



• U • C •

FMUC FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

JOSÉ ALBERTO COSTA DA SILVA

***Estenoses biliares não anastomóticas pós transplante hepático:  
associação anatomopatológica***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE CIRURGIA GERAL

Trabalho realizado sob a orientação de:

DULCE HELENA SARAMAGO DIOGO CORTES

RUI PEDRO CAETANO MOREIRA DE OLIVEIRA

FEVEREIRO/2019

**Estenoses biliares não anastomóticas pós transplante hepático: associação  
anatomopatológica**

Dissertação de acesso ao Grau de Mestre em Medicina

José Alberto Costa da Silva

2013134123

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

ze\_alberto95@live.com.pt

Dulce Helena Saramago Diogo Cortes

Unidade de Transplantação Hepática Pediátrica e do Adulto, Centro Hospitalar e Universitário  
de Coimbra, Portugal

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

netdiogo@gmail.com

Rui Pedro Caetano Moreira de Oliveira

Serviço de Anatomia Patológica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

ruipedrocoliveira@hotmail.com

## Índice

Resumo.....	4
Abstract.....	5
Introdução.....	6
Materiais e Métodos.....	7
Resultados.....	11
Discussão e Conclusão.....	20
Agradecimentos.....	24
Referências Bibliográficas.....	25
Apêndice A – Estatística descritiva da amostra.....	29
Apêndice B – Estatística inferencial.....	31
Apêndice C – Critérios histológicos de biópsia pós reperfusão.....	44
Apêndice D – Abreviaturas.....	45

## Resumo

As estenoses biliares são uma complicação frequente pós-transplante hepático. As estenoses não anastomóticas (ENA) são aquelas cuja etiologia está menos esclarecida. O presente estudo pretende determinar qual a associação entre as alterações anatomopatológicas das vias biliares e o desenvolvimento de ENA.

Trata-se de estudo longitudinal, retrospectivo incluído num estudo prospetivo realizado na Unidade de Transplantação Hepática Pediátrica e de Adultos do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra. De um total de 77 enxertos foram colhidas amostras de via biliar: via biliar 1 (VB1) (n=76) - via biliar do enxerto durante o tempo de isquémia fria e via biliar 2 (VB2) (n=75) - via biliar do enxerto imediatamente antes da anastomose biliar. As amostras foram avaliadas segundo os critérios histológicos descritos por Hansen et al. e Op den Dries et al.

Compararam-se as características histológicas das amostras e o desenvolvimento de estenose. Avaliou-se ainda a influência das lesões da do parênquima hepático pós reperfusão e dos tempos de isquémia na lesão histológica de VB1 E VB2.

Verificou-se que o desenvolvimento de ENA depende da inflamação da parede ductal da VB1 ( $p\text{-value}=0,020$ ). A necrose mural (NM) ( $p\text{-value}<0,001$ ), a lesão das glândulas peribiliares profundas (GPP) ( $p\text{-value}=0,075$ ) e a hemorragia da parede ductal ( $p\text{-value}=0,006$ ) da VB2 surgiram mais frequentemente para graus de hemossiderose mais elevados. A lesão das GPP ( $p\text{-value}=0,082$ ) e a NM ( $p\text{-value}=0,022$ ) surgiram mais frequentemente quando houve lesão de isquémia/reperfusão (I/R). O aumento do tempo de isquémia quente 2 relacionou-se com a lesão das GPP ( $p\text{-value}=0,076$ ) e lesão do plexo vascular peribiliar em VB2 ( $p\text{-value}=0,096$ ).

Os resultados suportam a influência das lesões das VB no desenvolvimento de ENA. Verifica-se ainda a influência da hemossiderose, lesão de I/R e do tempo de isquémia quente nas alterações histológicas das VB.

Palavras-Chave: Estenoses da via biliar, Estenoses não anastomóticas da via biliar, Transplante de Fígado, Doenças da via biliar,

## Abstract

Biliary strictures are a frequent complication after liver transplantation. Non-anastomotic strictures (NAS) are those whose etiology are less clear. This study aimed to determine if there is an association between anatomopathological lesions of the biliary tract and the development of NAS.

Longitudinal study included in a prospective one running at the Pediatric and Adult Liver Transplantation Unit of the Coimbra Hospital and University Centre. From a total of 77 grafts, bile ducts samples were collected. Two types of samples were defined: bile duct 1 (BD1) (n=76) – collected during the preparation of the graft and bile duct 2 (BD2) (n=75) – after reperfusion of the graft immediately before making the bile anastomosis.

Samples were analysed according to the histological classifications of Hansen et al. e Op den Dries et al. A comparison was made between the degree of BD's lesions and the development of NAS. It was still evaluated the influence of lesions found in the liver biopsy and the ischemic times in BD's histology.

It has been found that the development of NAS depends on the inflammation of the ductal wall of BD1 ( $p\text{-value}=0,020$ ). Wall necrosis (WN) ( $p\text{-value} < 0,001$ ), lesion of the deep peribiliary glands (DPG) ( $p\text{-value}=0,075$ ) and ductal wall bleeding ( $p\text{-value}=0,006$ ) of BD2 appeared more frequently for higher degrees of hemosiderosis. The lesion of DPG ( $p\text{-value}=0,082$ ) and WN ( $p\text{-value}=0,022$ ) occurred more frequently when ischemia/reperfusion injury was present. The increase in warm ischemia time was related to the lesion of the DPG ( $p\text{-value}=0,076$ ) and lesion of peribiliary vascular plexus in BD2 ( $p\text{-value}=0,096$ ).

These results support the influence of BD's lesions on the development of NAS. The effect of hemosiderosis, I/R lesion and warm ischemic time on the histological lesion of BD was also verified.

Key words: Biliary strictures, Non-anastomotic biliary strictures, Liver transplantation, Biliary diseases.

## Introdução

As estenoses da via biliar (EB) são uma complicação frequente após transplante hepático, resultando no aumento da morbimortalidade<sup>1,2</sup>.

Num estudo retrospectivo apresentado em 2017 na Unidade de Transplantação Hepática Pediátrica e de Adultos (UTHPA) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), registou-se uma incidência de 16.7 % de estenoses biliares não anastomóticas (ENA) num total 38.1% de EB<sup>3</sup>, considerada elevada quando comparada com a literatura<sup>4</sup>.

As ENA podem localizar-se na bifurcação dos grandes ductos biliares ou apresentar-se difusamente, afetando ductos pequenos e periféricos<sup>5</sup>. As ENA que surgem no primeiro ano pós transplante surgem maioritariamente junto da bifurcação e nos ductos extra-hepáticos, e relacionam-se com eventos isquémicos, enquanto que as ENA que surgem após o primeiro ano localizam-se preferencialmente na periferia, com possível etiologia imunológica<sup>5,6</sup>.

A patogénese destas lesões é multifatorial e está pouco esclarecida, estando identificados três mecanismos principais responsáveis pela sua formação: a lesão de isquémia-reperusão, a lesão induzida pelos ácidos biliares e a lesão imuno-mediada<sup>7</sup>.

A nível histológico, as características associadas ao desenvolvimento de ENA são a lesão das glândulas peribiliares profundas (GPP), a lesão do plexo vascular peribiliar (PVP) e a necrose mural (NM)<sup>8</sup>. Estes achados sugerem alterações da vascularização, com compromisso do PVP e a regeneração insuficiente devida a perda de células progenitoras das GPP<sup>8,9</sup> como os mecanismos subjacentes a estas lesões.

O presente estudo procura verificar a existência ou não de associação entre as alterações histológicas das vias biliares (VB), baseadas na descrição de Hansen et al.<sup>10</sup> e op den Dries et al.<sup>9</sup>, e o desenvolvimento de ENA. Como objetivos suplementares procurou-se avaliar a influência dos tempos de isquémia e das lesões da biópsia hepática nas lesões das VB.

## **Materiais e Métodos**

### Desenho do estudo

Estudo longitudinal retrospectivo incluído num estudo prospetivo realizado na UTHPA do CHUC.

### Seleção da amostra

Utilizaram-se os seguintes critérios de inclusão: transplantes hepáticos realizados entre 1 de Agosto de 2016 e 30 de Abril de 2018; na UTHPA do CHUC; recetores com idade igual ou superior a 18 anos; com enxerto de dador após morte cerebral de coração a bater; possibilidade de colheita de fragmento de VB sem causar dano no enxerto ou efeito deletério no recetor. Foram excluídos casos em que ocorreu trombose da artéria hepática, incompatibilidade AB0 e tempo de seguimento inferior a 6 meses (por falecimento ou retransplante por outra etiologia). De um total de 121 transplantes realizados na UTHPA, obteve-se uma amostra de 77 casos.

### Diagnóstico de estenose

Identificaram-se e classificaram-se as EB através da revisão dos dados clínicos e imagiológicos (relatórios e imagens) de colangiopancreatografia retrógrada endoscópica, colangiopancreatografia por ressonância magnética e colangiografia percutânea transhepática de todos os doentes. Assumiram-se como EA aquelas que surgem exclusivamente no local da anastomose como ENA as distantes da anastomose, múltiplas ou mistas e como sem estenose (S/E) as sem evidência de estenose. Considerou-se o grupo SENA (sem estenoses não anastomóticas) que compreende os casos S/E e as EA.

### Colheita e caracterização histológica das amostras de VB

No dia do transplante realizaram-se biópsias do colédoco do enxerto com registo da hora da colheita, utilizando-se lâmina ou tesoura sem cauterização do tecido. Definiram-se duas amostras: VB1 - tecido de VB obtido durante a preparação do enxerto (tempo de isquémia fria) e VB2 - tecido de VB obtido após a reperusão do segundo vaso e imediatamente antes da confeção da anastomose biliar. Cada amostra foi acondicionada num frasco de formaldeído a 4% e enviada para o Serviço de Anatomia Patológica (SAP do CHUC) na sua totalidade com referenciação dos topos cirúrgicos e cortes centrais bem como medição do comprimento, diâmetro máximo e mínimo.

A avaliação microscópica foi efetuada por dois anatomopatologistas experientes que avaliaram cortes histológicos de 4µm corados por hematoxilina e eosina com um microscópio ótico *Nikon Eclipse 50i*. Categorizaram-se as amostras quanto à sua qualidade em boa, aceitável e má, excluindo-se as últimas do estudo. As amostras foram avaliadas segundo critérios adaptados dos descritos por Hansen et al.<sup>10</sup> e Op den Dries et al.<sup>9</sup> (Tabela 1), avaliando-se a lesão do PVP, a hemorragia da parede ductal (HP), a arteriolonecrose, a inflamação da parede (IP), a NM e a lesão das GPP.

Tabela 1. Critérios histológicos de lesão da via biliar adaptados de Hansen et al. e Op den Dries et al.

Grau	Lesão do PVP	HP	Arteriolonecrose	IP	NM	Lesão das GPP
0	0 %	0% ou ≤ 50%	0%	0%	0 %	0%
1	> 0%	>50%	≤ 50%	>0%	≤25%	≤ 50%
2	-	-	>50%		>25-50%	>50%
3	-	-	-		>50 - ≤75%	
4	-	-	-		>75%	

PVP: plexo vascular peribiliar; HP: hemorragia da parede ductal; IP: inflamação da parede ductal; NM: necrose mural; GPP: glândulas peribiliares profundas



## Caracterização do enxerto e do dador

Os dados dos enxertos e dos dadores foram obtidos através da consulta de registos informáticos de cirurgia e da colheita do enxerto, de relatórios do SAP informatizados e em suporte papel e de registos do Gabinete Coordenador da Colheita e Transplantação do CHUC. Colheu-se informação sobre género, idade, grupo AB0, grupo Rh e histologia da biópsia pós reperfusão.

Foram considerados como critérios histológicos da biópsia pós reperfusão a esteatose pela classificação adaptada de Kleiner DE et al.<sup>11</sup>, a lesão de isquémia/reperfusão (I/R) segundo Ali JM et al.<sup>12</sup> e a hemossiderose, adaptada de Deugnier Y e Turlin B<sup>13</sup> (Apêndice C – tabela 1).

As informações clínicas presentes no estudo foram obtidas sob supervisão, com preservação do anonimato.

## Tempos de isquémia

Com recurso aos registos cirúrgicos e de anesthesiologia, foram considerados os seguintes tempos de isquémia: - Tempo de isquémia fria (TIF): intervalo de tempo que decorre desde a clampagem da aorta do dador até à retirada do fígado do gelo; - Tempo de isquémia quente 1 (TIQ1): desde a retirada do fígado do gelo até à reperfusão do primeiro vaso; - Tempo de isquémia quente 2 (TIQ2): desde a reperfusão do primeiro vaso até à reperfusão do segundo; - Tempo total de isquémia (TTI): desde o início da isquémia fria até à reperfusão do primeiro vaso; - Tempo de isquémia fria até à colheita de VB1 (TIF0).

## Análise estatística

Recorreu-se ao software SPSS Statistics (v. 25; IBM SPSS, Chicago, IL) para o tratamento estatístico dos dados. O nível de significância aplicado foi de 0,05 ( $p \leq ,05$ ), com intervalo de confiança de 95%. As variáveis qualitativas foram caracterizadas segundo a frequência absoluta e relativa percentual. As variáveis quantitativas foram caracterizadas pela média, desvio padrão (DP), mediana e amplitude interquartil (P25-P75).

Utilizou-se o Teste de Qui-Quadrado da independência para testar a existência de uma relação significativa entre duas variáveis categoriais. Quando a frequência de casos numa célula era inferior a cinco utilizou-se o Teste Exato de Fisher.

O pressuposto da normalidade das distribuições foi avaliado com o teste Shapiro-Wilk.

Para comparar dois grupos independentes quando a variável dependente é contínua, utilizou-se o Teste de Mann-Whitney. Para as comparações de três ou mais grupos, utilizou-se o Teste de Kruskal-Wallis.

### Pesquisa bibliográfica

A pesquisa bibliográfica foi realizada através da plataforma online Pubmed, utilizando os termos “Liver transplantation”, “Biliary Strictures”, “Non-anastomotic biliary strictures” e “Biliary diseases”.

## Resultados

### Análise Descritiva

As variáveis dos recetores encontram-se na tabela 2 e as dos dados no Apêndice A Tabela 1.

Tabela 2. Variáveis dos recetores

		Frequências
Género (n=77)	Feminino	24,7 % (n=19)
	Masculino	75,3% (n=58)
Grupo AB0 (n=75)	A	54,7% (n=41)
	B	8,0% (n=6)
	0	34,7% (n=26)
	AB	2,7 % (n=2)
Grupo Rh (n=75)	Negativo	10,7% (n=8)
	Positivo	89,3 % (n=67)
Idade (anos) <sup>1</sup> (n=77)	59 (15-82)	-

<sup>1</sup>Mediana (P25-P75)

Obtiveram-se amostras de 76 VB1, 75 VB2. As amostras de má qualidade foram excluídas do estudo. (tabela 3).

Tabela 3. Qualidade das amostras de via biliar.

	Qualidade				S/F (n)
	Boa (n)	Aceitável (n)	Viáveis (n)	Má (n)	
VB1	14	62	76	1	1
VB2	26	49	75	1	1

VB1-tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto, na *back table*; VB2- tecido de via biliar obtido após a reperusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; S/F: sem fragmento;

De um total de 77 transplantes avaliados, ocorreram EB em 31,2% (EA+ENA), sendo que as ENA representam 16,9% (tabela 4). Os casos descritos como NA correspondem a casos que foram excluídos por trombose da artéria hepática, incompatibilidade ABO e tempo de seguimento inferior a 6 meses (por falecimento ou retransplante).

Tabela 4. Resultados da análise de dados clínicos e imagiológicos relativos ao desenvolvimento de estenose

	Número absoluto	Porcentagem
S/E	41	53,2
EA	11	14,3
ENA	13	16,9
NA	12	15,6
Total	77	100,0

S/E: Sem estenose; EA: Estenose anastomótica; ENA: Estenose não anastomótica; NA: não aplicável

Nas biopsias do parênquima hepático pós reperfusão predominaram a presença de esteatose, presença de lesão de isquemia/reperfusão e ausência de hemossiderose (Apêndice A – tabelas 3-5).

### Análise histológica de VB1 e desenvolvimento de estenose

Pôde-se observar que o desenvolvimento de estenose depende da IP de VB1, sendo mais frequente nas ENA comparativamente com o grupo SENA (tabela 5). Não foi identificada relação estatisticamente significativa entre a HP, lesão do PVP, arteriolonecrose, NM e lesão das GPP de VB1 com o desenvolvimento de estenose (tabela 5).

Tabela 5. Comparação das lesões histológicas de VB1 e o desenvolvimento de estenose não anastomótica.

Lesão e grau de lesão		SENA (n=55)	ENA (n=14)	<i>p-value</i>
Hemorragia da parede ductal	0	100% (n=55)	100% (n=14)	NA
	1	-		
Lesão do plexo vascular peribiliar	0	100% (n=55)	100% (n=14)	NA
	1	-	-	
Arteriolonecrose	0	100% (n=55)	100% (n=14)	NA
	1	-	-	
Inflamação da parede ductal	0	96,4% (n=53)	85,7 % (n=12)	<b>0,020<sup>1</sup></b>
	1	3,6 % (n=2)	14,3% (n=2)	
Necrose mural	0	98,2% (n=54)	100% (n=14)	1,0 <sup>1</sup>
	1	-	-	
	2	1,8%(n=1)	-	
Lesão das glândulas peribiliares profundas	0	90,9% (n=50)	100% (n=14)	0,575 <sup>1</sup>
	1	9,1% (n=5)	-	
	2	-	-	

VB1: tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto; SENA: sem estenoses não anastomóticas; ENA: Estenose não anastomótica; Critérios histológicos de lesão da via biliar adaptados de Hansen et al e Op den Dries et al; <sup>1</sup>Teste Exato de Fisher

### Análise histológica de VB2 e desenvolvimento de estenose

A HP, IP e a lesão das GPP são mais frequentes no grupo que desenvolveu ENA (tabela 6). Não foi identificada relação estatisticamente significativa entre lesões histológicas de VB2 e o desenvolvimento de ENA. (tabela 6)

Tabela 6. Comparação das lesões de VB2 e o desenvolvimento de estenose.

Lesão e grau de lesão		SENA (n=54)	ENA (n=14)	<i>p-value</i>
Hemorragia da parede ductal	0	90,7 % (n=49)	85,7 % (n=12)	0,627 <sup>1</sup>
	1	9,3% (n=5)	14,3 % (n=2)	
Lesão do plexo vascular peribiliar	0	98,1 % (n=53)	100,0 % (n=14)	1,000 <sup>1</sup>
	1	1,9 % (n=1)	-	
Arteriolonecrose	0	100,0 % (n=54)	100,0 % (n=14)	NA
	1			
Inflamação da parede ductal	0	81,5% (n=44)	71,4% (n=10)	0,464 <sup>1</sup>
	1	18,5% (n=10)	28,6% (n=4)	
Necrose mural	0	87% (n=47)	92,9% (n=13)	0,844 <sup>2</sup>
	1	7,4% (n=4)	7,1% (n=1)	
	2	3,7% (n=2)	-	
	3	1,9% (n=1)	-	
Lesão das glândulas peribiliares profundas	0	87,0% (n=47)	78,6% (n=11)	0,418 <sup>1</sup>
	1	13,0% (n=7)	21,4% (n=3)	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; SENA: sem estenoses não anastomóticas; ENA: Estenose não anastomótica; NA: não aplicável; Critérios histológicos de lesão da via biliar adaptados de Hansen et al e Op den Dries et al; <sup>1</sup>Teste Exato de Fisher; <sup>2</sup>Teste Qui quadrado

### Comparação entre a histologia das amostras de VB1 e VB2

Todos os tipos de lesão, excepto a arteriolonecrose, são mais frequentes em VB2 (tabela 7).

Tabela 7. Comparação entre grau de lesão histológica das amostras de VB1 e VB2

		VB1 (n=76)	VB2 (n=75)
Hemorragia	0	100 % (n=76)	90,5% (n=67)
	1	-	9,5%(n=7)
Lesão vascular	0	100 % (n=76)	98,6 % (n=73)
	1	-	1,4% (n=1)
Arteriolonecrose	0	100 % (n=76)	100 % (n=74)
	1	-	-
Inflamação	0	94,7% (n=71)	79,7% (n=59)
	1	5,3% (n=4)	20,3% (n=15)
Necrose Mural	0	96% (n=72)	85,1% (n=63)
	1	1,3% (n=1)	10,8% (n=8)
	2	2,7% (n=2)	2,7% (n=2)
	3	-	1,4 % (n=1)
Lesão GPP	0	92% (n=69)	85,1% (n=63)
	1	6,7% (n=5)	14,9% (n=11)
	2	1,3% (n=1)	-

VB1:tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto; VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; Critérios histológicos de lesão da via biliar adaptados de Hansen et al e Op den Dries et al;

### Características histológicas do parênquima hepático e histologia de VB1

A IP, HP, lesão do PVP, arteriolonecrose, NM e lesão das GPP em VB1 são mais frequentes se houver esteatose, contudo não se verifica relação estatisticamente significativa (Apêndice B - Tabelas 1-4).

Não se verifica relação estatisticamente significativa entre a hemossiderose e as lesões de VB1 (Apêndice B – Tabelas 5-8)

A NM em VB1 surgiu mais frequentemente na presença de lesão de I/R (tabela 8). A lesão das GPP também apresenta essa tendência, com *p-value* a tender para a significância (tabela 9). Não se verifica relação estatisticamente significativa entre a lesão de I/R e as restantes lesões de VB1 (apêndice B – tabelas 9 -11).

Tabela 8. Comparação da lesão de isquemia/reperfusão nos grupos de necrose mural em VB1

		Necrose Mural			<i>p-value</i>
		0 (n=71)	1 (n=1)	2 (n=2)	
Lesão de I/R	Não	19,7% (n=14)	-	100% (n=2)	<b>0,022<sup>1</sup></b>
	Sim	80,3 % (n=57)	100,0 % (n=1)	-	

VB2- tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ; I/R: isquemia/reperfusão <sup>1</sup>Teste Qui quadrado



Tabela 9. Comparação da lesão de isquemia/reperfusão nos grupos de lesão das glândulas peribiliares profundas em VB1

		Lesão das glândulas peribiliares profundas			<i>p-value</i>
		0 (n=68)	1 (n=1)	2 (n=2)	
Lesão de I/R	Não	22,1% (n=15)	-	100% (n=2)	<b>0,082<sup>1</sup></b>
	Sim	77,9 % (n=53)	100,0 % (n=5)		

VB2- tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ;<sup>1</sup>Teste Qui quadrado

#### Características histológicas do parênquima hepático e histologia de VB2

Amostras de VB2 com HP e NM surgiram mais frequentemente para graus de hemossiderose mais elevados, com significância estatística (tabelas 10 e 11). A lesão das GPP também apresenta essa tendência, com *p-value* a tender para a significância (tabela 12). Não há relação estatisticamente significativa da hemossiderose com as restantes lesões em VB2. (Apêndice B – tabelas 12-17).

Não há relação estatisticamente significativa entre a esteatose e lesão de I/R e as lesões de VB2 (Apêndice B - tabelas 17-28).

Tabela 10. Comparação da hemossiderose nos grupos de hemorragia em VB2.

		Hemorragia da parede ductal		<i>p-value</i>
		0 (n=65)	1 (n=5)	
Hemossiderose	0	53,8% (n=35)	40,0% (n=2)	<b>0,006<sup>1</sup></b>
	1	26,2% (n=17)	40,0% (n=2)	
	2	12,8% (n=9)	-	
	3	6,2% (n=3)	20,0% (n=1)	
	4	-	-	

VB2- tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ;<sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 11. Comparação do grau de hemossiderose nos grupos de necrose mural em VB2.

		Necrose mural				<i>p-value</i>
		0 (n=58)	1 (n=8)	2 (n=2)	3 (n=1)	
Hemossiderose	0	55,9% (n=33)	37,5% (n=3)	50,0% (n=1)	-	<b>&lt;0,001<sup>1</sup></b>
	1	23,7% (n=14)	62,5% (n=5)	-	-	
	2	13,6% (n=7)	-	-	100%(n=1)	
	3	6,8% (n=4)	-	-	-	
	4	-	-	50,0%(n=1)	-	

VB2- tecido de via biliar obtido após a reperusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ;<sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 12. Comparação da hemossiderose nos grupos de lesão das glândulas peribiliares profundas em VB2.

		Lesão das glândulas peribiliares profundas		<i>p-value</i>
		0 (n=60)	1 (n=10)	
Hemossiderose	0	52,5% (n=31)	60,0% (n=6)	<b>0,075<sup>1</sup></b>
	1	30,5% (n=18)	10,0% (n=1)	
	2	10,2% (n=7)	20,0% (n=2)	
	3	6,8% (n=4)	-	
	4	-	10,% (n=1)	

VB2- tecido de via biliar obtido após a reperusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ;<sup>1</sup>Teste Qui quadrado

### Lesões histológicas de VB1 e VB2 e tempos de isquemia

Não se identificou associação estatisticamente significativa na relação entre o TIF0 e as lesões de VB1 (Apêndice B – tabelas 32-34).

As amostras de VB2 com maior grau de lesão do PVP e das GPP apresentaram um aumento TIQ2 (tabela 13), com *p-value* a tender para a significância. Regista-se que quando há maior grau de IP, lesão GPP, HP, NM, o TIQ1 é mais prolongado, ainda que sem significância estatística (Apêndice B – tabelas 29-31). Não se observaram tendências nem diferenças estatisticamente significativas entre os restantes tempos de isquemia e as alterações histológicas VB2 (Apêndice B – tabelas 29-31).

Tabela 13. Comparação do TIQ 2 e a lesão do plexo vascular peribiliar e lesão das glândulas peribiliares profundas em VB2.

	Lesão do plexo vascular peribiliar			Lesão das glândulas peribiliares profundas		
	0	1	<i>p-value</i>	0	1	<i>p-value</i>
TIQ2 <sup>1</sup>	47 ± 17 (n=63)	46 ± 14 (n=3)	<b>0,096<sup>2</sup></b>	46 ± 17 (n=63)	53 ± 11 (n=10)	<b>0,076<sup>2</sup></b>

TIQ2, tempo de isquemia quente 2; VB2- tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; <sup>1</sup>Média ± DP; <sup>2</sup>Teste Mann Whitney

## Discussão e Conclusão

As EB, nomeadamente as ENA, são uma complicação frequente no pós transplante hepático, aumentando o consumo de cuidados de saúde, estudos radiológicos, procedimentos invasivos, eventos infecciosos e necessidade de retransplante.<sup>1,2,14,15</sup>. Neste estudo, obteve-se uma incidência de ENA de 16,9% num total de 32,1% EB na UTHPA, verificando-se a diminuição de EB (38,1% em 2017<sup>3</sup>) à custa da redução da taxa de EA.

A maioria das estenoses relacionadas com alterações isquémicas surgem nos primeiros doze meses após o transplante ao passo que as lesões imuno-mediadas provocam estenose após o primeiro ano de transplante<sup>6</sup>. Na UTHPA, o tempo mediano para a ocorrência de ENA é de 27 semanas, superior às 17 das EA<sup>3</sup>, razão pela qual foi dado um tempo de observação mínima de 6 meses. Excluíram-se casos em que houve trombose da artéria hepática e incompatibilidade ABO tendo em conta que as estenoses associadas derivam provavelmente da trombose ou da causa imunológica, respetivamente, não sendo primariamente influenciado pelas lesões histológicas da VB<sup>16</sup>.

Alguns estudos referem como fatores para o desenvolvimento de ENA o aumento do tempo de isquémia fria e quente<sup>17</sup>, a imunogenicidade (incompatibilidade ABO, hepatite autoimune e colangite esclerosante primaria e citomegalovírus)<sup>17</sup>, as alterações da biópsia do parênquima hepático<sup>18</sup>, o uso de vasopressores<sup>19</sup>, o dador de coração parado<sup>20</sup> e idade avançada do dador<sup>21</sup>, pelo que algumas destas variáveis foram analisadas neste estudo. Estudos anteriores nesta unidade avaliaram alguns destes fatores<sup>3,22</sup> e para este selecionaram-se os tempos de isquémia e as alterações da biópsia do enxerto para avaliarmos o seu impacto nas lesões das VB.

Neste estudo, registou-se que o desenvolvimento de ENA depende da IP da VB1 ( $p\text{-value}=0,020$ ), sendo mais frequente nas ENA comparativamente ao grupo SENA. Isto pode indicar que a IP presente na via biliar durante o TIF pode ser um fator que predispõe ao desenvolvimento de ENA. Esta inflamação pode dever-se a patologia prévia nativa da VB do dador, manipulação durante a colheita, consequência da isquémia fria ou da preservação do órgão. Estudos descrevem que a presença de IP em VB2 se associa a VB que não desenvolvem EB, constituindo assim uma função protetora<sup>10</sup>. Na nossa série, a IP em VB2 é mais frequente que em VB1 (20,3 % versus 5,3 %) e não se associa estatisticamente à formação de ENA. De forma a verificar a importância desta variável, poder-se-á avaliar cada caso individualmente e averiguar a

progressão da IP no período pré e pós reperfusão, relacionando com o desenvolvimento de EB.

Em VB2 graus superiores de HP, IP e de lesão das GPP foram mais frequentes nas ENA, embora sem significância estatística. As GPP estão localizadas na camada fibromuscular dos ductos biliares, representando um aglomerado de células pluripotentes e são uma fonte importante de multiplicação celular quando ocorre lesão do epitélio biliar<sup>23</sup>, facto comprovado imuno-histoquímicamente pela atividade do Ki67 e da citoqueratina 19<sup>5,24</sup>. Os colangiócitos são células sensíveis à anóxia e à reperfusão/oxigenação, produzindo espécies reativas de oxigénio que lesam as membranas e causando morte celular<sup>25,26</sup>. Apesar de durante a isquémia fria e a isquémia quente ocorrer lesão dos ductos com perda do epitélio luminal, estas alterações não parecem levar por si só à formação de ENA. O PVP e as GPP parecem ser fundamentais neste processo<sup>9,27,28</sup>. Há estudos que sugerem também o papel das células ovais dos canais de Herring e das células estaminais derivadas da medula óssea como potencialmente envolvidas<sup>29,30</sup>. Neste sentido, futuros estudos incidentes nestas estruturas poderão trazer novas informações e o uso de fatores de crescimento de células estaminais mesenquimais poderá ser uma opção de forma a estimular a regeneração das GPP<sup>9</sup>.

A comparação das características entre a lesão histológica VB1 e VB2 permitiu identificar um aumento do grau de lesão entre as duas amostras, explicável pelo facto de VB1 apenas estar exposta ao efeito deletério da isquémia fria, enquanto que à VB2 se acrescenta lesão condicionada pela isquémia quente e ainda a I/R. Seria de esperar que o grau de lesão histológica de VB2 apresentasse alguma associação positiva com o desenvolvimento de ENA, o que não se verificou nesta série. No entanto, este trabalho apenas pesquisou a associação isoladamente entre um tipo de lesão histológica e o *outcome*. Algumas amostras de VB apresentavam mais que um tipo de lesão; a análise utilizando o somatório dos vários tipos de lesões em cada amostra (e não apenas a pesquisa de associação com cada parâmetro individualmente) deve ser alvo de estudo.

As amostras de VB1 com maior lesão de NM e das GPP surgiram mais frequentemente na presença de lesão de I/R (*p-value*=0,022 e 0,082, respetivamente), conferindo significância estatística a trabalhos desenvolvidos neste centro<sup>22,31</sup>.

Verificou-se que graus de esteatose mais elevados na biópsia hepática são mais frequentes em todos os tipos de lesões de VB1 e HP de VB2, ainda que sem significância estatística. Um estudo deste centro identificou que os doentes com EB tinham uma frequência de esteatose superior aos S/E<sup>3</sup>. A esteatose é descrita como

fator limitante da microcirculação local e pode contribuir para o desenvolvimento de ENA<sup>32</sup>.

Graus mais elevados de hemossiderose na biópsia hepática surgiram associados a graus mais elevados de NM em VB2 ( $p\text{-value}=0,030$ ). A NM é uma das lesões histológicas descritas como significativamente associadas ao desenvolvimento de ENA<sup>8</sup>. Um estudo anterior realizado neste centro demonstrou que a incidência de hemossiderose era superior no grupo com EB<sup>3</sup>. O ferro é um agente oxidativo e a sua acumulação intracelular conduz ao recrutamento de células inflamatórias que podem comprometer a viabilidade celular dos colangiócitos<sup>33</sup>. Assim, poderá existir relação entre a hemossiderose e o desenvolvimento de ENA por intermédio da sua associação à NM, razão pela qual deve ser motivo de estudo.

Verificou-se ainda que as amostras de VB2 com maior grau de lesão do PVP ( $p\text{-value}=0,096$ ) e das GPP ( $p\text{-value}=0,076$ ) apresentaram um aumento do TIQ2, sugerindo a influência do prolongamento do TIQ2 no grau de lesão destas estruturas. Este achado é corroborado por estudos deste centro<sup>3,22,31</sup> e por outro estudo que associa o aumento do TIQ2 à incidência de complicações biliares<sup>34</sup>. Regista-se que quando há maior grau de IP, lesão GPP, HP, NM, o TIQ1 também parece ser mais prolongado. A manutenção do fígado em baixa temperatura é descrita como um fator essencial para diminuir o metabolismo celular e preservar os tecidos<sup>27</sup>. Têm sido realizados vários estudos de forma a minimizar o impacto dos tempos de isquémia nas lesões da VB. As máquinas de perfusão de fígados dos dadores, ao reduzirem a quantidade de lesão nas VB, podem reduzir a incidência de ENA<sup>27</sup>. A máquina de perfusão *ex-situ* pode ser usada no dador antes do armazenamento do fígado a frio, após o armazenamento a frio e antes da implantação e durante todo o período de preservação<sup>27,35</sup>. Com a perfusão pré armazenamento no frio protege-se o tecido biliar e hepático antes de o submeter à isquémia fria, podendo reduzir subseqüentes lesões que resultam dos tempos de isquémia. O uso de máquina de perfusão hipotérmica oxigenada associou-se a uma maior preservação de PVP<sup>36</sup> e a menor incidência de EB<sup>37</sup>. Estudos realizados com máquina de perfusão normotérmica em modelos experimentais sugerem resultados também mais favoráveis comparativamente com a refrigeração estática<sup>38,39</sup>.

A avaliação histológica das amostras foi feita segundo características morfológicas. Existem estudos que referem a utilização do rácio sais biliares/fosfolípidos<sup>27</sup>, a concentração biliar de bicarbonato e de glicose<sup>27,40</sup>. Assim, o uso de marcadores metabólicos e imunológicos pode ser complementar e permitir interpretações mais fundamentadas, não obstante os custos acrescidos que possam acarretar.

Quanto às mais-valias deste estudo podemos referir o facto de a amostra ser homogénea e de se tratar de um estudo unicêntrico enquadrado num estudo prospetivo, com equipas cirúrgicas definidas e cujas amostras foram analisadas por dois anatomopatologistas experientes. Além disso, todos os enxertos são de dadores pós morte cerebral com coração a bater e todas as amostras foram preservadas com a mesma solução, sendo que na maioria dos casos, as amostras (VB1 e VB2) foram obtidas sequencialmente.

Quanto às limitações do estudo podemos afirmar que o tamanho da amostra, nomeadamente quando estratificada, dificultou a interpretação estatística dos dados e pode influenciar a sua significância. A contínua atualização da base de dados e o desenvolvimento de estudos com maiores amostras poderá conduzir a interpretações mais fidedignas. A falta de centralização dos dados relativos à transplantação hepática no CHUC pode ter levado à ocorrência de viés de informação, com *missings* em dados do enxerto e do dador, bem como das VB e das biópsias do parênquima do enxerto. A presença de artefactos nas preparações histológicas pode ter interferido na avaliação das amostras.

Em suma, podemos concluir que as lesões histológicas das VB podem ter impacto na formação de ENA. A colheita de amostras de VB é um procedimento de execução simples e possivelmente com viabilidade económica, tornando o seu uso sistemático na transplantação hepática exequível e permitindo assim a identificação de lesões de risco para o desenvolvimento de ENA. A identificação de fatores preditivos de ENA seria uma ferramenta importante para deteção precoce desta complicação pós transplante, de forma a garantir um *follow up* mais rigoroso e individualizado com intervenção terapêutica mais adequada.

Estudos adicionais são fundamentais para melhor compreender estas alterações e assim poder minimizar a morbimortalidade associada.

## **Agradecimentos**

À Dr<sup>a</sup> Dulce Diogo, por ter despertado em mim o interesse pela cirurgia e pela transplantação hepática bem como pelo apoio, competência e orientação constantes.

Ao Dr<sup>o</sup> Rui Caetano Oliveira, pelo estímulo científico e pelo auxílio na interpretação histológica.

À Dr<sup>a</sup> Cristiana Marques, pelo inestimável apoio na análise estatística.

Aos doentes transplantados, por possibilitarem a realização do estudo.

À minha família, por tudo.



## Referências Bibliográficas

1. Vries Y De, Meijnefeldt FA Von, Porte RJ. Department of Surgery SC. *BBA - Mol Basis Dis*. 2017.
2. Mourad MM, Algarni A, Lioussis C, et al. Aetiology and risk factors of ischaemic cholangiopathy after liver transplantation. 2014;20(20):6159–6169.
3. Leite DC, Cortes DHSD FE-B. Estenoses biliares anastomóticas e não anastomóticas pós transplante hepático : análise de fatores etiológicos. 2017.
4. Gastaca M. Biliary Complications after Orthotopic Liver Transplantation : A Review of Incidence and Risk Factors. *Transplant Proc*. 2012;44(6):1545–1549.
5. Sutton ME, Lisman T, Porte RJ. Protection of Bile Ducts in Liver Transplantation : Looking Beyond Ischemia. 2011;92(4):373–379.
6. Verdonk RC, Buis CI, Jagt EJ Van Der, et al. Nonanastomotic Biliary Strictures After Liver Transplantation , Part 2 : Management , Outcome , and Risk Factors for Disease Progression. 2007:725–732.
7. Cursio R, Gugenheim J. Ischemia-Reperfusion Injury and Ischemic-Type Biliary Lesions following Liver Transplantation. 2012;2012:15–17.
8. Op Den Dries S, Westerkamp AC, Karimian N, et al. Injury to peribiliary glands and vascular plexus before liver transplantation predicts formation of non-anastomotic biliary strictures. *J Hepatol*. 2014;60(6):1172–1179.
9. Karimian N, Op Den Dries S, Porte RJ. The origin of biliary strictures after liver transplantation: Is it the amount of epithelial injury or insufficient regeneration that counts? *J Hepatol*. 2013;58(6):1065–1067.
10. Hansen T, Hollemann D, Pitton MB, Otto G. Histological examination and evaluation of donor bile ducts received during orthotopic liver transplantation — a morphological clue to ischemic-type biliary lesion ? *Virchows Arch*. 2012:41–48.
11. Kleiner DE, Brunt EM, Natta M Van, et al. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. 2005:1313–1321.

12. Ali JM, Davies SE, Brais RJ, et al. Analysis of Ischemia / Reperfusion Injury in Time-Zero Biopsies Predicts Liver Allograft Outcomes. 2015:487–499.
13. Deugnier Y. Pathology of hepatic iron overload. 2007;13(35):4755–4760.
14. Wojcicki M. Biliary Tract Complications after Liver Transplantation : A Review. 2008:245–257.
15. Ab DV, Jj K, Ten L, Jr F, Rj P, Berg V Den. Impact of non-anastomotic biliary strictures after liver transplantation on healthcare consumption , use of ionizing radiation and infectious events. *Clin Transplant*. 2016:81–89.
16. Ostroff JW. Management of Biliary Complications in the Liver Transplant Patient. 2010;6(4):264–272.
17. Michelle L. DeOliveira, MD,\*† Wayel Jassem, MD, PhD,\* Roberto Valente, MD, MSc, PhD,\* Shirin Elizabeth Khorsandi, MD,\* Gregorio Santori, MD, PhD,‡ Andreas Prachalias, MD,\* Parthi Srinivasan, MD,\* Mohamed Rela, MD,\* and Nigel Heaton M. Biliary Complications After Liver Transplantation Using Grafts from Donors After Cardiac Death. *Ann Surg*. 2011;C(5):716–723.
18. Baccarani U, Isola M, GI A, Avellini C, Lorenzin D, Rossetto A. Steatosis of the hepatic graft as a risk factor for post-transplant biliary complications. 2010:631–635.
19. Guichelaar MMJ, Benson JT, Malinchoc M, Krom RAF, Wiesner H, Charlton MR. Risk Factors for and Clinical Course of Non- Anastomotic Biliary Strictures After Liver Transplantation. 2003:885–890.
20. Lee HW, Suh K, Shin WY, et al. Classification and Prognosis of Intrahepatic Biliary Stricture After Liver Transplantation. 2007:1736–1742.
21. Perfusion BP, Moench C, Moench K, Lohse AW, Thies J. Prevention of Ischemic-Type Biliary Lesions by Arterial. 2003;9(3):285–289.
22. Catarina Brandão, Dulce Diogo RO. Influência do dador e da isquemia na histologia da via biliar do enxerto em transplantação hepática. *Tese Mestr*. 2017:1–49.
23. Cardinale V, Wang Y, Carpino G, et al. Multipotent Stem/Progenitor Cells in Human Biliary Tree Give Rise to Hepatocytes, Cholangiocytes, and Pancreatic Islets. 2011:2159–2172.

24. Schlegel A, Graf R, Clavien P, Dutkowski P. Hypothermic oxygenated perfusion ( HOPE ) protects from biliary injury in a rodent model of DCD liver transplantation. *J Hepatol*. 2013.
25. 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*. 2012;10(2):79–89.
26. Martins RM, Teodoro JS, Furtado E, Rolo AP, Marques C, Tralhão JG. Recent insights into mitochondrial targeting strategies in liver transplantation. 2018;15.
27. Weeder PD, Rijn R Van, Porte RJ. Review Machine perfusion in liver transplantation as a tool to prevent non-anastomotic biliary strictures : Rationale , current evidence and future directions. *J Hepatol*. 2015.
28. Karimian N, Westerkamp AC, Porte RJ. Biliary complications after orthotopic liver transplantation. 2014:209–216.
29. Sutton ME, Dries S Den, Koster MH, Lisman T, Gouw ASH. Regeneration of human extrahepatic biliary epithelium : the peribiliary glands as progenitor cell compartment. *Liver Int*. 2012;(6):554–559.
30. Demetris AJ, Lunz JG, Specht S, et al. Biliary wound healing , ductular reactions , and IL-6 / gp130 signaling in the development of liver disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(22):3512–3522.
31. Diogo D, Pacheco C, Oliveira R, Martins R, Cipriano M, Tralhão J.G., Furtado E. The influence of ischemia time in injury of deep peribiliary glands of the bile ducts graft: a prospective study. *Transplant Proc*. 2019.
32. Frongillo F, Lirosi MC, Sganga G, et al. Graft Steatosis as a Risk Factor of Ischemic-Type Biliary Lesions in Liver Transplantation. *Transplant Proc*. 2014;46(7):2293–2294.
33. Gozzelino R, Arosio P. Iron Homeostasis in Health and Disease. *Int J Mol Sci Rev*. 2016:1–14.
34. Wang M, Jin Z, Chen D, Li X, Zhao X, Fan H. Risk factors of severe ischemic biliary complications after liver transplantation Ming-Feng. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2011;10(4):374–379.

35. Rougemont O De, Lehmann K, Clavien P. Preconditioning , Organ Preservation , and Postconditioning to Prevent Ischemia- Reperfusion Injury to the Liver. *LIVER Transplant*. 2009:1172–1182.
36. op den Dries S, Sutton ME, Karimian N, de Boer MT, Wiersema-Buist J et al. Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion Prevents Arteriolonecrosis of the Peribiliary Plexus in Pig Livers Donated after Circulatory Death. *PLoS ONE* 9. 2014;9(2).
37. Guarrera J V, Henry SD, Samstein B, Guarrera J V. Hypothermic Machine Preservation in Human Liver Transplantation : The First Clinical Series. *AmericanJournalofTransplantation*. 2010;10:372–381.
38. Liu Q, Nassar A, Farias K, et al. Sanguineous Normothermic Machine Perfusion Improves Hemodynamics and Biliary Epithelial Regeneration in Donation After Cardiac Death Porcine Livers. *LIVER Transplant* 20. 2014:987–999.
39. Boehnert MU, Yeung JC, Bazerbachi F. Normothermic Acellular Ex Vivo Liver Perfusion Reduces Liver and Bile Duct Injury of Pig Livers Retrieved After Cardiac Death. *Am J Transplant*. 2013:1441–1449.
40. Guzelian P, Boyer JL, Invest JC, Guzelian P, Boyem JL. Glucose reabsorption from bile . Evidence for a biliohepatic circulation . Find the latest version : Glucose Reabsorption from Bile EVIDENCE FOR A BILIOHEPATIC CIRCULATION. *J Clin Invest*. 1974;53(2):526–535.

## Apêndice A – Estatística descritiva da amostra.

Tabela 1. Variáveis dos dados.

		Frequências
Gênero (n=77)	Feminino	41,1 % (n=32)
	Masculino	58,9 % (n=45)
Grupo AB0 (n=77)	A	44,6% (n=35)
	B	8,1% (n=6)
	0	47,3% (n=36)
Grupo Rh (n=77)	Negativo	14,3 % (n=11)
	Positivo	85,7 % (n=66)

Tabela 2. Dimensões das amostras VB1, VB2

	Tamanho (cm)		
	Comprimento	Diâmetro máx.	Diâmetro mín.
VB1 (n=76)	0.5 (0.4-0.7) <sup>1</sup>	0.5 (0.4-0.6) <sup>1</sup>	0.3 (0.2-0.5) <sup>1</sup>
VB2 (n=75)	0,7 (0.4-1.15) <sup>1</sup>	0.5 (0,4-0,7) <sup>1</sup>	0,3 ± 0.15 <sup>2</sup>

VB1-tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto, na *back table*; VB2- tecido de via biliar obtido após a reperusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ; <sup>1</sup>Mediana (P25-P75) <sup>2</sup>Média ± DP

Tabela 3. Frequência relativa de esteatose

	Sem esteatose	Com esteatose <sup>1</sup>
Esteatose (n=75)	46,7 % (n=35)	53,3 % (n=40)

<sup>1</sup>Inclui microvacuolar, macrovacuolar e mista

Tabela 4. Frequência relativa de lesão de isquemia/reperfusão

	Sem lesão	Com lesão <sup>1</sup>
Lesão isquemia/reperfusão (n=75)	21,3% (n=16)	78,7 (n=59)

<sup>1</sup>inclui lesão mínima, ligeira, ligeira-moderada, moderada, marcada e severa

Tabela 5. Frequência relativa de hemossiderose

	0	1	2	3	4
Hemossiderose (n=72)	54,2% (n=39)	26,4% (n=19)	12,5% (n=9)	5,6 % (n=4)	1,4% (n=1)

## Apêndice B – Estatística inferencial

Tabela 1. Comparação da esteatose nos grupos de hemorragia, lesão do plexo vascular peribiliar e arteriolonecrose de VB1

		Hemorragia da parede ductal (n=74)	Lesão do plexo vascular peribiliar (n=74)	Arteriolonecrose (n=74)	<i>p-value</i>
Esteatose	Não	46,6% (n=34)	46,6% (n=34)	46,6% (n=34)	NA
	Sim	53,4% (n=40)	53,4% (n=40)	53,4% (n=40)	

VB1: tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto, na *back table*; NA: Não aplicável

Tabela 2. Comparação da esteatose nos grupos de inflamação de VB1 e VB2

		Inflamação da parede ductal					
		VB1			VB2		
		0 (n=70)	1 (n=4)	<i>p-value</i>	0 (n=60)	1 (n=13)	<i>p-value</i>
Esteatose	Não	47,8% (n=33)	25,0% (n=1)	0,618 <sup>1</sup>	45,0% (n=27)	53,8% (n=7)	0,5971
	Sim	52,2% (n=37)	75,0% (n=3)		55,0% (n=33)	46,2% (n=6)	

VB1: tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto, na *back table*; VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; <sup>1</sup>Teste Exato de Fisher;

Tabela 3. Comparação da esteatose nos grupos de necrose mural de VB1

		Necrose mural			
		0 (n=71)	1 (n=1)	2 (n=2)	<i>p-value</i>
Esteatose	Não	47,1% (n=33)	-	50,0% (n=1)	0,647 <sup>1</sup>
	Sim	52,9%(n=38)	100% (n=1)	50,0% (n=1)	

VB1: tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto, na *back table*; <sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 4 .Comparação da esteatose nos grupos de lesão das glândulas peribiliares profundas em VB1.

		Lesão glândulas peribiliares profundas			
		0 (n=68)	1 (n=5)	2 (n=1)	<i>p-value</i>
Esteatose	Não	42,5% (n=31)	40,0% (n=2)	100,0% (n=1)	0,535 <sup>1</sup>
	Sim	53,7% (n=37)	60,0% (n=3)	-	

VB1: tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto, na *back table*; <sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 5. Comparação da hemossiderose nos grupos de hemorragia, lesão vascular e arteriolonecrose em VB1

		Hemorragia, lesão vascular e arteriolonecrose	
		0 (n=71)	<i>p-value</i>
Hemossiderose	0	54,3% (n=38)	NA
	1	27,1% (n=19)	
	2	11,4% (n=9)	
	3	5,7% (n=4)	
	4	1,4% (n=1)	

VB1: tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto, na *back table*; NA: não aplicável;

Tabela 6. Comparação da hemossiderose nos grupos de inflamação em VB1.

		Inflamação da parede ductal		
		0 (n=68)	1 (n=3)	<i>p-value</i>
Hemossiderose	0	56,7% (n=36)	66,7% (n=2)	0,227 <sup>1</sup>
	1	28,4% (n=19)	-	
	2	11,9% (n=9)	-	
	3	4,3% (n=3)	33,3% (n=1)	
	4	1,5% (n=1)	-	

VB1: tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto, na *back table*; <sup>1</sup>Teste Qui quadrado



Tabela 7. Comparação da hemossiderose nos grupos de necrose mural em VB1.

		Necrose mural do ducto biliar			<i>p-value</i>
		0 (n=68)	1 (n=1)	2 (n=2)	
Hemossiderose	0	52,2% (n=35)	100% (n=1)	100% (n=2)	0,951 <sup>1</sup>
	1	28,4% (n=19)	-	-	
	2	11,9% (n=9)	-	-	
	3	6,0% (n=4)	-	-	
	4	1,5% (n=1)	-	-	

VB1: tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto, na *back table*; ;<sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 8. Comparação da hemossiderose nos grupos de lesão das GPP em VB1.

		Lesão das glândulas peribiliares profundas			<i>p-value</i>
		0 (n=65)	1 (n=4)	2 (n=1)	
Hemossiderose	0	52,3% (n=34)	75,0% (n=3)	100% (n=1)	0,977 <sup>1</sup>
	1	27,7% (n=18)	25,0% (n=1)	-	
	2	12,3% (n=8)	-	-	
	3	6,2% (n=4)	-	-	
	4	1,5% (n=1)	-	-	

VB1: tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto, na *back table*; ;<sup>1</sup>Teste Exato de Qui quadrado

Tabela 9. Comparação da lesão de isquemia/reperfusão nos grupos de hemorragia, lesão vascular e arteriolonecrose em VB1

		Lesão glândulas peribiliares profundas, lesão do plexo vascular e arteriolonecrose	
		0 (n=74)	<i>p-value</i>
Lesão de I/R	Não	21,6% (n=16)	NA
	Sim	78,4% (n=58)	

VB1: tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto, na *back table*; I/R: isquemia/reperfusão; NA: não aplicável

Tabela 10. Comparação da lesão de isquemia/reperfusão nos grupos de necrose mural em VB1

		Necrose Mural			<i>p-value</i>
		0 (n=71)	1 (n=1)	2 (n=2)	
Lesão de I/R	Não	19,7% (n=14)	-	100% (n=2)	<b>0,022<sup>1</sup></b>
	Sim	80,3 % (n=57)	100,0 % (n=1)		

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ; I/R: isquemia/reperfusão ;<sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 11. Comparação da lesão de isquemia/reperfusão nos grupos de lesão das glândulas peribiliares profundas em VB1

		Lesão das glândulas peribiliares profundas			<i>p-value</i>
		0 (n=68)	1 (n=1)	2 (n=2)	
Lesão de I/R	Não	22,1% (n=15)	-	100% (n=2)	<b>0,082<sup>1</sup></b>
	Sim	77,9 % (n=53)	100,0 % (n=5)		

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ;<sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 12. Comparação da hemossiderose nos grupos de hemorragia em VB2.

		Hemorragia		<i>p-value</i>
		0 (n=65)	1 (n=5)	
Hemossiderose	0	53,8% (n=35)	40,0% (n=2)	<b>0,006<sup>1</sup></b>
	1	26,2% (n=17)	40,0% (n=2)	
	2	12,8% (n=9)	-	
	3	6,2% (n=3)	20,0% (n=1)	
	4	-	-	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ;<sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 13. Comparação da hemossiderose nos grupos de lesão do plexo vascular peribiliar em VB2.

		Lesão do plexo vascular peribiliar		<i>p-value</i>
		0 (n=69)	1 (n=1)	
Hemossiderose	0	52,9% (n=36)	100,0% (n=1)	0,924
	1	27,9% (n=19)		
	2	11,8% (n=9)		
	3	5,9% (n=4)		
	4	1,5% (n=1)		

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ;<sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 14. Comparação da hemossiderose nos grupos de necrose mural em VB2

		Necrose mural				<i>p-value</i>
		0 (n=58)	1 (n=8)	2 (n=2)	3 (n=1)	
Hemossiderose	0	55,9% (n=33)	37,5% (n=3)	50,0% (n=1)	-	<b>&lt;0,001<sup>1</sup></b>
	1	23,7% (n=14)	62,5% (n=5)	-	-	
	2	13,6% (n=7)	-	-	100%(n=1)	
	3	6,8% (n=4)	-	-	-	
	4	-	-	50,0%(n =1)	-	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ;<sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 15. Comparação da hemossiderose nos grupos de arteriolonecrose em VB2.

		Arteriolonecrose	
		0 (n=69)	p-value
Hemossiderose	0	53,6% (n=37)	NA
	1	27,5% (n=19)	
	2	11,6% (n=9)	
	3	5,8% (n=4)	
	4	1,4% (n=1)	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; NA: Não aplicável

Tabela 16. Comparação da hemossiderose nos grupos de inflamação em VB2.

		Inflamação da parede ductal		p-value
		0 (n=58)	1 (n=12)	
Hemossiderose	0	52,6% (n=30)	58,3% (n=7)	0,206 <sup>1</sup>
	1	29,8% (n=19)	16,7% (n=2)	
	2	12,3% (n=8)	8,3% (n=1)	
	3	5,3% (n=3)	8,3% (n=1)	
	4	-	8,3% (n=1)	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ;<sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 17. Comparação da hemossiderose nos grupos de lesão das glândulas peribiliares profundas em VB2.

		Lesão das glândulas peribiliares profundas		p-value
		0 (n=60)	1 (n=10)	
Hemossiderose	0	52,5% (n=31)	60,0% (n=6)	<b>0,075<sup>1</sup></b>
	1	30,5% (n=18)	10,0% (n=1)	
	2	10,2% (n=7)	20,0% (n=2)	
	3	6,8% (n=4)	-	
	4	-	10,% (n=1)	

VB2- tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ;<sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 18. Comparação da esteatose nos grupos de hemorragia em VB2

		Hemorragia da parede ductal		p-value
		0 (n=66)	1 (n=7)	
Esteatose	Não	47,0% (n=31)	42,9% (n=3)	1,00 <sup>1</sup>
	Sim	53,0% (n=35)	57,1% (n=4)	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ; <sup>1</sup>Teste Exato de Fisher

Tabela 19. Comparação da esteatose nos grupos de arteriolonecrose em VB2

		Arteriolonecrose		p-value
		0 (n=73)		
Esteatose	Não	47,2% (n=34)		<b>NA</b>
	Sim	52,8% (n=39)		

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; NA: Não aplicável

Tabela 20. Comparação da esteatose nos grupos de lesão do plexo vascular peribiliar em VB2.

		Lesão do plexo vascular peribiliar		p-value
		0 (n=72)	1 (n=7)	
Esteatose	Não	46,5% (n=33)	100% (n=1)	0,466 <sup>1</sup>
	Sim	53,5% (n=39)	-	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ; <sup>1</sup>Teste Exato de Fisher

Tabela 21. Comparação da esteatose nos grupos de necrose mural em VB2.

		Necrose mural			<i>p-value</i>
		0 (n=62)	1 (n=8)	2 (n=2)	
Esteatose	Não	45,2% (n=28)	50,0% (n=4)	100,0% (n=2)	0,354
	Sim	54,81% (n=34)	50,0% (n=4)	-	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ; <sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 22. Comparação da esteatose nos grupos de lesão das glândulas peribiliares profundas em VB2.

		Lesão glândulas peribiliares profundas		
		0 (n=62)	1 (n=11)	<i>p-value</i>
Esteatose	Não	45,2% (n=28)	54,5% (n=6)	0,745 <sup>1</sup>
	Sim	54,8% (n=34)	45,5% (n=5)	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ; <sup>1</sup>Teste Exato de Fisher

Tabela 23. Comparação da lesão de isquemia/reperusão nos grupos hemorragia em VB2.

		Hemorragia		<i>p-value</i>
		0 (n=66)	1 (n=7)	
Lesão de I/R	Não	17,7% (n=13)	28,6% (n=2)	0,627 <sup>1</sup>
	Sim	80,3% (n=53)	71,4% (n=5)	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; I/R: isquemia/reperusão ; <sup>1</sup>Teste Exato de Fisher

Tabela 24 . Comparação da lesão de isquemia/reperfusão nos grupos de lesão do plexo vascular peribiliar em VB2

		Lesão do plexo vascular peribiliar		
		0 (n=72)	1 (n=1)	<i>p-value</i>
Lesão de I/R	Não	19,4 % (n=14)	100 % (n=1)	0,205 <sup>1</sup>
	Sim	80,6% (n=58)		

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; I/R: isquemia/reperfusão; <sup>1</sup>Teste Exato de Fisher

Tabela 25. Comparação da lesão de isquemia/reperfusão nos grupos de arteriolonecrose em VB2.

		Arteriolonecrose	
		0 (n=73)	<i>p-value</i>
Lesão de I/R	Não	20,5% (n=15)	NA
	Sim	79,5% (n=58)	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; I/R: isquemia/reperfusão; NA: não aplicável

Tabela 26. Comparação da lesão de isquemia/reperfusão nos grupos de inflamação em VB2

		Inflamação		
		0 (n=60)	1 (n=13)	<i>p-value</i>
Lesão de I/R	Não	21,7 % (n=13)	15,4%(n=2)	1,000 <sup>1</sup>
	Sim	78,3% (n=47)	84,6% (n=11)	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; I/R: isquemia/reperfusão; <sup>1</sup>Teste Exato de Fisher

Tabela 27. Comparação da lesão de isquemia/reperfusão nos grupos de necrose mural em VB2

		Necrose Mural			<i>p-value</i>
		0 (n=62)	1 (n=8)	2 (n=2)	
Lesão de I/R	Não	21,0% (n=13)	12,5 % (n=1)	50% (n=1)	0,649 <sup>1</sup>
	Sim	79,0% (n=57)	87,5 % (n=7)	50% (n=1)	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; I/R: isquemia/reperfusão; <sup>1</sup>Teste Qui quadrado

Tabela 28. Comparação da lesão de isquemia/reperfusão nos grupos de lesão das glândulas peribiliares profundas em VB2

		Inflamação		<i>p-value</i>
		0 (n=62)	1 (n=11)	
Lesão de I/R	Não	19,4 % (n=12)	27,3%(n=3)	0,686 <sup>1</sup>
	Sim	80,6% (n=50)	72,7% (n=8)	

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; I/R: isquemia/reperfusão; <sup>1</sup>Teste Exato de Fisher



Tabela 29. Comparação dos tempos de isquemia nos grupos de inflamação da parede ductal e de lesão das glândulas peribiliares profundas, em VB2.

	Inflamação da parede ductal			Lesão das glândulas peribiliares profundas		
	0	1	<i>p-value</i>	0	1	<i>p-value</i>
TIF <sup>1</sup>	327 (280-366) (n=59)	312 (289-351)(n=15)	0,604 <sup>2</sup>	320 (285-366) (n=63)	341 (276-366) (n=11)	0,861 <sup>2</sup>
TIQ1 <sup>1</sup>	49 (42-59)(n=59)	50 (42-75) (n=15)	0,608 <sup>2</sup>	48 (42-59) (n=63)	49 (42-75) (n=11)	0,277 <sup>2</sup>
TIQ2 <sup>1</sup>	43 (36-55)(n=59)	45 (34-56) (n=14)	0,955 <sup>2</sup>	43 (36-52) (n=64)	57 (42-60) (n=10)	<b>0,076</b> <sup>2</sup>
TTI <sup>1</sup>	382 (331-435)(n=58)	359(335-407)(n=15)	0,830 <sup>2</sup>	375 (334-437) (n=62)	404 (335-427) (n=11)	0,764 <sup>2</sup>

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperusão do segundo vaso e imediatamente antes da estenose biliar; TIF: tempo de isquemia fria; TIQ1, tempo de isquemia quente 1; TIQ2: tempo de isquemia quente 2; TTI, tempo total de isquemia; <sup>1</sup> Mediana (P25-P75) <sup>2</sup>Teste Mann Whitney

Tabela 30. Comparação dos tempos de isquemia nos grupos de hemorragia da parede ductal e lesão do plexo vascular peribiliar em VB2.

	Hemorragia da parede ductal			Lesão do plexo vascular peribiliar		
	0	1	<i>p-value</i>	0	1	<i>p-value</i>
TIF <sup>1</sup>	323 (289-366) (n=67)	295 (276-385) (n=7)	0,733 <sup>2</sup>	323 (287-366) (n=73)	285 (n=1)	0,374 <sup>2</sup>
TIQ1 <sup>1</sup>	48 (42-59) (n=67)	63 (42-75) (n=7)	0,160 <sup>2</sup>	49 (42-59) (n=73)	50 (n=1)	0,907 <sup>2</sup>
TIQ2 <sup>1</sup>	44 (36-55) (n=67)	44 (37-66) (n=7)	0,631 <sup>2</sup>	44 (36-55) (n=73)	21 (n=1)	<b>0,096</b> <sup>2</sup>
TTI <sup>1</sup>	377 (334-429) (n=66)	404 (335-476) (n=7)	0,639 <sup>2</sup>	380 (325-433) (n=72)	335 (n=1)	0,380 <sup>2</sup>

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar; TIF, tempo de isquemia fria; TIQ1: tempo de isquemia quente 1; TIQ2: tempo de isquemia quente 2; TTI, tempo total de isquemia; <sup>1</sup> Mediana (P25-P75) <sup>2</sup>Teste Mann Whitney

Tabela 31. Comparação dos tempos de isquemia nos grupos de necrose mural do ducto biliar, em VB2.

	Necrose mural do ducto biliar				<i>p-value</i>
	0	1	2	3	
TIF <sup>1</sup>	323 (280-366)(n=63)	322 (296-403)(n=8)	280 (276)(n=2)	325(n=1)	0,527 <sup>2</sup>
TIQ1 <sup>1</sup>	48 (51-59)(n=63)	51 (43-59)(n=8)	62 (50)(n=2)	113 (n=1)	0,257 <sup>2</sup>
TIQ2 <sup>1</sup>	43 (36-55)(n=64)	46 (42-55)(n=7)	43 (21)(n=2)	42(n=1)	0,918 <sup>2</sup>
TTI <sup>1</sup>	380 (331-429)(n=62)	370 (339-475)(n=8)	343 (335)(n=2)	438(n=1)	0,574 <sup>2</sup>

VB2: tecido de via biliar obtido após a reperfusão do segundo vaso e imediatamente antes da anastomose biliar ;TIF, tempo de isquemia fria; TIQ1, tempo de isquemia quente 1; TIQ2, tempo de isquemia quente 2; TTI, tempo total de isquemia, <sup>1</sup> Mediana (P25-P75); <sup>2</sup>Teste Mann Whitney

Tabela 32. Comparação do TIF0 nos grupos de inflamação da parede ductal e de lesão das glândulas peribiliares profundas em VB1.

	Inflamação da parede ductal			Lesão das glândulas peribiliares profundas		
	0 (n=54)	1 (n=4)	<i>p-value</i>	0 (n=54)	1 (n=4)	<i>p-value</i>
TIF0 <sup>1</sup>	232 (208-263)	218 (190-309)	0,759 <sup>2</sup>	232 (202-263)	240 (186-311)	0,842 <sup>2</sup>

VB1: tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto; TIF0, tempo de isquemia fria até colheita de VB1. <sup>1</sup> Mediana (P25-P75) <sup>2</sup> Teste Mann Whitney

Tabela 33. Comparação do TIF0 nos grupos de inflamação da hemorragia e de lesão plexo vascular peribiliar em VB1.

	Hemorragia da parede ductal		Lesão do plexo vascular peribiliar	
	0 (n=58)	<i>p-value</i>	0 (n=58)	<i>p-value</i>
TIF0 <sup>1</sup>	232 (202-263)	NA	232 (202-263)	NA

VB1: tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto; TIF0: tempo de isquemia fria até colheita de VB1. <sup>1</sup> Mediana (P25-P75); <sup>2</sup> Teste Mann Whitney; NA: não aplicável

Tabela 34. Comparação do TIF0 nos grupos de necrose mural e arteriolonecrose em VB1.

	Necrose mural			<i>p-value</i>	Arteriolonecrose	
	0 (n=56)	1 (n=1)	1 (n=2)		0 (n=58)	<i>p-value</i>
TIF0 <sup>1</sup>	235 (204-264)	230	190	0,507 <sup>2</sup>	232 (202-263)	NA

VB1: tecido de via biliar obtido durante a preparação do enxerto; TIF0: tempo de isquemia fria até colheita de VB1. <sup>1</sup> Mediana (P25-P75); <sup>2</sup> Teste Mann Whitney; NA: não aplicável

## Apêndice C – Critérios histológicos de biópsia pós reperfusão

Tabela 1. Critérios de classificação histológica da biópsia pós-reperfusão.

	Esteatose <sup>1</sup>	Lesão isquemia/reperfusão <sup>2</sup>	Hemossiderose <sup>3</sup>
0	ausente	ausente	0%
1	presente	presente	<5%
2	-	-	5-30%
3	-	-	31-60%
4	-	-	>60%

<sup>1</sup>Segundo Kleiner DE et al. <sup>2</sup>Segundo Ali JM et al. <sup>3</sup>Segundo Deugnier Y e Turlin B

## **Apêndice D – Abreviaturas**

BD1 – Bile duct 1

BD2 – Bile duct 2

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

DP – Desvio padrão

DPG – Deep peribiliary glands

EA – Estenoses anastomóticas

EB – Estenoses biliares

ENA – Estenoses não anastomóticas

GPP – Glândulas peribiliares profundas

HP – Hemorragia da parede ductal

I/R – Isquémia/reperfusão

IgG – Imunoglobulina G.

IP – Inflamação da parede ductal

NA – Não aplicável

NAS – Non-anastomotic strictures

NM – Necrose mural

PVP – Plexo vascular peribiliar

S/E – Sem estenose

SAP – Serviço de Anatomia Patológica

SENA – Sem estenose não anastomótica

TIF – Tempo de isquémia fria

TIQ1 – Tempo de isquémia quente

TIQ2 – Tempo de isquémia quente 2

TTI – Tempo total de isquémia

UTHPA - Unidade de Transplantação Hepática Pediátrica e do Adulto

VB1 – Via biliar 1

VB2 – Via biliar 2

WN – Wall necrosis