CM, Guarch GA, Jouria JM, Andrews DM, et al. Long-term coagulation changes after resection of thoracoabdominal malignancies. *J Am Coll Surg.* 2014 Apr;218(4):846–54.
- 52 Thorson CM, Van Haren RM, Ryan ML, Curia E, Sleeman D, Levi JU, et al. Pre-existing hypercoagulability in patients undergoing potentially curative cancer resection. *Surgery.* 2014 Jan;155(1):134–44.
- 53 Thorson CM, Van Haren RM, Ryan ML, Curia E, Sleeman D, Levi JU, et al. Persistence of hypercoagulable state after resection of intra-abdominal malignancies. *J Am Coll Surg.* 2013 Apr;216(4):580–9.
- 54 Massicotte L, Beaulieu D, Roy JD, Marleau D, Vandenbroucke F, Dagenais M, et al. MELD score and blood product requirements during liver transplantation: no link. *Transplantation.* 2009 Jun;87(11):1689–94.
- 55 Alonso IJ, Maestro OC, Gómez NF, Mateos RS, Quinto AM, Molero FC, et al. Mind the model for end-stage liver disease: model for end-stage liver disease score as an indicator of hemoderivate transfusion and survival in liver transplantation. *Transplant Proc.* 2015 Jan-Feb;47(1):97–9.
- 56 Dumitrescu G, Januszkiewicz A, Ågren A, Magnusson M, Wahlin S, Wernerman J. Thromboelastometry: relation to the severity of liver cirrhosis in patients considered for liver transplantation. *Medicine (Baltimore).* 2017 Jun;96(23):e7101.
- 57 Gurusamy KS, Pissanou T, Pikhart H, Vaughan J, Burroughs AK, Davidson BR. Methods to decrease blood loss and transfusion requirements for liver transplantation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011 Dec;(12):CD009052.

Journal of Thrombosis and Thrombolysis

NETs (neutrophil extracellular traps), transfusion requirements and clinical outcomes in orthotopic liver transplantation

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	NETs (neutrophil extracellular traps), transfusion requirements and clinical outcomes in orthotopic liver transplantation
Article Type:	Original Article/Investigation
Keywords:	Keywords: neutrophil extracellular traps, blood transfusion, NETosis, liver transplantation
Corresponding Author:	Ana Paula Hitomi Yokoyama, M.D. Hospital Israelita Albert Einstein, Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular, SAO PAULO, SP BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Hospital Israelita Albert Einstein, Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular,
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Ana Paula Hitomi Yokoyama, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Ana Paula Hitomi Yokoyama, M.D.
	Jose Mauro Kutner, PhD
	Bruna Moraes Mazetto Fonseca, PhD
	Gabriela Lisiane Mesquita
	Araci Massami Sakashita, PhD
	Ana Paula Rosa
	Cristiane Yoshie Nakazawa
	Marcio D Almeida
	Fernanda Loureiro Andrade Orsi, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Background: Inflammatory phenomena have a direct impact on the prognosis of orthotopic liver transplantation (OLT). Neutrophil extracellular traps (NETs) contribute to OLT inflammation and hemostasis imbalance in OLT. The association between NETosis , clinical outcomes and transfusion requirements is not determined. Objectives: To evaluate NETs release during OLT and the effect of NETosis ontransfusion requirements and adverse outcomes in a prospective cohort of patients submitted to OLT. Methods: We quantified citrullinated histones(cit-H3) and circulating-free- DNA (cf-DNA) in ninety-three patients submitted to OLT in three periods: pre-transplant, after graft reperfusion and before discharge. NETs markers were compared between these periods using ANOVA test. The association of NETosis and adverse outcomes was evaluated using regression models adjusted for age, sex and corrected MELD. Results: We observed a peak of circulating NETs following reperfusion, evidenced by a 6-fold increase in cf-DNA (mean levels of cf-DNA pre-transplant:158.36 ng/mL, post reperfusion:907.27 ng/mL, pre-discharge: 195.57ng/mL, p<0.001) and a 2-fold increase in cit-H3 levels in the post-graft reperfusion period (mean levels of cit-H3 pre transplant: 1.66ng/mL, after reperfusion:3.022ng/mL and at discharge 0.87ng/mL,

p<0.0001). We observed an association between increased levels of cit-H3 and in hospital death (OR=1.168, 95%CI 1.021-1.336, p= 0.024). No association was found between NETs markers and transfusion requirements.

Conclusions: There is a prompt release of NETs after reperfusion that is associated with poorer outcomes and death. Intraoperative NETs release seems to be independent of transfusion requirements. These findings highlight the relevance of inflammation promoted by NETS and its impact on OLT adverse clinical outcomes.

Title: NETs (neutrophil extracellular traps), transfusion requirements and clinical outcomes in orthotopic liver transplantation

Authors: Ana Paula Hitomi Yokoyama^{1,2}, Jose Mauro Kutner¹, Bruna de Moraes Mazetto³, Gabriela Lisiane Vecchiatto Tripichia Mesquita², Araci Massami Sakashita¹, Ana Paula Rosa², Cristiane Yoshie Nakazawa⁵, Marcio D Almeida⁵, Fernanda Andrade Orsi⁴

Affiliations:

¹Hemotherapy and Cell Therapy Department, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil

²Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

³Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, Brazil

⁴Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

⁵Hospital Municipal Dr Gilson de Cássia Marques de Carvalho, São Paulo, Brazil

Corresponding author:

Ana Paula Hitomi Yokoyama ana.yokoyama@einstein.br

Hemotherapy and Cell Therapy Department

Av Albert Einstein, 627 – 3o andar

CEP: 05652-000 São Paulo – SP Brazil

Running title: Neutrophil extracellular traps, NETosis, transfusion, liver transplantation

Essentials

- Inflammatory phenomena have a direct impact on the prognosis of orthotopic liver transplantation (OLT)
- Neutrophil extracellular traps contribute to the inflammation and hemostasis imbalance during OLT and their role on clinical outcomes and transfusion requirements is not determined
- In this study, NETs release during reperfusion phase was associated to in hospital death
- Targeting against NETs formation may form a potential therapy in preventing OLT complications

Abstract

Background: Inflammatory phenomena have a direct impact on the prognosis of orthotopic liver transplantation (OLT). Neutrophil extracellular traps (NETs) contribute to OLT inflammation and hemostasis imbalance in OLT. The association between NETosis, clinical outcomes and transfusion requirements is not determined.

Objectives: To evaluate NETs release during OLT and the effect of NETosis on transfusion requirements and adverse outcomes in a prospective cohort of patients submitted to OLT.

Methods: We quantified citrullinated histones (cit-H3) and circulating-free DNA (cf-DNA) in ninety-three patients submitted to OLT in three periods: pre-transplant, after graft reperfusion and before discharge. NETs markers were compared between these periods using ANOVA test. The association of NETosis and adverse outcomes was evaluated using regression models adjusted for age, sex and corrected MELD.

Results: We observed a peak of circulating NETs following reperfusion, evidenced by a 6-fold increase in cf-DNA (mean levels of cf-DNA pre-transplant: 158.36 ng/mL, post reperfusion: 907.27 ng/mL, pre-discharge: 195.57 ng/mL, $p < 0.001$) and a 2-fold increase in cit-H3 levels in the post-graft reperfusion period (mean levels of cit-H3 pre transplant: 1.66 ng/mL, after reperfusion: 3.022 ng/mL and at discharge 0.87 ng/mL, $p < 0.0001$). We observed an association between increased levels of cit-H3 and in-hospital death (OR=1.168, 95%CI 1.021-1.336, $p = 0.024$). No association was found between NETs markers and transfusion requirements.

Conclusions: There is a prompt release of NETs after reperfusion that is associated with poorer outcomes and death. Intraoperative NETs release seems to be independent of transfusion requirements. These findings highlight the relevance of inflammation promoted by NETs and its impact on OLT adverse clinical outcomes.

Keywords: neutrophil extracellular traps, blood transfusion, NETosis, liver transplantation

Introduction

The role of neutrophils as key mediators in infection (1), thrombosis (2) , cancer(3) and autoimmune diseases (4) has been widely described. In response to inflammatory stimuli, neutrophils are able to degranulate and assemble a scaffold of decondensed chromatin (1), forming a web-like structure called neutrophil extracellular traps (NETs). These structures actively participate in trapping and killing of pathogens (1), protecting against infection, but are also involved in the pathophysiology of many events, such as atherosclerosis (5), thrombosis (6,7), systemic thrombotic microangiopathies (8), transfusion acute lung injury (TRALI) (9), amongst others. Indeed, despite crucial to many physiological events, NETs can trigger tissue lesion when dysregulated (10) , through proinflammatory pathways.

NETs have also been described in the scenario of liver transplantation (11), contributing to inflammation (11) and activation of coagulation (12). In murine models, the initiation of liver ischemic/reperfusion (I/R) injury resulted in the release of damage-associated molecular patterns (DAMP's), neutrophil recruitment and NETs formation in sinusoidal lobes. Elevated tissue level of citrullinated-histone H3 (cit-H3) and serum levels of myeloperoxidase (MPO)-DNA complexes, which are considered NET markers, were shown to induce cytokines release and cell death (11). Also, cell- free DNA (cfDNA) and nucleosome levels peaked after reperfusion and were associated with activation of coagulation (13), contributing to the hemostatic rebalance and prothrombotic state in orthotopic liver transplantation (OLT).

Previous studies have elucidated novel aspects of neutrophil biology, with NETs implicated in the development of inflammatory events in many diseases. While NETosis has already been associated to increased risk of rejection (13) and prothrombotic events (14) in lung transplantation, the effect of NETs in OLT outcomes has not been described yet. Also, since it has been shown they trigger thrombus formation and elevation of thrombin-antithrombin complexes and prothrombin fragments (2,15) and thus contributes to hemostasis balance, they might also have an impact on transfusion requirements during OLT. However, the association between NETosis, clinical outcomes and transfusion of blood components in OLT remains unknown. Considering that NETosis is an inherent phenomenon in I/R injury in OLT, we aimed to determine the evolution of NETosis markers during OLT and whether they are associated with blood transfusion requirements and clinical outcomes in these scenario.

Methods

This is an observational prospective cohort study conducted at Hospital Israelita Albert Einstein, a tertiary hospital in Sao Paulo, Brazil and the Hematology and Hemotherapy Center of the University of Campinas (UNICAMP), Brazil. The study was approved by the Brazilian National Committee for Research Ethics CONEP, CAAE 65116317.7.0000.0071 and by the Ethics and Research Committees of participating institutions. From April 2017 to January 2020, all adult patients who had been admitted for OLT at the center were assessed for inclusion. Patients under the age of 18 years or who refused to participate in the study were excluded. Informed consent was obtained from all the participants or their legal representatives.

The primary outcome was to describe the evolution of NETs release during OLT. The secondary outcomes were to evaluate the association of intraoperative NETosis and: i. transfusion of blood components, factor concentrates and hemostatic agents' requirements in intraoperative and postoperative period and ii. the occurrence of thrombosis, organ dysfunction (defined by acute kidney injury, need and duration of mechanical ventilation for more than 1 day after OLT, need of vasopressors and /or extracorporeal membrane oxygenation support), infection, graft rejection and death.

Data collection

After inclusion, we recorded baseline clinical, laboratory and demographic characteristics. Additional data related to surgical procedure, such as total duration of surgery, warm and cold ischemia times, intraoperative complications, preoperative, post-reperfusion and end of OLT thromboelastographic results (ROTEM) were also collected. During the entire hospital stay, patients were daily assessed, and clinical and laboratory data were recorded to evaluate blood product transfusions, incidence of thrombotic events in postoperative period, infections, acute liver rejection, early allograft dysfunction, organ damage and death. There was no loss of follow up among the ninety-three patients included in the study.

Laboratory procedures

Serum and plasma samples were obtained at three time points during hospital stay: at hospital admission for OLT (which occurred within a two-hour timeframe from beginning of surgery- time A), immediately after graft reperfusion (maximum estimated time after reperfusion: 10 minutes- time B) and at hospital discharge (time C). The time points for sample collection for these patients were standardized during surgical procedures for hemostatic evaluation and for the purpose of this study. Samples were centrifuged for 15 min at 1500G within a 2-hour period

from collection in order to avoid pre-analytical interferences. Plasma and serum were kept in 100 µl and 500 µl aliquots frozen at -80° C for further analysis. Only patients with adequate samples for analysis at the admission for OLT and after graft reperfusion were included. Any missing samples or samples compromised by pre-analytical issues at admission or post reperfusion would implicate exclusion from the study. Sequential analysis of NETosis markers allowed us to account for real procedure-induced NETosis, since the associations between outcomes and OLT- NETosis were made from the delta between post reperfusion markers (time B) and baseline pre-transplant NETosis status (time A).

In order to confirm NETosis, we performed assays to detect specific remnants of NETs, by using ELISA based immunometric assay Citrullinated histone H3 (cit-H3) (Clone 11 D3; Cayman, Inc). 100 µL of plasma was added to the wells and incubated for two hours at room temperature on an orbital shaker. After that, washes were repeated for five times with wash buffer and 100 µL of anti-histone H3 HRP conjugate working solution was added. The plates were covered and incubated for one hour at room temperature on an orbital shaker. Then, the plates were emptied and rinsed for five times with wash buffer and 100 µL of TMB substrate solution was added, followed by a 30-minute -period incubation in the dark on an orbital shaker. 100 µL of HRP stop solution was then added and the plate was read at a wavelength of 450 nm.

To evaluate baseline, post-reperfusion and pre-discharge cf-DNA, we extracted DNA from serum samples using QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit™. Quantitation was performed with 200µL extracted DNA with Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (ThermoFisherScientific, USA) A fluorescence microplate reader to determine absorbance at 520 nm wavelength was used.

Statistical analysis

The trial was designed to enroll at least 50 patients. We calculated that this sample size would provide 80% power to detect significant increase in cit-H3 levels from time A (pre-transplantation) to time B (after graft reperfusion) at the 0.05 level of significance.

Descriptive analyses were expressed as counts and percentages in the case of categorical variables. For continuous variables, means with standard deviations or medians with interquartile ranges (IQR) were used, according to the data distribution. Continuous variables were compared using Mann-Whitney U test, and categorical variables were compared using chi-square test or Fisher's exact test. We compared NETs markers (cf-DNA and cit- H3) between all the time points (pre-OLT, immediately after reperfusion and pre discharge) throughout hospital stay using a mixed-design ANOVA model.

Next, we evaluated the association of NETosis and clinical outcomes using univariate and multivariate models. We first performed univariate analysis comparing Cit-H3 and PicoGreen levels for patients who had and had not the adverse outcomes on times A (pre-OLT), B (immediately after reperfusion) and C (before hospital discharge). After that, we calculated the absolute increase in Cit-H3 levels (delta) from pre-OLT (time A) to post-reperfusion (time B) by subtracting the levels of Cit-H3 between both periods. As levels of Cit-H3 are the most specific marker of NETosis among those evaluated in this study, we used Cit-H3 as a surrogate marker of NETosis in this second analysis. Delta Cit-H3 between times A and B was entered as independent variable and blood product transfusion, factor concentrates and antifibrinolytics, and adverse outcomes entered as dependent variables. No confounding factors were expected in these paired analysis, since patients were compared to themselves over different times at OLT. The regression models were adjusted for pre-determined factors potentially associated with inflammation and poorer outcomes, such as age, sex and corrected Model for end stage liver disease (MELD) score. All statistical analyses were performed with SPSS version 23.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

From April 2017 to January 2020, 158 OLTs were performed at our center. One hundred and twenty-four patients were enrolled for the study, among which thirty-one patients were excluded from the analysis due to inadequate sample processing or missing samples, resulting in ninety-three patients being included in the study. Patients whose samples collected at time A or B were inadequate or missing were excluded from the analysis. These individuals were missed completely at random. We ended up with ninety-three patients eligible for analysis of cf-DNA and cit-H3 collected at times A and B, and forty-one and thirty-eight for analysis of cf-DNA and cit-H3, respectively, at time C. These ninety-three patients were followed during the entire hospital stay, until discharge or death, daily. There was no loss of follow up. Table 1 shows baseline characteristics of the patients and Table 2 shows clinical data of liver disease.

NETosis during OLT

Circulating free-DNA and cit-H3 were measured in order to analyze NETosis in the three pre-specified time-points of OLT (pre OLT -baseline, immediate post graft reperfusion and pre-discharge).

We observed an increase in Cit-H3 levels and cf-DNA and from pre-OLT to post-reperfusion phase, followed by a decrease afterwards (Table 3). The mean levels of cit-H3 were 1.66ng/ml

(SD=4.61) pre-OLT, 3.02ng/ml (SD=4.61) after reperfusion and 0.87ng/mL (SD= 1.13ng/ml, $p<0.0001$) at discharge. The mean levels of cf-DNA from all patients were 158.36ng/ml (SD= 308.13) pre-OLT, 907.27ng/ml (SD=1086.15) after reperfusion and 195.57ng/ml (SD= 591.85, $p<0.001$) at discharge. See general data of NETosis during OLT on Table 3.

Clinical outcomes and NETosis

Median of ICU length of stay was 4 days (IQR 3-8) and median of hospital length of stay was 11 days (IQR 8-17) (Table 4). Forty patients developed infection during hospitalization, most of them due to bacteria (58.1%). Half (48.7%) of the patients developed organ dysfunction, among those, one third had acute kidney injury with renal replacement therapy requirement. Fifteen percent of the patients had rejection and seven patients had new thrombosis in the post operative period. Nine patients died during hospital stay and another five patients died within the course of a year post OLT. One-year survival was 84.9%.

Use of blood products, coagulation factor concentrates, hemostatic agents are shown in Table 5. Most of the patients (69,9%) received at least one unit of red blood cells (RBC), median usage was 3 units of RBC per patient. The majority of patients did not receive factor concentrates or antifibrinolytics. Pre- OLT and post graft reperfusion laboratory data are shown in Table S1 (Supplementary Appendix). Overall, patients had mild hemostatic derangements, with CT (median 67, IQR 61-82) and CFT (median 138, IQR 96-237) slightly increased on EXTEM, associated to thrombocytopenia, which exacerbated in post reperfusion period (Table S1 in supplementary appendix). Surgical times are shown on table S2

Absolute levels of Cit-H3 and Pico Green at times A, B and C from patients with infection, organ dysfunction, occurrence of new thrombosis, graft rejection and in hospital death were compared to patients who had not had these events in Figure 1. Univariate analysis showed that patients who developed graft rejection ($p=0.009$) and infection ($p=0.029$) had statistically significant higher levels of cit-H3 prior to transplantation (samples collected at time A). No other associations were found on NETosis markers and occurrence of new thrombosis, death during hospitalization and organ dysfunction in univariate analysis.

In order to determine whether the release of NETs was associated to OLT outcomes and blood transfusion requirements, we performed multivariate models to analyse increases in cit-H3 levels from time A (prior to transplantation) to B (immediately after reperfusion) (Figure 2). In

order to account for severity of the disease, baseline conditions, pre-OLT status these multivariate analysis were adjusted for corrected MELD, age and sex. We observed that increases in cit-H3 from time A to B were independently associated to the risk of in-hospital death ($p=0.024$). No other associations were found between intraoperative NETosis and clinical outcomes in OLT (Figure2).

When analysing intraoperative NETosis and blood products requirements among these patients, we found no associations between increases in Cit-H3 levels and number of blood products transfused. However, we observed that increases in Cit-H3 levels were associated with reductions of tranexamic acid usage (OR 0.82, CI95% 0.71-0.96, p 0.02) (Figure 3).

Discussion

In this study of ninety-three patients submitted to OLT, we aimed to describe the associations between NETosis markers, blood transfusion requirements and adverse OLT outcomes. We demonstrated an increase in NETs markers after graft reperfusion, followed by a decrease pre-discharge, as demonstrated by the measures of cit-H3 and cf-DNA pre-transplant, post reperfusion and pre-discharge phases. These findings corroborate with the hypothesis that there is indeed cell damage because of I/R injury, as previously demonstrated in animal models (11) and as previously demonstrated (12). There is abundant neutrophil infiltrate immediately after reperfusion, cytokine release and reactive oxygen species (ROS) (16). NETosis is an inherent inflammatory phenomenon of OLT, as a consequence of I/R injury (11), upon DAMP's release such as high mobility group box-1 (HMGB-1), inducing NETosis via toll-like receptors 4 and 9(11). Our results are consistent with this evidence and further confirm that these phenomena occur in OLT patients, once we reported elevations of NETs markers after graft reperfusion.

We also investigated if NETs were associated with transfusion requirements. Chronic liver disease is characterized by a complex hemostatic imbalance, with deficits on primary and secondary hemostasis, low levels of procoagulant and anticoagulant factors, thrombocytopenia, platelet dysfunction, dysfibrinogenemia, erratic fibrinolysis (17). In addition, during the anhepatic phase of liver transplantation, hemostasis is even more challenged due to hemodilution, hypothermia, reduced clearance of tissue plasminogen activator (tPA) and reduced synthesis of coagulation factors, with further tPA release from the graft after reperfusion. Since NETs do activate coagulation (2,8,18), enhance thrombin generation(19,20) we assumed they might play a role on balancing hemostasis and reducing the need of blood transfusion requirements in OLT. Our first hypothesis was that NETs markers could be

associated with a reduction on transfusion of blood components. We observed, however, no association between NETosis and perioperative blood transfusions. Previous studies correlated cf-DNA and thrombin generation in a dose-dependent manner, as well as activation of factors XI and XII (20,21). Indeed, cf-DNA impairs fibrinolysis, inhibiting plasmin and plasminogen activation, which reinforces the thrombogenic role of NETs (19,22). Curiously, our findings suggest that the higher the increase of NETosis markers post reperfusion, the lower the tranexamic acid requirements, an antifibrinolytic agent used to treat hyperfibrinolysis after reperfusion, which may suggest that NETosis mitigates the stimulus for hyperfibrinolysis in the post-reperfusion period.

Activation and recruitment of neutrophils form a scaffold to support platelets, histones, granular enzymes, red blood cells, fibrin and coagulation factors, inducing thrombosis (23). Neutrophils are also able to increase production of thromboxane A2 and enhance NETosis through integrins pathways, ROS and HMGB-1, as well as activating factor XII and mobilizing Weibel-Palade bodies (24). Therefore, we evaluated interactions between NETosis markers and postoperative thrombosis. At first, considering the prothrombotic potential of NETs, we expected that NETosis would be protective for hemorrhagic events and a risk factor for postoperative thrombosis. However, no association between NETs markers and thrombosis was found. Since NETs have several prothrombotic triggers as mentioned above, one possible explanation for the absence of an association between NETosis, thrombosis and transfusion requirements is the fact that we may have underestimated circulating NETs post reperfusion. NETs are released by liver sinusoids and end up adhering to endothelium and von Willebrand factor (25,26). Our study only considered circulating NETs markers and we did not evaluate NETs in liver tissues, which may have underestimated NET formation. Another explanation is that, as the incidence of thrombosis was low in this cohort (10 events), our study may have been underpowered to evaluate a potential association between NETosis and thrombotic events post-OLT.

Once proinflammatory states are associated with negative outcomes in OLT, we sought to evaluate if NETosis would be associated to death, organ dysfunction, rejection, and infections. We observed an association between NETosis and in hospital death. Despite the limited number of events (nine patients died in the hospital), we were able to establish this association, which emphasizes the impact of NETosis and worse outcomes in OLT. No other associations were found between NET markers and clinical outcomes.

Our study has limitations inherent to a single-center observational study. First, we had a low incidence of outcome events, which may have had impact on some negative results, such as

those related to thrombosis and bleeding risk. Second, our findings may reflect the characteristics of the studied population and generalization of the results to other centers may not be feasible. Third, we only evaluated the circulating levels of NETs, which may have underestimated the potential of NETosis formation in OLT, since NETs can also be formed in the liver sinusoids and those were not detected by our methods. Also, we had several exclusions due to pre analytical issues and missing samples for times A and B. Due to the study design of sequential analysis of NETs release during OLT, we inevitably needed NETosis markers measured at least pre transplant and post reperfusion. This methodology provided us the true procedure-induced NETosis, no matter the baseline amounts of NETs before OLT, which suffers considerable variations according to diagnostics. Conversely, this methodology resulted on several exclusions. One of the strengths of the study relies on the fact that we included all acute and chronic liver patients eligible for OLT, no matter the ethiology of liver disease. These study design allowed us to evaluate release of NETs in several acute and chronic conditions. We are aware that NETs do contribute to the pathogenesis of several forms of liver diseases (27), and baseline NETosis was detected on samples collected prior to OLT. One might argue that NETosis on time A may have influenced our results, but sequential analysis pre OLT, post reperfusion and pre-discharge and analysis of delta between NETs markers from times A to B provided us evidence to analyse remnants of NETs considering within-person variance. Finally, the follow-up was limited to the in-hospital stay, which also prevented us from analyzing potential long-term effects of intraoperative NETosis.

In conclusion, our study evaluated the evolution of NETs release during OLT in a clinical cohort and demonstrated a peak of circulating NETs following reperfusion. While the peak of NETs release after reperfusion was not associated with transfusion requirements, its association with in-hospital death was evident. Considering the clinical relevance of NETs in post-OLT complications, our findings may encourage the conduction of clinical studies focused on evaluating alternative therapies - including inhibitions(28) of neutrophil-platelet interactions or deoxyribonucleases - to mitigate NETs release and prevent adverse outcomes in OLT.

Authorship details: Conceptualization: Ana Paula H. Yokoyama, Fernanda L. A. Orsi;
investigation: Ana Paula H. Yokoyama, Bruna M. Mazetto, Araci M. Sakashita, Cristiane Y.
Nakazawa, Gabriela L. V. T. Mesquita, Ana Paula Rosa, Marcio D Almeida, Jose M. Kutner,
Fernanda L. A. Orsi; formal analysis: Ana Paula H. Yokoyama, Fernanda L. A. Orsi; resources:
Fernanda L. A. Orsi; writing: Ana Paula H. Yokoyama, Fernanda L. A. Orsi; final approval:
Fernanda L.A.Orsi

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest

Table 1- Baseline demographic data of 93 patients submitted to OLT between April 2017 to January 2020

Patients submitted to orthotopic liver transplantation	n=93
Male, n (%)	58 (62.4)
Age (min-máx, %)	21-72
20-30	9(9.6)
31-40	10 (10.6)
41-50	10 (10.6)
51-60	28 (29.8)
>61	37 (39.4)
Ethnicity(n=89)	
Caucasian, n (%)	59 (66.3)
African American, n (%)	29 (32.6)
Asian, n (%)	1(1.1)
BMI (median, IQR)	27.16 (23.9-31.1)

BMI= Body mass index, IQR=interquartile range

Table 2- Baseline clinical features of 93 patients submitted to OLT

Patients submitted to orthotopic liver transplantation	(n=93)
Diagnosis (n=93)	
PAF/ Budd Chiari/NASH/Cryptogenic/Neuroendocrine tumor, n (%)	27 (29)
	23 (24.7)
Viral cirrhosis, n (%)	
Alcoholic, n (%)	22 (23.6)
Autoimmune diseases (Primary biliar cirrhosis/ Autoimmune hepatitis /	
Sclerosing cholangitis), n (%)	11 (11.8)
Alcoholic cirrhosis+ virus, n (%)	6 (6.5)
Fulminant hepatitis, n (%)	4 (4.3)
MELD score, median (IQR)	16 (11-25.5)
Corrected MELD score, median (IQR)	29 (25.5-29)
Special situation, n (%)	71 (76.3)
Special situation -reason	
HCC, n (%)	27 (38)
PAF, n (%)	5 (7)
HCC no downstaging, n (%)	2 (2.8)
HCC with downstaging, n (%)	1 (1.4)
Miscellaneous (Recurrent Cholangitis, neuroendocrine tumors, hemangioendothelioma, polycystic disease, Budd Chiari), n (%)	13(11.3)
Child-Pugh score (n=83)	
A, n (%)	14 (16.9)
B, n (%)	31 (37.3)
C, n (%)	30 (36.2)
Nodule or Tumor, n (%)	32 (34.4)
Previous hemorrhagic events, n (%)	12 (12.9)
Previous abdominal surgeries, n (%)	38 (40.9)
Portal vein thrombosis, n (%)	12 (12.9)

Esophageal varices, n (%)	15 (16.1)
Ascitis, n (%)	42 (45.2)
Portal hypertension, n (%)	43 (46.2)
Comorbidities, n (%)	47 (50.5)
Obesity, n (%)	68 (73.1)
Hypertension, n (%)	22 (23.6)
Diabetes mellitus, n (%)	21 (22.6)
Tobacco smoking, n (%)	13 (14)
Thyroid disease, n (%)	5 (5.3%)
Pre transplant chronic dialytic therapy, n (%)	2 (2.1)
Karnofsky (n=86)	
80 - 100, n (%)	82 (95.3)
40 - 60, n (%)	4 (4.7)

Table 3-NETosis markers at times A, B C

	A	B	C	
Citrullinated H3 (median, IQR)	0,53 (0,24-1,2)	1,21 (0,73-3,34)	0,55 (0,23-0,85)	P<0.0001
Pico Green	34,43 (18,21-78,53)	556,39 (141,10-1033,19)	66,66 (42,73-123,29)	P<0.001

IQR: interquartile range; A: pre- OLT; B= after reperfusion; C= pre discharge

Table 4- Secondary clinical outcomes and clinical data

	Patients submitted to OLT (n=93)
ICU length of stay, median (IQR)	4 (3-8)
Hospital stay, median (IQR)	11(8-17)
Days on mechanical ventilation, median(IQR)	1(1-2)
Infection, n (%)	43 (46.2)
Infection sites	
Bloodstream infection, n (%)	11 (25.6)
Urinary tract infection	8 (18.6)
Graft positive blood culture, n (%)	8 (18.6)
Lung, n (%)	6 (13.9)
Ascites, n (%)	4 (9.3)
Miscellaneous (central venous cateter infection, meningitis, gastrointestinal infection)	6 (13.9)
Agent	
Bacterial, n (%)	25 (58.1)
CMV, n (%)	6 (13.9)
Fungal(Candida e Trichosporon), n (%)	4 (9.3)
Tb, n (%)	1 (2.3)
Tb Graft, n (%)	1 (2.3)
Miscellaneous, n (%)	3 (7)
Organ dysfunction, n (%)	44 (47.3)
Renal replacement therapy, n (%)	31 (33.3)
Postoperative thrombosis, n (%)	10 (10.8)
Rejection, n (%)	14 (15)
Type of rejection	
Acute cellular rejection, moderate n (%)	8 (57.1)
Acute cellular rejection, severe n (%)	5 (35.7)
Other, n (%)	2 (14.2)

Reoperation, n (%)	11 (11.8)
Reoperation	
Bleeding, n (%)	7 (63.6)
Second look, n (%)	3 (27.3)
Other, n (%)	1 (9.1)
Retransplantation, n (%)	4 (1.3)
Retransplantation causes	
Primary nonfunction, n (%)	2 (50)
Hepatic artery thrombosis, n (%)	2 (50)
Hospital death, n (%)	9 (9.7)
Cause of death	
Septical shock, n (%)	4 (44.4)
Distributive shock, n (%)	2 (22.2)
Hemorrhagic shock, n (%)	1 (11.1)
Cardiogenic shock, n (%)	1 (11.1)

IQR: interquartile range; ICU= intensive care unit; UTI= urinary tract infection, CMV= cytomegalovirus infection

Table 5- Transfusion of blood components and factor concentrates and antifibrinolytics requirements

RBC, median (min-máx.)	1 (0-5)
Platelet doses*, median (min-máx.)	0 (0-6)
FFP, median(min-máx.)	0 (0-4)
Cryoprecipitate, median (min-máx.)	0 (0-8)
Intraoperative recovery volume on cell salvage (n= 48), median (IQR)	916 (502-1286)
Prothrombin complex, n (%)	20 (22,2)
Tranexamic acid, n (%)	7 (7,5)

Fibrinogen concentrate, n (%)	36 (38.7)
-------------------------------	-----------

RBC= red blood cell units; FFP= fresh frozen plasma units, IQR= interquartile range

*Platelet dose = 1 apheresis or 1 pool of 6 whole blood derived platelets

Table S1- Perioperative laboratory data

	Patients submitted to OLT (n=93)	
	Pre OLT	Post OLT
Hb, median (IQR)	11.1 (8.7-12.8)	9.5 (8.2-10.3)
Platelet count, median (IQR)	70 000 (48000-113 000)	60 000 (44 000-104 000)
INR, mediana (IQR)	1.6 (1.4-2.0)	NA
pH (n=79), median (IQR)	7.4 (7.3-7.4)	7.3 (7.3-7.4)
HCO ₃ (n=78), median (IQR)	23.6 (20.9-26.6)	NA
BE (n=77), median (IQR)	1.1 (-1.1, -4.85)	NA
Lactate (n=76), median (IQR)	13 (9-18.5)	23 (14.5-32)
CT EX, median (IQR)	67 (61-82)	69 (57-83)
CFT, median (IQR)	138 (96-237)	160 (155-243)
ALFA, median (IQR)	66(56-74)	63 (52.7-72)
A5, median (IQR)	32 (23-40)	29.5 (22-34.2)
A10, median (IQR)	43 (33-51)	39 (31-43)
MCF, median (IQR)	51 (41-58)	49 (41-43.2)
A10FIB, median (IQR)	11 (7-16)	9 (6-11)
A5 FIB, median (IQR)	10 (6-15)	9 (6-11)
MCF FIB, median (IQR)	12 (7.5-17)	NA
A20 FIB, median (IQR)	12 (7.7-17.2)	10 (7-13.5)

Hb: hemoglobin; IQR: interquartile range; INR= International normalized ratio; BE=base excess;

EX= EXTEM assays, FIB= FIBTEM assays, CT= clotting time, CFT= clot formation time;

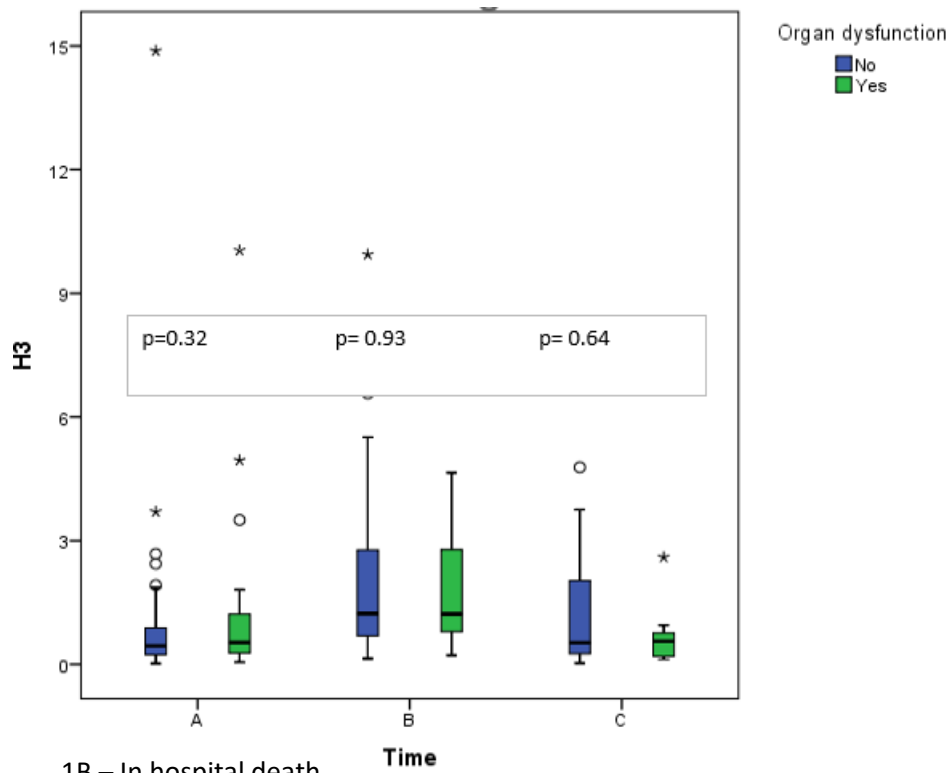
MCF=maximum clot firmness

Table S2- Surgical times

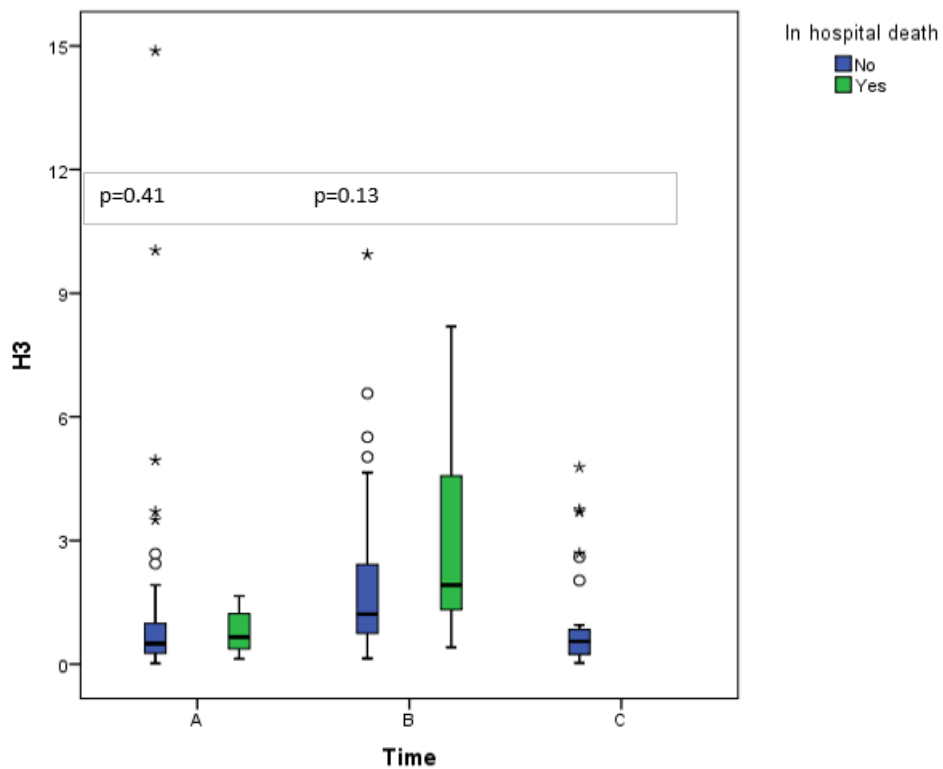
	Patients submitted to OLT (n=93)
Warm ischemia time (min), median (IQR)	30 (25-38)
Cold ischemia time(min), median (IQR)	371 (326-454)
Duration of surgery (min), median (IQR)	287 (240-360)
Duration of anesthesia course (min), median (IQR)	367 (301-455)
Surgical complications, n (%)	35 (37.6)
Intraoperative thrombectomy, n (%)	10 (3.3)

Figure 1- Cit- H3 levels and clinical outcomes – Times A, B and C

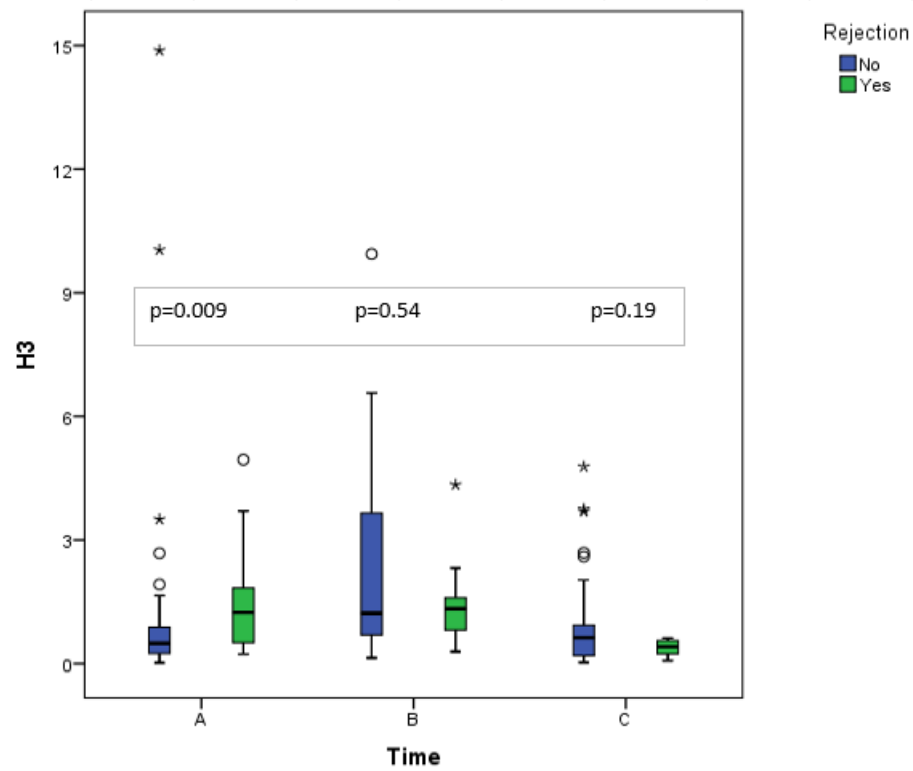
1A – Organ dysfunction



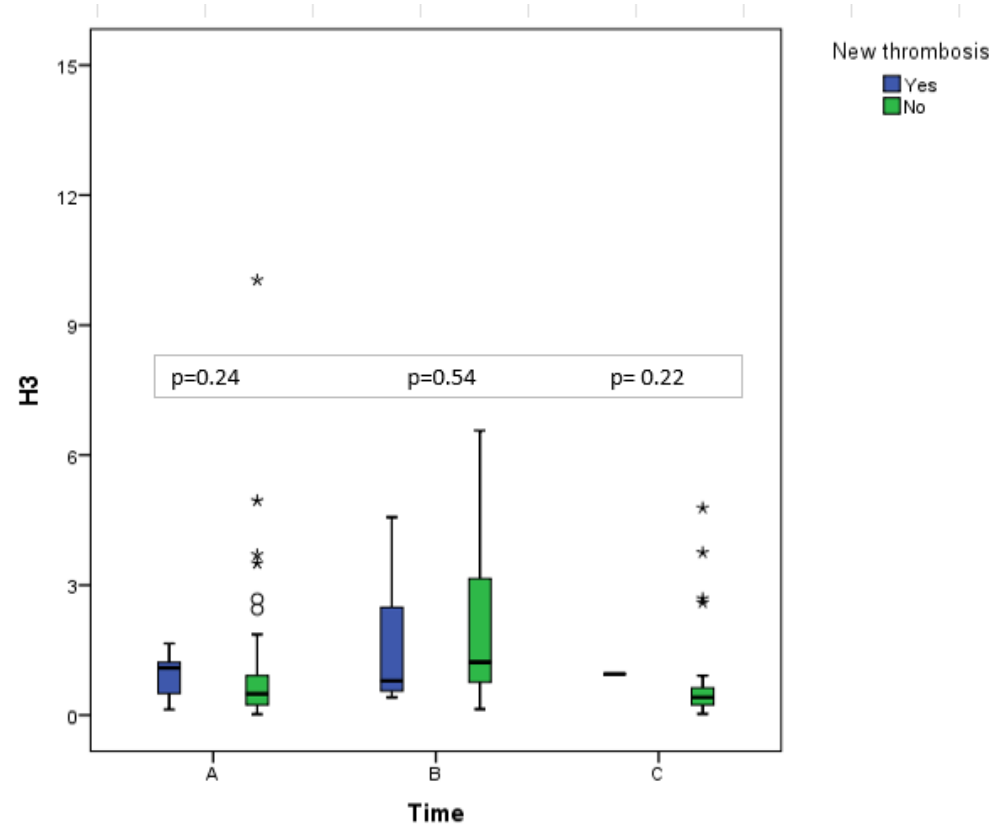
1B – In hospital death



1C- Graft rejection



1D- New thrombosis



1E - Infection

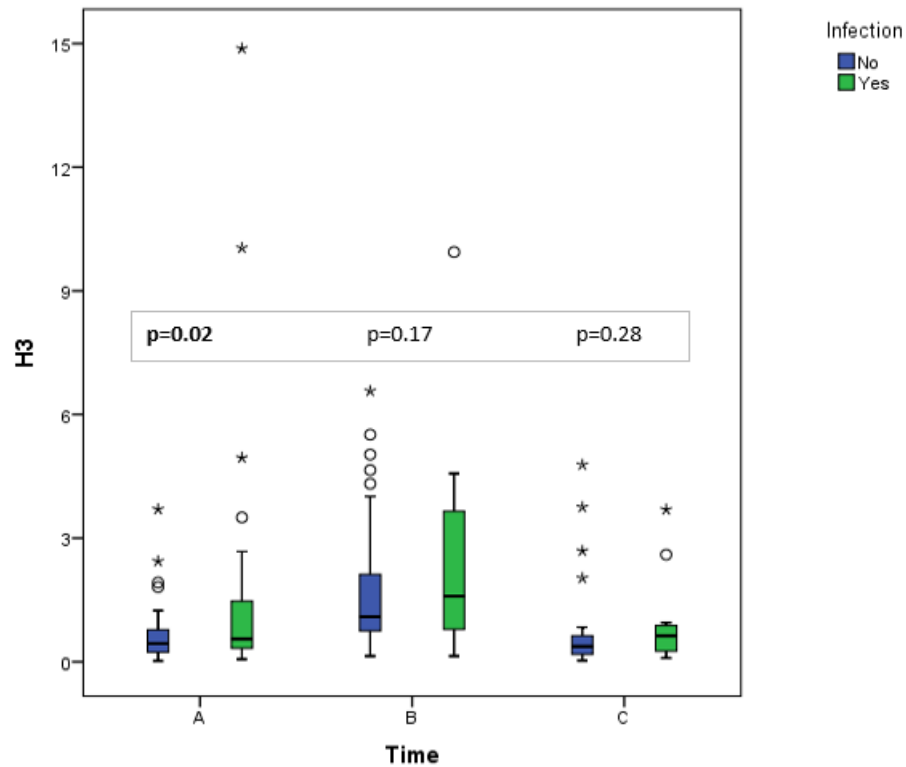


Fig 1- Comparison between Cit-H3 levels collected at times A, B and C in patients and clinical outcomes. Patients who developed graft rejection ($p=0.009$) and infection ($p=0.02$) had statistically significant higher levels of cit-H3 prior to transplantation (samples collected at time A) in univariate analysis

Figure 2 – Associations between CIT H3 levels (increase from time A→B) and clinical outcomes in OLT adjusted for sex, age, corrected MELD

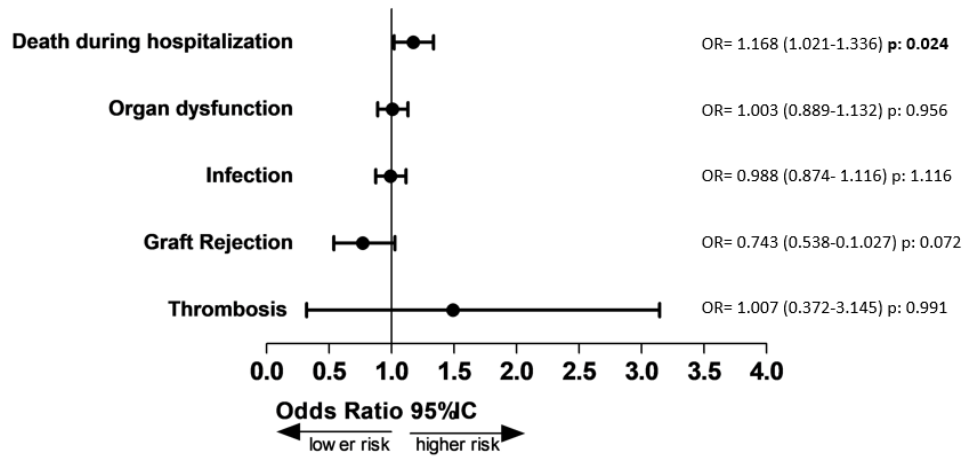
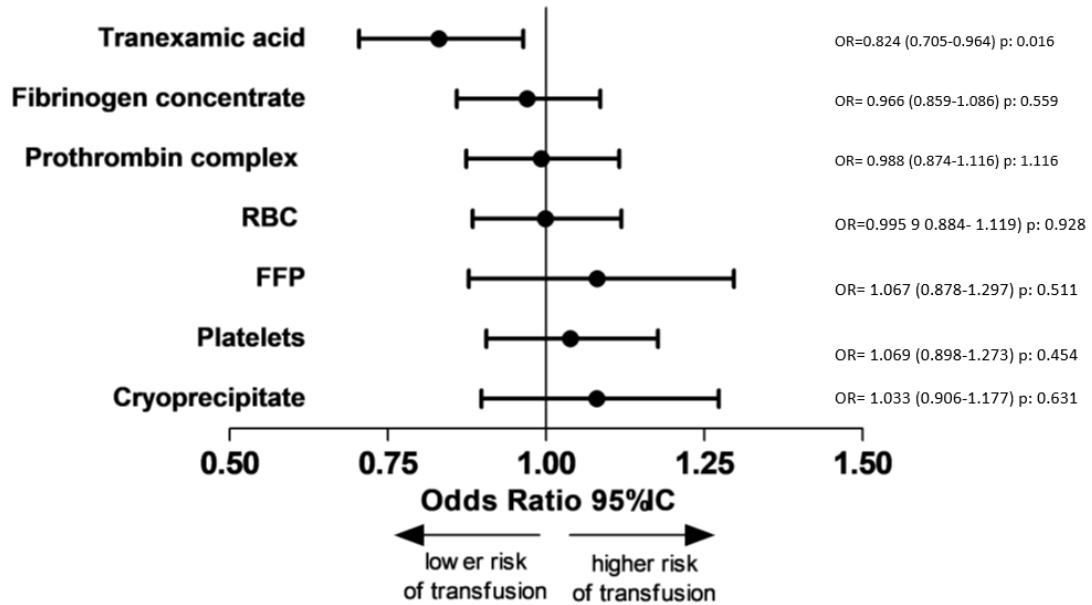


Figure 3-Associations between Cit-H3 levels (increments from time A→B) transfusion requirements and antifibrinolytics, adjusted for sex, age, corrected MELD



RBC= red blood cell; FFP= fresh frozen plasma

References

1. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria [Internet]. Available from: <https://www.science.org>
2. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 7;107(36):15880–5.
3. Demers M, Wagner DD. NETosis: A new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2014;40(3):277–83.
4. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013 Mar 27;5(178).
5. Qi H, Yang S, Zhang L. Endothelial dysfunction in atherosclerosis and thrombosis. Vol. 8, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
6. Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, Dale GL, Friesse P, Esmon NL, et al. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: Involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood*. 2011 Aug 18;118(7):1952–61.
7. Ammollo CT, Semeraro F, Xu J, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011 Sep;9(9):1795–803.
8. Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lämmle B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood*. 2012 Aug 9;120(6):1157–64.
9. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *Journal of Clinical Investigation*. 2012 Jul 2;122(7):2661–71.
10. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. Vol. 18, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 134–47.
11. Huang H, Tohme S, Al-Khafaji AB, Tai S, Loughran P, Chen L, et al. Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. *Hepatology*. 2015 Aug 1;62(2):600–14.
12. von Meijenfeldt FA, Burlage LC, Bos S, Adelmeijer J, Porte RJ, Lisman T. Elevated Plasma Levels of Cell-Free DNA During Liver Transplantation Are Associated With Activation of Coagulation. *Liver Transplantation*. 2018 Dec 1;24(12):1716–25.
13. Scozzi D, Wang X, Liao F, Liu Z, Zhu J, Pugh K, et al. Neutrophil extracellular trap fragments stimulate innate immune responses that prevent lung transplant tolerance. *American Journal of Transplantation*. 2019 Apr 1;19(4):1011–23.
14. Sayah DM, Mallavia B, Liu F, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, DerHovanessian A, et al. Neutrophil extracellular traps are pathogenic in primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Feb 15;191(4):455–63.

15. von Meijenfeldt FA, Burlage LC, Bos S, Adelmeijer J, Porte RJ, Lisman T. Elevated Plasma Levels of Cell-Free DNA During Liver Transplantation Are Associated With Activation of Coagulation. *Liver Transplantation*. 2018 Dec 1;24(12):1716–25.
16. Dar WA, Sullivan E, Bynon JS, Eltzschig H, Ju C. Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: Cellular and molecular mechanisms. Vol. 39, *Liver International*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 788–801.
17. Tripodi A, Mannuccio Mannucci P, Bonomi Hemophilia B. The Coagulopathy of Chronic Liver Disease. Vol. 365, *n engl j med*. 2011.
18. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. Vol. 32, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012. p. 1777–83.
19. Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, Dwivedi DJ, Mai SHC, Weitz JI, et al. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(9):1977–84.
20. Gould TJ, Vu TT, Stafford AR, Dwivedi DJ, Kim PY, Fox-Robichaud AE, et al. Cell-Free DNA Modulates Clot Structure and Impairs Fibrinolysis in Sepsis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015 Dec 1;35(12):2544–53.
21. Vu TT, Leslie BA, Stafford AR, Zhou J, Fredenburgh JC, Weitz JI. Histidine-rich glycoprotein binds DNA and RNA and attenuates their capacity to activate the intrinsic coagulation pathway. *Thromb Haemost*. 2016;115(1):89–98.
22. Borissoff JI, Joosen IA, Versteyleen MO, Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Aug;33(8):2032–40.
23. Kimball AS, Obi AT, Diaz JA, Henke PK. The emerging role of NETs in venousthrombosis and immunothrombosis. Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation; 2016.
24. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 2012 Apr 9;209(4):819–35.
25. Yang J, Wu Z, Long Q, Huang J, Hong T, Liu W, et al. Insights Into Immunothrombosis: The Interplay Among Neutrophil Extracellular Trap, von Willebrand Factor, and ADAMTS13. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
26. Kolaczowska E, Jenne CN, Surewaard BGJ, Thanabalasuriar A, Lee WY, Sanz MJ, et al. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun*. 2015;6.
27. Hilscher MB, Shah VH. Neutrophil Extracellular Traps and Liver Disease. *Semin Liver Dis*. 2020 May 1;40(2):171–9.

28. Molinaro R, Yu M, Sausen G, Bichsel CA, Corbo C, Folco EJ, et al. Targeted delivery of protein arginine deiminase-4 inhibitors to limit arterial intimal NETosis and preserve endothelial integrity. Cardiovasc Res. 2021 Nov 15;117(13):2652–63.