



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

**Valoración de la calidad del injerto hepático mediante la
determinación de patrones metabonómicos en biopsia del
hígado donante**

Miriam Cortés Cerisuelo

Médico especialista en Cirugía General y Aparato Digestivo

PROGRAMA DE DOCTORADO 040F:
991 CIRUGÍA Y SUS ESPECIALIDADES
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE VALENCIA

2014

TESIS DOCTORAL



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**Valoración de la calidad del injerto hepático mediante la
determinación de patrones metabonómicos en biopsia del
hígado donante**

Miriam Cortés Cerisuelo

Médico especialista en Cirugía General y Aparato Digestivo

PROGRAMA DE DOCTORADO 040F:
991 CIRUGÍA Y SUS ESPECIALIDADES
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE VALENCIA

2014

TESIS DOCTORAL

Esta tesis ha sido realizada en la Unidad Analítica Mixta del Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Fe, en la Unidad de Trasplante Hepático y Cirugía Hepatobiliopancreática del Hospital Universitario La Fe y en la Unidad de Trasplante del King's College Hospital en Londres.

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA
DEPARTAMENT DE CIRURGIA

**Valoración de la calidad del injerto hepático mediante la
determinación de patrones metabonómicos en biopsia del hígado
donante**

Miriam Cortés Cerisuelo
Médico especialista en Cirugía General y Aparato Digestivo

Directores de la tesis:

Agustín Lahoz Rodríguez

Eugenia Pareja Ibars

Eduardo García Granero



2014

D. AGUSTÍN LAHOZ RODRÍGUEZ, Doctor en Farmacia Investigador
Principal en el Instituto para la Investigación del Hospital Universitario
La Fe de Valencia,

CERTIFICA:

Que Doña MIRIAM CORTES CERISUELO ha realizado, bajo mi
dirección, el presente trabajo titulado “**Valoración de la calidad del
injerto hepático mediante la determinación de patrones
metabonómicos en biopsia del hígado donante**” presentado en el
Departament de Cirurgia de la Facultat de Medicina de la Universitat de
València para la obtención del grado de Doctor.

Fdo. Dr. Agustín Lahoz Rodríguez

D. EDUARDO GARCÍA GRANERO, Doctora en Medicina y Cirugía, Profesor adjunto del Departamento de Cirugía de la Facultat de Medicina de la Universitat de València, Facultativo especialista en Cirugía General y del Aparato Digestivo, Jefe de Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo del Hospital Universitario La Fe de Valencia,

CERTIFICA:

Que Doña MIRIAM CORTES CERISUELO ha realizado, bajo mi dirección, el presente trabajo titulado **“Valoración de la calidad del injerto hepático mediante la determinación de patrones metabonómicos en biopsia del hígado donante”** presentado en el Departament de Cirurgia de la Facultat de Medicina de la Universitat de València para la obtención del grado de Doctor.

Fdo. Dr. Eduardo García Granero

D^a. EUGENIA PAREJA IBARS, Doctora en Medicina y Cirugía,
Facultativo especialista en Cirugía General y del Aparato Digestivo,
adjunto de la Unidad Hepatobiliopancreática y Trasplante del Hospital
Universitario La Fe de Valencia,

CERTIFICA:

Que Doña MIRIAM CORTES CERISUELO ha realizado, bajo mi
dirección, el presente trabajo titulado “**Valoración de la calidad del
injerto hepático mediante la determinación de patrones
metabonómicos en biopsia del hígado donante**” presentado en el
Departament de Cirurgia de la Facultat de Medicina de la Universitat de
València para la obtención del grado de Doctor.

Fdo. Dra. Eugenia Pareja Ibars

A mi padres
A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Fue en tercero de Medicina en el Hospital Clinic de Barcelona hace ya unos cuantos años, cuando descubrí el mundo del Trasplante y de la Cirugía Hepática; desde ese momento supe a que quería dedicarme el resto de mi vida. Durante la residencia en el Hospital La Fe, fui acercándome todo lo que pude al mundo del Trasplante Hepático asistiendo extracciones e implantes, aunque supusiera perderme la última comida familiar antes de que a mi tío le diagnosticaran un cáncer de pulmón irreseccable o no estar junto a mi hermano cuando tuvo que ingresar de urgencias por una hemorragia digestiva masiva. Pero pese a todo, no podía dejar de pensar en el mundo del hígado; ya estaba acabando la residencia y lo que más deseaba era dedicarme al Trasplante Hepático...pero parecía imposible, tenía la impresión de que las subespecialidades en Medicina parecían cotos cerrados en los que necesitas invitación para entrar. Fue entonces cuando Pepe Mir y Eugenia Pareja me tendieron la mano y me propusieron solicitar la beca post-residencia en el Instituto para la Investigación junto con Bancaja y así poder trabajar con ellos. A Pepe Mir le agradezco que contara conmigo y que me diera una oportunidad, él me ha transmitido su pasión por el trasplante, a hacer las cosas lo mejor posible y a perseverar en tiempos difíciles. De Eugenia, que puedo decir, ha sido mi adjunta, mi tutora de la beca, mi directora de tesis y lo más importante, mi amiga. De ella he aprendido mucho pero sobre todo a no darme por vencida y a sacar energía de donde sea.

Con esta beca, también tuve la suerte de conocer al que se convertiría en mi tutor de tesis y también en un buen amigo, Agustín Lahoz, de quien he aprendido a disfrutar del mundo de la investigación pese a las dificultades y que para obtener resultados debemos estar dispuestos a errar por el camino todas las veces que sean necesarias. A Eugenia y a Agus les agradezco profundamente el haber confiado en mí, el haberme ayudado en todo lo que he necesitado pese a la distancia, su paciencia y en haberme hecho partícipe en un proyecto tan interesante como la aplicabilidad de la metabonomía al mundo del trasplante.

Gracias a la Dra. M^a José Gómez-Lechón y el Dr. Jose Vicente Castell por ayudarme a conseguir la beca post-residencia. Ha sido un honor trabajar y aprender de profesionales de la investigación como ellos, así como trabajar con otros miembros del Centro como Silvia, Ana, Sandra y Juan Carlos.

También agradezco al Dr. García Granero el aceptar ser tutor de esta tesis junto con Eugenia y Agus. Gracias a Fernando San Juan por ayudarme con la base de datos y aclararme todas las dudas. A César Fort por ayudarme en la realización de la base de datos y enseñarme a pensar como un informático.

A Ángel Moya, Paco Orbis y Fernando San Juan les agradezco su apoyo y compañerismo. A todos los miembros de la Unidad de Trasplante de la Fe, Eugenia, Ángel, Paco, Fernando, Eva y Rafa les doy las gracias por haberme transmitido sus conocimientos en cirugía. A Paqui, le agradezco que cuidara de mí y me animara a seguir.

Desde hace dos años y medio, tengo la suerte de trabajar en la Unidad de Trasplante del King's College Hospital donde poco a poco estoy cumpliendo mis sueños, sin embargo, la actividad frenética de este centro ha retrasado la consecución de esta tesis, que no hubiera sido posible sin el apoyo constante de Eugenia y Agus. Pero me gustaría agradecer a todos los consultantes de trasplante: Profesor Heaton, Hector Vilca-Melendez, Wayel Jassem, Andreas Prachalias, Parthi Srinivasan y Krish Menon el permitirme viajar a Valencia el tiempo necesario para poder finalizar este proyecto. También quería agradecer al Profesor Sanchez-Fueyo y a Hector Vilca-Melendez por permitirme proponerles como miembros del tribunal internacional.

También querría agradecer a mis grandes amigas Alegría, Romina, Isa, Lili, Marina, Lucky y Cristina por escucharme cuando lo necesitaba y por animarme a no darme por vencida cuando pensaba que era imposible.

Por último, quería agradecer a mi familia el darme todo sin pedir nada a cambio, el estar siempre ahí, el apoyarme persiguiendo sueños aunque suponga separarse en la distancia, que sé que es lo más difícil, pero sobre todo les agradezco que confíen en mí. Ellos han sido, son y siempre serán mi modelo a seguir.

Dejamos de temer aquello que se ha aprendido a entender

Marie Curie (1867-1934)

Índice

Abreviaturas	7
Resumen/Abstract	15
1. Introducción	
1.1. Inicios del trasplante hepático	27
1.2. Evolución de los donantes y ampliación de los criterios de selección	32
1.3. Disfunción del injerto: distintos criterios y nomenclatura	37
1.4. Factores de riesgo de disfunción del injerto relacionados con el donante, receptor y cirugía	44
1.4.1. Factores relacionados con el donante	45
1.4.2. Factores relacionados con el receptor	53
1.4.3. Factores relacionados con la cirugía	57
1.5. Metabonómica: concepto y aplicaciones	59
1.6. Hipótesis y objetivos	67
2. Material y métodos	
2.1. Análisis metabonómico de biopsias hepáticas de hígado donante	71
2.1.1. Población del estudio metabonómico	71
2.1.2. Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes	73
2.1.3. Clasificación de la evolución clínica del receptor tras el trasplante hepático	75
2.1.4. Características clínicas de la serie	76
2.1.5. Pauta de inmunosupresión en el receptor	80
2.1.6. Cirugía del trasplante	82

2.1.7.	Base de datos para la recogida de las variables relacionadas con los donantes, receptores y cirugía del trasplante para la realización del estudio	84
2.1.8.	Recogida de muestras de tejido hepático para el estudio del perfil metabonómico	88
2.1.9.	Procesamiento de las muestras	90
2.1.10.	Análisis UPLC-Q-ToF de las biopsias hepáticas	91
2.1.11.	Análisis multivariante de los datos del espectrómetro de masas	96
2.2.	Creación de un modelo continuo para la evaluación de la función del injerto tras el trasplante hepático	101
2.2.1.	Población a estudio para el desarrollo del modelo	101
2.2.2.	Recolección de los datos relacionados con el donante-cirugía-receptor	102
2.2.3.	Protocolo de recogida de las muestras de laboratorio	102
2.2.4.	Caracterización de las variables incluidas en el análisis estadístico	103
2.2.5.	Selección de las variables clínicas del receptor para desarrollar el modelo	106
2.2.6.	Modelización de las variables seleccionadas para evaluar la función inicial del injerto	107
2.2.7.	Análisis estadístico	107
3.	Resultados	
3.1.	Población del estudio metabonómico	111
3.2.	Características de la población del estudio metabonómico	113
3.3.	Seguimiento de la robustez instrumental y de la calidad de los datos	123

3.4.	Perfil metabólico de injertos hepáticos humanos	130
3.4.1.	Elucidando la firma metabólica de la función del injerto	130
3.4.2.	Visualización de las ruta metabólicas alteradas	136
3.4.3.	Desarrollo del modelo predictivo PLSDA	138
3.5.	Creación de un score continuo de valoración clínica de la función del injerto tras el trasplante	140
3.5.1.	Cohorte de estudio y descripción de la muestra	140
3.5.2.	Selección de las variables clínicas del receptor para modelizar la función del injerto	144
3.5.3.	Modelado de las variables seleccionadas para describir la función temprana del injerto	147
3.5.4.	Comparación del MEAF score con una clasificación categórica de la función temprana del injerto	150
3.5.5.	Relación entre el MEAF score y la supervivencia	151
3.5.6.	Factores de riesgo asociados a la aparición de disfunción temprana del injerto	152
3.6.	Relación entre el MEAF score y la firma metabonómica de la función del injerto	157
4.	Discusión	
4.1.	Disfunción del injerto	161
4.2.	Necesidad de un modelo que anticipe la función inicial del injerto hepático y valore su calidad	172
4.3.	Búsqueda de biomarcadores de calidad del injerto hepático mediante el perfilado metabonómico de la biopsia del hígado donante	178
4.4.	Valoración cuantitativa de la calidad del injerto	182

5. Conclusiones/Conclusions	185
6. Anexos	191
7. Bibliografía	203
8. Artículos derivados de la tesis	223
9. Índice de tablas y figuras.	231

Abreviaturas

ABREVIATURAS

Ac: anticuerpos

ADP: adenosina difosfato

AFP: alfa-fetoproteína

ALT: alanina aminotransferasa

AMP: adenosina monofosfato

AST: aspartato aminotransferasa

ATP: adenosina trifosfato

AUC: área bajo la curva (area under the curve)

ACV: accidente cerebral vascular

BA: ácidos biliares

Bb: bilirrubina

CMV: citomegalovirus

CV: validación cruzada (cross validation)

D: donante

DCD: donante tras muerte cardiaca

DM: diabetes mellitus

DPO: días post-operatorios

DRI: donor risk index

DS: desviación estándar

EAD: early allograft dysfunction

EBV: virus de Epstein-Barr

ECD: donante con criterios expandidos (extended criteria donor)

ECDF: función de distribución empírica acumulativa

ESI: ionización por electrospray

FDR: false discovery rate

FXR: receptor farnesoide X

GC: cromatografía de gases

GSK: glucógeno sintasa quinasa (glycogen synthase kinase)

HBc Ac: anticuerpos anticore contra la hepatitis B

HBs Ac: anticuerpos de superficie de la hepatitis B

HBs Ag: antígeno de superficie de la hepatitis B

HCC: carcinoma hepatocelular

HDA: hemorragia digestiva alta

HILIC: cromatografía de interacción hidrofílica (hydrophilic interaction chromatography)

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia (high performance liquid chromatography)

HTA: hipertensión arterial

ICG: verde de indocianina

IGF: función inmediata del injerto

IMC: índice de masa corporal

INR: ratio normalizado internacional (international normalized ratio)

IPF: pobre función inicial (initial poor function)

IQ: índice de Quick

I/R: isquemia/reperfusión

IS: estándar interno (internal standard)

JNK: quinasa c-Jun N-terminal (c-Jun N-terminal kinase)

LC: cromatografía líquida

LDH: lactato deshidrogenasa

LysoPCs: lisofosfatidilcolina

LysoPEs: lisofosfatidiletanolamina

LysoPLs: lisofosfolípidos

LT: liver transplant

LV: variable latente

MEAF: modelo para la función temprana del injerto (model for early allograft function)

MEGX: monoetilglicinexilidido

MELD: model for end stage liver disease

MVDA: análisis multivariante de los datos (multivariate data analysis)

MRS: espectrometría por resonancia magnética

MS: espectrometría de masas

m/z: relación masa/carga

ONT: Organización Nacional de Trasplantes

PBE: peritonitis bacteriana espontánea

PCs: fosfatidilcolinas

PEs: fosfatidiletanolaminas

PLs: fosfolípidos

PCA: análisis de componentes principales (principal component analysis)

PCR: parada cardiorrespiratoria

PDF: disfunción primaria (primary dysfunction)

PLS: regresión por mínimos cuadrados o proyección de estructuras latentes

PLSDA: regresión por mínimos cuadrados análisis discriminante

PNF: fallo primario (primary non-function)

PT: tiempo de protrombina (prothrombin time)

Q²: bondad de predicción

QC: control de calidad (quality control)

Q-ToF: cuadrupolo tiempo de vuelo (quadrupole time of flight)

RI: importancia relativa

RMN: resonancia magnética nuclear

SRTR: registro científico de receptores de trasplante (scientific registry of transplant recipients)

R: receptor

R²: bondad de ajuste

RP: fase reversa (reverse phase)

RR: riesgo relativo

RSD: desviación estándar relativa

sPCA: análisis de componentes principales disperso (sparse principal component analysis)

SMs: esfingomielinas

TAA: tiempo de anastomosis arterial

TAS: tensión arterial sistólica

TCE: traumatismo craneoencefálico

TH: trasplante hepático

TIC: tiempo de isquemia caliente

TIF: tiempo de isquemia fría

TIPS: shunt portosistémico transyugular intrahepático

TOF: tiempo de vuelo (time of flight)

TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activado

Tr: tiempo de retención

UCH: unidad de concentrado de hemátíes

UCI: unidad de cuidados intensivos

UNOS: United Network for Organ sharing

UPLC: cromatografía líquida de alta resolución (ultra performance liquid chromatography)

UPFC: unidad de plasma fresco congelado

UW: universidad de Wisconsin

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VHC: virus de la hepatitis C

BSEP: bomba extractora de sales biliares (bile salt export pump)

Resumen/Abstract

RESUMEN

El trasplante de hígado (TH) constituye en el tratamiento de elección para las enfermedades hepáticas en estadio terminal, sin embargo, el desequilibrio entre el número de donantes y pacientes en lista de espera ha conducido a las diferentes unidades de trasplante a la utilización de injertos procedentes de donantes con criterios extendidos. Esta práctica, se ha traducido en una reducción de la tasa de mortalidad entre los pacientes en lista de espera, a expensas de un aumento de las complicaciones post-trasplante, como la disfunción temprana del injerto (EAD). Dicha complicación influye negativamente tanto en la evolución del paciente como del injerto después del TH y su incidencia se relaciona directamente con la calidad de hígado donante. Pese a ello, actualmente, sigue faltando una prueba o test fiable que evalúe la calidad del injerto hepático y permita predecir su funcionalidad. Con el objetivo de intentar solventar estos aspectos, proponemos la realización de un análisis metabonómico de tejido hepático del donante, que permitiría obtener un conjunto de biomarcadores de disfunción del injerto, que podrían estar relacionados con la calidad del injerto hepático y así, anticipar la función del órgano. Por esta razón, el primer objetivo de este proyecto consistió en la búsqueda de una firma metabonómica, obtenida a partir de biopsias de hígado de donantes, asociada con la EAD. Para llevar a cabo este objetivo, realizamos un análisis metabonómico mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida de las biopsias procedentes del hígado donante en el momento de la extracción.

Los injertos hepáticos de los que se obtuvo biopsia para el análisis metabonómico fueron clasificados en dos grupos, de acuerdo a su función en el receptor: i) pacientes con EAD, ii) pacientes con función inmediata del injerto (IGF). Con el objetivo de investigar la relación entre los perfiles metabonómicos

presentes en los hígados de los donantes antes del trasplante y su función en el receptor, realizamos un análisis multivariante de los datos, tratando de identificar el conjunto de biomarcadores asociados a EAD. Los principales cambios metabonómicos observados incluyeron un aumento significativo de los niveles de sales biliares, lisofosfolípidos, fosfolípidos, esfingomielinas y productos del metabolismo de la histidina. Así, las diferencias observadas en el perfil metabonómico entre los hígados de donantes antes del trasplante pudieron relacionarse con la calidad del injerto. Basándonos en estos biomarcadores, diseñamos un modelo predictivo de EAD, obteniendo una sensibilidad del 91% y una especificidad del 82%. Este modelo fue posteriormente validado con biopsias hepáticas de donantes diferentes a los utilizados para el diseño del mismo.

Una vez identificamos un perfil metabonómico en los hígados donantes capaz de predecir la EAD, echamos en falta la existencia de una clasificación clínica de EAD más precisa con el fin de poder correlacionar de un modo más exacto el perfil metabonómico del hígado donante con el grado de disfunción tras el TH. La función del injerto después del trasplante ha sido categorizada en la literatura general, en dos grupos EAD o no EAD, en función de variables clínicas cuyos puntos de corte se han escogido de manera arbitraria o bien en parámetros subjetivos como por ejemplo la encefalopatía. Estas discrepancias, crean serias dificultades al intentar comparar los resultados del TH entre los distintos hospitales. En consecuencia, las clasificaciones existentes hasta el momento actual son insuficientes para definir con exactitud el grado de disfunción hepática en el receptor tras el TH. Por lo tanto, el segundo objetivo de este proyecto consistió en el desarrollo de un modelo continuo para la evaluación temprana de la función del injerto al que llamamos “ model for early allograft function” (MEAF). Para ello, realizamos un estudio retrospectivo incluyendo 1.026 trasplantes hepáticos consecutivos pertenecientes a un mismo centro. Se

realizó un análisis multivariante de los datos con la finalidad de escoger aquellas variables postoperatorias más adecuadas para definir la EAD. La distribución de las variables clínicas seleccionadas en nuestra población fue modelada matemáticamente con el fin de asignar una puntuación para cada valor real de dichas variables. Por tanto, construimos un modelo basado en parámetros clínicos de fácil obtención (ALT, INR y bilirrubina), con el objetivo de puntuar la función hepática del injerto tras el TH entre 0 y 10. La puntuación MEAF mostró una asociación significativa con la supervivencia del paciente y del injerto a los 3, 6 y 12 meses tras el TH. Por otra parte, factores de riesgo bien reconocidos asociados a la disfunción del injerto y relacionados con el donante, receptor y la cirugía, se asociaron con una puntuación elevada del MEAF score (EAD). De este modo, variables como la esteatosis hepática y la edad en los donantes; los tiempos de isquemia fría y caliente así como el síndrome post-reperusión; la estancia hospitalaria y en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), el MELD score, el Child-Pugh, el índice de masa corporal (IMC) y la transfusión de plasma post-TH se asociaron a valores elevados del MEAF score, y por tanto a una EAD más severa.

El MEAF score puede ayudar a estandarizar los criterios diagnósticos de EAD y permitir la comparación de resultados clínicos del TH entre los diferentes centros de trasplante. Dicho score, muestra una asociación significativa con la evolución tanto del injerto como del paciente, y permite estimar la supervivencia del receptor según la puntuación obtenida. Valores elevados del MEAF score pueden alertar a los médicos que el paciente está en riesgo de sufrir complicaciones relacionadas con la disfunción del injerto y ayudar en la toma de decisiones sobre la posible necesidad de retrasplante. El MEAF score también puede ayudar en los estudios traslacionales que requieren una clasificación más precisa y objetiva de la función del injerto.

Nuestro tercer y último objetivo del trabajo fue estudiar la asociación entre el MEAF score y los niveles de los marcadores de EAD encontrados mediante el análisis metabonómico, lo que nos permitió asignar una puntuación reflejo de la calidad del injerto para cada hígado donante. Para ello, calculamos el MEAF score en cada uno de los receptores que recibieron los hígados de los que se obtuvieron las biopsias para el análisis metabonómico previamente descrito. El análisis multivariante mediante la regresión por mínimos cuadrados mostró una buena correlación entre el perfil metabonómico y el MEAF score calculado, permitiéndonos asignar una puntuación funcional de calidad entre 0 y 10 a cada hígado donante.

El enfoque propuesto puede convertirse en una herramienta clínica para la evaluación de la calidad del hígado donante, ya que al ser capaz de predecir la función del injerto antes del trasplante, nos puede ayudar en la decisión sobre aceptar o rechazar un órgano así como a mejorar su asignación a los receptores con el fin de maximizar el beneficio de la supervivencia. La firma metabonómica hallada también puede ser útil en la evaluación de los donantes con criterios expandidos u otras fuentes de injertos hepáticos, como los donantes a corazón parado, donde la apariencia macroscópica o examen histológico no es suficiente, en la mayoría de los casos, para valorar su idoneidad. Ello permitiría aumentar el pool de hígados donantes.

ABSTRACT

Liver transplantation (LT) has become the effective treatment for end-stage liver disease, however, the imbalance between the number of donors and patients on waiting list has led transplant units to use liver grafts from extended donor criteria. This practice has resulted in lower mortality rates among patients on waiting list at the expenses of an increasing post-transplant complications, such as early allograft dysfunction (EAD). This complication dramatically influences graft and patient outcome after LT and its incidence is strongly determined by donor liver quality. Nowadays, a reliable test to assess donor liver quality and to predict graft functionality is still lacking. For this purpose, a metabonomic analysis of donor liver tissue would provide us a set of graft dysfunction biomarkers, which could be related to donor liver quality and anticipate organ function. For this reason, the first aim of this project was to investigate whether there is a liver metabonomic biosignature obtained from donor liver biopsies associated with EAD. Thus, a comprehensive metabonomic profiling of donor liver biopsies collected before transplantation was performed by mass spectrometry coupled to liquid chromatography. Donor liver grafts were classified into two groups according to their function in the receptor in EAD or immediate graft function (IGF). Multivariate data analysis was used to search for the relationship between the metabonomic profiles present in donor livers before transplantation and their function in recipients identifying a set of liver graft dysfunction-associated biomarkers. Key changes include significantly increased levels of bile acids, lysophospholipids, phospholipids, sphingomyelins and histidine metabolism products, all suggestive of disrupted lipid homeostasis and altered histidine pathway. The remarkable metabonomic differences among donor livers before transplant can relate to their different quality based on these biomarkers, therefore, a predictive EAD model was built and further evaluated

by assessing different donor liver biopsies, yielding 91% sensitivity and 82% specificity.

Once we identified the metabonomic biosignature that accurately anticipates EAD, we missed the existence of a more accurate classification of EAD to establish a more precise association between the pattern of dysfunction-biomarker and the degree of EAD. Graft function after OLT has been usually categorized according to arbitrary pre-established clinical variables cut-offs or subjective parameters (e.g. encephalopathy) in patients with EAD or no-EAD. Such discrepancies make the comparisons of the results of LT among centers difficult in terms of recipients' clinical evolution and management. Existing classifications are insufficient to accurately grade recipients' liver function after LT. Therefore, the second aim in this project consisted on developing a continuous model for the early assessment of allograft function (MEAF).

Thus, a single-center retrospective study including 1026 consecutive liver transplants was performed. Multivariate data analysis was used to pick the most adequate postoperative variables for modeling EAD. The distribution of the selected clinical variables in our population was mathematically modeled in order to assign a score for each actual value. A model, based on easily obtainable clinical parameters (i.e., ALT, INR and bilirubin), which scores liver function from 0 to 10, was built. The MEAF score showed a significant association with patient and graft survival for 3, 6 and 12-month follow-up. Furthermore, well-recognized risk factors for graft dysfunction were associated with high MEAF score (EAD). Hepatic steatosis and age for donors; cold/warm ischemia times and post-reperfusion syndrome for surgery; ICU and hospital stays, MELD score, Child-Pugh, BMI and fresh frozen plasma transfusion for recipients were factors that associated significantly with EAD. The MEAF score may help standardize EAD diagnosis criteria, and can enable the comparison of the recipients' clinical outcome, treatments and clinical results among different

Transplant Centers. The model shows a significant association with both graft and patient outcome, and allows survival to be estimated according to each recipient's score. High score values may warn clinicians that a patient is at risk and can help them make decisions on potential retransplantation. The MEAF score may also help in translational studies that require a precise and objective graft function endpoint.

Our third and main goal was to assign a quality/function score for each donor liver, to this end the relationship between the EAD metabonomic biosignature and the MEAF score was studied. Thus, the MEAF score was calculated for each receptor who received a graft that was included in our formerly described metabonomic study. The PLS analysis showed a good correlation between the metabonomic profile of the liver biopsies with the calculated score, thus allowing us to assign a quality/function score, ranging from 0 to 10, to each donor liver. The proposed approach may become a clinical tool for donor liver quality assessment, as anticipating graft function before transplant can facilitate making decisions about accepting or rejecting an organ and also improve donor allocation in order to maximize the survival benefit. This metabonomic biosignature may also be helpful in evaluating "*extended criteria donors*" or other sources of liver organs, such as donors after cardiac death, where macroscopic appearance or histological examination does not suffice in most cases to decide their suitability and it will probably increase the pool of donors

1. Introducción

1.1. Inicios del trasplante hepático

El trasplante hepático ortotópico constituye desde hace más de 25 años (1), el tratamiento de elección de las enfermedades hepáticas crónicas en estadio terminal así como de la hepatitis aguda fulminante en las que otros tratamientos médicos o quirúrgicos han fracasado.

El primer trasplante experimental de órganos descrito en la literatura fue realizado con éxito por *Emerich Ullmann* (2), quien realizó a principios del siglo XX, en Viena, un autotrasplante del riñón en un perro desde su localización anatómica al cuello. Posteriormente en 1955, surge la primera referencia de un trasplante hepático experimental en perros, realizado por *Welch* (3) quien implanta el hígado en una posición heterotópica; pero fue *Canon* (4) un año después quien consiguió en la misma especie y por primera vez, implantar el órgano en una posición ortotópica en la Universidad de California y quien ya especuló respecto al importante papel del rechazo en el fracaso de la función hepática. De la misma manera, el trasplante hepático (TH) experimental fue desarrollado principalmente por dos grupos de trabajo de Estados Unidos: *Moore et al.*(5) en Boston y *Starzl et al.* (6) en Denver desde comienzos de los años 50 siendo el rechazo del órgano, la causa de muerte y de pérdida del injerto más frecuente. Con el uso de azatioprina y suero antilinfocitario como agentes inmunosupresores se obtuvieron supervivencias a largo plazo en este tipo de trasplante experimental. La obtención de estos resultados y tras evidenciar la eficacia de la combinación prednisona-azatioprina en injertos renales, se llevó a cabo el primer intento de trasplantar un hígado en humanos. Fue el 1 de marzo de 1963 cuando el *Dr. Thomas Starzl* realizó el primer trasplante hepático en Denver (7) .

1. Introducción

Tras los primeros 8 trasplantes no se consiguió una supervivencia superior a los 23 días por lo que el programa se suspendió temporalmente (8). Tras un período de estudio profundizando en distintos aspectos como las alteraciones de la coagulación, el control de la hemorragia, los mecanismos isquemia-reperusión y la inmunosupresión, se logró un aumento en la supervivencia del trasplante experimental (9-12). Todas estas líneas de investigación, propiciaron que finalmente, el 23 de Julio de 1967 *Starzl* lograra tras realizar un TH en una niña afecta de un hepatocarcinoma, aunque al final falleciese por diseminación metastásica de su enfermedad con una supervivencia de 13 meses (13). En Europa, sin embargo, no fue hasta el 2 de mayo 1968 cuando se llevó a cabo el primer TH con éxito por *Sir Roy Calne*, en la Universidad de Cambridge (14). A él se unieron más tarde otros equipos europeos en Hannover (*Pichlmayr et al.*, 1972) y París (*Bismuth et al.*, 1974) (15, 16).

Uno de los principales problemas en el desarrollo del TH fue el evitar el rechazo del injerto, empleándose inicialmente técnicas de irradiación corporal total que conllevaba a una aplasia medular total y en consecuencia a un aumento de la morbimortalidad. Posteriormente se introdujeron fármacos utilizados en tratamientos oncológicos tales como el metrotexato y la ciclofosfamida, cayendo en desuso por la aplasia medular producida (11). En 1967, *Starzl* emplea la combinación de la azatioprina con sueros antilinfocitarios y corticoides, obteniendo buenos resultados, sin embargo, todavía se navegaba según *Calne* entre el rechazo y la aplasia (11). De este modo el éxito del TH no llegó hasta que en 1976, *Borel* (17) descubre las propiedades inmunosupresoras de una droga obtenida del hongo *Tolyocladium inflatum* de la que investigaba sus propiedades antibióticas: la ciclosporina A. La ventaja de este nuevo fármaco era su actividad selectiva inhibiendo la población de linfocitos T colaboradores, lo suficientemente potente para evitar el rechazo pero sin afectar a otras líneas celulares a dosis inmunosupresoras. Dicho descubrimiento se ha considerado

1. Introducción

como el factor que más ha contribuido en el mundo del trasplante, siendo *Calne* (18) quien utilizó por primera vez este fármaco como inmunosupresor en los trasplantes, obteniendo unos resultados espectaculares, nunca antes alcanzados.

En España, el primer TH fue realizado por *Jaurrieta y Margarit* (19) en 1984 en el Hospital de Bellvitge. Posteriormente, durante la década de los 80, fue cuando múltiples centros en todo el mundo introdujeron dicho tratamiento en su arsenal terapéutico para los pacientes con enfermedades hepáticas en estadio terminal, siendo el 5 de enero de 1991 cuando se realizó el primer TH en el Hospital La Fe de Valencia (20).

Además de la necesidad de obtener buenos inmunosupresores, otro obstáculo en el mundo del TH fue la preservación del órgano desde su extracción hasta su implante, lo que no sólo limitaba el funcionamiento del órgano, sino la posibilidad de obtener donantes de lugares lejanos al hospital donde se iba a llevar a cabo el trasplante. Inicialmente, sólo se utilizaba suero o plasma para perfundir el injerto hasta su inmediato implante (8). *Calne y Pegg* (21) demostraron en 1963, que la perfusión de un riñón isquémico con sangre fría podía prolongar su preservación hasta 12 horas en un modelo de trasplante canino. Además del enfriamiento del injerto, otro de los objetivos que debía cumplir la solución de preservación era mantener las funciones del órgano durante el mayor tiempo posible, por lo que en 1969 *Collins et al.* (22) describió una solución de preservación que imitaba la composición del líquido intracelular consiguiendo con ello preservar los riñones hasta 30 horas, sin embargo, esta solución no era tan útil para preservar otros órganos como el páncreas, hígado o corazón debido a las diferencias metabólicas órgano-específicas de estos órganos con respecto al riñón.

1. Introducción

La modificación posterior de esta solución: Euro-Collins (23) tampoco consiguió incrementar las ventajas de la solución inicial en el campo de los trasplantes diferentes al renal. En 1987, *Belzer* (24, 25) introdujo la solución de preservación que lleva su nombre y también conocida como solución de la Universidad de Wisconsin (UW), que amplió el margen de seguridad de preservación de los órganos hasta las 24 horas. El desarrollo de los programas de TH y trasplante de páncreas a principios de los años ochenta, así como la introducción de la ciclosporina como principal inmunosupresor, reavivó el interés en la preservación de los órganos para el trasplante. En esos años, el tiempo máximo de conservación para hígado y páncreas era de 6-8 horas, habitualmente en solución Euro-Collins.

Otro de los factores que ha contribuido al desarrollo del TH ha sido la experiencia adquirida en el área de la cirugía, lo que ha permitido realizar modificaciones en la técnica inicialmente descrita por *Starzl* (7, 26). Determinadas técnicas quirúrgicas han sido modificadas, como la preservación de la vena cava o técnica del piggy-back (27) y otras han sido abandonadas como la reconstrucción de la vía biliar mediante colecistoduodenostomía (28). También se han incorporado técnicas nuevas como reducciones hepáticas o trasplantes segmentarios (29, 30), con el fin de adaptar el tamaño del injerto al del receptor; la bipartición hepática o el “Split liver” (31) que permite aprovechar un órgano para dos receptores; el donante vivo (29) para trasplantes segmentarios, en los que se evita la necesidad de donante cadáver por motivos de urgencia o ético-religiosos y el trasplante auxiliar (32), que consiste en trasplantar el nuevo órgano en una posición heterotópica u ortotópica, manteniendo el hígado enfermo y hasta que éste se recupere.

Junto con todos estos avances técnicos, también ha mejorado el manejo del paciente, tanto en el mismo acto quirúrgico como en el postoperatorio, gracias a los avances en los sistemas de ventilación mecánica, la monitorización

1. Introducción

cardiopulmonar, infusión rápida de fluidos y el recuperador celular; así como la aparición de nuevos fármacos inmunosupresores y antibióticos que han permitido un mejor control de las posibles complicaciones post-trasplante.

En España, desde el primer trasplante efectuado por *Margarit y Jaurrieta* (19) hasta diciembre del 2013, se han realizado 21.516 trasplantes en 27 centros, con una supervivencia equiparable a la del resto del mundo (33).

1. Introducción

1.2. Evolución de los donantes y ampliación de criterios de selección

El éxito terapéutico del TH ha conllevado un mayor número de indicaciones y por tanto un mayor número de pacientes susceptibles de beneficiarse de él, lo que ha supuesto un incremento de la demanda y en consecuencia un aumento del número de pacientes en lista de espera.

Según datos epidemiológicos de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) (33), durante el año 2013 se incluyeron 1457 pacientes en lista de espera, añadiéndose a los 639 que había a principios de año. Del total de 2095 pacientes pendientes de TH, se trasplantaron 1093, permaneciendo 667 en lista de espera, a finales del 2013 (**Figura 1**).

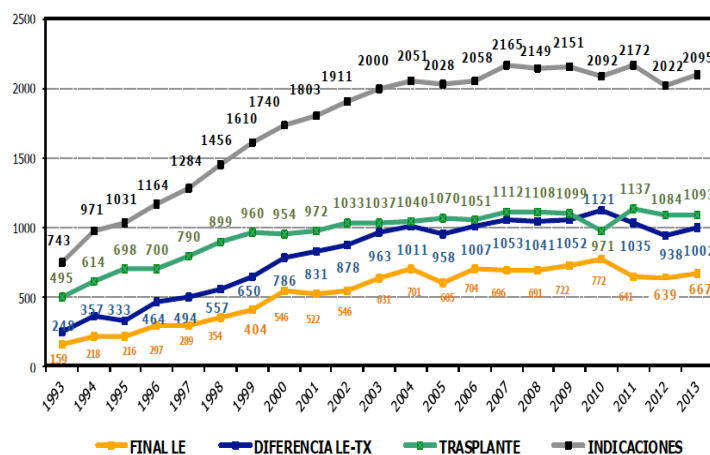


Figura 1. Evolución de la lista de espera del trasplante hepático. Gráfico procedente del dossier 2013 de la ONT.

Pese a que España es el país con mayor número de donantes en Europa, con una tasa de donación de 35.1 por millón de habitantes en el año 2013 seguido de Bélgica y Portugal, en los últimos 4 años se ha mantenido estable alrededor de 1600 donantes por año (**Figura 2**).

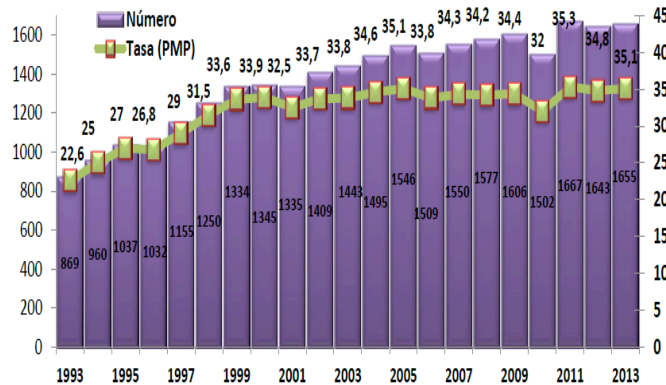


Figura 2. Número total y tasa anual (p.m.p.) de donantes de órganos. España 1993-2012. Gráfico procedente del dossier 2013 de la ONT.

De este modo, la gran desproporción entre la oferta y la demanda de órganos ha derivado en el intento de maximizar los donantes existentes así como a buscar nuevas fuentes tales como el donante vivo (34, 35), donante a corazón parado o el uso de un injerto hepático para dos donantes mediante técnicas de partición hepática (36). Debido a la alta tasa de donación en nuestro país, durante el 2013, el 93.4% de los injertos hepáticos provenían de donantes a corazón latiente con el diagnóstico de muerte encefálica, con una proporción minoritaria de donante vivo (2.1%) y de donantes a corazón parado o asistolia (2.6%).

Cabe destacar que el número de donantes óptimos ha ido disminuyendo a lo largo de los años, especialmente desde la entrada en vigor de la Ley Vial en el año 1993 que imponía la utilización del casco y que tuvo como consecuencia, una disminución muy importante del donante joven por traumatismo craneoencefálico (TCE) (**Figura 3**).

1. Introducción

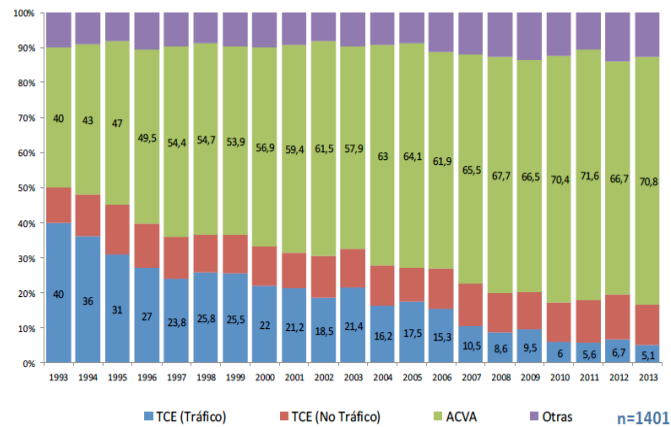


Figura 3. Causas de muerte de los donantes de hígado. Gráfico procedente del dossier 2013 de la ONT.

Además, las variaciones sociodemográficas de nuestra sociedad han producido un cambio tanto en las características de los donantes como de los receptores, con un aumento de la edad media (**Figura 4**) y de la esperanza de vida, así como una mayor prevalencia de enfermedades crónicas asociadas. De este modo, el prototipo de donante actual es el fallecido como consecuencia de un accidente cerebral vascular (ACV) y de edad comprendida entre los 50 y 70 años, representando en la actualidad el 66,7% de las donaciones en España (33).

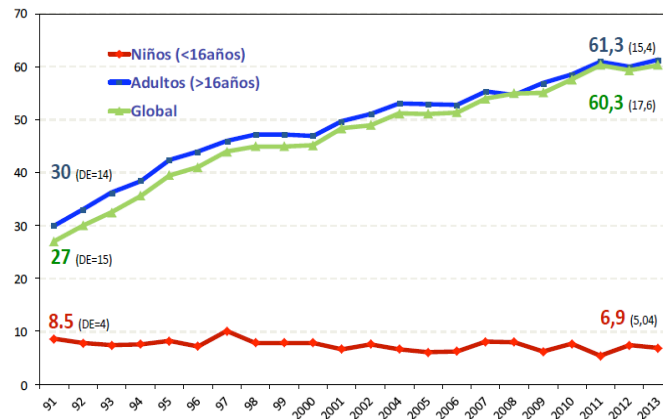


Figura 4. Edad media de los donantes de hígado. Gráfico procedente del dossier 2013 de la ONT.

En un análisis retrospectivo realizado en nuestra población de donantes, comparando sus características en dos periodos de tiempo entre enero de 1991 a junio de 1995 y febrero del 2004 a diciembre del 2005, se confirma este cambio en las características de la población. En dicho estudio se observa un aumento de la edad media de los donantes de 32.4 años a 52.3 entre el primer y el segundo periodo de tiempo, así como una mayor incidencia de enfermedades crónicas tales como diabetes, hipertensión arterial y afecciones cardiopulmonares en el grupo más añoso. Se describe el traumatismo craneoencefálico como la principal causa de muerte en el primer período y el accidente cerebrovascular en el segundo (37).

Vemos pues, como los criterios que definen la idoneidad de un órgano se han ido modificando gracias a la mejora en el mantenimiento del donante, la técnica quirúrgica y el seguimiento del paciente trasplantado, pasando a utilizarse órganos que anteriormente eran considerados como “marginales” (38). Del mismo modo, dichos criterios se han ido expandiendo con la finalidad de

1. Introducción

aumentar el número de donantes y disminuir o minimizar la mortalidad en lista de espera. El término “marginal”, “subóptimo” o “criterios expandidos” (ECD) hace referencia a donantes que por sus características clínicas, analíticas así como las características anatómico-patológicas del injerto son considerados de riesgo inmediato de disfunción o fallo primario después de su implante, así como a medio y largo plazo (39, 40). En este grupo de ECD se incluyen aquellos órganos que presentan alguna de las siguientes características: esteatosis macrovesicular superior al 40% (41), edad avanzada (42), anticuerpos anticore del virus B positivo, estancias prolongadas en la unidad de cuidados intensivos (UCI) (43), la hipernatremia (>150meq) (44), acidosis (43), tratamiento con dosis elevadas de fármacos vasoactivos, alcoholismo, hipertensión arterial (44), arteriosclerosis (45), hipotensión y/o parada cardiorespiratoria (46), infecciones y positividad para determinadas serologías (47), tiempo de isquemia prolongada (44, 48), donante vivo y los donantes a corazón parado también se incluyen en este concepto (48). La aceptación por los centros de trasplante de algunos de estos injertos procedentes de ECD ha permitido disminuir la mortalidad en lista de espera (49, 50), sin embargo su uso parece estar asociado con un incremento de la morbimortalidad; esto queda reflejado en un aumento de la incidencia de disfunción del injerto después del TH, lo cual afecta tanto a la supervivencia del injerto como del paciente (51).

1.3. Disfunción del injerto: distintos criterios y nomenclatura

La expansión de los criterios de aceptación de donantes ha permitido disminuir la mortalidad de los pacientes en lista de espera; sin embargo, ello puede repercutir y afectar la función inicial del injerto tras el trasplante y en consecuencia ser responsable de una disminución de la supervivencia tanto del injerto como del paciente (51). Esta función inicial se ve influenciada no sólo por factores relacionados con el donante sino también por las características del receptor, así como por los factores relacionados con la cirugía del trasplante (52). La mayoría de los injertos hepáticos tras el trasplante presentan cierto grado de disfunción, tanto desde el punto de vista clínico como analítico, Esta alteración de la función hepática varía desde formas leves hasta grados muy severos de disfunción, pudiendo llegar en ocasiones a ser irreversible (46, 53). Autores como *Greig et al.*, consideran que la función inicial del injerto constituye el mayor factor determinante de la evolución clínica del paciente tras el TH (52).

La etiopatogenia de los mecanismos que ocasionan la disfunción del injerto es desconoce; es sabido, tal y como demuestran las alteraciones de parámetros como las transaminasas y el tiempo de protrombina, que el hígado trasplantado sufre diferentes tipos de lesiones desde el momento previo a la extracción en un donante cadáver hasta su implante, durante los tiempos de isquemia fría y caliente así como tras la reperfusión (41). De tal modo, la lesión por isquemia-reperfusión (I/R) se refiere a la lesión celular y tisular resultante del restablecimiento del flujo sanguíneo y del oxígeno de un órgano que previamente se encontraba en situación de isquemia o anoxia y se considera la responsable de la disfunción el injerto hasta en un 10% de los casos (41, 53); esta lesión se ve magnificada en casos de donantes marginales (54), siendo la responsable de la mayor incidencia de disfunción del injerto en estos casos (51).

1. Introducción

Para poder establecer el diagnóstico de disfunción del injerto, deben haber sido descartadas previamente todas aquellas causas responsables de una disfunción secundaria del injerto, como la trombosis arterial o portal, una malrotación de las venas suprahepáticas, o bien, sepsis y el rechazo hiperagudo.

Uno de los principales problemas que se plantean en la actualidad reside en la falta de consenso que existe entre los distintos autores a la hora de definir el concepto de disfunción inicial o temprana del injerto tras el TH, unido al hecho de que existe una amplia nomenclatura para definir dicho evento. Todo ello da lugar a que existan distintos criterios que describen un mismo suceso, clasificando a los pacientes en diferentes grupos según el criterio seguido por el autor, resultando a su vez en distintas prevalencias para un mismo evento, lo que hace extremadamente difícil hacer conclusiones. De tal modo, en la literatura encontramos diferentes términos para definir la disfunción del injerto tales como pobre función inicial del injerto del inglés *initial poor function* (IPF) (55, 56), disfunción temprana del injerto del inglés *early allograft dysfunction* (EAD) (57, 58), disfunción primaria del injerto del inglés *primary dysfunction* (PDF) (53), fallo primario del inglés *primary non-function* (PNF) (46, 53) o fallo del injerto del inglés *graft failure* (56). Por ejemplo, *Ploeg et al.* (53) utilizan el término PDF que incluye IPF y PNF. Otros autores como *Olthoff et al.* (58) y *Deschenes et al.* (57) hablan de EAD que incluye el PNF.

Entre los autores que introducen el término “IPF”, hacen referencia a la situación clínica donde el injerto presenta cierto grado de disfunción pero que se recuperará durante la primera semana tras el TH (53, 57), sin embargo, el fallo primario o “PNF” hace referencia a la forma más severa e irreversible de disfunción del injerto e implica a aquellos injertos que no funcionan en el post-trasplante inmediato produciendo la muerte del receptor si no se retrasplanta (46, 53, 56, 59). El fallo primario está caracterizado por la presencia de hipoglucemia, coagulopatía, ausencia o poca producción de bilis, valores elevados o en

1. Introducción

aumento de transaminasas, coma, insuficiencia renal, y shock cardiogénico, con una incidencia estimada por los diferentes autores entre el 7 y el 10% (41, 46). Además de ésta entidad, considerada por la mayoría de los autores como un evento con entidad propia, nos encontramos con el inconveniente de muchas de las clasificaciones actuales en las que los autores no consideran diferentes grados de disfunción, teniendo en cuenta únicamente la existencia o ausencia de ésta (46, 57, 58). En consecuencia, clasificaran a pacientes con distintos grados de disfunción en el mismo grupo y por tanto, con una determinada evolución clínica esperada.

Por otro lado, si atendemos a los criterios utilizados para definir disfunción, la mayoría de los autores coinciden en considerar no sólo parámetros de detoxificación, como las transaminasas (AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanina aminotransferasa), sino también parámetros de síntesis, como el tiempo de protrombina (PT), el ratio normalizado internacional (INR) o la síntesis de bilirrubina, valorados en distintos días después del trasplante según el autor pero durante la primera semana. A su vez, también hay una falta de concordancia en los puntos de corte de las variables escogidas para la clasificación de disfunción. De esta manera, los puntos de corte para ALT y AST varían desde 1000 U/mL (60) a 3500 U/mL (55) medidos el día 1 tras el TH (46, 55), entre los días 1 a 3 (58, 60), del 1 al 7 (41, 57) o del 2 al 7 (53, 57) así como del día 2 al 10 tras el TH (61).

Es importante mencionar que mientras algunos autores sólo consideran los valores de ALT o AST el primer día tras el TH (46), otros consideran como indicadores relacionados con la función del injerto la existencia de encefalopatía (57), los niveles de amonio (53) y la producción de bilis (60). Ello puede conllevar una serie de inconvenientes: en primer lugar la determinación de la amonemia no se realiza de forma rutinaria en la mayoría de los centros, en segundo lugar, la colocación del tubo de Kehr en la anastomosis biliar ha caído

1. Introducción

en desuso imposibilitando contabilizar la producción de bilis tras el TH y por último, la subjetividad inherente al valorar los distintos grados de encefalopatía. La revisión bibliográfica realizada reflejada en la **Tabla 1**, pone de manifiesto la falta de consenso entre los criterios existentes que definen el concepto de disfunción tras el TH, así como cuáles son los parámetros óptimos que hay que tener en consideración para definir este evento post-trasplante.

1. Introducción

Autor	n	DPO	Parámetros para definir EAD	Incidencia EAD (%)
<i>Makowka</i> 1987 (55)	219	1	AST >3500 ALT >2500 TP >25	15
<i>Greig</i> 1990 (52)	83	2-7	AST >2500 TP anormal Poca producción de bilis	-
<i>Mor</i> 1992 (46)	365	1	AST o ALT >2000	13,2
<i>Ploeg</i> 1993 (53)	331	2-7	AST >2000 TP >16 NH ₄ >50	22
<i>Strasberg</i> 1994 (41)	-	1-7	AST >1500 TP >20	-
<i>Gonzalez</i> 1994 (60)	168	1-3	ALT >2500 TP (%) <60 Producción de bilis <40	27
<i>Deschênes</i> 1998 (57)	710	2-7	Bb >10 TP >17 Encefalopatía	23%
<i>Nanashima</i> 2002 (62)	93	1-3	AST/ALT >1500	18%
<i>Pokorny</i> 2005 (63)	734	5	AST >2500 Soporte transfusional >2d	13.1%
<i>Oloff</i> 2010 (58)	297	1-7	AST >2000 Bb ≥ 10 INR >1.6	23.2%

Tabla 1. Resumen de las diferentes definiciones de disfunción del injerto. ALT: alanina aminotransferasa (U/mL); AST: aspartato aminotransferasa; Bb: bilirrubina (mg/dl); DPO: días postoperatorios; EAD: *early allograft dysfunction*; INR: ratio internacional normalizado; IQ: índice de quick (%); Producción de bilis (ml); TP: tiempo de protrombina (s).

Algunas de las clasificaciones descritas intentan mejorar la falta de precisión a la hora de definir la disfunción del injerto creando más categorías. *Makowka at al.*

1. Introducción

(55) clasifican la función inicial del injerto en tres grupos: buena “good”, justa “fair” y pobre “poor”. Tres años más tarde, *Greig et al.* (52) también clasifican la función inicial del injerto añadiendo una categoría nueva: buena “good”, adecuada “adequate”, pobre “poor” y fallo del injerto “graft failure”. *González et al.* (60, 64) definen 3 categorías: buena función inicial del injerto *good early graft function*, disfunción moderada del injerto *moderate graft dysfunction* y disfunción severa del injerto *severe graft dysfunction*. Posteriormente, en el 2007 *Silberhumer et al.* (65) clasifican la función inicial del injerto en 4 grupos: buena y justa función del injerto *good and fair function*, pobre función y fallo primario del injerto *poor function* y *primary non function*.

Pese a los múltiples esfuerzos realizados para conseguir una clasificación más detallada de la función del injerto tras el trasplante, la ausencia de unos criterios unificados respecto a los puntos de corte, el periodo postoperatorio considerado y las diferentes variables evaluadas no lo han permitido. Ello pone en evidencia la falta de un sistema de clasificación, cuya puntuación permita clasificar a los pacientes en base al grado de disfunción del injerto tras el TH basado en criterios objetivos y fácilmente reproducibles. Por ello, nuestro estudio plantea la creación de un sistema continuo de puntuación que valore el grado de disfunción del injerto hepático tras el TH, con el fin de evitar los errores de clasificación relacionados con la existencia de puntos de corte para cada grado de disfunción. Se pretende con ello evitar catalogar erróneamente a los pacientes en grupos, ya que las clasificaciones existentes hasta la fecha dan lugar a que pacientes con un valor determinado de transaminasas puedan ser clasificados según el criterio empleado como presencia o ausencia de disfunción.

Nuestro objetivo es obtener información más precisa que con las clasificaciones actuales así como unificar los criterios diagnósticos de disfunción. De tal modo, este nuevo modelo permitirá no sólo realizar estudios comparativos entre diferentes Unidades de Trasplante y ayudar a los especialistas en la toma de

1. Introducción

decisiones sobre la viabilidad del injerto, pudiendo predecir la evolución clínica del paciente; sino también realizar estudios traslacionales, especialmente en la era de las “-ómicas”, donde se analizan múltiples biomarcadores con el fin de descifrar las bases moleculares que predisponen a los diferentes grados de disfunción del injerto.

1.4. Factores de riesgo de disfunción del injerto relacionados con el donante, receptor y cirugía

Como se ha mencionado anteriormente, la creciente demanda de injertos hepáticos ha obligado a expandir progresivamente los criterios en el momento de aceptar un posible donante con el fin de disminuir la lista de espera, lo que deriva en el uso de ECD. Dichos donantes se consideran marginales ya que su uso conlleva o implica un riesgo de disfunción del injerto o fallo primario del mismo, así como pérdidas tardías del injerto (51).

Los factores de riesgo relacionados con la aparición de disfunción del injerto pueden estar relacionados con el donante, el receptor o la cirugía. Muchos son los trabajos existentes en la literatura que evalúan estos factores. *Strasberg et al.* (41) clasifican los factores de riesgo para la aparición de disfunción del injerto en tres grupos: los que claramente se ha demostrado que afecta la evolución del injerto, los que posiblemente pueden ser factores de riesgo pero no hay una relación evidente con la evolución post-trasplante y aquellos factores de riesgo que no se ha demostrado que exista asociación con la aparición de EAD (**Tabla 2**).

1. Introducción

Clasificación de los factores de riesgo	VARIABLES DEL DONANTE	VARIABLES PERIOPERATORIAS	VARIABLES DEL RECEPTOR
Relación demostrada con la evolución	-TIF -Esteatosis -Edad	-TIC	No hay factores de riesgo con una correlación claramente demostrada
Posible relación con la evolución	-Estancia en UCI -Bioquímica -Drogas vasoactivas	-Reducción del injerto -Transfusión intraoperatoria de hemoderivados	-Retrasplante -Estado fisiopatológico -Insuficiencia renal
Sin relación demostrada con la evolución	-Causa de muerte -Variantes arteriales -Equipo extractor diferente al del implante -ABO -Raza -Insuficiencia respiratoria -Anatomía patológica	-Duración de la cirugía -Duración de la anestesia	-Edad -Género -Raza -Tipo de enfermedad hepática -Estado nutricional

Tabla 2. Factores de riesgo de disfunción del injerto tras el TH. TIC: tiempo de isquemia caliente; TIF: tiempo de isquemia fría; UCI: unidad de cuidados intensivos.

1.4.1. Factores relacionados con el donante

Tiempo de isquemia fría (TIF)

Se define como el tiempo transcurrido desde el inicio de la perfusión con solución de preservación en el donante hasta que el hígado es extraído del hielo previo a su implante. A pesar de que el TIF es inevitable para la realización de un TH se considera un factor de riesgo independiente de las lesiones del injerto por preservación y en consecuencia una de las principales causas de disfunción del injerto (59). De este modo, se considera que un TIF >30 horas es un riesgo absoluto para la aparición de PNF del injerto con la solución de Wisconsin (66), un TIF >12 horas supone un factor de riesgo relativo para la aparición de

disfunción del injerto (53, 67), y un tiempo de isquemia fría ≥ 14 horas supone un riesgo dos veces mayor de lesión del injerto por preservación resultando en mayor estancia hospitalaria, mayor riesgo de complicaciones biliares, especialmente estenosis tardías no anastomóticas así como menor supervivencia del injerto (53, 68, 69). *Ploeg et al.* (53) describieron una incidencia de hasta 7% de fallo primario cuando el TIF es inferior a 12 horas, frente a un 19% cuando es superior a las 12 horas. *Feng et al.* (48) definen un aumento del riesgo de disfunción del injerto del 1% por cada hora adicional de TIF.

Esteatosis hepática

La esteatosis es un hallazgo frecuente en los hígados donantes con una incidencia entre el 9 y el 26% (70, 71), pudiendo estar relacionada con factores tales como la edad, obesidad, diabetes, alcoholismo y con la nutrición parenteral (70, 72). En 1987, *Portman et al.* (73) advirtieron sobre el riesgo de utilizar hígados donantes con infiltración grasa. Principalmente, se pueden observar dos patrones histológicos: una infiltración difusa de vacuola pequeña o microesteatosis (74), o una combinación de ésta con vacuolas grandes o macroesteatosis (75, 76). *D'Alessandro et al.* (70) categorizaron el grado de esteatosis según la cantidad de grasa respecto a la proporción de hepatocitos en: mínima (<33%) moderada (entre 33% y 66%) y severa (>66%), describiendo esta última categoría factor de riesgo absoluto del fallo primario. *Adam et al.* (72), también clasificaron la esteatosis en tres grupos: leve, moderada y severa utilizando como puntos de corte el 30% y el 60%, describiendo una incidencia de PNF para las categorías moderada y severa del 13% frente a un 2.5% en los no esteatósicos, destacando también que la esteatosis moderada por si sola no implica una mala evolución del receptor, en cambio, cuando se combina con un mal estado general del paciente antes del trasplante los resultados son precarios (72). Otros estudios consideran que los injertos hepáticos con esteatosis moderada, presentarán durante los primeros días tras el trasplante cierto grado de

disfunción con aumento de los valores de las transaminasas así como mayor riesgo de sangrado (51).

Existen diferentes motivos por los que la esteatosis afecta a la calidad del injerto; por un lado la ocupación grasa del citoplasma del hepatocito aumenta el tamaño de éste produciendo obstrucción del sinusoides (77), también se ha demostrado en estudios experimentales en animales que los hígados grasos presentan menor capacidad tanto para almacenar ATP durante el periodo de isquemia fría como para restaurar dichos niveles después de la reperfusión (78). Además, hay que tener en cuenta que en este tipo de hígado existe disfunción de las células de Kupffer, la adhesión de los leucocitos está aumentada y se ha detectado una necrosis isquémica de las células endoteliales (79). De este modo, hígados con una esteatosis >60% no se deberían utilizar si no es como terapia puente en una situación de urgencia (71). Los hígados con macroesteatosis >30% han demostrado funcionar igual que los no grasos a no ser que se asocien a otros factores de riesgo del donante como por ejemplo la edad avanzada. En cambio, la microesteatosis no suele asociarse a un mayor porcentaje de disfunción del injerto, aceptándose en algunos grupos de trasplante una microesteatosis de hasta el 60% (76, 80).

Edad del donante

La edad del donante constituye uno de los factores que plantean más controversia. Inicialmente, una edad del donante superior a 50 años era considerado un factor de riesgo para disfunción del injerto, sin embargo, estudios posteriores han demostrado que aquellos hígados procedentes de donantes con edades mayores de 50 sin asociarse a otros factores de riesgo, se comportan igual que hígados procedentes de donantes jóvenes (46, 81, 82). En cambio, una edad del donante >70 años se ha asociado a una menor supervivencia del injerto y del paciente (83). *Feng et al.* (48) describen un

aumento progresivo del riesgo de disfunción cuando la edad del donante supera los 60 años.

Los hígados añosos suelen ser más pequeños, de coloración más oscura y con fibrosis capsular (84), sin embargo parecen ser inmunes al paso de los años ya que el hígado tiene mayor reserva funcional, mayor capacidad regenerativa y doble aporte sanguíneo que excede sus necesidades metabólicas (85). Se ha demostrado que estos hígados son más susceptibles a la lesión de las células endoteliales secundariamente a la isquemia fría y muestran menor síntesis de ATP después de la reperusión lo que puede influir en la capacidad regenerativa así como una menor función sintética (86). Pese a que la edad avanzada del donante por si sola, sin asociarse a otros factores de riesgo, no afectan la supervivencia del injerto y del donante, sí que presenta cierto grado de disfunción del injerto así como un patrón colestásico en los controles analíticos (87). Los estudios multivariantes han sido fundamentales para determinar la influencia de la edad del donante en la evolución post-trasplante ya que existen otras variables de confusión como el estado médico del receptor que pueden magnificar o infraestimar la importancia de la edad (52, 53, 88). Así, cuanto peor es el estado del paciente más evidente es la influencia de la edad (89).

Estancia en UCI

La influencia de una estancia prolongada en UCI sobre la funcionalidad del injerto parece estar relacionada con episodios de hipotensión en pacientes con estancias prolongadas, especialmente en aquellos con muerte cerebral que presentan inestabilidad hemodinámica, así como con estado de malnutrición (bajas reservas de glucógeno). *Cywes et al.* (90) demostraron que los hígados con depósitos de glucógeno repletos presentan mejor funcionalidad cuando se exponen a TIC prolongados. En esta línea, *Greig et al.* (52) describen tras la

realización de un análisis multivariante, como una estancia en UCI superior a 3 días constituye un factor de riesgo de disfunción, frente a otros estudios que no encuentran ninguna relación (46, 53). *Ploeg et al.* (53) encontraron significativa la estancia en UCI de más de 4 días en el estudio univariante pero no en el multivariante. *Mor et al.* (46) describieron un aumento de lesión hepatocelular cuando los donantes permanecían en la UCI más de 3 días, pero ello no afectaba a la evolución clínica del paciente.

Bioquímica del donante

Es difícil determinar la influencia de valores altos de transaminasas y de la bilirrubina en el donante ya que la mayoría de éstos suelen ser descartados. Alteraciones discretas de la función hepática no son factores de riesgo absolutos, incluso con valores elevados, si presentan tendencia al descenso (41) aunque no se han determinado los puntos de corte. *Avolio et al.* (91) describieron que los valores elevados de transaminasas y de sodio se relacionaban con la aparición de disfunción del injerto. *Greig et al.* (52) relacionaron los niveles de bilirrubina > 1.1 mg/dl con la aparición de disfunción. *Mor et al.* (46) no encontraron ninguna relación con la evolución clínica de los pacientes si los donantes presentan valores de AST>150 U/L o de ALT>100 U/L, así como valores de bilirrubina > 2mg/dl.

Otros autores apuntaron que una hipernatremia > 155mEq/L en el donante se asocia a un mayor porcentaje de disfunción del injerto (91, 92), constituyendo uno de los factores de riesgo más significativo para la disfunción, retrasplante o muerte del receptor antes de los 30 días. Valores elevados del sodio plasmático se han relacionado con estancias prolongadas en la UCI, con la diabetes insípida y con la reposición excesiva con suero fisiológico.

Inestabilidad hemodinámica y uso de drogas vasoactivas

La inestabilidad hemodinámica se define como un descenso de la presión arterial sistólica por debajo de 90 mmHg durante más de 15 minutos (46). Datos de la “United Network for Organ Sharing” (UNOS) muestran que aquellos órganos procedentes de donantes con episodios de hipotensión prolongada no se asocia a mayor riesgo de pérdida del injerto tras el trasplante (51). Existen controversias respecto a si la parada cardíaca reversible del donante afecta negativamente la calidad del injerto (93) o por lo contrario ejerce un efecto protector sobre éste (94). Dicho fenómeno, llamado isquemia-precondicionamiento se ha observado en cirugía hepática (95) pero no existe la suficiente evidencia sobre su efecto beneficioso en el TH (96). En un estudio reciente no se encontró relación entre la existencia de parada cardiorrespiratoria del donante y la disfunción del injerto, incluso cuando la parada sobrepasaba los 15 minutos de duración o cuando los valores de transaminasas triplicaban el límite de la normalidad, posiblemente relacionado con la estabilidad hemodinámica conseguida tras la parada (97). En dicho estudio como en otro publicado por *Wilson et al.* (98) tampoco se demostró un beneficio de la parada cardíaca sobre la evolución post-trasplante.

El efecto de los vasopresores en la funcionalidad del injerto está relacionado con su efecto en la reducción del flujo hepático. *Mor et al.* (46) destacaron que el uso de dopamina a dosis vasoconstrictoras por si mismo no es perjudicial si la presión sistólica permanece por encima de 90 mmHg, recomendando mantener estable la presión del donante monitorizando la presión venosa central utilizando productos sanguíneos y fluidos. No existe un acuerdo entre diferentes autores sobre a partir de que dosis de dopamina aumenta el riesgo de disfunción. *Mor et al.* (46) publicaron que dosis de dopamina $>15\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$ asociado a hipotensión están relacionadas con la aparición de disfunción del injerto. Otros autores como *Markmann et al.* (44) y *Mimeault et al.* (88) publicaron que dosis menores de dopamina ($10\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ y $>6\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ respectivamente) también se

relacionaban con la aparición de disfunción del injerto. *Mimeault et al.* (88) también relacionaron el uso de dopamina con otra droga vasoactiva con la mala evolución tras el trasplante.

Sexo

Un estudio realizado por la UNOS con datos entre 1992 y el 2000 mostró un aumento del riesgo de disfunción del injerto cuando había discordancia de sexo entre el donante y receptor respecto a cuando no la había del 12.2% versus 11.3% ($p=0.13$). *Rustgi et al* (99) publicaron que existía un riesgo aumentado de disfunción de hasta un 12,9% cuando un receptor varón recibía un injerto de un donante mujer, en cambio este riesgo desaparecía si un receptor mujer recibía un injerto de un donante varón, disminuyendo la incidencia de disfunción a 11.5% ($p=0.003$).

Causa de muerte del donante

La causa de muerte del donante constituye otro de los factores de riesgo para la aparición de disfunción hepática. *Mimeault et al.* (88) y *Greig et al.* (52) relacionaron el traumatismo cerebral con una peor evolución del paciente, sin embargo, *Ploeg et al.* (53) relacionaron la hemorragia cerebral como causa de muerte del donante con la peor evolución del receptor en un análisis univariante sin poder confirmarse en el análisis multivariante. *Feng et al.* (48) encontraron un aumento del riesgo de disfunción del injerto cuando la causa de muerte es el accidente cerebral vascular u otras causas con un riesgo relativo de 1.16 y 1.20 respectivamente, frente al trauma y la anoxia.

IMC del donante

El aumento de la prevalencia de la obesidad en la población general ha conllevado un aumento del número de donantes obesos, siendo ésta el mayor factor de riesgo de esteatohepatitis no alcohólica (100, 101). El hallazgo de esteatosis en el hígado donante es frecuente (75) requiriendo, en ocasiones, la realización de una biopsia que ayude en la decisión respecto a la viabilidad del injerto, ya que la severidad de la esteatosis en los hígados donantes aumenta a la vez que el índice de masa corporal (100, 102). *Yoo et al.* (102) analizaron la evolución post-trasplante en 22.303 receptores dependiendo del IMC del donante en los Estados Unidos, encontrando para todos los IMC incidencias similares de fallo primario y de tasa de retrasplante. Dicho autor tampoco encuentra una relación entre el IMC y la supervivencia del paciente o del injerto a corto y largo plazo.

Serología positiva del donante

La infección *de novo* por el virus de la hepatitis B suele transmitirse por medio del donante (103). El riesgo de transmitir el virus de la hepatitis B de un donante con el antígeno de superficie negativo pero con anticuerpos anticore positivos a un receptor con todos los marcadores negativos para la hepatitis B varía del 33 al 78% (104, 105). Por otro lado, el riesgo de transmisión de este virus en donantes con anticuerpos de superficie positivos y anticuerpos del core negativos es mínimo (103). Con la profilaxis adecuada, los pacientes que reciben injertos con anticuerpos anticore positivo siendo ellos negativos, no presentan alteración de la supervivencia del paciente y del injerto.

Los hígados de donantes con anticuerpos contra la hepatitis C deberían utilizarse únicamente en receptores con hepatitis C. Así, *Testa et al.* (106) publicaron una serie de 22 pacientes con hepatitis C que recibieron injertos de donantes con anticuerpos contra la hepatitis C observando tasas de recurrencia y supervivencia

similares respecto al grupo de pacientes cuyo donante tenía la serología negativa para la hepatitis C.

Otros factores

Otras variables como si el equipo extractor es el local o el hígado procede de otro centro (53) o la presencia de variantes anatómicas arteriales (46) no parecen tener influencia en la evolución post-trasplante. El sexo y el grupo étnico (53), así como la existencia de insuficiencia respiratoria del donante (46) tampoco han demostrado tener relación con la aparición de disfunción del injerto para algunos autores, en cambio, *Feng et al.*(48), describen un aumento del riesgo de disfunción cuando el hígado procede de donantes africano-americano.

1.4.2. Factores relacionados con el receptor

Retrasplante

El retrasplante no sólo se ha asociado a un mayor riesgo de disfunción del injerto según *Ploeg et al.* (53) sino también a una menor supervivencia al año de hasta el 48% (107, 108). La mayoría de las publicaciones sobre el retrasplante hepático estudian la supervivencia del injerto y del paciente a corto y medio plazo sin centrarse en la incidencia de disfunción del injerto tras el mismo. Pese a que no existe un consenso en el tiempo transcurrido entre el primer trasplante y el segundo, se distingue entre retrasplante temprano y tardío para comparar los resultados a corto y largo plazo. Las principales causas de retrasplante precoz son: el fallo primario del injerto, las complicaciones vasculares y el rechazo celular agudo incontrolable (109-111), frente a la recurrencia de la enfermedad y las complicaciones biliares (109, 111) como causas de retrasplante tardío. Un estudio reciente comparando los resultados tras el retrasplante precoz y tardío refiere que la causa más frecuente de pérdida del injerto a los 3 meses es la sepsis, sin encontrar un aumento de la incidencia de fallo primario (112).

Situación clínica del receptor

Los resultados del TH son peores cuanto peor es la situación clínica del receptor (89). *Mimeault et al.* (88) encontraron correlación entre la situación clínica del receptor y la disfunción del injerto, en cambio, en el estudio multivariante publicado por *Ploeg et al.* (53) no se demostró dicha correlación. Actualmente el sistema de priorización en lista de espera se establece según el MELD score del inglés *Model for End Stage liver disease* basado en parámetros analíticos del receptor antes del trasplante tales como la creatinina, la bilirrubina y el INR (113). Por lo que en ocasiones, ECD se utilizan en los pacientes más enfermos pudiendo afectar la supervivencia del injerto y del paciente. *Olthoff et al.* (58) describieron un aumento del riesgo de disfunción del injerto de hasta el 44% por cada 10 puntos de aumento del MELD. Cabe destacar que la influencia del estado clínico del receptor sobre la evolución tras el TH se hace más evidente cuando se asocia a otros factores de riesgo tales como edad avanzada del donante (89) o esteatosis del injerto (72). En cambio, *Amin et al.* (50) estudiaron el riesgo/beneficio de utilizar o no un ECD según la situación clínica del paciente, comparando el uso inmediato de dicho injerto procedente de un ECD frente al esperar a un hígado estándar. Los resultados mostraron un aumento de la supervivencia al año al utilizar dichos órganos de hasta un 50% en aquellos pacientes con un MELD score a partir de 20 frente al esperar.

Briceño et al. (54) publicaron el impacto del número de criterios extendidos en el donante en la función del injerto post-trasplante dependiendo del MELD del receptor y describieron que el daño por I/R en pacientes con MELD elevados (≥ 28) conllevaba un aumento de la disfunción del injerto en comparación a aquellos pacientes con MELD bajos. Definieron que la combinación de 3 o más criterios expandidos junto con un MELD igual o mayor a 29 afectaba la evolución del injerto y la aparición de disfunción tras el TH, remarcando que el MELD score es uno de los factores más potentes en el momento de determinar la

evolución. Otros autores también definen un aumento de la incidencia de disfunción del injerto cuanto mayor es el MELD, variando desde 23% para MELD scores entre 11 y 20 hasta el 88% para MELD entre 26 y 30 (50).

Función renal del receptor

La insuficiencia renal asociada al síndrome hepatorenal constituye otro de los factores de riesgo de disfunción del injerto relacionados con el receptor (53); dicha insuficiencia renal también se asocia a una mayor estancia en la UCI y a una mayor tasa de mortalidad del receptor (114). *Ploeg et al.* (53) relacionaron la disfunción renal con la aparición de disfunción del injerto cuando la creatinina es mayor de 2.5 mg/dl y la diuresis <500ml/24 horas.

Medidas antropométricas del receptor

Actualmente, el aumento progresivo de personas obesas deriva en un aumento de donantes y receptores con IMC elevados. Dicha situación, conlleva a un aumento de la esteatohepatitis no alcohólica como indicación de trasplante (115). El aumento de la morbilidad y mortalidad postoperatoria en los pacientes obesos está aumentada respecto a los que no lo son (116). Así, la obesidad del receptor (índice de masa corporal >30 Kg/m²) se ha relacionado con un aumento de complicaciones tras el TH como insuficiencia respiratoria y complicaciones vasculares sistémicas e infecciones (117), afectando negativamente la función del injerto. Algunas publicaciones han mostrado resultados excelentes tras el trasplante en pacientes con IMC >30 kg/m² (118) e incluso con IMC >35 kg/m² (119). En cambio, otros autores han demostrado un aumento de las complicaciones postoperatorias y de la mortalidad cuando el IMC es >30 kg/m². *LaMattina et al.* (120) publicaron en el 2012 la serie más larga de pacientes obesos trasplantados, encontrando un aumento de la tasa de complicaciones intraoperatorias así como un aumento de las necesidades transfusionales perioperatorias, mayor estancia en UCI, un aumento de las complicaciones

biliares, de infección o dehiscencia de la herida, de infección intrabdominal y de neumonía. Poco se menciona sobre la relación del IMC del receptor y la función del injerto. *Mor et al.* (46) describieron un aumento del grado de disfunción del injerto así como una mayor tasa de pérdida del injerto a los 3 meses tras el trasplante cuando el peso del donante es >100 kg, sin embargo, *LaMattina et al.* (120) no encontraron un aumento de la incidencia de fallo primario del injerto en los pacientes obesos ni tampoco de pérdida del injerto.

Edad del receptor

Debido al aumento progresivo de la esperanza de vida media en la población general, la demanda de órganos en la población mayor de 65 años aumenta progresivamente (121). La edad del receptor entre 55 y 65 años no se ha relacionado con un aumento del riesgo de disfunción del injerto respecto a los más jóvenes. Tampoco se ha encontrado relación entre el sexo o grupo étnico del receptor, etiología de la enfermedad hepática, clasificación de Child-Pugh y el estado nutricional con la aparición de disfunción del injerto (53).

1.4.3. Factores relacionados con la cirugía

Tiempo de isquemia caliente (TIC)

El TIC se define como el periodo desde que el hígado se saca del hielo hasta que se reperfundes vía portal, arterial o ambas a la vez. La duración del TIC es el que mayor impacto tiene en la función del injerto (122). El efecto perjudicial de este tiempo sobre la disfunción del injerto se debe al recalentamiento del hígado de 4°C a 37°C que se produce mientras se realizan las anastomosis (123) con una relación exponencial con el pico postoperatorio de transaminasas. Durante el TIC se produce un aumento de la liberación de mediadores inflamatorios que afectaran la morbilidad postoperatoria del receptor (124). *Mimeault et al.* (88) describieron el TIC como factor de riesgo de disfunción, en cambio *Ploeg et al.* (53) no encontraron dicha relación posiblemente debido a que los tiempos de isquemia en su estudio se encuentran entre los límites recomendados. En 1997, *Platz et al.* (122) relacionaron la mala función inicial del injerto con TIC mayores de 90 minutos. Posteriormente, *Totsuka et al.* (125) estudiaron el efecto del TIC en combinación con el TIF sobre la funcionalidad del injerto encontrando un aumento significativo de la pérdida del injerto cuando el TIC sobrepasa los 45 minutos sólo si el TIF es mayor a 12 horas.

Transfusión intraoperatoria de derivados sanguíneos

La mejora en las técnicas de preservación, en la anestesia, hemostasia (126-128) y la remisión precoz de los pacientes a los Centros de Trasplante, es el motivo por el que las pérdidas sanguíneas intraoperatorias han disminuido notablemente desde el principio del TH (129). Sin embargo, desde el uso del MELD para priorizar a los pacientes en lista de espera favoreciendo a aquellos más enfermos, se ha observado un aumento de las pérdidas sanguíneas durante el trasplante (130). Las transfusiones de hemoderivados favorece la aparición de sepsis bacteriana, lesión pulmonar aguda e inmunosupresión (131). De tal modo, la

1. Introducción

transfusión masiva de hemoderivados durante el trasplante se ha relacionado con mayor estancia hospitalaria, con una peor evolución postoperatoria (132) así como con una menor supervivencia tras el trasplante (130, 133, 134). *Rana et al.* (134) definieron la transfusión de 28 unidades de concentrados de hematíes o más como factor de riesgo directo de mortalidad. *Esmat Gamil et al.* (130) no encontraron relación entre el MELD y las pérdidas hemáticas durante el trasplante, sin embargo definieron que aquellos pacientes con un INR ≥ 1.6 tienen mayor riesgo de recibir transfusión masiva de hemoderivados (>6 unidades). La transfusión intraoperatoria puede reflejar desde hipotensión del receptor hasta dificultad de la cirugía. Diferentes autores han identificado como factores de riesgo de mayor sangrado quirúrgico, la duración de la hepatectomía y los antecedentes de cirugías abdominales previas (132, 134, 135). *Mimeault et al.* (88) no encontraron relación entre la transfusión intraoperatoria y la aparición de disfunción, en cambio, *Ploeg et al.* (53) sólo demostraron que la transfusión intraoperatoria de derivados sanguíneos era factor de riesgo de disfunción en el análisis univariante. Dicho hallazgo podría estar relacionado con el TIC, de hecho, *Rana et al.* (134) definen el TIC como factor de riesgo de pérdidas sanguíneas intraoperatorias especialmente tras la reperfusión del injerto, ya que la duración del TIC se relaciona directamente con la función inicial del injerto.

Temperatura de la solución de preservación

La temperatura a la que se mantiene el órgano en la solución de preservación se considera un factor a tener en consideración, de forma que la disfunción del injerto se describe con mayor frecuencia cuando la temperatura se mantiene por debajo de los 0° C que cuando se mantiene entre 2 ° C y 4 ° C (66).

1.5. Metabonomía: concepto y aplicaciones

La metabonomía, definida como el estudio dinámico de los cambios metabólicos que sufre un sistema biológico en respuesta a un estímulo (136), es una disciplina relativamente reciente con un auge creciente en diversas áreas relativas a la salud humana, tales como farmacología, toxicología, oncología, trasplante de órganos e identificación de biomarcadores pronósticos y diagnósticos de enfermedades (137-140). Al igual que otras “-ómicas”, la metabonomía, también conocida como metabolómica (141), permite plantear estudios holísticos en los que se pretende analizar el mayor número posible de metabolitos para posteriormente discriminar aquellos que aportan información útil y relevante dentro de un contexto biológico global. La metabonomía es capaz de proporcionar información sobre un gran número de moléculas de bajo peso molecular, menos de 1.5 kDa (metabonoma) presentes en un sistema biológico (célula, tejido u organismo) tales como: lípidos, pequeños péptidos, carbohidratos, cofactores, aminoácidos, etc. La metabonomía viene a completar las áreas de conocimiento previamente abarcadas por la genómica y la proteómica, mediante la medida cuantitativa de los metabolitos endógenos presentes en muestras biológicas de distinto origen (orina, plasma, células, tejidos,...). Frente al resto de “-ómicas” la metabonomía es quizás una aproximación más adecuada a la hora de estudiar las manifestaciones de una patología ya que el metabonoma presenta un carácter más dinámico que el transcriptoma o el proteoma y al encontrarse por debajo del último eslabón de la cadena de expresión génica, es un reflejo fiel e integrador tanto de las características genéticas del individuo como de su interacción con agentes externos (142, 143).

En la actualidad existen fundamentalmente dos plataformas para abordar un estudio metabonómico: la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS) generalmente acoplada a cromatografía líquida

1. Introducción

(LC) o a cromatografía de gases (GC). Cada una de las plataformas presenta ventajas e inconvenientes, aunque la realidad es que son complementarias. Entre las principales ventajas de la RMN destacan su robustez analítica, su naturaleza intrínsecamente cuantitativa, la poca manipulación de la muestra, su naturaleza no destructiva y la capacidad de realizar análisis in vivo. Las principales ventajas de la MS son su elevada sensibilidad, lo que permite la detección de metabolitos en orden de concentración nanomolar en unos pocos microlitros de muestra, la gran resolución obtenida cuando se combina con una etapa previa de separación cromatográfica de la muestra y la posibilidad de determinar la fórmula molecular de los compuestos de interés gracias a la combinación de la exactitud en la determinación de la masa con la posibilidad de llevar a cabo espectros de fragmentación (característicos de cada molécula). Además, una ventaja adicional es que la MS permite realizar un análisis no sólo de modo holístico (análisis no dirigido), en el cual se trata de analizar el mayor número posible de compuestos, sino que también posibilita los análisis dirigidos, en los que la detección se centra en un grupo determinado de metabolitos de interés, lo que permite trabajar con una sensibilidad mayor y de forma cuantitativa (138, 144).

El esquema básico de trabajo en cualquier “-ómica” y por tanto en metabonomía se muestra en la **Figura 5**. Es necesario destacar algunos de los puntos de dicho esquema debido a su relevancia.

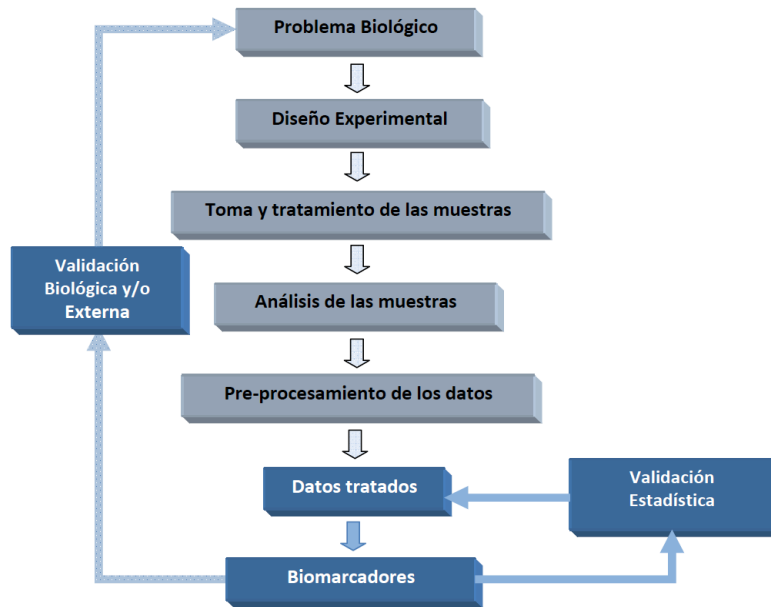


Figura 5. Flujo de trabajo en un estudio metabonómico.

El diseño experimental es clave en cualquier estudio metabonómico debido a la gran variabilidad experimental que puede introducir un diseño inadecuado. Algunos aspectos a considerar son: definición de la cohorte de estudio, tratamiento de las muestras, elección del método analítico, etc... Otro punto crítico es el procesamiento de los datos generados por el espectrómetro de masas. En un estudio holístico realizado con LC-MS como plataforma analítica, la información obtenida para cada una de las muestras se organiza en una gran matriz (tiempo de retención (t_r), relación masa/carga (m/z) e intensidad), donde cada una de las señales obtenidas informa acerca de un metabolito, fragmento o aducto presente en la muestra. Con el fin de extraer la información latente que contienen dichas mega-matrices es necesario utilizar métodos de minería de datos de tipo multivariante. Antes de analizar los datos es necesario llevar a cabo un pre-procesamiento de los mismos, fundamentalmente se realiza un

1. Introducción

alineamiento de los picos cromatográficos y una normalización de las variables que contiene cada muestra, lo que nos asegura el poder comparar las señales obtenidas entre las diferentes muestras. A partir de los datos procesados se realiza un análisis multivariante, para lo que normalmente se utilizan dos tipos de métodos: métodos no supervisados (ej. análisis de componentes principales, PCA) y métodos supervisados (ej. regresión de mínimos cuadrados análisis discriminante, PLS-DA). En ambas aproximaciones la gran cantidad de variables experimentales obtenidas (mega matriz) es reducida a un pequeño número de variables latentes (componentes principales) que explican de un modo mucho más sencillo las similitudes o diferencias entre muestras (observaciones) y las variables (metabolitos) responsables de esas diferencias o similitudes. La principal diferencia entre los métodos supervisados y no supervisados es que en el segundo caso el algoritmo parte de un conocimiento previo, sobre los datos que maneja, como por ejemplo las clases (buena función y disfunción del injerto en nuestro caso) de modo que busca las variables que mejor describen las diferencias existentes entre dichas muestras teniendo en cuenta la clase a la que pertenecen (138, 142, 144).

La metabonomía se presenta como una herramienta extremadamente útil para caracterizar los cambios metabólicos que pueden tener lugar en el hígado trasplantado. La aplicación de la metabonomía al trasplante todavía se encuentra en etapas tempranas pero en general, los estudios metabonómicos en el trasplante de órganos sólidos se han centrado especialmente en la monitorización de tres situaciones: daño post-reperfusión, rechazo y disfunción del órgano (145). De todas las publicaciones al respecto, un 60% son sobre el trasplante renal, seguido por el hígado en un 21%, corazón en un 10%, páncreas en un 5% y pulmones en un 6% (146). La mayoría de las moléculas medidas por métodos metabonómicos son las relacionadas con procesos metabólicos generales existentes en todo ser vivo tales como la glicolisis, gluconeogénesis,

1. Introducción

metabolismo lipídico, etc...Cambios en estos metabolitos universales tales como la glucosa, citrato, lactato, ATP, AFP reflejan cambios en la viabilidad celular como la apoptosis, los niveles de oxigenación (anoxia, flujo sanguíneo), pH local y homeostasis en general (147). Dichas moléculas nos informarán de la función celular o del estrés celular y por tanto, de la función del órgano. Otros metabolitos menos abundantes como el tromboxano, histamina o clorotirosina podrían reflejar la función inmune o respuesta inflamatoria (148-150).

En el TH, se han realizado estudios con RMN, cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y MS para cuantificar la lesión del injerto por preservación (151, 152), recuperación del injerto después del trasplante (151) y también para identificar biomarcadores diagnósticos y pronósticos del rechazo del injerto y de disfunción (153-155). Debemos recordar que el hígado también es el principal órgano responsable del metabolismo del ciclo de la urea, por lo que muchos biomarcadores serán metabolitos de la urea, glutamina o arginina. *Martin-Sanz et al.* (153) describieron en el año 2003 a los derivados metilados de la arginina como biomarcadores pronósticos de rechazo del injerto. *Silva et al.* (151) publicaron que la cantidad y la tasa de recuperación de los niveles de arginina extracelular parecían ser un buen indicador de la función del injerto en las primeras 24 horas después del trasplante. Posteriormente, *Singh et al.* (154) relacionaron los niveles bajos de urea y los niveles elevados de glutamina en suero y en orina como biomarcadores no invasivos de rechazo agudo del injerto.

Si tenemos en cuenta que el éxito terapéutico del trasplante hepático ha traído consigo un mayor número de indicaciones y de pacientes susceptibles de beneficiarse de él, derivando en una mayor demanda y por lo tanto, en una mayor lista de espera y con ello un aumento de la morbi-mortalidad. Ante esta situación y con el fin de aumentar el número de donantes, los criterios para definir la idoneidad de un órgano han sido gradualmente modificados, pasando a utilizarse hígados procedentes de ECD con el consiguiente riesgo de aparición

1. Introducción

de complicaciones postoperatorias como la disfunción severa del injerto y el fallo hepático primario (40, 156). Pese a que los órganos procedentes de ECD no son óptimos, representan una buena alternativa frente al fallecer en lista de espera de trasplante (51). La pregunta sería, ¿cuánto podemos expandir los criterios del donante?; y si ésta es la única solución, ¿qué criterios nos deberíamos basar para decidir que hígados podemos utilizar?.

Existen numerosos factores que juegan un papel importante en la aparición de disfunción del injerto o fallo primario (157). El daño por I/R podría ser responsable de muchos casos de disfunción del injerto. La hipotermia reduce el metabolismo y ayuda a mantener las funciones metabólicas esenciales; sin embargo, induce daño celular (cambios en la homeostasis del calcio, modificaciones del citoesqueleto y destrucción local del tejido por proteasas). La reperfusión implica la producción de radicales libres de oxígeno (ROS), incluyendo superóxidos, peróxidos de hidrógeno, radicales hidroxilos, todos ellos implicados en el daño por I/R (151). Otros factores como el pH, la respuesta inflamatoria y los cambios en la microcirculación, agravan la lesión celular. Sin embargo, todavía no se conoce por completo todos los mecanismos involucrados en la disfunción del injerto.

Tras el trasplante, la mayoría de los injertos presentan algún tipo de disfunción hepática de naturaleza metabólica en los momentos inmediatamente posteriores al trasplante, de los que alrededor de un 20% son atribuibles a fallos en la capacidad metabólica del hígado. De todos los factores responsables de ello, algunos cabe considerarlos *a priori* como potencialmente controlables, y entre ellos destaca la calidad metabólico-funcional del injerto. Disponer, por tanto, de criterios objetivos que permitan pronunciarse sobre la calidad del injerto previo a su implante, resultaría de enorme utilidad para tomar decisiones que minimizasen el riesgo de una disfunción metabólica severa y/o fallo hepático primario. Por otra parte, si junto al estudio anatomopatológico se pudiese aportar

1. Introducción

una información de esa naturaleza, podría evitarse el descartar un órgano simplemente por su aspecto macroscópico (criterio subjetivo ligado al cirujano, que no siempre es coincidente), o una histología poco definitiva, aumentando así el número de órganos utilizables basados en un criterio objetivo de selección.

Pese a que los resultados del trasplante han mejorado de manera espectacular hasta el momento actual, el cirujano de trasplantes todavía se basa en la valoración subjetiva del aspecto macroscópico del injerto (forma, color, aspecto y tacto), en los parámetros clínicos y analíticos del donante y en ocasiones en el análisis histológico de una biopsia hepática para valorar la idoneidad de un injerto para su uso. La biopsia hepática ayudará a valorar el grado de esteatosis, la existencia de fibrosis, sepsis e isquemia. Todavía existen controversias en el momento de valorar órganos con esteatosis leve-moderada, lo que refleja tanto la dificultad de predecir la funcionalidad del injerto basándose en los cambios morfológicos (158) así como la ausencia de una evaluación funcional que ayude bien a descartar injertos con riesgo elevado de fallo primario, o bien, a aceptar órganos que basados en una valoración subjetiva hubieran sido descartados para trasplante.

Por todo ello, las cuestiones que nos hemos planteado son como podríamos establecer parámetros numéricos límite para el uso de injertos procedentes de ECD y en consecuencia qué biomarcadores deberíamos determinar en los hígados donante, para minimizar el riesgo de una mala función, una vez implantados. Además, en España durante el año 2013, de los 1655 posibles hígados valorados para trasplante, 346 (24.6%) fueron descartados por causas tales como esteatosis, fibrosis o isquemia prolongada. Dichas decisiones no han estado apoyadas por un estudio adicional del injerto en el que se valorase su capacidad funcional, lo que en gran medida determinaría su comportamiento clínico una vez implantado. Por lo que si pudiéramos disponer de perfiles o “huellas” metabonómicas del injerto que reflejaran su calidad y capacidad

1. Introducción

funcional, podríamos predecir la evolución tras el trasplante y la respuesta clínica a partir del perfil metabólico del injerto hepático previo a su implante.

1.6. Hipótesis y objetivos

El objetivo principal de esta tesis es desarrollar un modelo capaz de valorar la calidad funcional de un hígado donante y predecir su función antes de su implante

El metabonoma de un órgano es un fiel reflejo de su estado funcional, por lo tanto, el estudio del perfil metabonómico de biopsias hepáticas de hígados donante antes de su implante y su correlación con la evolución clínica del receptor una vez implantados, podría permitirnos encontrar biomarcadores que reflejen la calidad del injerto hepático antes de su implante, así como anticiparnos a su función en el receptor.

Los objetivos secundarios de este proyecto que nos permitirán cumplir el objetivo principal son los siguientes:

1. Identificación de patrones metabonómicos en las biopsias hepáticas. Para ello realizaremos el perfilado metabonómico de biopsias hepáticas mediante el análisis no dirigido por espectrometría de masas. El objetivo es determinar los metabolitos que discriminan entre injertos que presentan disfunción temprana de los que presentan buena función una vez implantados.

2. Diseño de un modelo de valoración de la función temprana del injerto hepático. Desarrollar un modelo que evalúe la función del injerto en el receptor de manera continua. Para ello nos basaremos en la modelización de parámetros bioquímicos medidos de manera rutinaria en el receptor tras el trasplante.

3. Establecer un valoración cuantitativa y continua de la calidad del injerto antes de su implante. Estudiaremos la asociación entre los diferentes perfiles metabonómicos (objetivo 1) con el grado de funcionalidad del injerto una vez implantado (objetivo 2), de este modo podremos establecer un valor cuantitativo de la calidad del injerto antes de su implante y predecir su función.

2. Material y Métodos

2.1. Análisis metabonómico de biopsias hepáticas de hígado donante

2.1.1. Población del estudio metabonómico

Se incluyeron en este estudio prospectivo todos aquellos pacientes trasplantados en la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y TH del Hospital Universitario La Fe de Valencia, durante el periodo de tiempo comprendido entre el 1 de Abril del 2007 y el 31 de Julio del 2012, a los que se les tomó biopsia del hígado donante tras finalizar la extracción para su análisis metabonómico. Los pacientes fueron incluidos en la lista de espera para TH según el MELD (113) y el Child-Pugh (159) de acuerdo con nuestro comité de trasplantes y tras haber firmado el consentimiento informado. Todos ellos presentaban compatibilidad del grupo sanguíneo ABO con el donante. Todos los injertos hepáticos procedían de donantes cadáver con el diagnóstico de muerte cerebral y la realización del implante hepático fue llevada a cabo en el Hospital Universitario La Fe de Valencia por el equipo quirúrgico de la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y TH. El consentimiento para la donación del hígado fue obtenido mediante la solicitud a los familiares de los donantes por medio del equipo de coordinación de trasplantes. El estudio fue aprobado por el Comité ético del Hospital La Fe.

Dado que todos los hospitales de nuestra Comunidad se encuentran acreditados para la extracción de órganos, los injertos hepáticos incluidos en nuestro estudio fueron extraídos en 25 hospitales diferentes de la Comunidad Valenciana durante el periodo de tiempo referido (**Tabla 3**).

2. Material y Métodos

Hospitales	Número de extracciones
Hospital Comarcal de Vinaroz	4
Hospital General de Castellón	30
Hospital Provincial de Castellón	4
Hospital de Sagunto	8
Hospital Clínico Universitario de Valencia	45
Hospital Arnau de Vilanova	3
Hospital Universitario y Politécnico La Fe	143
Centro Hospitalario General Universitario de Valencia	39
Hospital Dr. Peset	15
Hospital de Manises	4
Hospital de Requena	10
Hospital La Ribera	20
Hospital Francesc de Borja de Gandía	21
Hospital Lluís Alcanyís de Játiva	22
Hospital de Dénia	30
Hospital Virgen de los Lirios de Alcoi	10
Hospital Marina Baixa de Villajoyosa	50
Hospital clínico San Juan de Alicante	14
Hospital General de Elda	18
Hospital General de Alicante	110
Hospital General Universitario de Elche	64
Hospital de La Plana	2
Hospital Vega Baja de Orihuela	55
Hospital de Torreveja	18
Hospital San Juan de Alicante	11

Tabla 3. Hospitales de la Comunidad de Valencia de los que proceden los donantes

2.1.2. Criterios de inclusión y exclusión de pacientes

Criterios de inclusión de los donantes

Se incluyeron todos aquellos donantes que cumplieron los siguientes requisitos:

1. Injertos totales hepáticos procedentes de donantes cadáver que cumplieran los criterios de muerte encefálica.
2. Ausencia de historia previa de enfermedad hepática.
3. Ausencia de antecedentes de enfermedad tumoral en los últimos 10 años (160).
4. Considerado apto para trasplante por el cirujano extractor, en base a su experiencia, aspecto macroscópico del hígado y/ o resultado de la biopsia.
5. Donantes con criterios extendidos tales como edad avanzada, estancia prolongada en la UCI, niveles de sodio en sangre elevados ($\text{Na} \geq 155 \text{ mEq/L}$), episodios de hipotensión ($\text{TAS} < 60 \text{ mmHg}$) y parada cardiorrespiratoria antes del diagnóstico de muerte encefálica (97).

Criterios de inclusión de los receptores para trasplante hepático

Se incluyeron todos aquellos receptores que cumplieron los siguientes requisitos:

1. Pacientes a los que se les realizó un TH con el diagnóstico de Cirrosis Hepática de cualquier etiología en la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante Hepático del Hospital Universitario La Fe de Valencia, en el mencionado periodo de tiempo.
2. Receptores adultos (edad mayor de 18 años).
3. Receptores de un solo injerto.
4. Acceder voluntariamente al TH, previa firma del consentimiento informado.

De entre los donantes y receptores que se ajustaron a los criterios anteriores, fueron excluidos los siguientes:

Criterios de exclusión de los donantes

Fueron excluidos del estudio todos aquellos donantes que presentaban:

1. Cualquier tipo de infección: bacteriana o fúngica no tratada.
2. Positividad para los antígenos de superficie contra la hepatitis B, anticuerpos contra el VHC y/o del VIH.
3. Aquellos en los que la biopsia detectó un porcentaje de esteatosis macrovesicular > 40% (161).
4. Todos aquellos donantes que presentaban algún grado de fibrosis
5. Los injertos hepáticos con arteriosclerosis significativa de la arteria hepática como hallazgo durante la extracción hepática.
6. Donantes a corazón parado.
7. Mala perfusión del injerto durante la extracción.
8. Hallazgo de un tumor en el donante durante la extracción con histología de malignidad.

Criterios de exclusión de los receptores para Trasplante Hepático

Fueron excluidos del estudio:

1. Receptores pediátricos (<18 años)
2. Trasplantes hepáticos de donante vivo.
3. Trasplantes hepáticos dominó.
4. Trasplantes hepáticos de injertos reducidos o split.
5. Receptores multiviscerales.
6. Receptores con fallo hepático fulminante.
7. Retrasplantes hepáticos por complicaciones vasculares (trombosis de la arteria hepática, síndrome de Budd-Chiari).

8. Receptores que presentaron fallo primario del injerto hepático
9. Receptores que fallecieron en la primera semana post-trasplante.
10. Retrasplante precoz por recurrencia precoz del virus de la hepatitis C (hepatitis colestásica fibrosante).
11. No disponer de la información requerida.

2.1.3. Clasificación de la evolución clínica del receptor tras el trasplante hepático

Con el objetivo de estudiar la relación entre los perfiles metabonómicos obtenidos de las diferentes biopsias pre-implante y la evolución clínica del injerto tras el TH, clasificamos la función del injerto para cada uno de los receptores de nuestra población según los criterios propuestos por *Olthoff et al.* (58). Dichos criterios definen la disfunción temprana del injerto del inglés *early allograft dysfunction* (EAD) como la presencia de una o más de las siguientes variables analíticas en el postoperatorio inmediato del TH:

1. Bilirrubina ≥ 10 mg/dL en el día 7 tras el TH.
2. Ratio internacional normalizado, del inglés “international normalized ratio” (INR) ≥ 1.6 en el día 7 tras el TH.
3. Alanina aminotransferasa (ALT) ó Aspartato aminotransferasa (AST) > 2000 U/L durante los 7 primeros días tras el TH.

Así, aquellos pacientes que tras el TH cumplieron uno o más criterios de disfunción de *Olthoff* se clasificaron como EAD y los que no cumplieron ningún criterio se clasificaron como función inmediata del injerto del inglés *immediate graft function* (IGF).

2.1.4. Características clínicas de la serie

El diagnóstico de cirrosis hepática en los pacientes se basó en las manifestaciones clínicas, determinaciones analíticas, pruebas de imagen (ecografía abdominal y la tomografía computerizada) así como en la búsqueda del factor etiológico (viral, enólica, autoinmune, criptogénica o tumoral).

Características clínicas y analíticas de los donantes

De todos los donantes que fueron aceptados según los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente, se realizó un estudio exhaustivo de la historia clínica, pruebas analíticas y medidas antropométricas. Las variables recogidas correspondientes a donantes quedan reflejadas en la **Tabla 4**. También se realizó una determinación analítica completa, en los hospitales donde se realizó la extracción del injerto que comprendía: hemograma completo, pruebas de coagulación determinaciones bioquímicas en suero, gasometría arterial, y serología (CMV, EBV, toxoplasma, HBs Ag, HBc Ac, HBs Ac, HCV Ac, HIV Ac).

Variables
Edad (años)
Sexo (masculino/femenino)
Concordancia de sexo
IMC (kg/m ²)
Causa de muerte
Estancia en UCI (días)
Hipotension (no/sí)
PCR (no/sí)
Drogas vasoactivas
Na (mEq/L)
Bilirrubina (mg/dl)
ALT (U/L)
INR
Esteatosis (leve/moderada/severa)

Tabla 4. Variables relacionadas con los donantes del estudio metabonómico. ALT: alanina aminotransferasa; IMC: índice de masa corporal; INR: ratio normalizado internacional; Na: sodio; PCR: parada cardiorrespiratoria; UCI; unidad de cuidados intensivos.

La esteatosis hepática se clasifica según el análisis histológico del tejido en leve (<30%), moderada (entre el 30% y el 60%) y severa (>60%). La determinación de los principales valores analíticos en los donantes se realizó en el laboratorio de bioquímica del Hospital donante, siguiendo los métodos convencionales tanto de extracción como de conservación y obtención de resultados (**Tabla 5**).

2. Material y Métodos

Variables analíticas	Valores de normalidad
<u>BIOQUÍMICA</u>	
Albumina	3.3-5g/dl
ALT	0-31U/L
AST	0-31U/L
Bilirrubina	0.1-1.1 mg/dl
Creatinina	0.51-0.95 mg/dl
Glucosa	76-110 mg/dl
Sodio/potasio	135-150/3.5-5.5 mEq/l
Proteínas totales	6.6-8.7 g/dl
Urea	10-50 mg/dl
<u>HEMOGRAMA</u>	
Hematocrito	37-47 %
Hemoglobina	12-16 g/dl
Leucocitos	4.5-10.8x10 ³ /μl
Plaquetas	150-400x10 ³ /μl
<u>COAGULACIÓN</u>	
TTPA	23-35 s
Fibrinógeno	170-437 mg/dl
INR	1-1.25
Índice de Quick	70-100 %
Tiempo de protrombina	14.2-19 s

Tabla 5. Parámetros analíticos recogidos en los donantes y receptores del estudio metabonómico. ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; INR: ratio normalizado internacional; TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activado.

Características clínicas de los receptores.

De todos los receptores incluidos en lista de espera para TH tras previo consenso del comité multidisciplinario de trasplante, se les realizó un protocolo pre-trasplante (Protocolo 1, se adjunta documento en anexos) en el que se detallan las características clínicas de los receptores, sus antecedentes, indicación de trasplante y pruebas complementarias realizadas como base del estudio antes del TH. Las variables relacionadas con el receptor, antes y después del TH, se detallan en la **Tabla 6**.

Variables
Edad (años)
Sexo (masculino/femenino)
IMC (kg/m ²)
Diagnóstico
Tumoral (HCC/Neuroendocrino)
Retransplante (no/sí)
MELD score
Child-Pugh score
UCI (días)
Estancia hospitalaria (días)
UCH (sí/no)
UPFC (sí/no)
CMV (positivo/negativo)
HBc Ac (positivo/negativo)
Bilirrubina (mg/dl)
ALT (U/L)
INR
Exitus (sí/no)

Tabla 6. Variables relacionadas con los receptores del estudio metabonómico. ALT: alanina aminotransferasa; CMV: citomegalovirus; HCC: carcinoma hepatocelular; HBc Ac: anticuerpos anticore de la hepatitis B; IMC: índice de masa corporal; INR: ratio normalizado internacional; MELD: model for end stage liver disease; UCI: Unidad de cuidados intensivos; UCH: transfusión postoperatoria de unidades de concentrados de hematíes; UPFC: transfusión postoperatoria de unidades de plasma fresco congelado.

La determinación de todos los valores analíticos en los receptores se realizó en el laboratorio del Hospital Universitario La Fe de Valencia, siguiendo los métodos convencionales de extracción, conservación y obtención de resultados (**Tabla 5**).

2.1.5. Pauta de inmunosupresión en el receptor

La inmunosupresión de los receptores se ha mantenido según el protocolo de terapia establecido en el Hospital Universitario La Fe de Valencia y que consta de una pauta de inmunosupresión de inducción y de una pauta de mantenimiento. Adjuntamos una copia del protocolo de inmunosupresión actualmente utilizado en nuestra Unidad en los anexos (Protocolo 2, protocolo de inmunosupresión del Hospital la FE (Valencia)). La pauta habitual de inmunosupresión en el postoperatorio es la doble terapia con un anticalcineurínico como la Ciclosporina ó Tacrolimus + Esteroides. El tipo de anticalcineurínico se elige de forma aleatoria según el número de historia clínica, empleando Ciclosporina Neoral en las historias clínicas pares y Tacrolimus en las historias impares. Existen una serie de variaciones de la pauta de inmunosupresión de inducción. De tal modo, en los casos en los que el paciente presenta:

-Insuficiencia renal pretrasplante hepático: el tratamiento inmunosupresor se basará en la terapia de inducción con Basiliximab o como alternativa Daclizumab junto con esteroides. Posteriormente se introducirá el Micofenolato de Mofetil y entre los días 3-7 se introducirá el anticalcineurínico a mitad de dosis.

-Pacientes con Diabetes Mellitus antes del TH: en aquellos receptores con diabetes insulín-dependiente con necesidad de insulina mayor de 30 unidades/día o de difícil control, se utilizar doble terapia con Ciclosporina o Tacrolimus a las dosis recomendadas y Micofenolato de mofetil 1 g cada 12 h.

-Pacientes VIH positivo y con enfermedad hepática por VHC: indicaremos la doble terapia con Ciclosporina y esteroides.

-En los receptores con insuficiencia hepática aguda grave y en cirrosis autoinmunes: la inmunosupresión en estas circunstancias se basará en triple terapia con: Ciclosporina o Tacrolimus, esteroides y Azatioprina. Consideramos que el término autoinmune incluye la cirrosis biliar primaria, la cirrosis autoinmune, la colangitis esclerosante primaria o autoinmune, críptogénica y la hepatitis fulminante.

2.1.6. Cirugía del trasplante

El procedimiento del TH consta de cuatro fases bien definidas:

Cirugía en el donante

La técnica quirúrgica en el donante cadáver que realizamos en nuestra unidad sigue los pasos descritos por Starzl (26, 162). La vía de abordaje es una esternotomía y laparotomía media con valoración inicial de la existencia de posibles lesiones tumorales y del aspecto macroscópico del hígado para decidir si es válido o no basándonos en la coloración, consistencia y morfología. En ocasiones, será necesario realizar una biopsia para la valoración histológica, si lo requiere el cirujano para decidir sobre la validez del órgano para trasplante. Una vez identificadas y referenciadas las estructuras vasculares principales, se procede a la heparinización del donante. Posteriormente, se canula la aorta infrarrenal y la vena porta, y se procede a la infusión de la solución de preservación (Celsior® o Wisconsin®) con previo clamplaje de la aorta infradiafragmática, con sección de la vena cava inferior y exanguinación del cadáver. En este momento, se realiza el enfriamiento rápido del órgano con suero fisiológico y hielo, prosiguiendo la perfusión de la solución de preservación (163).

Cirugía de banco

Consiste en la preparación para su implante en el receptor, del órgano extraído del donante. Se realiza siempre a la temperatura de la solución de preservación donde se encuentra conservado el injerto entre 2° y 4° C. Se realiza la disección de las estructuras venosas: vena cava supradiafragmática e infradiafragmática, y vena porta; así como de las estructuras arteriales: tronco celíaco y arteria hepática (163).

Cirugía en el receptor

Previa sección de los ligamentos, se procede a la identificación de las estructuras a nivel del hilio hepático. Se ligan la arteria hepática y sus ramas, se secciona la vía biliar y se disecciona la vena porta (que se deja con flujo sanguíneo). La técnica estándar y de elección es una hepatectomía con técnica de “piggy-back” o de preservación de la vena cava (27). Para preservar la vena cava se procede a la ligadura y sección de todas las venas retrohepáticas de drenaje directo en la vena cava y a la sección del ligamento hepatocava derecho e izquierdo, hasta alcanzar las tres venas suprahepáticas, que son disecadas totalmente. En este momento se realiza la ligadura y sección proximal de la vena porta. Se procede, finalmente, al clampaje vascular de las venas suprahepáticas, sección de las mismas confeccionando un orificio común y se extrae el hígado patológico del receptor.

Implante hepático

En primer lugar, se anastomosa la boca común de las venas suprahepáticas con la vena cava suprahepática del donante. Posteriormente, se realiza la anastomosis de la vena porta dejando un pequeño defecto para su canulación y proceder al lavado del injerto con suero fisiológico. Finalizada la anastomosis de la vena porta, se cierra la vena cava infrahepática y se procede al desclampaje de la vena cava suprahepática primero e inmediatamente después de la vena porta reperfundiendo el injerto. Seguidamente, se realiza la reconstrucción de la arteria hepática y la anastomosis de la vía biliar con la colocación opcional de tubo en T de Kehr. Si no es posible dicha anastomosis se realiza una hepático-yeyunostomía en Y de Roux. En este momento se realiza una biopsia del injerto con tru-cut para su estudio anatomopatológico. Finalmente, se procede a la colocación de los drenajes, y cierre de la pared abdominal y de la piel (164). De tal modo, de todos los TH realizados, recogimos aquellas variables relacionadas

2. Material y Métodos

con el procedimiento quirúrgico del trasplante, tanto de la hepatectomía como del implante como se detallan a continuación en la **Tabla 7**.

Variables
Duración de la cirugía (min)
TIF (min)
TIC (min)
TAA (min)
Salvacélulas (ml)
UCH (unidades)
UPFC (unidades)
Lavado del injerto
Síndrome post-reperfusión (no/sí)
Kehr (no/sí)
Laparotomía por sangrado(no/sí)

Tabla 7. Variables relacionadas con la cirugía en el análisis metabonómico. TAA: tiempo de anastomosis arterial; TIC: tiempo de isquemia caliente; TIF: tiempo de isquemia fría; UCH: unidades de concentrados de hematies; UPFC: unidades de plasma fresco congelado.

2.1.7. Base de datos para la recogida de las variables relacionadas con los donantes, receptores y cirugía del trasplante para la realización del estudio

Para la recogida de las variables clínicas y analíticas relacionadas con el donante, el receptor y la cirugía del trasplante, se diseñó una base de datos utilizando Borland Delphi 7 y MySQL®, community server version 5, para Windows, donde se registraron prospectivamente los datos previamente mencionados en el apartado 2.1.

A continuación mostramos las pantallas de la base de datos donde se recogió la información. En la **Figura 6** se muestra la pantalla relacionada con los datos del donante.

2. Material y Métodos

THLife BASE DE DATOS DE TRASPLANTE HEPÁTICO

Nº TRASPLANTE: 1465 COD. DONANTE: 2008023 Nº HISTORIA: 6023272

1. DONANTES | 2. RECEPTORES | 3. CIRUGÍAS | 4. EVOLUCIONES

DONANTES

Nº TRASPLANTE: 1465 COD. DONANTE: 2008023 Nº HISTORIA: 6023272 TIPO: CADAVER EDAD: 51 SEXO: M PESO: 80 GRUPO ABO: A PER. TOR: R: DE TÓRAX: TALLA: 170 IMC: 27,6 R#: PER. ABD: ANEMIA: N

ANTECEDENTES

HTA: S HEPATOPATÍA: F FIEBRE DE O.C.: N CAUSA DE MUERTE C: ACV HIPOTENSIÓN: S OTROS: DM: F NEFROSIAS: N DROGADICCIÓN: F TIEMPO EN UCI: 8 d PARADA CARDÍACA: N CARDIOPATÍA: F ALCOHOLISMO: F FUMADOR: N TIEMPO DE HOSP: d h TRANSF. SANGRE: u

ANAMNESIS

T: °C pO2: mm Hg FIO2: % A-hb: N VHC: F TOWO: S RX: DE TÓRAX: SOSP. INFECCIÓN: N pH: 7,42 CMV: S VHI: F VEB: S NEUMONÍA: N ANTIBIOTERAPIA: S TIPO: AUM 2/8+ LINCID C Sat O2: % A-hb: N VHZ: N DERRAME: N I.R.S: F VHB: F LUES: N ATELECTASIA: N ECO. ABDOMINAL: NORMAL ECO. ABDOMINAL: Hígado normal. Vía biliar normal. Mínima líquido perihap. bco. RD 2 quistes simples (1/3 medio inferior (el > 2x32), R1 Quiste simple polo inferior (23 x

ANALÍTICA

HTO: 29,5	GOT: 238	K: 4,1	PROT. TOT: 7	TPA: 28,7
HBI: 8,9	GPT: 225	UREA: 132	ALBUMINA: F81	F81: 827
PLAQUETAS: 225000	GGT: CREATININA: 1,9	HEC: INR:		
LEUCOC: 14100	FAI: GLUCOSA: 125	LDL: BB. DIRECTA:		
NEUTROF: 75,6	LH: 440	COL: I. QUORC: 63	AMILASA:	
BB: 0,5	NA: 149	TRIGL: T. PROTO:		

FARMACOS

ADM. DROGAS V: DOSES

ADRENALINA: N NORADRENALINA: N DORAMBIA: S 2 DOBUTAMBIA: N DESMOPRESINA: N

GRUPO DE BANCO

TIPO ANOM VA: H-CE ARTERIOESCLE: N BIOPSIA METAB: S BIOPSIA AP: N BORDES: BIOPSIA PRE-R: NORMAL CONSISTENCIA: COLORACIÓN: BIOPSIA POS-R: NORMAL ESTEATOSIS: NO PERFUSIÓN H: S

FILTRAR: Nº TRASPLANTE 1465

Figura 6. Datos relacionados con el donante.

Los datos relacionados con el procedimiento quirúrgico, así como las complicaciones tras el trasplante se recogen en la pantalla que se muestra en la Figura 7.

THLife BASE DE DATOS DE TRASPLANTE HEPÁTICO

Nº TRASPLANTE: 1465 COD. DONANTE: 2008023 Nº HISTORIA: 6023272

1. DONANTES | 2. RECEPTORES | 3. CIRUGÍAS | 4. EVOLUCIONES

CIRUGÍAS

DURACIÓN DE LA CIRUGÍA Y LA ISQUEMIA

ANESTESIA: min. CIRUGÍA: 280 min. ISQUEMIA FRÍA (TIF): 190 min. ISQUEMIA CALIENTE (TIC): 45 min. ISQUEMIA TOTAL: 225 min. DEMORA ARTERIAL: 30 min.

BIPLANTE

CONSUMO DE UCI: 0 INESTABILIDAD HEMOD. INTRAOP: N KEH: N PLASMA: 0 u. TIPO ANASTOMOSIS BILIAR: COLEDOCO-COLEDOCO SIN KEH POOL DE PLAQUETAS: 0 ANASTOMOSIS ARTERIAL: HGR-TGD F-VII: EXTR. TROMBO PORTAL: N SÍNDR. POSTREPERF: N LAVADO: SANGRE FIBRINÓGENO: SALVACELULAS: 400

PAUTA DE INMUNOSUPRESIÓN

DOBLE TERAPIA

CICLOSPORINA + ESTEROIDES: S TACROLIMUS + ESTEROIDES: N CICLOSPORINA + MICOFENALATO: N TACROLIMUS + MICOFENALATO: N

TRATAMIENTO CON AC

SIMULECT + CICLOSP: N ZENAPAX + CICLOSP: N SIMULECT + TACROLIMUS: N ZENAPAX + TACOL: N SIMULECT + MICOF. + CICLOSP: N ZENAPAX + MICOF. + CICLOSP: N SIMULECT + MICOF. + TACROL: N ZENAPAX + MICOF. + TACROL: N SIMULECT + RAPAMICINA + CICLOSP: N ZENAPAX + RAPAMICINA + CICLOSP: N SIMULECT + RAPAMICINA + TACROLIMUS: N ZENAPAX + RAPAMICINA + TACROLIMUS: N

TRIPLE TERAPIA

CICLOSP. + ESTEROIDES + AZATIOPRINA: N TACROLIMUS + ESTEROIDES + AZATIOPRINA: N

OBSERVACIONES:

MIF-ESTEROIDES

PROFILAXIS

VHB: N CMV: S VHI: N

COMPLICACIONES QUIRÚRGICAS | COMPLICACIONES NO QUIRÚRGICAS

RECHAZO: N COMPL. ARTERIAL: N COMPL. VENOSA: N C. VÍA BILIAR FÍSTULA: N ESTENOSIS: N OTRAS: COLEPERITONEO: N REINTERVENCIÓN: N CAUSA: NO FECHA:

FILTRAR: Nº TRASPLANTE 1465

Figura 7. Datos relacionados con la cirugía y complicaciones tras el TH.

2. Material y Métodos

La información pretrasplante del receptor así como la fecha del TH, los días de hospitalización y la transfusión de derivados sanguíneos tras el trasplante se recoge en la pantalla siguiente (**Figura 8**).

The screenshot shows the 'THLafe BASE DE DATOS DE TRASPLANTE HEPÁTICO' interface. It features a search bar with 'Nº TRASPLANTE' set to 1465 and a 'SINCRONIZAR FILTROS' button. Below the search bar are four tabs: '1. DONANTES', '2. RECEPTORES', '3. CIRUGÍAS', and '4. EVOLUCIONES'. The 'RECEPTORES' tab is active, displaying a table with one entry for 'Nº TRASPLANTE: 1465'. Below the table, a 'DATOS' section contains various fields for patient information, including 'FECHA N.' (07/03/1958), 'EDAD: 49', 'SEXO', 'RESO: 61', 'TALLA: 158', 'IMC: 24,4', 'GRUPO ABO: A', 'RH: +', 'FER. TOR: 96', and 'FER. ABO: 91'. The 'INDICACION TH' section includes 'VIRUS' (VHB, Ach, AChb), 'PAT. BENIGNA' (POLIQUISTOSIS, HEMANGIOMAS, HIDAITIDOSIS), 'ETIOLOGIA: POLIQUISTOSIS HEPÁTICA', and 'TTO. PREVIO AL TRASPLANTE' (BETABLOQ, DILATRICOS, ANTIVIRALES). The 'ESTADIO FUNCIONAL' section shows 'MELD: 3', 'CHILD-PUGH: AS', 'ESTADO GENERAL: I', 'DIAS HOSPITI: 240', and 'DIAS REANIM: 54'. The 'ANTECEDENTES' section includes 'IMFEC. PREVIA AL TRASPLANTE: N', 'HTA: S', 'FUMADOR: S', and 'HÁBITO ENVÉLICO: N'. The 'CLÍNICA | MORTALIDAD' section contains 'ENCEFALOPATÍA: N', 'SÍNDR. HEP-RENAL: N', 'ALFA-FETOPROTEÍNA: 4,3', 'ASCITIS: /', 'PARACENTESIS: N', 'DERRAME PLEURAL: /', 'TTO. HEPATOCAR: /', 'HCC: N', and 'LATERALIDAD: /'. A filter bar at the bottom shows 'FILTRAR: N TRASPLANTE' with a value of 1465 and buttons for 'FILTRAR' and 'QUITAR FILTRO'.

Figura 8. Datos relacionados con el receptor antes y después del TH.

2. Material y Métodos

En la última pantalla se recogen los datos analíticos antes del trasplante y durante la primera semana tras el mismo (**Figura 9**).

The screenshot displays the 'THLife BASE DE DATOS DE TRASPLANTE HEPÁTICO' interface. At the top, there are navigation tabs: '1. DONANTES', '2. RECEPTORES', '3. CIRUGÍAS', and '4. EVOLUCIONES'. The 'EVOLUCIONES' tab is active, showing a purple header with the following information: 'Nº TRASPLANTE: 1750', 'COD. DONANTE: 2010157', 'Nº HISTORIA: 1561404', and 'ID. EVOLUCIÓN: 41703'. Below this, a sidebar on the left contains a vertical menu with 'TABLA' and 'DATOS' options. The main area displays a grid of laboratory test results, each with a text input field for the value. The tests and their values are: DIA (0), FECHA (12/09/2010), AMILASA, GLUCOSA (175), UREA (37), CREATININA (1,36), COLESTEROL, TRIGLICERIDOS, GOT (34), GPT (27), GGT, FA, LDH, BILIRUBINA (1,7), BB_DIRECTA, PROTEINAS_TOTALES (7,1), ALBUMINA, NA (132), K (4,2), HB (9,8), HTO (30,1), LEUCOCITOS (2,7), NEUTROFILOS (70), PLAQUETAS (20000), TTPA, TT, FIBRINOGENO, TROTROMBINA (21,9), IQ (48), INR (1,68), PO2, PCO2, and PROTEINURIA. At the bottom, there is a search bar with 'FILTRAR: N TRASPLANTE' and the value '1750', along with 'FILTRAR' and 'QUITAR FILTRO' buttons.

Test	Valor
DIA	0
FECHA	12/09/2010
AMILASA	
GLUCOSA	175
UREA	37
CREATININA	1,36
COLESTEROL	
TRIGLICERIDOS	
GOT	34
GPT	27
GGT	
FA	
LDH	
BILIRUBINA	1,7
BB_DIRECTA	
PROTEINAS_TOTALES	7,1
ALBUMINA	
NA	132
K	4,2
HB	9,8
HTO	30,1
LEUCOCITOS	2,7
NEUTROFILOS	70
PLAQUETAS	20000
TTPA	
TT	
FIBRINOGENO	
TROTROMBINA	21,9
IQ	48
INR	1,68
PO2	
PCO2	
PROTEINURIA	

Figura 9. Datos analíticos del receptor.

2.1.8. Recogida de muestras de tejido hepático para el estudio del perfil metabonómico

El protocolo de recogida de la muestra se detalla a continuación:

1. La toma de la biopsia hepática se realiza al principio de la cirugía de banco, es decir, una vez extraído el órgano. Ésta se realiza por el mismo equipo que ha extraído el injerto del donante durante el tiempo de isquemia fría. La cirugía de banco se realiza con el órgano mantenido a 4°C en solución de preservación y en hielo.
2. La biopsia consiste en una cuña de tejido hepático sacada con bisturí frío o tijera, habitualmente del segmento III (Couinaud) del lóbulo Hepático Izquierdo. El tamaño de la muestra oscila entre 4-7 mm x 4-7 mm con un peso entre 20 y 100 mg como se muestra en la **Figura 10**.



Figura 10. Biopsia hepática.

3. Esta muestra será introducida en un Criovial (**Figura 11**).



Figura 11. Criovial donde se guarda la muestra de tejido hepático.

4. El criovial se rotula con el código de donante e inmediatamente se deposita en un tanque de nitrógeno líquido. Se debe tener la precaución de que el tanque siempre contenga nitrógeno con el fin de que la muestra se conserve adecuadamente. Dicho tanque de nitrógeno es transportado mensualmente al Instituto para la Investigación del Hospital la Fe donde un técnico de laboratorio se encarga de la recepción, registro y almacén de las muestras en otro tanque de nitrógeno hasta su análisis por espectrometría de masas.

2.1.9. Procesamiento de las muestras

Reactivos

Todos los disolventes y productos químicos usados para el análisis de las muestras fueron de grado MS, el agua fue adquirida de Romil (Teknokroma, San Cugat del Vallés, España), el metanol y el acetonitrilo se compraron de Fisher Scientific (Loughborough, U.K.). Todos los aditivos y estándares se compraron de Sigma-Aldrich Quimica SA (Madrid, Spain)

Preparación de las muestras para el análisis UPLC-Q-ToF

La homogeneización y extracción de los metabolitos a partir de las muestras de tejido hepático se llevó a cabo siguiendo un protocolo descrito previamente, con algunas modificaciones (165).

El protocolo utilizado es el siguiente:

1. El tejido hepático congelado (20-100 mg) se coloca en tubos de 2 ml que contiene bolas de cerámica de pequeño calibre (Precellys kit CK14, France).
2. Se añade secuencialmente al tubo los siguientes volúmenes: 4 mL/g de metanol y 1.25 mL/g de una disolución acuosa conteniendo 2.4 μ M en leucina encefalina y 1.2 μ M en rifampicina (estándares internos, IS).
3. El tejido hepático se homogeniza 2 veces durante 25 segundos a 6000 revoluciones por minuto en un sistema Precellys 24 Dual (Precellys, France) equipado con sistema de refrigeración Cryolys.
4. El tejido homogenizado se centrifuga durante 5 minutos a 3000 revoluciones por minuto (3000 g), y el sobrenadante se transfiere a un tubo de Eppendorf limpio de 2 ml.

5. Los pellets de tejido sólido se vuelven a extraer con 4 mL/g de etanol y 1.25 mL/g de una solución acuosa conteniendo 2.4 μ M de Leucina Enkefalina y 1.2 μ M de Rifampicina.

6. Tras la centrifugación, los sobrenadantes se juntan con los previos. Los extractos de tejido hepático se alicuotan y almacenaron en tubos Eppendorf de 2ml a -80°C hasta su análisis.

7. Antes del análisis, las muestras líquidas de tejido hepático se descongelan en hielo, centrifugándose posteriormente durante 5 minutos a 10000g y transferidas a viales de UPLC.

2.1.10. Análisis UPLC-Q-ToF de las biopsias hepáticas

Para la adquisición de los perfiles metabonómicos a partir del tejido hepático, se utilizó un cromatógrafo Acquity UPLC (ultra performance liquid chromatography) de Waters (HMDS Waters, UK), conectado a un espectrómetro de masas de tipo Q-ToF (quadrupole-time of flight) SYNAPT (HDMS Waters, U.K.). La obtención de los datos se realizó mediante el software Masslynx v4.1. El perfil metabonómico se obtuvo bajo cuatro condiciones analíticas diferentes con el fin de obtener una cobertura metabólica lo más completa posible. Se utilizaron dos técnicas diferentes de cromatografía: i) fase reversa o “*reverse phase*” (RP) para metabolitos de polaridad media a baja, ii) HILIC (hydrophilic interaction chromatography) para metabolitos de polaridad alta y media. La ionización por electrospray (ESI) se realizó en ambos modos, positivo y negativo, para cada modo de separación cromatográfica. La estrategia analítica utilizada se detallada en la **Figura 12**.

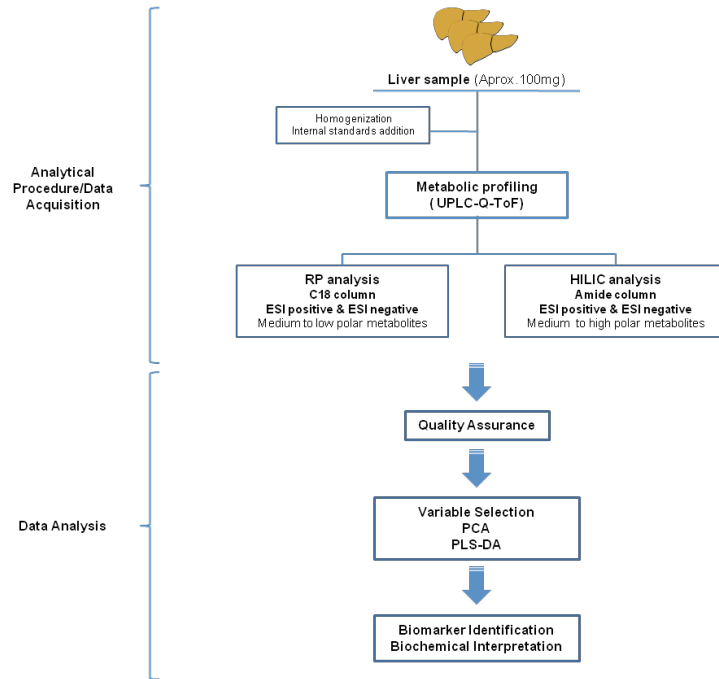


Figura 12. Flujo de trabajo propuesto para el análisis del tejido hepático.

Parámetros de Q-TOF

Se utilizó la ionización por ESI y los parámetros se ajustaron de la siguiente manera: los voltajes del capilar y del cono se fijaron en 2.8 Kv y 40 V en modo ESI negativo. Las temperaturas de la fuente y de desolvatación fueron 120°C y 350°C, respectivamente. Los flujos de gas de cono y de nebulización fueron 60 L/h y 800 L/h, respectivamente. La adquisición de datos se llevó a cabo haciendo un barrido completo de los iones en modo TOF con una relación masa/carga (m/z) comprendida en el rango de 50 a 1000 m/z con un tiempo de barrido de 0.1 segundos. Los datos en MS/MS se adquirieron simultáneamente mediante la aplicación de una energía de colisión entre 10 y 70 eV para así poder fragmentar los iones de interés. Con el fin de mantener una exactitud

2. Material y Métodos

adecuada de la masa durante el análisis se utilizó un espray de referencia (lock spray) con infusión post columna de una solución de 50 pg/mL de leucina enkephalina (m/z 556.2771 o 554.2615 en ESI + y ESI-, respectivamente) en una solución de acetonitrilo/agua (0.1% ácido fórmico) (1:1), para ello se utiliza una bomba isocrática con un flujo de 50 μ L/min. La adquisición del spray de referencia se realizó cada 10s con un tiempo de barrido de 0.1 s.

Parámetros UPLC

La columna y el auto dispensador se mantuvieron a 40°C y 4°C, respectivamente. Se realizó LC con una tasa de flujo de solvente a 400 μ L/min y con un volumen de muestra inyectada de 5 μ l. Se utilizó una columna de tipo C18 WatersAcquityTM UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm (Waters Corporation) en el modo de fase reversa, mientras que para el modo HILIC se utilizó una columna Acquity UPLC BEH Amide 1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm (Waters Corporation). La composición de los solventes de elución para cada condición analítica fueron los siguientes: i) para el análisis en fase reversa en ESI positivo, la fase móvil A era 1% 1M de acetato de amonio y 0.1% de ácido fórmico en acetonitril:isopropanol (5:2); ii) para el análisis en fase reversa en ESI negativo, la fase móvil A era 1% 1 mM de fluoruro de amonio en agua y en la fase móvil B acetonitrilo; iii) para el análisis HILIC en ESI positivo, la fase móvil A era acetonitrilo y la fase móvil B 100mM de acetato de amonio ajustado a pH3 con ácido fórmico en agua; iv) para el análisis HILIC en ESI negativo, la fase móvil A era acetonitrilo y la fase móvil B era 2mM de fluoruro de amonio en agua. Información más detallada sobre los gradientes UPCL se representan en las **Tablas 8-10**.

2. Material y Métodos

Tiempo(min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0	100	0
1	100	0
2.5	50	50
11	0	100
15	0	100
15.5	100	0
18	100	0

Tabla 8. Gradiente de elución utilizado en el análisis de fase reversa en el modo ESI positivo.

Tiempo(min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0	100	0
2	100	0
5	50	50
11	0	100
15	0	100
15.5	100	0
18	100	0

Tabla 9. Gradiente de elución utilizado en el análisis de fase reversa en el modo ESI negativo.

Tiempo(min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0	95	5
3	95	5
9	75	25
12	40	60
15	40	60
15.5	95	5
18	95	5

Tabla 10. Gradiente de elución utilizado en el análisis HILIC.

Controles de calidad en el análisis del perfil metabonómico en UPLC-Q-ToF

Como hemos descrito previamente, realizamos un seguimiento de la robustez instrumental (165) con el fin de analizar la calidad de los resultados obtenidos. Para ello, incorporamos en el análisis diferentes IS: leucina encefalina y rifampicina y muestras de control de calidad (QC). Se incorporaron dos IS diferentes en la muestras durante la homogenización de éstas y en la extracción de metabolitos. Estos estándares internos tienen una doble función: por un lado, sus niveles se utilizan para evaluar la eficiencia del proceso de extracción entre las diferentes muestras; por otro lado, se utilizan para monitorizar junto con las muestras problema la estabilidad instrumental en el análisis a distintos niveles: i) tiempo de retención, ii) forma del pico cromatográfico, iii) precisión en la detección de masas y en el área del pico cromatográfico.

En el estudio se incluyeron dos controles diferentes de calidad: i) un pool de homogenizados de injertos hepáticos descartados para TH procedentes del Banco de hígados del Hospital La Fe (UHE-LAFE / CIBERehd, Valencia, Spain), adicionados con diferentes patrones internos, nos referimos a este control de calidad como "poolmix", cuyo objetivo es evaluar el funcionamiento del sistema ULPC-QToF antes y durante el proceso de adquisición de la muestra problema. ii) blancos, se trató como a las muestras problema pero sin adición de tejido. El propósito del blanco es detectar cualquier ion contaminante incluido mientras se procesan las muestras.

La adquisición de la cola de muestras se diseñó para asegurar la calidad de los resultados, así como para minimizar y detectar cualquier fuente de variación sin relación con la naturaleza biológica de las muestras. Se realizaron las siguientes consideraciones: i) el poolmix QC se inyectó 6 veces antes de empezar a analizar las muestras problema, no sólo para acondicionar la columna sino para

comprobar el funcionamiento del sistema antes de analizar las muestras problema; ii) las muestras QC se alternaron a lo largo de las colas de muestra de la siguiente manera: 1 poolmix QC cada 15 muestras biológicas y 1 blanco QC cada 10 muestras biológicas; iii) las muestras problema se analizaron de manera aleatoria. El orden del análisis QC se seleccionó para que se espaciara de acuerdo al intervalo descrito anteriormente.

Para comprobar el funcionamiento del instrumento, comprobamos la desviación estándar relativa (RSD) del *rt* y del área pico cromatográfico para cada IS de las muestras y en las muestras QC, también se valoró la precisión de *m/z* para los IS adicionados. Establecimos valores aceptables de RSD para el área pico y *rt* menores del 15% y 1%, respectivamente; el umbral de error de masas aceptable se estableció en 5 ppm. Todos los valores recogidos durante el análisis de las muestra debían reunir los criterios de aceptación especificados.

2.1.11. Análisis multivariante de los datos del espectrómetro de masas

El PCA es un método estadístico no supervisado en que la gran cantidad de variables obtenidas experimentalmente es reducida a un pequeño número de variables no relacionadas llamadas componentes principales (variables latentes). El primer componente principal describe la mayor varianza entre las muestras, mientras que el segundo componente principal (independiente y ortogonal al primero) es el que mejor describe la varianza residual entre las muestras después de la explicada por el primer componente, y así sucesivamente. Por el contrario, en el análisis de regresión por mínimos cuadrados (PLSDA) el algoritmo dispone de más información, en nuestro caso las clases (EAD e IGF), con este análisis podemos encontrar las variables responsables de describir las diferencias existentes entre las clases preestablecidas. Existen muchos modos de representar gráficamente el análisis de los datos después de su análisis multivariante, pero

2. Material y Métodos

generalmente este tipo de análisis se acompaña de dos graficas que resumen de una manera muy sencilla el conjunto de resultados.

La gráfica de *scores*, que describe las relaciones existentes entre las observaciones (muestras) y la gráfica de *loadings*, que describe la relación entre las variables (tr, m/z, intensidad) y su relación con las observaciones. Cada punto en una gráfica de scores representa una muestra y, en principio, las observaciones que se agrupan en la gráfica presentan mayor similitud que aquellas que aparecen menos agrupadas. La gráfica de *scores* es útil para la identificación de agrupamientos entre las muestras y para la identificación de muestras anómalas. Cada punto en la gráfica de *loadings* se corresponde a una variable y en base a su posición en la gráfica se pueden determinar las relaciones existentes entre las diferentes variables y su relevancia a la hora de describir las diferencias existentes en las muestras. Existe un tercer tipo de gráfica conocida como *biplot* o gráfico doble en la que se representan superpuestos los *scores* o puntuaciones y los *loadings* o cargas mostrando de una forma sencilla la relación existente entre las variables con respecto a las observaciones (138, 142, 144).

En nuestro estudio, el análisis multivariante de los datos generados por el espectrómetro de masas, se utilizó para extraer la información más relevante subyacente en la gran cantidad de datos obtenidos. La identificación de los metabolitos se realizó mediante la comparación de las masas observadas con la masa del posible metabolito en diferentes bases de datos (166, 167) con cierto margen de exactitud de masas (± 5 ppm). Con el fin de confirmar la identificación de los potenciales biomarcadores estudiamos su espectro del MS/MS y el uso de soluciones estándar de los mismos cuando fue posible. El análisis de los datos se realizó mediante el software libre R (168). El análisis de las rutas metabólicas se realizó mediante el módulo de análisis de rutas metabólicas de MetaboAnalyst tool (169).

2. Material y Métodos

Los datos en crudo obtenidos del análisis de espectrometría de masas de las muestras se procesaron utilizando el software MZMine (170). Las variables (*rt, m/z, intensidad*) se alinearon a lo largo de todas las muestras. Sólo se retuvieron aquellas variables presentes en al menos el 20% de las muestras problema. También eliminamos aquellas variables presentes en los blancos o identificadas como aductos o fragmentos. Los datos resultantes tras quitar las muestras QC consistían en una matriz de 96 muestras (48 correspondientes a IGF y 48 correspondientes al grupo de EAD) y 1697 variables (404 correspondientes al análisis en RP en el modo ESI negativo, 304 al análisis en RP en el modo ESI positivo, 505 al análisis en HILIC en el modo ESI negativo y 484 al análisis en HILIC en el modo ESI positivo). Las variables se normalizaron en relación a la intensidad del estándar interno, la leucina encefalina, este procedimiento se siguió para todas las condiciones analíticas.

El análisis de los datos se realizó utilizando el software libre R (168). Los datos se dividieron en set de entrenamiento y set de validación. El set de entrenamiento se utilizó para realizar la selección de variables y para la creación del modelo con las variables seleccionadas, mientras que el set de validación se utilizó para comprobar la habilidad de predicción del modelo; la estrategia de análisis de los datos se detalla en la **Figura 13**.

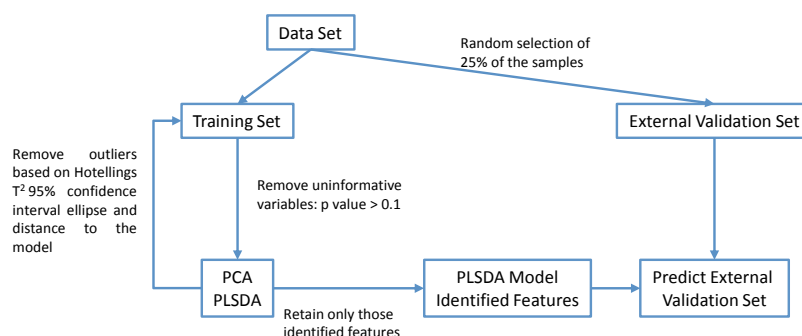


Figura 13. Flujo de trabajo propuesto para el análisis de los datos.

A continuación se realizó un análisis tipo PCA así como PLSDA de las variables seleccionadas. Si existían datos anómalos (outliers) éstos se eliminaron del set de entrenamiento. Finalmente, sólo se utilizaron para construir el nuevo modelo PLSDA aquellas características asignadas a entidades moleculares conocidas, las cuales fueron evaluadas utilizando un set de validación externa.

La selección de variables se realizó mediante el test t-Student de la transformación logarítmica de los datos, seleccionando aquellas variables con $p < 0.1$. Descartando por tanto aquellas variables con un valor $p > 0.1$ ya que se consideraran carentes de información. Antes de realizar el análisis multivariante, los datos fueron centrados a la media y escalados a varianza unitaria.

Se realizó un análisis PCA para estudiar la relación natural entre las muestras. El análisis multivariante supervisado se realizó mediante PLSDA con el objetivo global de modelar la relación entre X (conjunto de datos de MS) e Y (clases). El número de componentes a utilizar para construir el modelo se seleccionaron mediante la realización de una validación cruzada, utilizando como objetivo la precisión de predicción durante el entrenamiento. Una vez construido el modelo,

2. Material y Métodos

las muestras se representaron en gráficos de *scores* donde se dibujaron las elipses del intervalo de confianza Hotelling's T^2 95% para cada clase. Aquellas muestras que se proyectaron fuera de la elipse Hotelling o las que contenían valores anormales en la distancia al parámetro modelo se consideraron *outliers*.

La selección de variables y el proceso de construcción del modelo se repitió hasta que todas las muestras en el entrenamiento no se consideraron *outliers*. Finalmente, se realizó un modelo nuevo de PLSDA utilizando muestras pertenecientes a las muestras del set de entrenamiento y las variables retenidas identificadas positivamente. Este modelo, basado únicamente en variables identificadas, se utilizó para predecir la clase en 23 muestras independientes pertenecientes al set de validación externa.

2.2. Creación de un modelo continuo para la evaluación de la función del injerto tras el trasplante hepático

La valoración de la función del injerto tras el TH hasta el momento actual se basa en las diferentes clasificaciones descritas en la literatura (46, 56). Estas clasificaciones a partir de parámetros analíticos y clínicos del paciente en el postoperatorio inmediato, establecen en su mayoría dos grupos atendiendo a la función del injerto tras el TH: buena función y disfunción del injerto hepático.

En este proyecto, hemos desarrollado un nuevo modelo o score de valoración de la funcionalidad del injerto de manera continua, con el fin de establecer una valoración más precisa de ésta y evitar categorizaciones en grupos limitados que puede llevar a errores diagnósticos.

2.2.1. Población a estudio para el desarrollo del modelo

La muestra incluyó todos los TH realizados de manera consecutiva en el Hospital Universitario La Fe de Valencia (España) por cirrosis hepática de cualquier etiología entre el 1 de Enero del 2003 hasta el 31 de Julio del 2012, la población final del estudio comprendía 1026 trasplantes hepáticos en 981 receptores. Dichos pacientes fueron trasplantados tras ser incluidos en lista de espera para trasplante de acuerdo al MELD y el Child Pugh score. Los criterios de inclusión y exclusión fueron los descritos en el apartado 2.1.2.

2.2.2. Recolección de los datos relacionados con el donante-cirugía-receptor

La información requerida se obtuvo del registro de la Unidad de Trasplante Hepático, donde se recoge diariamente y de manera prospectiva la información relacionada con el donante, receptor (antes y después del trasplante) y con la cirugía. La información relacionada con el donante se detalla en las **Tablas 4 y 5** e incluye los datos clínicos y analíticos. Dicha información es proporcionada por el coordinador de Trasplante del hospital que genera el donante, siendo confirmada por el equipo de cirujanos del Hospital La Fe que acude al hospital correspondiente para llevar a cabo la extracción. De los pacientes que fueron trasplantados de hígado, recogimos las variables antes y después del TH **Tabla 6**. Respecto al procedimiento quirúrgico del receptor, recogimos aquellas variables detalladas en la **Tabla 7** que pueden relacionarse con la evolución clínica del paciente.

2.2.3. Protocolo de recogida de las muestras de laboratorio

Las variables clínicas y de laboratorio para evaluar la función del injerto tras el trasplante se obtuvieron mediante test bioquímicos, hematológicos y de coagulación (**Tabla 5**). Las muestras de sangre se recogieron:

1. Antes del TH: 1 hora antes del inicio de la cirugía
2. Tras el TH: durante el primer día cada 8 horas (durante las primeras 24 horas) y una vez al día ente los días 2 y 7
- 3.-Durante los días 2 al 7 tras el TH cada 24 horas.

2.2.4. Caracterización de las variables incluidas en el análisis estadístico

Las variables utilizadas para el análisis estadístico relacionadas con el donante, receptor, cirugía y evolución postoperatoria mencionadas en el apartado 2.1 se enumeran a continuación donde se clasifican según el tipo de variable. Las variables analizadas en referencia a los donantes se detallan en la **Tabla 11**.

VARIABLES CUANTITATIVAS	VARIABLES CUALITATIVAS
Código donante	Causa de muerte
Días en UCI	CMV
Edad	Discordancia sexo donante y receptor
IMC	Drogas vasoactivas
Peso	Esteatosis
Sodio	HBc Ac
Talla	Hipotensión
	Parada cardiorrespiratoria
	Sexo

Tabla 11. Caracterización de las variables relacionadas con el donante. CMV: citomegalovirus; HBc Ac: anticuerpos anticore de la hepatitis B; IMC: índice de masa corporal; UCI: unidad de cuidados intensivos.

En la **Tabla 12** se detallan las variables analizadas en referencia a los receptores junto con las mencionadas a continuación:

- Código de identificación del paciente.
- Fecha del TH.
- Fecha del exitus.
- Fecha de la última revisión.

2. Material y Métodos

Variables cuantitativas	Variables cualitativas
Child-Pugh score	Ascitis
Edad	CMV
IMC	Causa de retrasplante
MELD score	Compatibilidad ABO donante-receptor
Número de trasplante hepático	Diagnóstico
Peso	DM pretrasplante
Talla	Encefalopatía
	HBc Ac
	HCC
	HDA
	HTA pretrasplante
	PBE
	Retrasplante
	Rh
	Sexo
	TIPS

Tabla 12. Caracterización de las variables relacionadas con el receptor. CMV: citomegalovirus; DM: diabetes mellitus; HBc Ac: anticuerpos anticore de la hepatitis B; HCC: carcinoma hepatocelular; HDA: hemorragia digestiva alta; HTA: hipertensión arterial; IMC: índice de masa corporal; MELD: model for end stage liver disease; PBE: peritonitis bacteriana espontánea; TIPS: shunt portosistémico intrahepático transyugular.

Las variables relacionadas con la cirugía y analizadas en este estudio se describen en la **Tabla 13**.

2. Material y Métodos

Variables cuantitativas	Variables cualitativas
Duración de la intervención	Kehr
Plaquetas	Lavado del injerto
Salvacélulas	Síndrome post-reperfusión
TIF	
TIC	
TAA	
UCH	
UPFC	

Tabla 13. Caracterización de las variables relacionadas con la cirugía. TAA: tiempo de anastomosis arterial; TIC: tiempo de isquemia caliente; TIF: tiempo de isquemia fría; UCH: transfusión intraoperatoria de unidades de concentrado de hematies; UPFC: transfusión intraoperatoria de plasma fresco congelado.

Las variables relacionadas con la evolución y las complicaciones postoperatorias incluidas en el estudio se detallan en la **Tabla 14**.

Variables cuantitativas	Variables cualitativas
Estancia en UCI	Estado
Estancia hospitalaria	Causa de muerte
UCH	Causa de reintervención precoz
UPFC	Complicaciones vasculares
	Complicaciones biliares
	Reintervención precoz post-trasplante
	Reintervención por hemoperitoneo

Tabla 14. Caracterización de las variables relacionadas con la evolución postoperatoria. UCI: unidad de cuidados intensivos; UCH: unidades de concentrados de hematies; UPFC: unidades de plasma fresco congelado.

2.2.5. Selección de las variables clínicas del receptor para desarrollar el modelo

El primer paso a la hora de crear el nuevo score o modelo de clasificación de la función del injerto es escoger que variables del receptor están relacionadas con dicha función. De aquellos parámetros candidatos a ser incluidos en el modelo que se encuentran detallados en la **Tabla 15** realizamos un análisis de componentes principales (sPCA).

Bioquímica	Hemograma	Hemostasia
Albúmina	Hematocrito (%)	Fibrinógeno (mg/dl)
ALT (U/L)*	Hemoglobina (g/dl)	Índice de Quick (%)
AST (U/L)*	Leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$)	INR*
Bilirrubina (mg/dl)*	Plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$)	Tiempo de protrombina (s)*
Creatinina (mg/dl)		TTPA (s)
Glucosa (mg/dl)		
Iones Na/K (mEq/L)		
Proteínas totales (g/dl)		
Urea (mg/dl)		

Tabla 15. Parámetros clínicos del receptor utilizados para la selección inicial de las variables. *: parámetro utilizado frecuentemente por otros autores para definir la función del injerto; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; INR: ratio normalizado internacional; Na: sodio; K: potasio; TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activado.

2.2.6. Modelización de las variables seleccionadas para evaluar la función inicial del injerto

De las variables seleccionadas para participar en el score, estudiamos su distribución en nuestra población y basándonos en la función de distribución empírica acumulativa para cada variable (*ecdf*), desarrollamos un modelo de regresión no-lineal para asignar un valor del score para cada valor de la variable clínica. De tal modo, la *ecdf* nos da para cada posible valor de la variable la probabilidad de recibir ese valor o uno menor. El score final al que hemos llamado MEAF o modelo para la función temprana del injerto, del inglés *model for early allograft function*, corresponde a la suma de cuatro términos correspondientes a la extrapolación de cada valor de la variable incluida en el score en la función de regresión correspondiente.

2.2.7. Análisis estadístico

Para la realización del MEAF score, se realizó el análisis estadístico mediante el software R (version 2.15.3) Glmulti (version 1.0.7) y las bibliotecas mixOmics (version 4.1-4). Las variables cuantitativas se definieron como media y desviación estándar, las variables cualitativas como frecuencias. Las librerías R se utilizaron para el diseño del modelo promedio y para el análisis multivariante mediante sPCA respectivamente (171, 172). Para evaluar la relación entre el MEAF score y la supervivencia del paciente, se utilizó el modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales. El día de inicio para el análisis de supervivencia fue el día del trasplante. La supervivencia del paciente y del injerto se analizó a los 3, 6 y 12 meses tras la cirugía. El modelo de regresión multivariante se utilizó para estudiar la relación entre las variables pertenecientes al donante, cirugía y receptor que se han relacionado previamente con la disfunción del injerto y el MEAF score (**Tablas 11-14**). La importancia de la variable se estimó mediante el modelo promediado basado en los criterios de información

2. Material y Métodos

Bayesiano, el umbral de importancia se estableció en el 80% para controlar el riesgo tipo I.

3. Resultados

3.1. Población del estudio metabonómico

Durante el periodo comprendido entre el 1 de Abril del 2007 y el 31 de Julio del 2012 fueron valorados 750 donantes hepáticos en distintos hospitales de la Comunidad Valenciana (**Tabla 3**). Como resultados de estas donaciones y tras aplicar los criterios de exclusión, se llevaron a cabo 583 TH, en 556 receptores todos ellos realizados en la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante Hepático del Hospital Universitario La Fe de Valencia, y constituyeron la base inicial del estudio. De los 750 donantes valorados, 167 fueron excluidos por los motivos que a continuación (**Tabla 16**):

Causa	n
Infección bacteriana o fúngica no tratada	4
Positividad para los antígenos de superficie contra la hepatitis B, anticuerpos contra el VHC y/o del VIH	5
Esteatosis macrovesicular >40%	75
Fibrosis	45
Arteriosclerosis significativa de la arteria hepática	20
Mala perfusión del injerto	10
Tumor abdominal con histología de malignidad durante la extracción	8

Tabla 16. Donantes excluidos para trasplante hepático.

De los 583 trasplantes hepáticos realizados, 110 fueron excluidos en el estudio por los motivos descritos en la **Tabla 17**, siendo 473 TH incluidos finalmente en el estudio.

3. Resultados

Causa	n
Injertos reducidos o Split.	3
Donante vivo	4
Trasplante hepático dominó	1
Fallo hepático fulminante	26
Trasplantes hepáticos por trombosis de la arteria hepática	13
Trasplantes por fallo primario del injerto hepático	26
Receptores pediátricos (<18 años)	26
Receptores que fallecen en la primera semana post-trasplante	6
Síndrome de Budd-Chiari agudo	1
Receptores multiviscerales (hígado y riñón, hígado y pulmón)	2
Retrasplantes precoces por recurrencia precoz del virus de la hepatitis C (hepatitis colestásica fibrosante).	2

Tabla 17. Receptores excluidos del estudio.

De los 473 donantes aceptados finalmente que posibilitaron la realización de 473 trasplantes hepáticos en 467 receptores, la muestra de tejido hepático para el estudio metabonómico se tomó en 288. Con objeto de evitar sesgos en la recogida de la muestras, ésta fue realizada siempre por dos cirujanos del equipo, por lo que en 185 donantes no se tomó muestra para el análisis metabonómico.

Tras evaluar la función hepática de cada uno de los injertos de los que procedían dichas biopsias tras el TH, siguiendo los criterios de *Olthoff* mencionados (sección 2.1.3), observamos que la incidencia de EAD en nuestra población de pacientes trasplantados se aproximaba al 23%. Con el fin de obtener grupos balanceados para el análisis multivariante de los datos, para así evitar sesgos en el grupo con mayor número de pacientes, seleccionamos las primeras 60 biopsias procedentes de aquellos pacientes trasplantados en el periodo establecido y que presentaron EAD e IGF respectivamente. Del total de 120 biopsias, 48 en cada grupo se utilizaron para la realización del modelo y las 24 restantes se utilizaron para la validación externa de dicho modelo. Un paciente del grupo de validación externa se excluyó por no disponer de datos clínicos completos. Pese a que la PNF es un criterio de exclusión de los receptores incluidos en nuestro estudio, decidimos analizar 4 biopsias procedentes de los

hígados donantes de 4 pacientes que presentaron PNF en el postoperatorio inmediato precisando retrasplante urgente.

Los pacientes incluidos cumplían los criterios de inclusión y exclusión descritos en el apartado 2.1.2. La metodología de obtención de la muestra y procesamiento de las mismas es la descrita en los apartados 2.1.8. y 2.1.9.

3.2. Características de población del estudio metabonómico

Los datos relacionados con el donante para los dos grupos mencionados (EAD e IGF) tanto para las biopsias seleccionadas para la realización del modelo como para la validación externa se detallan en la **Tabla 18 y 19** respectivamente. Atendiendo a las características de los donantes, el estudio estadístico realizado demostró que no existían diferencias significativas entre ambos grupos, EAD e IGF, tanto entre los 96 pacientes para la creación del modelo (**Tabla 18**), como entre los 23 pacientes del grupo de validación externa (**Tabla 19**).

	IGF n=48	EAD n=48	p-valor
Edad (años)	54.2 ± 18.7	57.8 ± 14	0.3 ^a
Sexo (masculino/femenino)	28/20	33/15	0.5 ^a
IMC (kg/m ²)	25.6 ± 3.9	26.3 ± 4.7	0.6 ^a
Hipotensión (sí/no)	17/31	18/30	0.9 ^a
PCR (sí/no)	7/41	2/46	0.2 ^a
Esteatosis hepática			
No	32	32	0.9 ^a
Leve	9	13	0.4 ^a
Moderada	7	3	0.8 ^a
HBcAc (positivo/negativo)	8/40	6/42	0.8 ^b
CMV (positivo/negativo)	35/13	40/8	0.6 ^b
Bilirubin (mg/dl)	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.4	0.5 ^a
ALT (U/L)	47 ± 49	38 ± 31	0.7 ^a
INR	1.7 ± 1.6	1.1 ± 0.4	0.2 ^a

Tabla 18. Información relacionada con el donante utilizada para la creación del modelo. Las variables continuas se expresan como media ± desviación estándar. ^aTest t de Student o test de los rangos de Wilcoxon's; ^b test de chi-cuadrado. ALT: alanina aminotransferasa; HBc Ac: anticuerpos anticore de la hepatitis B; IMC: índice de masa corporal; CMV: citomegalovirus; INR: ratio normalizado internacional; PCR: parada cardiorrespiratoria.

3. Resultados

	IGF n=11	EAD n=12	p-valor
Edad (años)	60.4 ± 19.4	49.8 ± 15.6	0.12 ^a
Sexo (masculino/femenino)	6/5	7/5	1 ^a
IMC (kg/m ²)	28.1 ± 3.6	25.9 ± 2.5	0.11 ^a
Hipotensión (sí/no)	4/7	4/8	1 ^a
PCR (sí/no)	1/10	2/10	1 ^a
Esteatosis hepática			
No	8	7	0.8 ^a
Leve	2	5	0.4 ^a
Moderada	1		
HBcAc (positivo/negativo)	1/10	0/12	0.8 ^b
CMV (positivo/negativo)	8/3	8/4	0.9 ^b
Bilirubin (mg/dl)	0.68 ± 0.5	0.77 ± 0.43	0.7 ^a
ALT (U/L)	39 ± 63	37 ± 26	0.8 ^a
INR	1.1 ± 0.4	1.25 ± 0.4	0.7 ^a

Tabla 19. Información relacionada con el donante utilizada para la validación externa del modelo. Las variables continuas se expresan como media ± desviación estándar. ^aTest t de Student o test de los rangos de Wilcoxon's; ^b test de chi-cuadrado. ALT: alanina aminotransferasa; HBc Ac: anticuerpos anticore de la hepatitis B; IMC: índice de masa corporal; CMV: citomegalovirus; INR: ratio normalizado internacional; PCR: parada cardiorrespiratoria.

Con respecto a los receptores, el análisis estadístico no demostró diferencias significativas en la mayoría de las variables entre ambos grupos, EAD e IGF, ni en los 96 pacientes para la creación del modelo (**Tabla 20**) ni en los 23 que se utilizaron para la validación externa (**Tabla 21**). Las únicas variables que mostraron diferencias significativas entre los grupos de EAD e IGF fueron las variables analíticas utilizadas para definir ambos grupos: bilirrubina, ALT e INR. Cuando valoramos la estancia hospitalaria post- trasplante en los 96 pacientes del estudio, el análisis estadístico realizado mostró una mayor estancia hospitalaria post-trasplante en el grupo de EAD siendo este dato significativo desde el punto de vista estadístico (p=0.004).

3. Resultados

	IGF n=48	EAD n=48	p-valor
Edad (años)	53.3 ± 7.3	53.4 ± 7.7	0.4 ^a
Sexo (masculino/femenino)	31/17	38/10	0.3 ^a
IMC (kg/m²)	44.6 ± 68.8	36 ± 43.6	0.6 ^a
MELD Score			
<14	21	14	0.2 ^b
15-19	15	19	0.4 ^b
20-24	6	7	0.6 ^b
25-29	4	6	0.4 ^b
>30	2	2	0.3 ^b
Child-Pugh Score			
A	13	10	0.6 ^b
B	18	16	0.7 ^b
C	17	22	0.6 ^b
Estancia hospitalaria (días)	14.5 ± 7.4	30.7 ± 27.8	0.004 ^a
Transfusión PO UCH (sí/no)	11/37	18/30	0.3 ^a
Bilirrubina γ _{DPO} (mg/dl)	3.1 ± 2.3	14 ± 10.1	<0.001 ^a
ALT_{pico} (U/L)	471 ± 288.7	1081 ± 757	<0.001 ^a
INR_{pico}	1.9 ± 0.5	2.4 ± 0.52	<0.001 ^a
Exitus (sí/no)	6/42	7/41	0.9 ^b

Tabla 20. Información relacionada con el receptor para la creación del modelo. EAD: pacientes que mostraban disfunción temprana del injerto; IGF: pacientes que mostraban buena función inicial del injerto. Las variables continuas se expresan como media ± desviación estándar. ^a Test de Student o test de los rangos de Wilcoxon; ^b test de chi-cuadrado. ALT: alanina aminotransferasa. IMC: índice de masa corporal; INR: ratio normalizado internacional; MELD: model for end stage liver disease; PO: postoperatoria; UCH: unidades de concentrado de hemáties.

	IGF n=11	EAD n=12	p-valor
Edad (años)	54.4 ± 6.9	52 ± 7.5	0.4 ^a
Sexo (masculino/femenino)	7/4	8/4	1 ^a
IMC (kg/m²)	26.2 ± 3.8	27.3 ± 3.2	0.5 ^b
MELD Score			
<14	3	2	0.9 ^b
15-19	8	7	0.7 ^b
20-24		3	
25-29			
>30			
Child-Pugh Score			
A	2	3	1 ^b
B	5	6	1 ^b
C	4	3	0.8 ^b
Estancia hospitalaria (días)	18.8 ± 14.2	27.1 ± 16.6	0.1 ^a
Transfusión PO UCH (sí/no)	3/8	5/7	0.5 ^b
Bilirrubina			
γDPO (mg/dl)	4 ± 3.5	10.3 ± 6.5	0.02 ^a
ALT_{pico} (U/L)	386 ± 330	1893 ± 1520	0.04 ^a
INR_{pico}	1.94 ± 0.4	2.7 ± 0.6	0.001 ^a
Exitus (sí/no)	0/11	1/11	1

Tabla 21. Información relacionada con el receptor para la validación externa. EAD: pacientes que mostraban disfunción temprana del injerto; IGF: pacientes que mostraban buena función inicial del injerto. Las variables continuas se expresan como media ± desviación estándar. ^a Test de Student o test de los rangos de Wilcoxon; ^b test de chi-cuadrado. ALT: alanina aminotransferasa. IMC: índice de masa corporal; INR: ratio normalizado internacional; MELD: model for end stage liver disease; PO: postoperatoria; UCH: unidades de concentrados de hemáties.

3. Resultados

Para los mismos grupos de pacientes también comparamos las variables relacionadas con el procedimiento quirúrgico del trasplante. Como se muestran en las **Tablas 22 y 23**, ninguna variable mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (EAD e IGF) ni en el grupo de pacientes para la creación del modelo (**Tabla 22**) ni en el de validación externa (**Tabla 23**).

	IGF n=48	EAD n=48	p-valor
Duración de la cirugía (min)	249 ± 48	261 ± 45	0.3 ^a
TIF (min)	307 ± 169	375 ± 181	0.1 ^a
TIC (min)	45.6 ± 14	43.6 ± 10	0.5 ^a
Tiempo de anastomosis arterial (min)	37.8 ± 15.2	43.9 ± 16.9	0.07 ^a
Salvacélulas (mL)	751.5 ± 496	685.5 ± 500	0.6 ^a
Transfusión de UCH	3 ± 2.6	3.4 ± 2.8	0.5 ^a
Transfusión de UPFC (unidades)	2.6 ± 1.8	2.9 ± 1.8	0.6 ^a
Síndrome postreperfusión (sí/no)	5/43	8/40	0.6 ^b

Tabla 22. Información relacionada con la cirugía para la creación del modelo. EAD: pacientes que mostraban disfunción temprana del injerto; IGF: pacientes que mostraban buena función inicial del injerto. Las variables continuas se expresan como media ± desviación estándar. ^aTest t de Student o test de los rangos de Wilcoxon's; ^b test de chi-cuadrado; TIC: tiempo de isquemia caliente; TIF: tiempo de isquemia fría; UCH: unidades de concentrado de hematíes; UPFC: unidades de plasma fresco congelado.

3. Resultados

	IGF n=11	EAD n=12	p-valor
Duración de la cirugía (min)	252 ± 55	263 ± 50	0.6 ^a
TIF (min)	228 ± 146	353 ± 195	0.09 ^a
TIC (min)	41 ± 16	52 ± 41	0.4 ^a
Tiempo de anastomosis arterial (min)	38 ± 16	44 ± 15	0.3
Salvacélulas (mL)	722 ± 470	513 ± 390	0.3 ^a
Transfusión de sangre	2.4 ± 2.3	3.08 ± 2.6	0.5 ^a
Transfusión de UPFC (unidades)	1.6 ± 1.2	2.6 ± 1.6	0.09 ^a
Síndrome postreperfusión (sí/no)	3/8	4/8	1 ^b

Tabla 23. Información relacionada con la cirugía para la validación externa. EAD: pacientes que mostraban disfunción temprana del injerto; IGF: pacientes que mostraban buena función inicial del injerto. Las variables continuas se expresan como media ± desviación estándar. ^aTest t de Student o test de los rangos de Wilcoxon's; ^b test de chi-cuadrado; TIC: tiempo de isquemia caliente; TIF: tiempo de isquemia fría; UPFC: unidades de plasma fresco congelado.

No encontramos diferencias significativas entre los grupos en cuanto a duración del procedimiento quirúrgico, tiempo de isquemia caliente, tiempo de anastomosis arterial, volumen de sangre recuperado por el salvacélulas así como en la transfusión intraoperatoria de hemoderivados.

3. Resultados

En resumen, estos resultados muestran que ambos grupos (EAD, IGF) son comparables con respecto a las características de donante, cirugía y receptor, evitando cualquier sesgo que pudiera alterar los resultados. Ello nos permite focalizar nuestro estudio en la búsqueda de marcadores relacionados exclusivamente con la funcionalidad/calidad del injerto.

A continuación detallamos la información relacionada con los cuatro pacientes que presentaron PNF en el postoperatorio inmediato y de los que recogimos muestras de tejido hepático para el análisis metabonómico (**Tabla 24**), sin observar claros factores de riesgo de disfunción.

		PNF (n=4)
Edad (años)		64.25 ± 8.3
Género (masculino/femenino)		2/2
IMC (kg/m ²)		29 ± 4
Hipotension (sí/no)		2/2
Parada cardiorrespiratoria (sí/no)		1/3
Esteatosis hepática	No	3
	Leve	1
	Moderada	0
HBcAc (positivo/negativo)		1/3
CMV (positivo/negativo)		3/1
Bilirrubina _{7DPO} (mg/dl)		1.13 ± 1
ALT _{pico} (U/L)		50.25 ± 44
INR _{pico}		1.5 ± 1

Tabla 24. Información relacionada con el donante de los pacientes que presentaron PNF. ALT: alanina aminotransferasa; HBc Ac: Anticuerpos anticore del la hepatitis B; IMC: índice de masa corporal; CMV: citomegalovirus; INR: ratio normalizado internacional.

Las variables relacionadas con los 4 receptores se muestran a continuación, donde observamos un mayor pico de ALT e INR en las primeras 72 horas tras el TH. No disponemos del valor de la bilirrubina el día 7 tras el trasplante ya que

3. Resultados

estos pacientes fallecieron o se retrasplantaron antes del día 7 tras el TH (**Tabla 25**).

		PNF (n=4)
Edad (años)		58 ± 4.2
Género (masculino/femenino)		2/2
IMC (kg/m ²)		31.8 ± 5.1
	<14	0
	15-19	3
MELD Score	20-24	1
	25-29	0
	>30	0
Child-Pugh Score	A	0
	B	2
	C	2
Estancia hospitalaria (días)		22 ± 18
Transfusión postoperatoria de UCH (sí/no)		2/2
Bilirrubina γ _{DPO} (mg/dl)		-
ALT (U/L)		4975 ± 3200
INR		3.4 ± 1.1
Exitus (yes/no)		3/1

Tabla 25. Información relacionada con los receptores que presentaron PNF. ALT: alanina aminotransferasa; IMC: índice de masa corporal; INR: ratio normalizado internacional; UCH: unidad de concentrado de hematíes.

Las variables relacionadas con el procedimiento quirúrgico en estos 4 pacientes que presentaron PNF se muestran a continuación (**Tabla 26**).

	PNF (n=4)
Duración de la cirugía (min)	310 ± 87.6
TIF (min)	451 ± 160
TIC (min)	35 ± 9
Tiempo de anastomosis arterial (min)	55 ± 40
Salvacélulas (mL)	876 ± 399
Transfusión de UCH	2.25 ± 1.23
Transfusión de UPFC (unidades)	3.5 ± 1
Síndrome post-reperfusión (sí/no)	1/3

Tabla 26. Información relacionada con la cirugía de los pacientes que presentaron PNF. TIC: tiempo de isquemia caliente; TIF: tiempo de isquemia fría, UCH: unidad de concentrado de hemáties; UPFC: unidad de plasma fresco congelado.

3.3. Seguimiento de la robustez instrumental y de la calidad de los datos

Como ya se ha descrito en material y métodos, el correcto funcionamiento instrumental así como la calidad de los datos se monitorizó siguiendo una estrategia rigurosa de control de calidad en el análisis de las muestras. Las **Figuras 14-16** muestran los valores obtenidos para: t_r , área de pico cromatográfico y exactitud de masas para todos los compuestos incluidos en el poolmix y analizados en la fase reversa en condiciones de ESI positivo. Como observamos en la **Figura 14**, el tiempo de retención para los diferentes compuestos se mantiene entre los límites de desviación aceptada.

3. Resultados

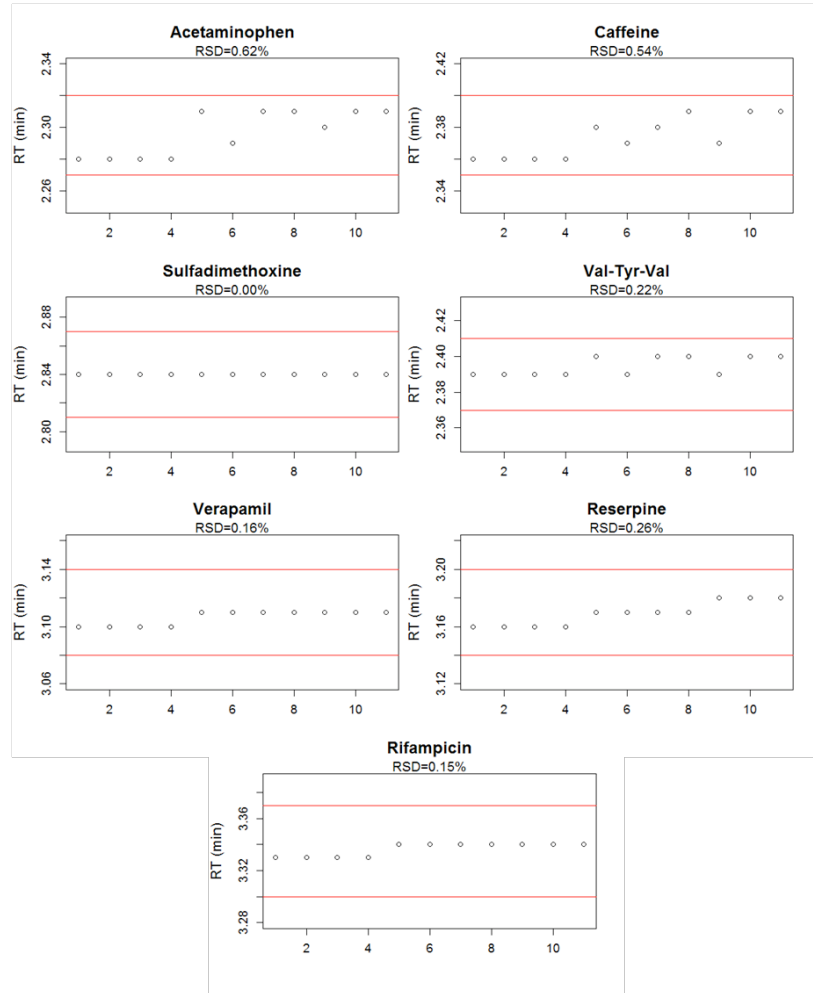


Figura 14. Los valores obtenidos para el tiempo de retención (RT, expresado en minutos) para los diferentes compuestos incluidos en el poolmix QC. Las líneas rojas indican la desviación aceptada $\pm 1\%$ para el RT.

En la **Figura 15** se muestra como los valores obtenidos para el pico área para los diferentes compuestos incluidos en el poolmix QC se mantiene entre la desviación aceptada para el área del $\pm 15\%$.

3. Resultados

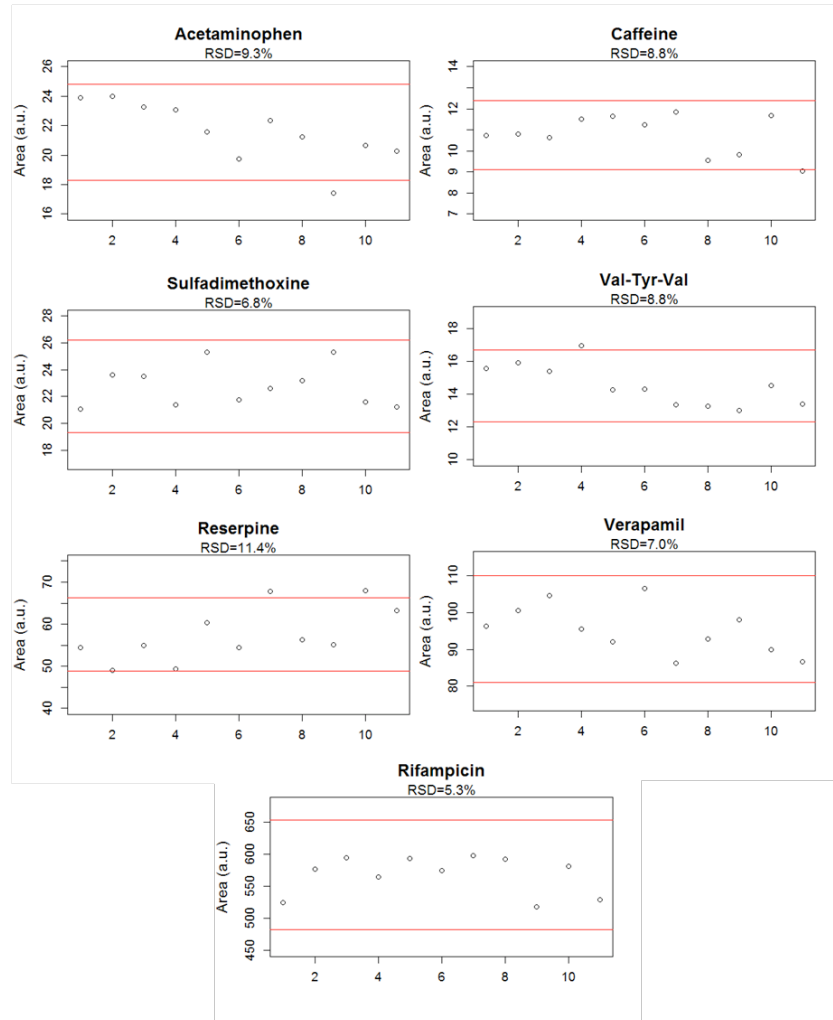


Figura 15. Los valores obtenidos para el pico área (expresados en unidades arbitrarias) para los diferentes compuestos incluidos en el poolmix QC. Las líneas rojas indican la desviación aceptada para el área del $\pm 15\%$.

En la **Figura 16** se muestran los valores obtenidos para el error de masas (expresado en ppm) para los diferentes compuestos del poolmix del control de calidad, sin encontrar errores más allá de los 5 ppm permitidos.

3. Resultados

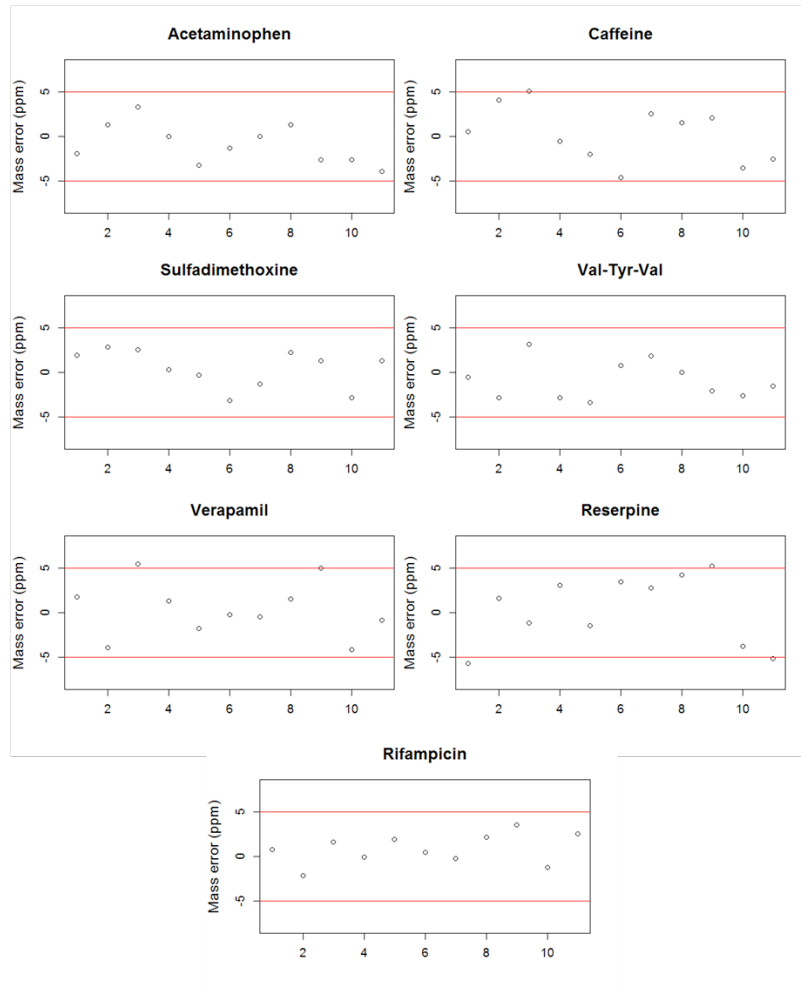


Figura 16. Los valores obtenidos para el error de masas (expresado in ppm) para los diferentes compuestos incluidos en el poolmix QC. Las líneas rojas indican los criterios aceptados de ± 5 ppm como hemos especificado en el texto.

En la **Figura 17** se muestran los valores obtenidos para el tiempo de retención, área pico y el error de masas para los dos estándares internos (leucina enkephalina y rifampicina) añadidos a las muestras problema, encontrándose en su mayoría entre los límites establecidos.

3. Resultados

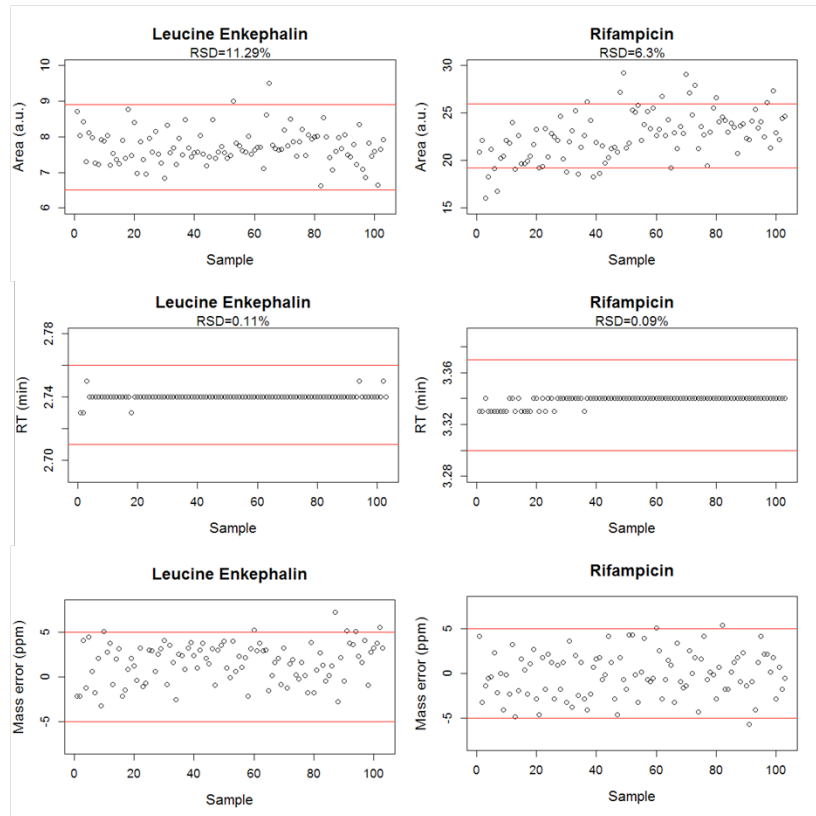


Figura 17. Los valores obtenidos para el tiempo de retención (panel superior), área pico (panel del medio) y el error de masas (panel inferior) para los dos estándares internos (leucina enkephalina y rifampicina) añadidos a las muestras problema. Cada gráfico muestra los valores para todas las muestras problema analizadas en fase reversa en condiciones ESI positivo. Las líneas rojas de los gráficos del panel inferior indican los criterios de aceptación para cada parámetro: 15% de desviación del área, 1% de desviación del tiempo de retención (RT) y 5ppm para el error de masas.

3. Resultados

Para investigar el agrupamiento natural de los diferentes tipos de muestras (blancos, poolmix, EAD, IGF), realizamos un análisis de componentes principales (PCA). Podemos observar que todas las muestras pertenecientes al mismo tipo (blanco, poolmix y muestras problema) se agrupan juntas y de manera separada de las muestras pertenecientes a un tipo diferente (**Figura 18**). Todos estos resultados indican el buen funcionamiento del sistema UPLC-QToF a lo largo del análisis para las diferentes condiciones analíticas, ya que cada tipo de muestra se localiza en su correspondiente grupo.

3. Resultados

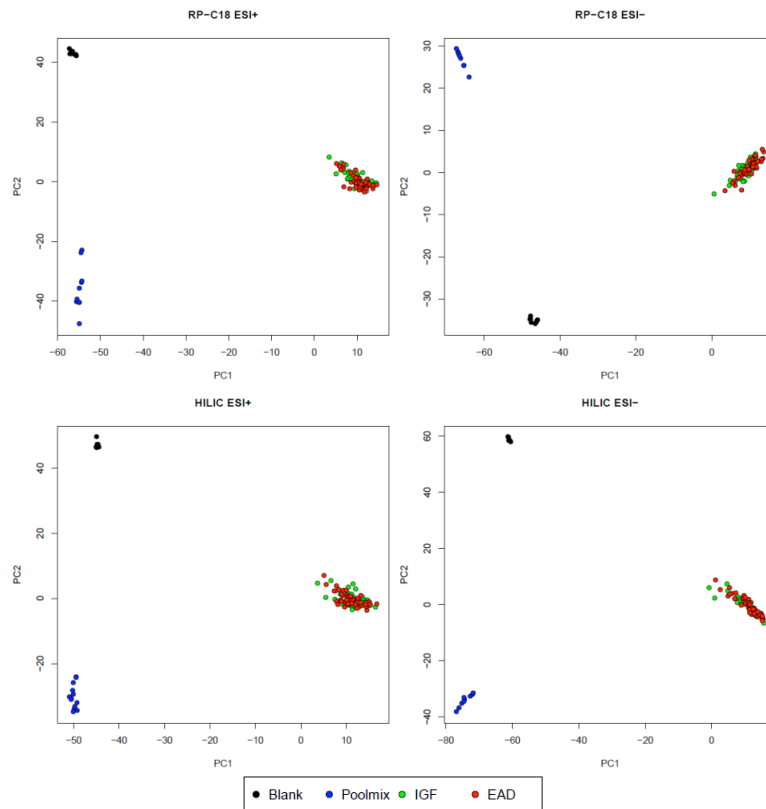


Figura. 18. Score plots de PCA, uno para cada condición analítica. En cada gráfica se muestran las muestras problema (los grupos buena función inicial y disfunción inicial del injerto del inglés “early allograft dysfunction” (EAD)) y las muestras QC (blancos y poolmix) analizadas bajo una condición analítica específica (C18 ESI+, C18 ESI-, HILIC ESI+, HILIC ESI-).

3.4. Perfil metabólico de injertos hepáticos humanos

El análisis por UPLC-Q-ToF permitió detectar un total de 1697 características (intensidad, m/z y rt), en un rango de masas entre 50-1000 Dalton. Los datos en crudo del espectrómetro de masas se normalizaron en relación a la intensidad de un estándar interno (leucina encefalina). Posteriormente, se realizó un procedimiento de selección de variables para eliminar aquellas carentes de información, lo que permitió reducir el número de biomarcadores potenciales a 369 y mejorar el análisis multivariante de los datos (MVDA).

3.4.1. Elucidando la firma metabólica de la función del injerto

Realizamos un análisis por PCA de las variables seleccionadas (369) con el fin de investigar el agrupamiento natural de las muestras y la detección de posibles valores extremos. El score plot del PCA muestra una separación clara entre las muestras de EAD e IGF con muy pocos solapamientos entre ellos. (**Figura 19A**). Además, no se identificó ninguna de las muestras como valores extremos, cayendo todas en el Hotelling's T2 (95% elipse del intervalo de confianza). Estos resultados sugerían la existencia de una huella metabólica subyacente capaz de discriminar entre los diferentes fenotipos de los injertos hepáticos (EAD, IGF). Para investigar más profundamente este patrón metabólico, realizamos un MVDA supervisado mediante el análisis de tipo PLSDA. El score plot de PLSDA de los dos primeros componentes mostró una separación evidente de los grupos sin ningún solapamiento entre las muestras (**Figura 19B**).

Los parámetros de ajuste del modelo, se comprobaron mediante validación cruzada (CV), mostrando un R^2 de 0.85; y un Q^2 de 0.69. R^2 indica lo bien que el modelo explica la variabilidad de una variable y Q^2 indica la capacidad predictiva del modelo, siendo mejor cuanto más cerca de 1 tanto para R^2 como para Q^2 . Pese a que estos valores son aceptables, aplicamos un segundo procedimiento de validación más riguroso mediante un test de permutación de

3. Resultados

clases cuyos resultados confirmaron la consistencia y fiabilidad del modelo (Figura 19C).

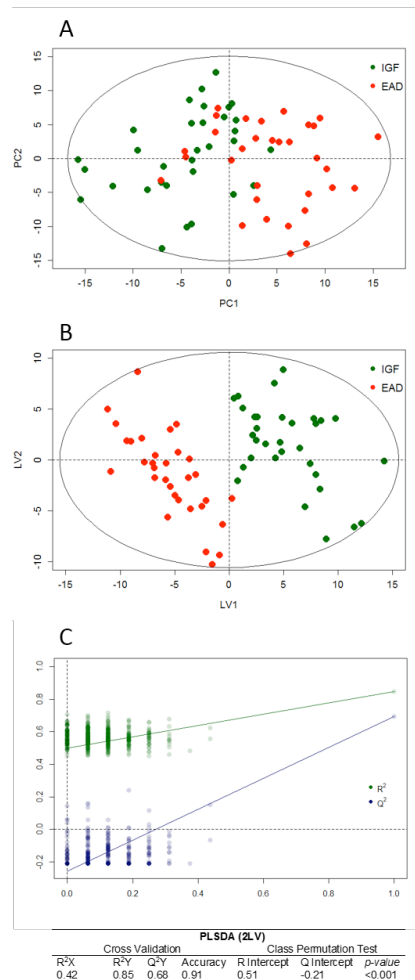


Figura 19. Análisis multivariante del perfil metabonómico de los donantes. **(A)** Los gráficos de *score* del PCA muestran una tendencia a la separación entre los pacientes que muestran disfunción inicial del injerto (EAD, rojo) y buena función inicial (IGF, verde). **(B)** El gráfico de *score* del PLSDA muestra una separación completa entre los grupos (EAD, IGF). **(C)** Validación del modelo de PLSDA mediante el test de permutación de clases. El eje vertical del gráfico nos informa de los valores de R^2 (bondad de ajuste) y Q^2 (bondad de predicción) para cada modelo. El eje horizontal representa la correlación entre los datos reales y los permutados (clase “y”).

3. Resultados

A continuación se procedió a la identificación de los posibles marcadores, de las 369 variables incluidas en el modelo anterior, de las que fuimos capaces de identificar 93 metabolitos. En la **Tabla 27** se representa información más detallada sobre dichos metabolitos (biofirma metabolómica discriminante).

3. Resultados

Nombre	Niveles de los metabolitos		p-Valor	p-valor ajustado	Ruta metabólica	Ruta metabólica
	IGF	EAD				
Histamina	4.82 ± 0.10	4.87 ± 0.09	0.06	0.09	Derivados de los aminoácidos	Aminoácidos y péptidos
Ácido PiroGlutamico	6.21 ± 0.18	6.09 ± 0.20	0.014	0.04		
Ácido Urocancico	5.42 ± 0.36	5.62 ± 0.20	0.01	0.04		
Glutamato	6.15 ± 0.10	6.21 ± 0.14	0.04	0.06	Aminoácidos	
Glutamina	5.33 ± 0.19	5.21 ± 0.20	0.02	0.05	Peptide	
Histidina	6.16 ± 0.48	6.42 ± 0.21	0.009	0.04		
Ácido Gamma Glutamylglutamico	5.81 ± 0.16	5.92 ± 0.17	0.011	0.04		
Tripeptido(GluAsnAsn)	6.03 ± 0.18	6.14 ± 0.25	0.05	0.07		
Sorbitol-6-fosfato	5.09 ± 0.15	5.01 ± 0.15	0.04	0.07	Azúcares fosfatos	Carbohidratos
Deoxyglucosa	5.37 ± 0.09	5.41 ± 0.09	0.07	0.09	Azúcares	
Erythrosa	5.01 ± 0.07	5.06 ± 0.07	0.014	0.04		
Ácido Galactonio	5.86 ± 0.10	5.94 ± 0.15	0.03	0.05		
Galactolactone	6.54 ± 0.15	6.63 ± 0.20	0.03	0.06		
FAD	5.48 ± 0.34	5.61 ± 0.20	0.08	0.09	Vitaminas and cofactores	Vitaminas y cofactores
Acido Glicochenodeoxycholico	6.41 ± 0.34	6.59 ± 0.36	0.05	0.08	Ácidos biliares	
ÁcidoGlycocholico	6.15 ± 0.36	6.33 ± 0.41	0.08	0.09		
ÁcidoGlycochenodeoxycholi co 7-sulfate	5.42 ± 0.61	5.78 ± 0.88	0.07	0.09		
Sulfoglycolithocholate	6.06 ± 0.42	6.26 ± 0.44	0.07	0.09		
ÁcidoTaurochenodeoxycholi co	6.03 ± 0.31	6.21 ± 0.33	0.03	0.06		
ÁcidoTaurocholico	5.71 ± 0.32	5.93 ± 0.40	0.02	0.05		
Carnitina(14:0)	7.31 ± 0.23	7.18 ± 0.36	0.09	0.09	Carnitinas	
Carnitina(18:0)	7.56 ± 0.15	7.46 ± 0.23	0.05	0.08		
Carnitina(18:2)	7.73 ± 0.22	7.61 ± 0.33	0.09	0.1		
Carnitina(6:0)	6.33 ± 0.23	6.17 ± 0.44	0.07	0.09		
FA(14:0)	4.89 ± 0.24	4.73 ± 0.43	0.07	0.09	Ácidos grasos	
FA(18:2)	5.42 ± 0.22	5.23 ± 0.46	0.04	0.07		
N-docosahexaenoyl GABA	5.91 ± 0.33	6.10 ± 0.32	0.02	0.05		
N-palmitoylthreonina	5.34 ± 0.37	5.56 ± 0.45	0.04	0.06		
Citicolina	6.62 ± 0.14	6.54 ± 0.22	0.09	0.1	Metabolismo de los Glicerolipidos	
Glycerol 3-phosphate	5.48 ± 0.16	5.55 ± 0.16	0.09	0.1		
Fosfocolina	6.33 ± 0.14	6.39 ± 0.16	0.09	0.1		
LysoPA(16:0)	4.76 ± 0.18	4.83 ± 0.15	0.08	0.09	Lisofosfolipidos	Lipidos
LysoPC(16:0)	7.35 ± 0.14	7.43 ± 0.14	0.03	0.05		
LysoPC(16:1)	5.30 ± 0.26	5.44 ± 0.23	0.02	0.05		
LysoPC(18:0)	6.90 ± 0.16	7.02 ± 0.16	0.004	0.03		
LysoPC(18:1)	6.27 ± 0.18	6.43 ± 0.16	0.0006	0.015		
LysoPC(18:2)	6.29 ± 0.20	6.43 ± 0.23	0.015	0.05		
LysoPC(20:3)	5.32 ± 0.33	5.57 ± 0.23	0.0007	0.015		
LysoPC(20:4)	5.78 ± 0.26	5.97 ± 0.25	0.005	0.03		
LysoPC(O-16:0)	5.33 ± 0.15	5.49 ± 0.19	0.0003	0.015		
LysoPC(O-16:2)	5.66 ± 0.14	5.74 ± 0.15	0.03	0.05		
LysoPC(O-18:1)	5.35 ± 0.19	5.51 ± 0.18	0.0009	0.015		
LysoPE(18:0)	5.88 ± 0.18	6.02 ± 0.27	0.02	0.05		
LysoPE(18:1)	5.29 ± 0.22	5.45 ± 0.27	0.012	0.04		
LysoPE(20:0)	5.97 ± 0.10	6.04 ± 0.15	0.03	0.06		
LysoPE(20:1)	5.69 ± 0.15	5.79 ± 0.12	0.004	0.03		
LysoPE(20:2)	5.89 ± 0.10	5.94 ± 0.13	0.09	0.1		
LysoPE(O-16:1)	5.07 ± 0.09	5.13 ± 0.19	0.09	0.1		
LysoPG(16:1)	4.67 ± 0.29	4.86 ± 0.32	0.019	0.05		
LysoPI(16:0)	5.51 ± 0.24	5.62 ± 0.24	0.08	0.09		
LysoPI(18:1)	5.23 ± 0.22	5.41 ± 0.22	0.0015	0.018		
LysoPI(18:2)	5.45 ± 0.16	5.53 ± 0.20	0.06	0.09		
LysoPI(20:3)	5.07 ± 0.15	5.22 ± 0.17	0.0005	0.015		
LysoPI(20:4)	5.96 ± 0.14	6.07 ± 0.14	0.004	0.03		

Continua en la página siguiente

3. Resultados

Nombre	Niveles de los metabolitos		p-Valor	p-valor ajustado	Ruta metabólica	Ruta metabólica
	IGF	EAD				
Retinoylβ-glucuronido	4.36 ± 0.52	4.89 ± 0.74	0.0015	0.018	Miscelánea	
26-hydroxicolesterol sulfato	5.21 ± 0.2	5.37 ± 0.26	0.009	0.04		
PC(32:0)	6.83 ± 0.15	6.93 ± 0.13	0.003	0.03	Fosfolípidos	
PC(34:1)	8.14 ± 0.12	8.22 ± 0.08	0.003	0.03		
PC(36:1)	6.62 ± 0.22	6.75 ± 0.22	0.03	0.06		
PC(36:3)	7.75 ± 0.14	7.83 ± 0.14	0.016	0.05		
PC(36:4)	8.31 ± 0.08	8.35 ± 0.06	0.01	0.04		
PC(36:5)	7.49 ± 0.26	7.64 ± 0.26	0.02	0.05		
PC(38:3)	6.72 ± 0.25	6.84 ± 0.28	0.07	0.09		
PC(38:4)	7.55 ± 0.17	7.64 ± 0.17	0.04	0.06		
PC(38:5)	7.45 ± 0.1	7.51 ± 0.11	0.02	0.05		
PC(38:6)	8.01 ± 0.19	8.13 ± 0.13	0.005	0.03		
PC(38:7)	6.17 ± 0.2	6.28 ± 0.19	0.03	0.05		
PC(40:5)	6.05 ± 0.16	6.15 ± 0.15	0.007	0.04		
PC(40:6)	7.01 ± 0.28	7.18 ± 0.18	0.006	0.03		
PC(40:7)	6.57 ± 0.24	6.73 ± 0.25	0.011	0.04		
PC(O-32:0)	5.74 ± 0.08	5.79 ± 0.13	0.08	0.09		
PC(O-34:1)	5.86 ± 0.14	5.98 ± 0.13	0.0008	0.015		
PC(O-34:2)	5.61 ± 0.18	5.68 ± 0.15	0.08	0.09		
PC(O-36:3)	5.57 ± 0.19	5.66 ± 0.16	0.05	0.07		
PC(O-36:4)	6.23 ± 0.17	6.30 ± 0.13	0.07	0.09		
PC(O-38:5)	6.36 ± 0.18	6.44 ± 0.13	0.03	0.06		
PE(34:1)	5.68 ± 0.16	5.76 ± 0.19	0.06	0.09		
PE(36:2)	4.72 ± 0.37	4.84 ± 0.09	0.08	0.09		
PE(38:1)	5.85 ± 0.14	5.94 ± 0.13	0.013	0.04		
PE(38:6)	6.69 ± 0.21	6.83 ± 0.17	0.003	0.03		
PE(40:3)	5.45 ± 0.18	5.53 ± 0.21	0.09	0.1		
PE(40:5)	5.42 ± 0.18	5.53 ± 0.19	0.02	0.05		
PE(40:6)	5.9 ± 0.22	6.01 ± 0.15	0.02	0.05		
PE(40:7)	5.75 ± 0.19	5.87 ± 0.19	0.013	0.04		
PE(42:6)	5.79 ± 0.2	5.89 ± 0.14	0.02	0.05		
PG(38:7)	4.78 ± 0.27	4.91 ± 0.26	0.05	0.07		
PG(40:7)	5.89 ± 0.32	6.06 ± 0.25	0.02	0.05		
PG(40:8)	5.8 ± 0.3	5.93 ± 0.19	0.05	0.07		
SM(d32:1)	6.58 ± 0.13	6.63 ± 0.12	0.09	0.09	Esfingomielinas	
SM(d34:0)	6.06 ± 0.15	6.14 ± 0.12	0.018	0.05		
SM(d38:1)	5.49 ± 0.17	5.55 ± 0.11	0.07	0.09		
SM(d40:2)	5.36 ± 0.14	5.41 ± 0.09	0.05	0.07		
SM(d42:2)	5.48 ± 0.33	5.62 ± 0.15	0.03	0.05		

Tabla 27. Biofirma metabólica discriminante. EAD: pacientes que muestran disfunción inicial del injerto; IGF, pacientes que muestran función inmediata del injerto. Las intensidades de los metabolitos están relacionadas con un estándar interno y se expresan en unidades arbitrarias como media ± desviación estándar. El valor estadístico de la p se calculó utilizando el test de Student; el valor ajustado de la p se calculó mediante el “false discovery rate” (FDR) (Benjamini and Hochberg).

3. Resultados

Los metabolitos detectados como biomarcadores en el grupo de EAD se agruparon según su clase (**Figura 20**). Se observaron cambios significativos en los niveles de ácidos biliares (BAs) ($p < 0.01$), lisofosfatidilcolinas (LysoPCs) ($p < 0.01$), lisofosfatidiletanolaminas (LysoPEs) ($p < 0.01$), lisofosfolípidos (LysoPLs) ($p < 0.001$), fosfatidilcolinas (PCs) ($p < 0.01$), fosfatidiletanolaminas (PEs) ($p < 0.01$), fosfolípidos (PLs) ($p < 0.01$), esfingomiélinas (SMs) ($p < 0.05$) y componentes del metabolismo de la histidina ($p < 0.01$).

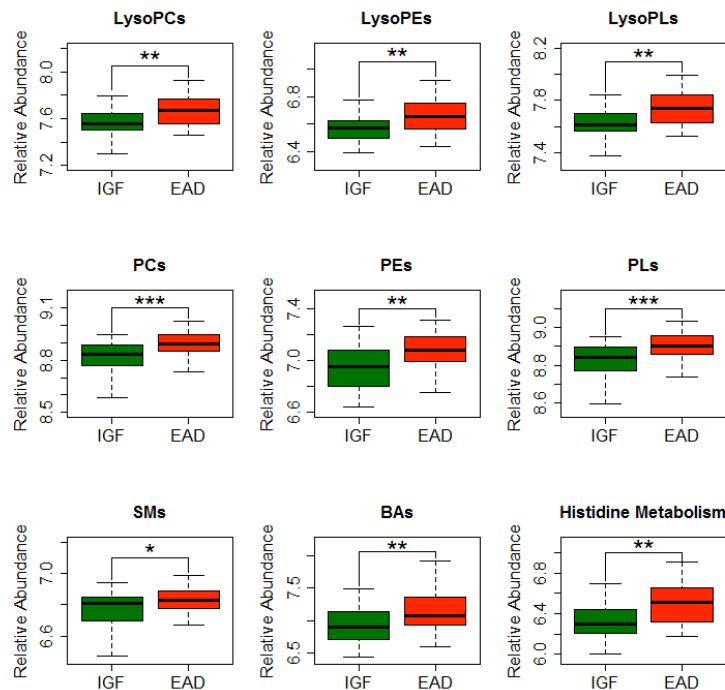


Figura 20. Distribución de las clases de metabolitos en la firma metabólica. Las cajas rojas y verdes representan los pacientes que muestran disfunción inicial del injerto (EAD, rojo) y función inmediata del injerto (IGF, verde) respectivamente. Las líneas representan las medianas y el diagrama de cajas y bigotes refleja los percentiles 10 y 90. La abundancia relativa de metabolitos se calcula comparando el pico de intensidad de los metabolitos a una concentración constante por mg de tejido de un estándar interno conocido. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ***; $p < 0.001$.

3.4.2. Visualización de las ruta metabólicas alteradas

Los 93 metabolitos identificados (**Tabla 27**) y sus concentraciones relativas se utilizaron para realizar un análisis cuantitativo de enriquecimiento funcional (169). La **Figura 21A** muestra las rutas metabólicas significativamente alteradas en los injertos de mala calidad (grupo EAD). El análisis funcional demostró que los metabolitos de la degradación de fosfolípidos, del metabolismo de la histidina y de la biosíntesis de ácidos biliares estaba aumentado (p-valor ajustado <0.05) de manera significativa. Otras rutas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno (reciclaje del amonio y ciclo de la urea) también se encontraron alteradas. Conjuntamente, estos resultados sugieren, que los injertos que mostraron EAD están expuestos a niveles elevados lípidos y de ácidos biliares que podrían desencadenar distintos procesos biológicos de regulación y/o potencial efectos tóxicos.

3. Resultados

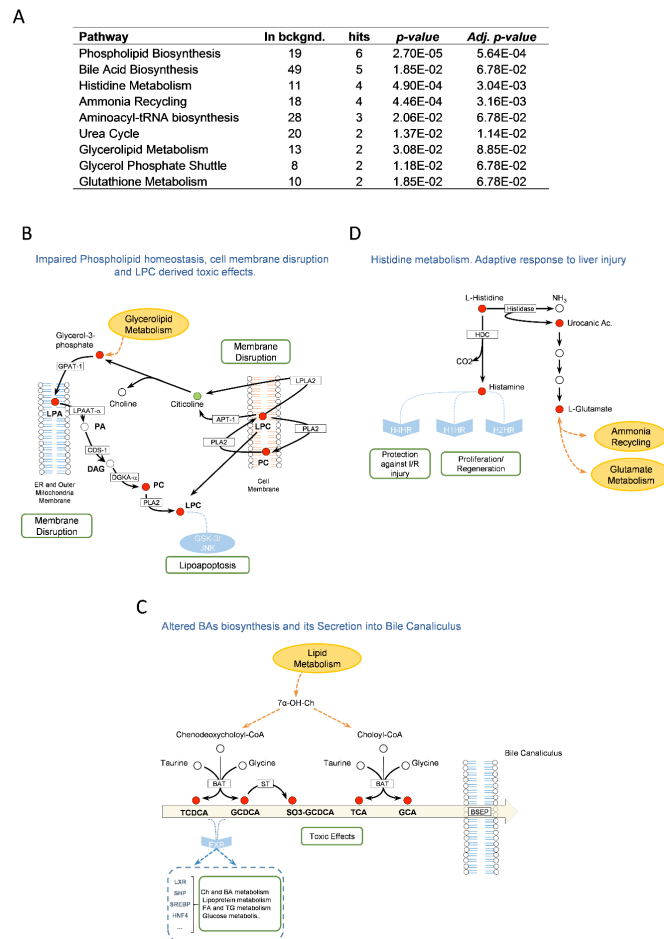


Figura 21. Visualización de la firma metabólica en las rutas bioquímicas. (A) Tabla resumen del análisis de enriquecimiento de los metabolitos donde las rutas metabólicas se ordenan según su impacto. (B) La homeostasis alterada de los fosfolípidos deriva en la ruptura de la membrana y provoca efecto tóxico desencadenado por la acumulación de LPC. (C) El metabolismo alterado de los lípidos provoca la alteración de la biosíntesis de los ácidos biliares y su acumulación deriva en efectos tóxicos y en la activación del receptor FXR. (D) La alteración en el metabolismo de la histidina como respuesta al daño hepático. Los metabolitos señalados en verde y rojo son los que están aumentados y disminuidos.

3.4.3. Desarrollo del modelo predictivo PLSDA

Se construyó un modelo predictivo basado en la firma metabólica de EAD descubierta (**Tabla 27**). El mejor modelo PLSDA se obtuvo utilizando una variable latente (LV). Como se muestra en el score plot PLSDA (**Figura 22A**), todas las muestras se agrupaban en su grupo respectivo con una separación clara entre pacientes con EAD e IGF. El análisis del modelo por CV y el test de permutación de clases mostró su consistencia (**Figura 22A**). En nuestro estudio, se utilizaron un total de 23 muestras para estimar la capacidad de predicción del modelo desarrollado. Los resultados revelaron que 11 de los 12 pacientes con EAD y 9 de los 11 con IGF se clasificaron correctamente (**Figura 22B**). La sensibilidad, especificidad y precisión del modelo fueron 91%, 82% y 87%, respectivamente. La capacidad predictiva del modelo PLSDA también se evaluó mediante el análisis de injertos que una vez implantados desarrollaron fallo primario (n=4). Todos los injerto con fallo primario se clasificaron de manera inequívoca en el grupo EAD (**Figura 22C**).

3. Resultados

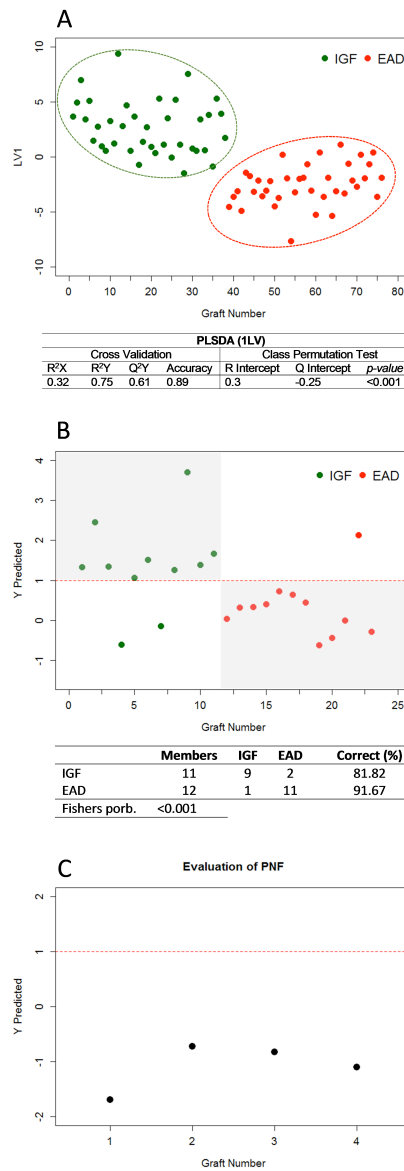


Figura 22. Realización del modelo PLSDA **(A)** El score plot de PLSDA muestra como se separan los pacientes que muestran disfunción inicial del injerto (EAD, rojo) y buena función inicial (IGF, verde). **(B)** La predicción de clase mediante PLSDA en la validación externa (n=23). Los pacientes que aparecen en el área sombreada del gráfico señaladas están correctamente clasificados **(C)** Predicción de clase mediante el modelo PLSDA para la evaluación del fallo primario (PNF) (n=4). Los injertos por encima de la línea roja horizontal se clasifican como injertos con buena función inicial.

3.5. Creación de un score continuo de valoración clínica de la función del injerto tras el trasplante

3.5.1. Cohorte de estudio y descripción de la muestra

El estudio incluye 1026 TH consecutivos en 981 receptores desde el 1 de enero del 2003 al 31 de Julio del 2012 en el Hospital La Fe de Valencia (España). Tras aplicar los criterios de exclusión mencionados en material y métodos, participaron en el análisis 839 TH en 829 receptores. Se excluyeron 152 pacientes por las razones que se muestran en la **Tabla 28**.

Causa de exclusión	n
Receptores pediátricos	47
Fallo hepático fulminante	45
Exitus 7DPO	6
Split	10
Fallos primarios	16
Trombosis precoz arteria hepática	16
Síndrome de Budd-Chiari	2
Hepatitis colestática fibrosante por recurrencia VHC	3
Datos incompletos	7

Tabla 28. Pacientes excluidos para el diseño del score y casusas de exclusión

De los 839 donantes incluidos en nuestro estudio, la edad media era de 54.48 años con un leve predominio del sexo masculino (60.66%). La causa principal de muerte fue el accidente vascular cerebral (67.58%). En la **Tabla 29** mostramos las características principales de los donantes. En general, en el 95% de los pacientes se utilizó la técnica del piggy-back con anastomosis a las 3 venas suprahepáticas con anastomosis termino-terminal entre la porta del donante y la del receptor. Para la anastomosis arterial se utilizó el parche de la arteria hepática común con la gastroduodenal del receptor.

3. Resultados

Variable	Media	DS	Valor min.	Valor máx.
Edad(años)	54.48	17.59	12	86
Sexo (masculino/femenino)	509/330			
Concordancia de sexo				
No	499			
Masculino(D) → Femenino (R)	116			
Femenino(D) → Masculino (R)	224			
IMC (kg/m ²)	26.47	4.04	13.84	49.38
Causa de muerte				
ACV	567			
TCE	205			
Anoxia	43			
Tumor cerebral	8			
Otros	16			
Estancia en UCI (días)	3.48	3	1	45
Hipotensión (no/sí)	487 /352			
PCR (no/sí)	710/129			
Drogas vasoactivas				
No	541			
<2	218			
≥2	80			
Na (mEq/L)	149	10.6	120	188
Esteatosis				
No	678			
Leve	143			
Moderada	18			

Tabla 29. Resumen de la información de los donantes incluidos en la creación del score. Las variables continuas se describen como media ± desviación estándar, valor mínimo y valor máximo. Las variables categóricas se expresan como número absoluto. ACV: accidente cerebral vascular; D: donante; DS: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal; Na: sodio; PCR: parada cardiorrespiratoria; R: receptor; TCE: traumatismo craneoencefálico; UCI: unidad de cuidados intensivos.

De los 839 TH llevados a cabo en 829 receptores, en la **Tabla 30**, se describen las variables relacionadas con los receptores antes y después del trasplante.

3. Resultados

Variable	Media	DS	Valor min.	Valor máx.
Edad (años)	54.14	9	17	70
Sexo (masculino/femenino)	633/206			
IMC	27.01	4.43	15.62	45.38
Diagnóstico				
Viral	195			
Alcohol	184			
Colestáticas	25			
Tumoral	19			
Viral+tumor	147			
Alcohol+viral	87			
Alcohol+tumor	56			
Alcohol+viral+tumor	55			
Otras	71			
Tumoral (HCC/Neuroendocrino)	229/10			
Retransplante (no/sí)	816/23			
MELD score	16.67	7.56	6	57
Child-Pugh score				
A	152			
B	284			
C	403			
Estancia en UCI (días)	6.10	5.10	1	115
Estancia hospitalaria (días)	23.36	21.36	1	240
Transfusión post-Tx UCH (sí/no)	681/158			
Transfusión post-TH UPFC (sí/no)	662/177			
CMV (positivo/negativo)	698/141			
Concordancia CMV				
Sí	590			
D (-)→R(+)	156			
D(+)->R(-)	93			
HBcAc (+/-)	403/436			

Tabla 30. Resumen de la información relacionada con los 839 TH llevados a cabo en 829 receptores con los receptores incluidos en la realización del score. Las variables continuas se describen como media \pm desviación estándar (DS), valor mínimo y valor máximo. Las variables categóricas se expresan como número absoluto. CMV: citomegalovirus; D: donar; HBc Ac: anticuerpos anticore de la hepatitis B; HCC: carcinoma hepatocelular; IMC: índice de masa corporal; MELD: model for end stage liver disease; Post-TH: post-trasplante hepático; R: receptor; RBC: red blood cells; UCH: unidades de concentrados de hemáties; UCI: unidad de cuidados intensivos; UPFC: unidades de plasma fresco congelado.

3. Resultados

Las características del procedimiento quirúrgico se detallan a continuación en la **Tabla 31**. La media del tiempo de isquemia fría de los injertos era de 5.18 horas y 43.89 minutos para el tiempo de isquemia caliente. Respecto a la transfusión intraoperatoria de hemoderivados, la media de unidades de concentrados de hematíes era de 3.04 unidades y de plasma fresco congelado 2.52 unidades. La mayoría de los injertos se lavaron con suero salino y sangre antes de la reperfusión y un pequeño porcentaje de pacientes, (9.38%) fueron reintervenidos tras el trasplante por hemoperitoneo.

Variables	Media	DS	Valor min.	Valor máx.
Duración de la cirugía (min)	254.6	48.41	100	545
TIF (min)	311.32	156.36	22	850
TIC (min)	43.89	15.40	15	135
TAA	43.15	19.44	10	180
Salvacélulas (ml)	710.66	698.54	0	10000
UCH(units)	3.04	2.82	0	33
UPFC (units)	2.52	1.68	0	14
Lavado del injerto				
Salino	83			
Sangre	289			
Salino y sangre	467			
Síndrome post-reperfusión (no/sí)	717/122			
Kejr (no/sí)	323 /516			
Relaparotomía por sangrado (no/sí)	767/72			

Tabla 31. Resumen de la información de la cirugía de los receptores incluidos en el realización del score. Las variables continuas se describen como media \pm desviación estándar, valor mínimo y valor máximo. Las variables categóricas se expresan como número absoluto. DS: desviación estándar; TAA: tiempo de anastomosis arterial; TIC: tiempo de isquemia caliente; TIF: tiempo de isquemia fría; UCH: unidades de concentrado de hematíes; UPFC: unidades de plasma fresco congelado.

3.5.2. Selección de las variables clínicas del receptor para modelizar la función del injerto

Para seleccionar que variables clínicas del receptor son las más apropiadas para modelizar la función del injerto hepático post-trasplante utilizamos el análisis de componentes principales disperso del inglés *sparse principal components analysis* (sPCA) (173). Dicho tipo de análisis sirve para hallar que variables explican mejor la variabilidad de los datos y las representa según su importancia. En la **Tabla 15** hemos resumido los parámetros analíticos candidatos a ser incluidos en el modelo; entre ellos, el análisis multivariante seleccionó los valores máximos de AST, ALT, INR y TP en las primeras 72 horas tras el trasplante así como el valor de la bilirrubina el día 7 como las variables que mejor explicaban la varianza de los datos analizados (**Figura 23**).

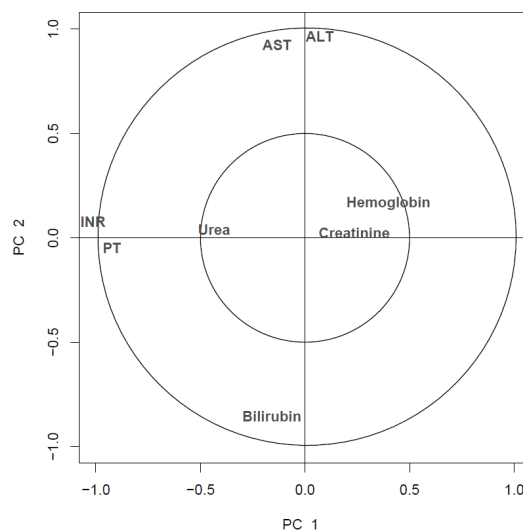


Figura 23. Círculo de correlación del análisis de componentes principales (sPCA). Las variables seleccionadas explican el 60 % de la varianza de los datos. Las variables con una correlación fuerte se proyectan en la misma dirección desde el origen. Cuanto mayor es la distancia del origen, mayor es la relación. Las dos circunferencias del gráfico corresponden al radio 0.5 y 1.

3. Resultados

El análisis de correlación entre las variables seleccionadas (**Figura 24**) mostraba una importante correlación positiva ($r = 0.85$) entre ALT y AST, así como entre el INR y el PT ($r = 0.85$).

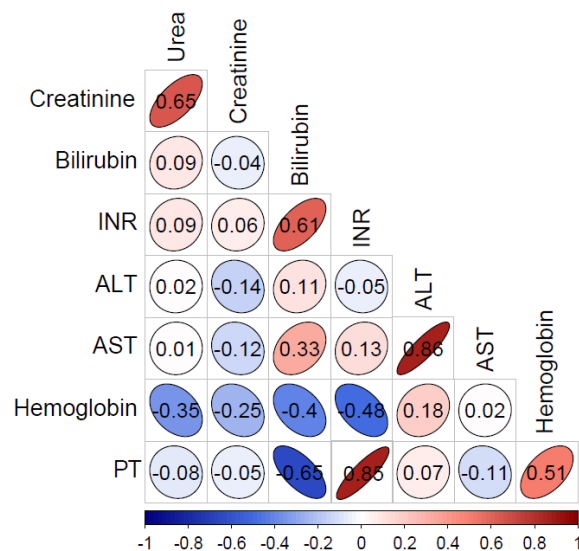


Figura 24. Análisis de correlación entre las variables clínicas del receptor seleccionadas por el PCA.

Para evitar utilizar información redundante en el modelo y por su especificidad en el daño del parénquima hepático, decidimos utilizar ALT en lugar de AST. En el caso de INR y PT, seleccionamos el INR porque es un parámetro normalizado y fácil de comparar entre diferentes laboratorios.

Las categorización de la evolución clínica del injerto en clases obliga a utilizar puntos de corte que pueden llevar a clasificar a dos pacientes en la misma categoría cuando presentan un mismo valor máximo de ALT en las primeras 72h pero diferente evolución clínica, tal y como se muestra en la **Figura 25**.

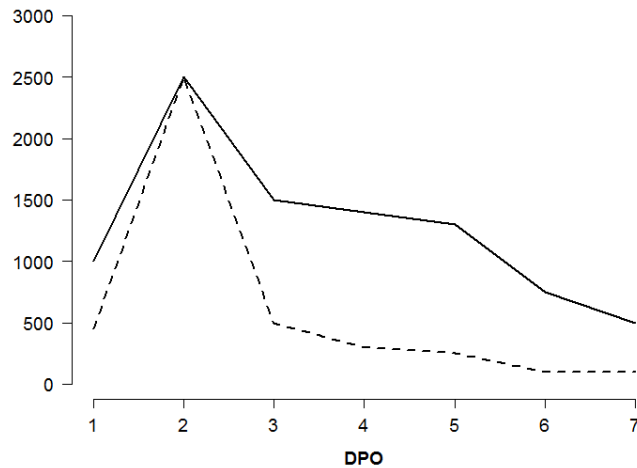


Figura 25. Evolución del valor de ALT en dos pacientes. El gráfico muestra una evolución diferente entre dos pacientes que muestran el mismo pico de ALT en las primeras 72 horas tras el trasplante.

Por este motivo decidimos incluir en el modelo una variable que tuviese en cuenta esta diferente evolución clínica en pacientes que parten con un mismo valor máximo de ALT. El área bajo la curva de ALT (ALT_{AUC}) en la primera semana tras el TH parece ser una variable que podría reflejar las diferencias en la evolución del valor de ALT, sin embargo mostraba una correlación importante con el pico de ALT ($r = 0.86$), por lo que no aportaba mucha información al modelo. En su lugar, seleccionamos el ratio ALT_{AUC}/ALT_{pico} para reflejar dichas diferencias clínicas y además dicho ratio mostraba poca colinealidad con el pico de ALT (**Figura 26**).

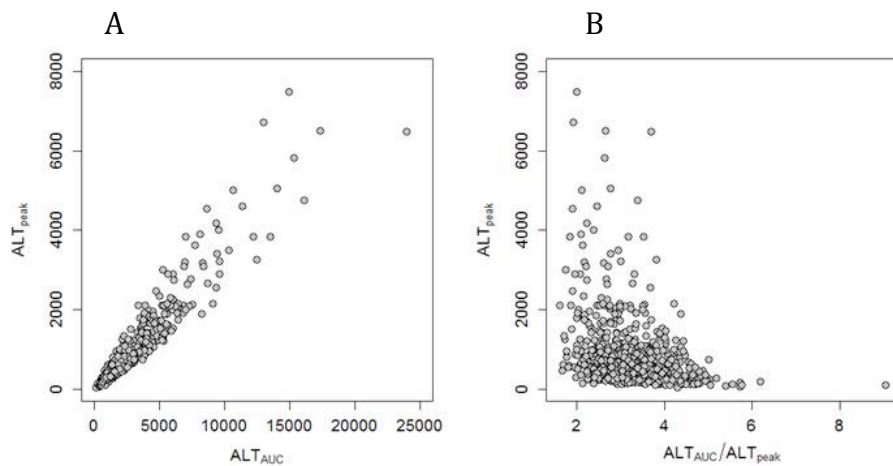


Figura 26. (A) Representación de los valores del pico de ALT versus ALT_{AUC} durante la primera semana tras el TH, mostrando una alta colinearidad entre las variables. (B) Representación de los valores del pico de ALT versus ALT_{AUC}/ALT_{pico} , mostrando que el ratio es una variable independiente respecto al pico de ALT.

3.5.3. Modelado de las variables que seleccionadas para describir la función temprana del injerto

Para modelar el comportamiento de las variables seleccionadas y asignar un score (puntuación) a cada valor real de dicha variable estudiamos la distribución de las variables clínicas en nuestra población. Para ello calculamos la función de distribución empírica acumulativa para cada una de ellas (*ecdf*), que nos informa para cada posible valor de la variable la probabilidad de recibir ese valor o uno menor, y desarrollamos un modelo de regresión no-lineal que asigna una puntuación (comprendida entre 0-3) para cada valor real de la variable clínica.

Para facilitar la interpretación del modelo, el rango del MEAF score definitivo se estableció de manera arbitraria entre 0 y 10 puntos. El ALT_{pico} , INR_{pico} , y la Bb_{7DPO} recibieron el mismo peso en el modelo, por lo que su rango variaba entre 0 para el valor más bajo y 3 para el más alto en el *ecdf*. La penalización para la

3. Resultados

variable ALT_{AUC}/ALT_{pico} se puntuó con un peso menor en el modelo por lo que su rango variaba entre 0 y 1. Se ajustó a una curva sigmoidea en todos los casos para alcanzar la saturación en ambos lados de la curva (**Figura 27**), los errores estándares residuales para cada ajuste fueron 0.029, 0.064, 0.028 y 0.01 respectivamente.

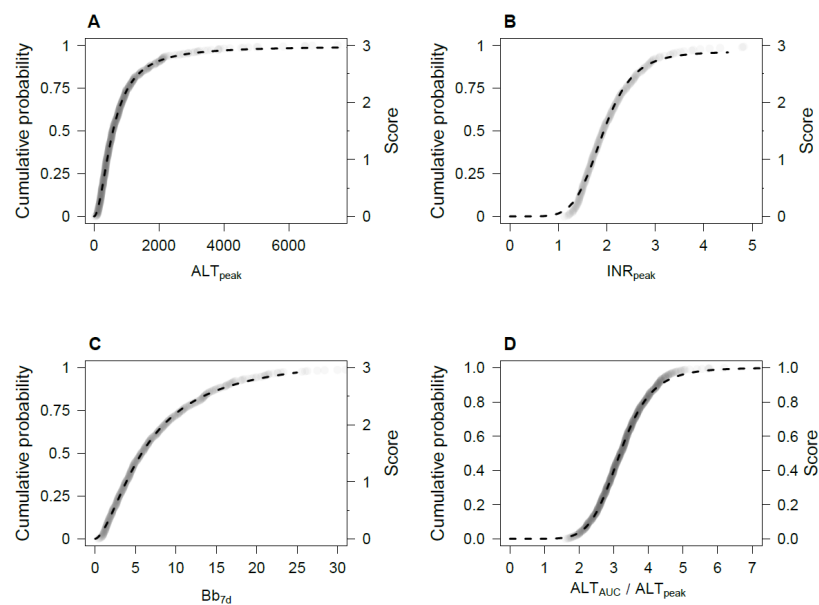


Figura 27. Modelado de las variables clínicas seleccionadas. Para aproximar cada variable a una función de distribución empírica acumulativa (línea sombreada), se realizó una regresión sigmoidea (línea punteada discontinua). El score se calculó utilizando cada función de regresión, para ALT_{pico} (**A**), INR_{pico} (**B**) y Bb_{7DPO} (**C**) el rango del score se estableció entre 0 y 3, mientras que para ALT_{pico}/AUC_{ALT} (**D**) se estableció entre 0 y 1.

El MEAF score final correspondía por tanto a la suma de cuatro términos, correspondientes a la extrapolación de cada valor del laboratorio en la función de regresión correspondiente (**Figura 28: Ecuación 1**). El MEAF score calculado para cada paciente mostró una distribución normal variando desde 0.87 a 9.26 con una desviación estándar de 1.65.

Ecuación 1

$$\text{MEAF} = \text{Score}_{\text{ALT}_{\text{peak}}} + \text{Score}_{\text{INR}_{\text{peak}}} + \text{Score}_{\text{Bb7DPO}} + \text{Score}_{\text{ALT}_{\text{peak}}/\text{AUC}_{\text{ALT}}}$$

$$\text{Score}_{\text{ALT}_{\text{peak}}} = \frac{2.9832}{1 + e^{-1.9162(\ln(\text{ALT}_{\text{peak}}) - 6.37)}}$$

$$\text{Score}_{\text{INR}_{\text{peak}}} = \frac{2.9377}{1 + e^{-7.3244(\ln(\text{INR}_{\text{peak}}) - 0.6825)}}$$

$$\text{Score}_{\text{Bb7DPO}} = \frac{3.0774}{1 + e^{-1.7754(\ln(\text{Bb7DPO}) - 1.6114)}}$$

$$\text{Score}_{\text{ALT}_{\text{peak}}/\text{ALT}_{\text{AUC}}} = \frac{1}{1 + e^{-7.0594(\ln(\text{ALT}_{\text{peak}}/\text{ALT}_{\text{AUC}}) - 1.1571)}}$$

Figura 28. Ecuación del MEAF score.

3.5.4. Comparación del MEAF score con una clasificación categórica de la función temprana del injerto

Para evaluar el grado de concordancia entre el MEAF score y otras clasificaciones previas, clasificamos los pacientes de nuestra población de acuerdo a los criterios de EAD de *Olthoff et al.* (58). La **Figura 29** representa la relación entre dicha clasificación y el MEAF score, mostrando una asociación gradual entre ambas.

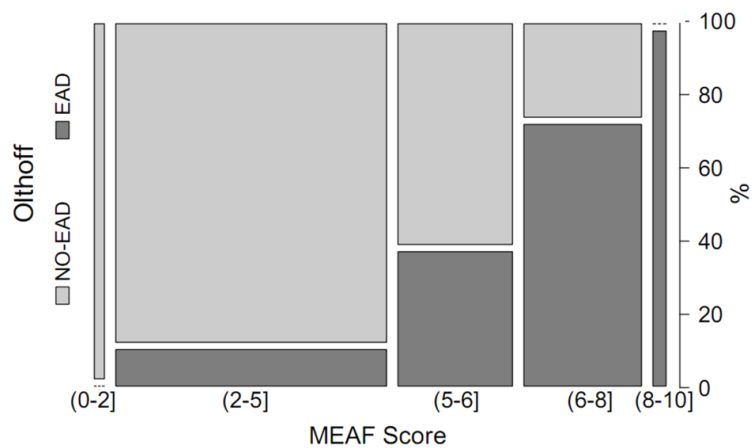


Figura 29. Comparación entre el MEAF score y la clasificación de EAD de *Olthoff et al.* Los pacientes en nuestra cohorte a estudio se clasificaron de acuerdo a los criterios de Olthoff y se compararon con el MEAF score calculado para cada uno de ellos. El gráfico muestra un patrón de concordancia entre ambos, donde los valores altos del MEAF score corresponden a la mayor proporción de pacientes con EAD según los criterios de Olthoff.

3.5.5. Relación entre el MEAF score y la supervivencia

Analizamos la relación entre el MEAF score y la supervivencia del paciente mediante el análisis por regresión de Cox. De los 829 receptores incluidos en el estudio, el número de pacientes fallecidos a los 3, 6 y 12 meses fueron 46, 73 y 88 respectivamente, siempre debido a causas relacionadas con el trasplante. El modelo de regresión de Cox mostró una asociación significativa entre el MEAF score y la mortalidad durante los 3 primeros meses ($p\text{-valor} = 0.03$). El hazard ratio estimado fue de 1.21 con un intervalo de confianza del 95% [1.02; 1.46] (**Figura 30**). Esta asociación todavía era significativa para los 6 meses con un $p\text{-valor} = 0.002$, aumentando el cociente de riesgo a 1.27 con un intervalo de confianza del 95% [1.10; 1.48] y para un año el $p\text{-valor}$ fue de 0.002, con un hazard ratio 1.29 y un intervalo de confianza de 95% [1.10; 1.52].

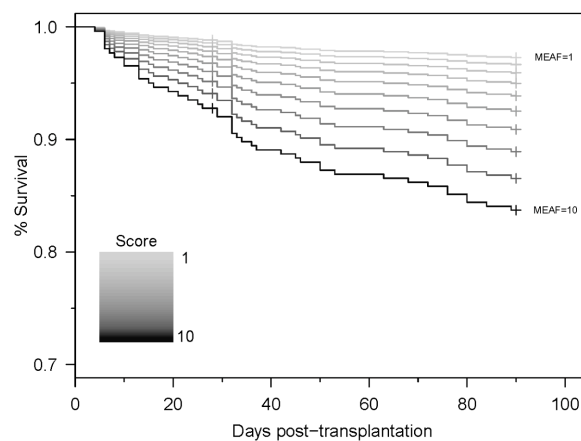


Figura 30. Estimación de la supervivencia a los 3 meses en función del MEAF score. El modelo de regresión de Cox mostraba una asociación significativa entre el score MEAF y la mortalidad durante los 3 primeros meses ($p\text{-value} = 0.03$). El hazard ratio estimado para cada aumento del score era de 1.21 con un 95% del intervalo de confianza [1.02; 1.46].

3.5.6. Factores de riesgo asociados a la aparición de disfunción temprana del injerto

Para descifrar qué variables se asociaban de manera significativa a valores elevados del MEAF score y por tanto a EAD severa, se utilizó el análisis estadístico basado en la importancia de las variables según el promediado de modelos. Se estableció como punto de corte de importancia relativa (RI) el valor 0.8. Las **Tablas 32-34** muestran los factores de riesgo evaluados con relación al donante, receptor y cirugía,

Las variables analizadas en referencia al donante fueron las detalladas en la **Tabla 32** donde edad (RI= 0.96), esteatosis hepática (RI = 0.92) y estancia en UCI (RI = 0.83) superaron el valor de 0.8 establecido y por tanto se consideran variables asociadas a la ocurrencia de EAD (valores altos de MEAF score).

Variab les	Importancia de los términos en el promedio modelado
Edad	0.96
Esteatosis hepática	0.92
Estancia en UCI	0.83
Drogas vasoactivas	0.49
Sodio	0.35
PCR	0.05
Rh	0.05
IMC	0.04
Hipotensión	0.03
Causa de muerte	0.01

Tabla 32. Importancia estimada de los parámetros relacionados con el donante mediante el promedio modelado. IMC: índice de masa corporal; PCR: parada cardiorrespiratoria; UCI: unidad de cuidados intensivos.

3. Resultados

Las variables analizadas en referencia a la cirugía fueron las detalladas en la **Tabla 33**, donde el TIF (RI =0.98), el síndrome post-reperfusión (RI = 0.95) y el TIC (RI = 0.88) superaron el valor de 0.8 establecido y por tanto se consideran variables asociadas a la ocurrencia de EAD (valores altos de MEAF score).

Variables	Importancia de los términos en el promedio modelado
TIF	1.00
Síndrome post-reperfusión	0.95
TIC	0.88
UCH	0.69
UPFC	0.58
Relaparatomía	0.29
Duración de la cirugía	0.18
Salvacélulas	0.09

Tabla 33. Importancia estimada de los parámetros relacionados con la cirugía mediante el promedio modelado. UCH: unidades de concentrados de hematíes; TIC: tiempo de isquemia caliente; TIF: tiempo de isquemia fría; UPFC: unidades de plasma fresco congelado; síndrome post-reperfusión definido como la hipotensión (disminución de la presión arterial media mean un 30% respecto al valor inmediato al final de la fase anhepática, que dura al menos 1 minuto durante los 5 minutos siguientes a la reperfusión) o asistolia tras el desclampaje.

3. Resultados

Las variables analizadas en referencia al receptor fueron las detalladas en la **Tabla 34** donde el MELD score (RI = 1), el IMC (RI = 1), el Child-Pugh (RI = 1) y la transfusión de UPFC tras la cirugía (RI = 0.82) superaron el valor de 0.8 establecido y por tanto se consideran variables asociadas a la ocurrencia de EAD (valores altos de MEAF score).

Variables	Importancia de los términos en el promedio modelado
MELD	1.00
IMC	1.00
Child Pugh	1.00
UPFC	0.82
Estancia en UCI	0.75
Estancia hospitalaria	0.81
Edad	0.30
Género	0.13
UCH	0.12
Retransplante	0.03
Función renal	0.03
PBE	0.03
HDA	0.03
Encefalopatía	0.02
Ascitis	0.01
HCC	0.01
CMV	0.00

Tabla 34. Importancia estimada de los parámetros del receptor mediante el promedio modelado. CMV: citomegalovirus; HDA: hemorragia digestiva alta; HCC: carcinoma hepatocelular ; IMC: índice de masa corporal; MELD: model for end stage liver disease; PBE: peritonitis bacteriana espontánea; UCI: unidad de cuidados intensivos; UCH: unidades de concentrado de hematíes; UPFC: unidades de plasma fresco congelado.

3. Resultados

Como muestra el análisis promediado de las variables estudiadas, la estancia prolongada en UCI del paciente tras el trasplante se relaciona con un MEAF score elevado. En la **Figura 31** podemos observar que cuanto mayor es la puntuación del score mayor es la estancia en UCI del receptor.

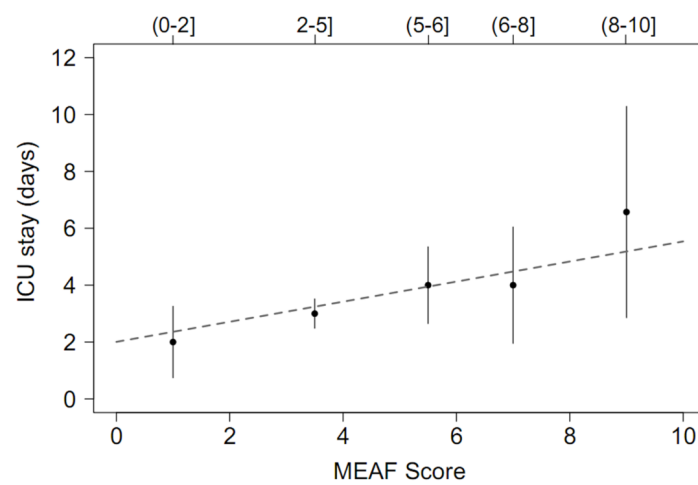


Figura 31. Relación entre el MEAF score y días en la UCI. Se observa una diferencia estadísticamente significativa entre valores elevados del MEAF score y la mediana de la estancia en la UCI. Los puntos negros representan la mediana de los valores y las barras la desviación estándar para cada intervalo del MEAF score. La línea punteada representa la regresión calculada mediante cuantiles censurados.

3. Resultados

En la **Figura 32** observamos que estancias hospitalarias más prolongadas tras el trasplante también se relacionan con un MEAF score más elevado.

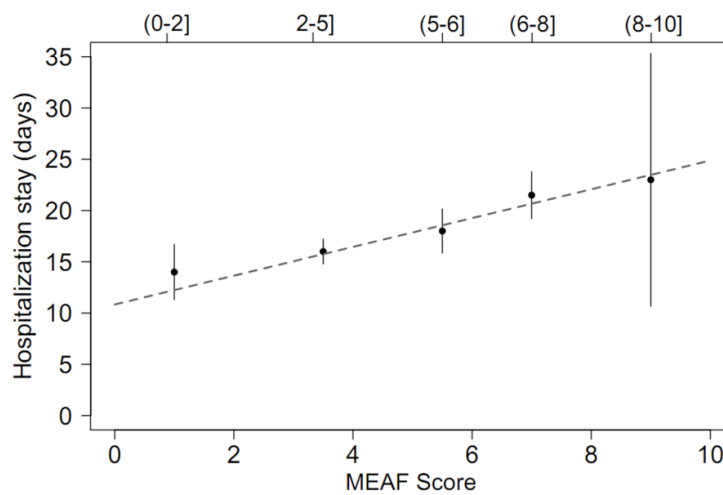


Figura 32. Relación entre el MEAF score y días de hospitalización. Se observa una diferencia estadísticamente significativa entre valores elevados del MEAF score y mayor estancia hospitalaria (mediana). Los puntos negros representan la mediana de los valores y las barras la desviación estándar para cada intervalo del MEAF score. La línea punteada representa la regresión calculada mediante cuantiles censurados.

3.6. Relación entre el MEAF score y la firma metabonómica de la función del injerto

Tras calcular el MEAF score en aquellos receptores en los que se analizó el perfil metabonómico de sus correspondientes hígados donantes, estudiamos la relación entre las diferentes puntuaciones del score y la firma metabonómica que predice la función temprana del injerto (sección 3.4.1.). Para ello realizamos un modelo de tipo PLS en el que como variable dependiente utilizamos los valores del score obtenido, en lugar de una clasificación categórica (EAD, IGF) como habíamos hecho anteriormente (sección 3.4.3.). Los valores de ajuste para el modelo PLS fueron de 0.79 para R^2 y de 0.57 para Q^2 , indicando un buen ajuste del modelo. En la **Figura 33** observamos una relación lineal entre el MEAF score calculado y el predicho por el modelo con un ajuste de $R^2=0.72$. Este modelo nos permitiría establecer una puntuación para cada hígado donante.

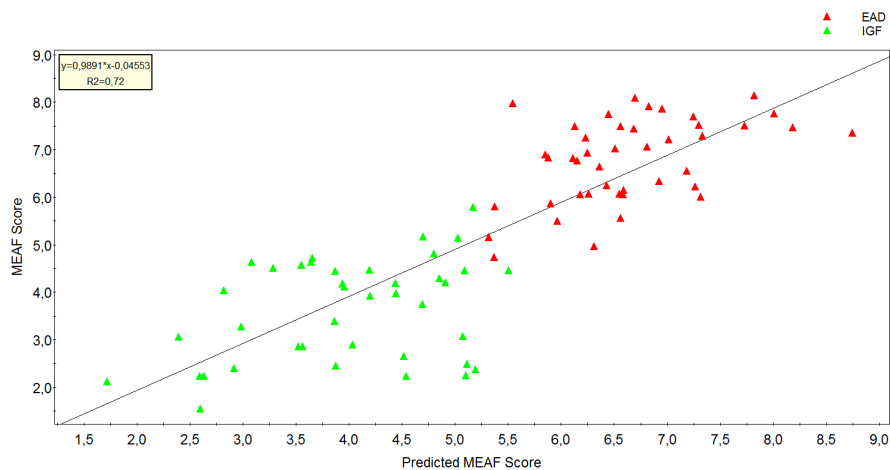


Figura 33. Gráfica de valores predichos del MEAF score frente valores reales.

4. Discusión

4.1. Disfunción el injerto

Desproporción donante-receptor

El trasplante de hígado ha progresado mucho en un periodo relativamente corto, considerado inicialmente un tratamiento experimental, hasta que en junio de 1983 en la conferencia de consenso en Bethesda (Maryland) se declara el TH como el tratamiento de elección de las enfermedades hepáticas en estadio terminal (174). El número de posibles candidatos a recibir un TH se ha incrementado a lo largo de los años, de forma paralela al aumento de la supervivencia tras el trasplante, así como a la ampliación de las indicaciones. Sin embargo, el número actual de donantes es insuficiente para satisfacer esta demanda (33). El desequilibrio entre la oferta y la demanda ha originado un incremento de la mortalidad de los pacientes en la lista de espera, que en el año 2002 alcanza una cifra del 9,5%. En España, desde el año 2005, el número de pacientes con indicación de TH ha sido superior a 2000, mientras que el número de donantes por año se ha mantenido estable alrededor de 1500 desde hace 4 años (33) (**Figura 1**). Con el fin de aumentar el número de donantes y disminuir la mortalidad de los pacientes en lista de espera, se ha recurrido a diferentes estrategias entre las que se encuentran: el donante vivo, el split, el trasplante dominó así como la expansión de los criterios de aceptación de los donantes (51), aunque las fuentes de injertos hepáticos diferentes al donante con muerte encefálica todavía constituyen una minoría en nuestro país. Por ejemplo, en el hospital La Fe se ha realizado en los últimos 5 años 3 splits, un trasplante dominó y 4 trasplantes de donante vivo.

Donante con criterios expandidos y su consecuencias

El donante con criterios expandidos (ECD) o previamente llamado donante “marginal”, hace referencia al donante cadáver con riesgo elevado de fallo del

injerto o que predispone a una menor supervivencia del paciente o del injerto si se compara con el donante ideal (39, 40).

Pese a los múltiples esfuerzos por expandir los criterios de aceptación del donante, durante el 2013 del total de donantes generados en España, 346 hígados fueron descartados (24.6%), siendo la causa principal la existencia de un hígado patológico en un 93% (esteatosis y aspecto macroscópico) seguido de patología sistémica (tumoral o infecciosa). En los últimos 5 años, en nuestro hospital, descartamos 167 injertos hepáticos de los 750 donantes que fuimos a valorar debido a la existencia de esteatosis moderada o severa (45%) y fibrosis del injerto (27%).

Otro aspecto a considerar en la ampliación de los criterios del donante es la edad en el momento de la extracción. Inicialmente, el donante prototipo era una persona joven, que fallecía en accidente de tráfico; sin embargo, con el aumento de la esperanza de vida y con los cambios en la normativa de la ley de circulación, el donante actual es una persona entre 50 y 70 años que fallece, en la mayoría de las ocasiones como consecuencia de un ACV (33). Respecto a nuestros donantes en los últimos 5 años, sólo el 35% tenían menos de 50 años, siendo la edad media de 56 y el máximo de 86 años. El cambio en la población junto con la creciente necesidad de aumentar el número de donantes para satisfacer la demanda, ha obligado a aceptar estos donantes. Como consecuencia de esto, en el momento actual, la utilización de injertos procedentes de donantes que hace años hubieran sido descartados, se ha convertido en la principal herramienta para satisfacer las demandas de la lista de espera para el TH (175).

En el año 2005, se reunieron en Nueva York un grupo de expertos con el fin de analizar la utilización de injertos procedentes de ECD. Considerando que no existía ningún consenso sobre los criterios exactos de este tipo de injertos (176), establecieron como punto de corte que define un ECD cuando el riesgo relativo

de fallo del injerto es ≥ 1.7 . De las características del donante establecidas por el SRTR (Scientific Registry of Transplant Recipients) como factores de riesgo de fallo del injerto, ninguna tenía un $RR \geq 1.7$, destacando que es la combinación de los diferentes factores del donante los que conllevan un aumento del riesgo de la pérdida del injerto (**Tabla 35**) (177).

Factor	RR	p valor
Edad 40-49	1.16	0.0006
Edad 50-59	1.30	<0.0001
Edad 60-69	1.51	<0.0001
Edad >70	1.63	<0.0001
Injerto reducido o split	1.53	<0.0001
DCD	1.52	0.0006
Causa de muerte ACV	1.20	0.0168
Causa de muerte diferente a TCE, ACV o anoxia	1.15	0.0001
Raza negra	1.19	<0.0001

Tabla 35. Características del donante con riesgo de fallo del injerto. ACV: accidente cerebral vascular; DCD: donante tras muerte cardiaca; TCE: traumatismo craneonencefálico.

Según lo mencionado anteriormente, parece imposible establecer unos criterios únicos y universales que permitan predecir el riesgo de mortalidad del receptor tras el trasplante así como el grado de disfunción del injerto esperado según las características del donante.

Repercusión de la disfunción del injerto

La ampliación de los criterios de aceptación de los donantes se justifica por la disminución de la mortalidad de los pacientes en lista de espera, siendo ésta del 5.9% en nuestro país en el año 2013, sin embargo conlleva una disminución de la supervivencia del injerto y del paciente tras el TH (54, 63, 178, 179). Uno de los inconvenientes de ampliar los criterios de aceptación del donante es el aumento de la incidencia de disfunción temprana del injerto tras el TH y en consecuencia, una disminución de la supervivencia del paciente y del injerto (180, 181).

Diversos autores han estudiado la disfunción temprana del injerto (EAD) con la fin de establecer unos criterios diagnósticos y analizar la influencia de las características del donante, receptor y cirugía en su aparición (40, 41, 51). La revisión bibliográfica realizada (**Tabla 1**), pone de manifiesto la ausencia de unanimidad en la nomenclatura referente a la disfunción del injerto, en los criterios diagnósticos, puntos de corte de las variables consideradas, momento en que deben ser evaluadas dichas variables incluidas en la definición así como la ausencia de una clasificación detallada de los grados de disfunción. Por otro lado, algunos de los criterios utilizados en las definiciones de disfunción están basados en variables subjetivas como encefalopatía (57) o variables no utilizadas en la práctica clínica diaria como los niveles de amonio en sangre (53) o cuantificación de la producción de bilis (56, 60). Dicha falta de consenso, ocasiona diferentes incidencias para un mismo evento (EAD), imposibilitando relacionar la aparición de disfunción con la evolución tras el trasplante, la influencia de las variables del donante, receptor y cirugía en la aparición de la misma así como la dificultad de comparar los resultados entre diferentes unidades de trasplante. El grado más severo de disfunción hepática tras el TH es el fallo primario del injerto (PNF), que deriva en retrasplante urgente o fallecimiento del paciente si éste no se retrasplanta; sin embargo, en la mayoría

de los casos, la disfunción del injerto se presentará en formas intermedias y no tan bien definidas en las que su función se recupera con el paso del tiempo pero también pueden derivar en la necesidad de retrasplante o fallecimiento en una etapa más tardía tras el TH (53). De tal modo, sería ideal disponer de un sistema de valoración de la funcionalidad del injerto, que a diferencia de los sistemas categóricos descritos hasta el momento actual (**Tabla 1**) fuera continuo, asignando un valor determinado a los diferentes grados de disfunción intermedia del órgano, pudiendo predecir la evolución del paciente según dicho valor. Por tanto uno de nuestros objetivos dentro de esta tesis, fue el desarrollar un modelo para caracterizar la funcionalidad del injerto que cumpliera los requerimientos descritos anteriormente al que llamamos MEAF score.

En un primer paso para el desarrollo del modelo decidimos seleccionar, mediante técnicas de análisis multivariante, aquellas variables analíticas que mejor reflejasen la evolución clínica inicial del injerto hepático. En las primeras definiciones de EAD los autores consideraban únicamente los valores de transaminasas para definir la existencia de disfunción según la literatura publicada (46, 52, 53, 55). En 1994, *Strasberg et al.* (41) introduce por primera vez en la definición de disfunción del injerto factores de síntesis hepática, considerando que reflejarían mejor la funcionalidad del injerto. Por ello, decidimos incluir en nuestro análisis todos los datos analíticos del receptor durante la primera semana tras el TH (**Tabla 15**). El motivo de utilizar únicamente aquellas variables analíticas durante la primera semana post-trasplante es porque la disfunción que aparece tras la primera semana suele deberse a otras causas diferentes a la calidad del injerto per se (41, 61, 182). En dicho análisis, resultaron seleccionadas variables previamente utilizadas por otros autores, como los picos máximos de transaminasas (AST, ALT), el pico máximo de INR y del TP en las primeras 72 horas tras el trasplante y el valor de la bilirrubina en el 7º día postoperatorio. De este modo nuestro score incluía

parámetros de síntesis (INR) y de daño celular (ALT). Pese a que las variables de síntesis podrían parecer las más importantes y a su vez suficientes para valorar la funcionalidad del injerto, *Salvalaggio et al.* (179) destacan el efecto del pico de transaminasas, en la supervivencia del paciente y del injerto a los 6 meses, especialmente cuando es mayor de 3000 UI/L. *Olthoff et al.* (58) también destacan la influencia individual de cada uno de los criterios utilizados en su definición de disfunción sobre la mortalidad (bilirrubina, INR, ALT). Pese a que cada criterio por separado tiene una capacidad limitada para predecir mortalidad, esta capacidad aumenta progresivamente con la combinación de los mismos, de forma que cuando se cumplen los 3 criterios, la capacidad de predecir mortalidad es mayor que cuando se cumplen dos. Dicho hallazgo también apoyaría nuestra idea de considerar más de una variable para clasificar EAD. La selección de la bilirrubina en el día 7 tras el TH y no en el postoperatorio inmediato como variable influyente en la evolución tras el trasplante se ve respaldada por *Olthoff* (58) que utiliza esta misma variable en su clasificación, para evitar la influencia de los valores de bilirrubina del receptor previos al TH. En la misma línea, *Ben-Ari* (61) no encuentra diferencias significativas entre el valor pretrasplante de la bilirrubina y su valor el día 2 tras el TH.

Una vez seleccionadas las variables que mejor describen la EAD (ALT_{pico} , INR_{pico} , $bilirrubina_{7DPO}$), analizamos su comportamiento durante la primera semana tras el TH, comprobando que pacientes con el mismo pico de ALT en las primeras 72 horas presentaban una tendencia a la mejoría de dicha variable, a velocidades diferentes, pudiendo afectar a la evolución postoperatoria del paciente (**Figura 25**). Para evitar que estos pacientes fueran puntuados por igual en nuestro score, decidimos considerar el AUC de ALT durante la primera semana tras el TH. Debido a la elevada correlación entre dicha variable (ALT_{AUC}) y el pico de ALT durante las primeras 72 horas, decidimos considerar el ratio. Por tanto el MEAF score incluiría cuatro variable analíticas, las

anteriormente citadas ALT_{pico} , INR_{pico} , $bilirrubina_{7DPO}$ y el ratio ALT_{AUC}/ALT_{pico} . Para establecer una puntuación para cada uno de los valores reales de estas variables utilizamos la función ecdf y el ajuste no lineal sigmoideo, asignando un valor de score entre 0 y 3 para las tres primeras variables y entre 0 y 1 para ALT_{AUC}/ALT_{pico} . Por lo que el MEAF score final resultaría de la suma de la puntuación para cada una de las variables seleccionadas y estaría comprendido entre 0 y 10. Siendo mayor la puntuación del MEAF score cuanto mayor sea la severidad de la EAD.

Un punto crítico de las clasificaciones categóricas utilizadas hasta el momento es que establecen puntos de corte de las variables utilizadas para diagnosticar la presencia de EAD y que esos puntos de corte son seleccionados de manera arbitraria y sin una justificación clara. Cabe destacar que *Strasberg* (41) es el único autor que ha justificado los puntos de corte de los valores de AST y del TP al compararlo con el grado de adhesión plaquetar como marcador de daño endotelial. Pese a que diferentes autores ya han intentado clasificar la disfunción del injerto en más de una categoría (52, 55, 60, 179), dichas categorías están basadas en puntos de corte arbitrarios. En nuestra opinión, esta forma de clasificación no es lo suficientemente precisa si lo comparamos a un sistema de clasificación continuo y si pretendemos establecer un grado diferente de disfunción para cada paciente.

El MEAF score aporta varias ventajas frente a las clasificaciones categóricas existentes hasta el momento. En primer lugar, su carácter continuo permite asignar un grado de disfunción exacto para cada paciente en lugar de clasificarlo en un grupo en concreto (EAD, IGF), evitando diagnósticos erróneos especialmente en aquellos pacientes con valores de las variables próximos a los puntos de corte preestablecidos, asumiendo una misma respuesta para todos aquellos individuos de un mismo grupo (183).

La EAD es un factor de riesgo independiente de pérdida del injerto y de la supervivencia del paciente, cuya incidencia parece estar en aumento progresivo (46, 53, 58, 179). El MEAF score confirmó dicha tendencia al mostrar una relación significativa con la mortalidad del paciente a los 3, 6 y 12 meses; resultando en un aumento de 1.21 del riesgo de fallecer a los 3 meses por cada punto que aumenta el score (**Figura 30**). De este modo, mediante un modelo de regresión lineal somos capaces de estimar la probabilidad de supervivencia para cada puntuación del score, cuanto mayor es el MEAF score, mayor es la mortalidad tras el trasplante.

En 1997, *Maring et al.* (184) mostraron un grado de concordancia entre las clasificaciones de disfunción de *Ploeg et al.* (53) y *González et al.* (60) de tan sólo un 34%. Pese a que dicha discordancia podría estar influenciada por ser poblaciones diferentes, decidimos comparar nuestra clasificación con una de las más recientes, la de *Olthoff et al.* (58). Como se observa en la **Figura 29**, el grado de concordancia entre ambos era máximo para valores del score <2 y >8 , en cambio observamos una discrepancia gradual para valores intermedios del score (>2 - <8). Al observar detenidamente aquellos pacientes con un MEAF score entre 6 y 8 (40 pacientes) el grado de discordancia era de un 26%. De estos 40 pacientes, la mayoría presentaban valores de INR, bilirrubina y ALT próximos a los puntos de corte establecidos por el Olthoff para definir EAD; así, 11 presentaban valores de INR entre 1.5 y 1.59, 19 tenían una bilirrubina el día 7 tras el trasplante entre 8.5 y 9.9 mg/dl y 10 tenían un pico de ALT entre 1900 y 2000 U/L. Dicho error al atribuir el grado de disfunción se debe a los puntos de corte establecidos de manera subjetiva para clasificar EAF o IGF.

En conclusión, la ventaja fundamental del MEAF score frente a los actuales scores categóricos existentes, es el hecho de ser un modelo continuo, capaz de asignar una puntuación para cada grado de disfunción. Además su cálculo es a partir de variables clínicas objetivas y fáciles de obtener en la práctica diaria. El

nuevo modelo podría convertirse en una herramienta útil para unificar y estandarizar los criterios diagnósticos de EAD y de este modo poder comparar resultados de TH entre distintos centros. Valores elevados del MEAF score pueden alertar al médico sobre la necesidad de realizar un tratamiento más agresivo, así como valorar la posibilidad de un trasplante. Además, el modelo es capaz de estimar la supervivencia según el valor calculado para cada receptor. Finalmente, el MEAF score puede ser una herramienta de gran utilidad en estudios traslacionales (“-omics”) relacionados con la funcionalidad del injerto y que precisan de un criterio de evaluación objetivo y preciso.

Factores de riesgo asociados a EAD

Diferentes publicaciones han intentado establecer cuáles son las variables relacionadas con un aumento de la incidencia de EAD y por tanto de la supervivencia del paciente tras el TH (41, 46, 51, 57), sin embargo los resultados han sido variables y en ocasiones hasta contradictorios. Dicha variabilidad podría estar relacionada con las distintas clasificaciones utilizadas para definir EAD, la existencia de diferentes poblaciones de donantes según la región, y al tipo de análisis estadístico utilizado. Además, debemos recordar que factores relacionados con la cirugía, tales como TIF, TIC así como determinados factores relacionados con el receptor, también pueden influir en la evolución post-trasplante (185). *Strasberg et al.* (41) y muchos otros autores (40, 48, 54) han analizado variables relacionadas con el donante como posibles factores de riesgo de EAD, tales como edad, sexo, raza, peso, grupo ABO, causa de muerte, días de estancia hospitalaria, insuficiencia respiratoria, parada cardiorrespiratoria, uso de drogas vasoactivas, bioquímica, esteatosis, tiempo de isquemia fría e hipernatremia.

En nuestro estudio y dado el origen multifactorial de la disfunción del injerto, decidimos analizar la influencia de los factores de riesgo relacionados con el

donante, la cirugía y el receptor sobre valores elevados del MEAF score (EAD). De todas las variables descritas en la literatura relacionadas con el donante como posibles factores de riesgo (41, 51) (**Tabla 2**), resultaron responsables de una puntuación elevada del MEAF score la edad del donante, la esteatosis y la estancia en UCI como ya han descrito previamente otros autores (51, 52, 70, 83) (**Tabla 32**). Respecto a las variables relacionadas con la cirugía, en la literatura se han descrito puntos de corte para los tiempos de isquemia, tanto fría como caliente, a partir de los cuales el riesgo de disfunción del injerto e incluso de PNF es elevado (53, 67, 123, 125). En nuestro estudio, evaluamos dichas variables de manera continua, observando que cuanto más prolongados son dichos tiempos mayor es la probabilidad de influir negativamente en la función del injerto (**Tabla 33**). Dichos hallazgos corroborarían el hallazgo publicado por *Feng et al.* (48) en el que el índice de riesgo del donante es mayor por cada hora que aumenta el tiempo de isquemia fría. La existencia del síndrome post-reperusión también resultó influenciar en la severidad de la disfunción del injerto posiblemente debido a que el episodio de hipotensión o parada cardiorrespiratoria que puede acontecer si ocurre dicho síndrome conlleva a la hipoperfusión del injerto durante un tiempo determinado y en consecuencia un aumento de las transaminasas postoperatorias y por lo tanto, un score más elevado. En nuestra serie, tan solo un 14.5% de los pacientes presentaron síndrome post-reperusión. El estado pretrasplante del receptor, reflejado en el MELD y Child Pugh scores también se relacionó con la aparición de disfunción del injerto (**Tabla 34**), lo que confirmaría la importancia del estado del paciente antes del TH en su evolución tras el mismo (58, 179, 186). Hoy en día, el sistema de priorización de los pacientes en lista de espera para el TH, basado en el MELD score, prioriza a aquellos receptores más graves de manera simple y objetiva, prediciendo la mortalidad en lista de espera, sin tener en cuenta la supervivencia tras el TH. En esta línea de investigación, *Halldorson et al* (187) destacan la importancia que representa en la supervivencia tras el TH, no sólo

las características del donante si no el estado del receptor antes del trasplante como también demostramos en nuestro análisis, dado que cuanto mayor es el MELD del receptor, mayor es la probabilidad de presentar grados más severos de disfunción. También se observó una influencia significativa del IMC del receptor y la transfusión postoperatoria de plasma fresco en scores altos. Esta última variable reflejaría un déficit de síntesis de factores de coagulación por el injerto, es decir, una mala función hepática, precisando un aporte externo. Respecto al IMC del receptor, pese a que no existe una evidencia clara sobre su influencia en la aparición de disfunción del injerto, receptores con IMC elevados presentan mayor número de complicaciones postoperatorias que pueden conllevar a la disfunción del injerto (117). Además, valores elevados del MEAF score se asociaron significativamente con estancias más prolongadas en la UCI y días de hospitalización. Estos resultados se ven corroborados por publicaciones previas en las que se ha descrito que la aparición de EAD conlleva al aumento de complicaciones y en consecuencia a mayor estancia hospitalaria (**Figura 31 y 32**)(57, 178).

De lo anteriormente expuesto, podemos deducir que cuando concurren un mayor número de factores de riesgo, mayor será el grado de severidad EAD esperada, repercutiendo en la supervivencia del paciente y del injerto (188). Sin embargo, no debemos concluir que aquellos donantes con muchos factores de riesgo deberían descartarse sino por el contrario, debemos tratar de evitar los factores de riesgo que podemos modificar como son los tiempos de isquemia, así como optimizar la selección del receptor para cada donante con el fin de maximizar la supervivencia (187).

4.2. Necesidad de un modelo que anticipe la función inicial del injerto hepático y valore su calidad

Índices pronóstico de disfunción del injerto

En la literatura se han descrito diferentes modelos pronósticos cuya finalidad es valorar objetivamente las características del donante y el riesgo inherente de fallo del injerto, con el objeto de optimizar la distribución de los hígados en los diferentes receptores en lista de espera, así como ayudar en la toma de decisión a la hora de aceptar o no un órgano (40, 48, 187). Con este propósito, *Feng et al.* (48) publicaron en el 2006 un índice de riesgo del donante del inglés *Donor Risk Index* (DRI). Tras analizar las variables del donante y la cirugía relacionadas con el fallo del injerto, 7 características del donante resultaron significativas: edad, raza, altura, ACV como causa de muerte, otra causa de muerte diferente (no TCE, o anoxia), donante tras muerte circulatoria (DCD) y Split; de las variables relacionadas con el trasplante, dos de ellas, el TIF y el hecho de enviar el órgano a otra región diferente a la que se ha realizado la extracción, fueron significativas.

Sin embargo, otras variables relacionadas con el donante como valores elevados de transaminasas y sodio en sangre en el donante, hipotensión, uso de drogas vasoactivas y sexo femenino no resultaron significativas en dicho análisis. No debemos obviar que este índice está referido a la población americana con diferentes características demográficas y sanitarias. Además, un inconveniente de éste DRI es que no tiene en cuenta el estado del receptor en el momento del trasplante para valorar el riesgo de fallo del injerto, el cual repercute en su evolución post-trasplante.

La expansión de los donantes conlleva la disyuntiva de decidir si los pacientes más enfermos en la lista de espera se beneficiarían del trasplante con injertos hepáticos procedentes de éstos donantes. Para ello, se diseñó un modelo

estadístico con el objetivo de identificar que combinación de donante y receptor se asocia a una peor evolución post-trasplante (187). Dicho modelo se basó en el MELD score antes del trasplante, que reflejaría el riesgo de fallecer del paciente tras el trasplante (189), y en uno de los factores más importantes del donante, la edad, siendo ambas variables importantes factores de riesgo de grados severos de disfunción, según nuestro análisis. El producto de ambas variables estratificaba según dicho autor, la supervivencia del paciente tras el trasplante y la duración de su estancia hospitalaria.

Otro estudio llevado a cabo por *Cameron et al.* (40) en la línea de nuestro estudio, identifican como factores de riesgo de fallo del injerto la edad avanzada, la estancia prolongada en UCI del donante, los tiempos de isquemia fría y caliente así como la edad del receptor y la urgencia en el momento del trasplante. Dicho autor también analiza el efecto acumulativo de estas variables en la supervivencia del receptor y el mejor modo de combinar dichos factores de riesgo, todo ello con un objetivo: mantener una adecuada supervivencia del paciente y del injerto. Para ello, elabora un score de criterios expandidos del donante asignando un punto a cada una de las siguientes variables: edad del donante > de 55 años, estancia en la UCI > 5 días, TIF > 10 horas, TIC > 40 minutos. Los resultados demuestran un descenso en la supervivencia del injerto cuando el score del donante era 3, especialmente en receptores mayores de 50 años y que se trasplantaban de urgencia. Destaca que los scores de los donantes deberían servir no para aceptar o rechazar órganos sino para optimizar su uso modificando las variables susceptibles de cambio, tales como los tiempos de isquemia, la edad del receptor y la indicación del trasplante (40, 190).

En el 2012, *Shrem et al.* (191) analizan la sensibilidad, especificidad y exactitud de los 3 modelos predictivos descritos: *Cameron, Feng y Halldorson* (40, 48, 187) en 291 TH, encontrando una capacidad global de predicción de dichos modelos del 62%, lo que indicaría poca validez, aunque, dicho resultado podría

ser atribuido a las diferencias en las cohortes de estudio empleadas. Por tanto, la aplicabilidad de estos scores es variable según centros, no habiendo sido demostrada una utilidad clara excepto el evitar la combinación de muchos factores de riesgo de disfunción.

Test actuales de valoración del injerto

Hasta el momento actual, la aceptación o el rechazo de un injerto hepático en las Unidades de Trasplante se basa principalmente en la experiencia del cirujano extractor, quienes se basan en los datos clínicos del donante, ayudándose o no de los scores mencionados y evaluando el aspecto macroscópico del órgano, lo cual constituye un criterio subjetivo, cirujano dependiente. En ocasiones se recurre al análisis histológico del tejido hepático, pero la información obtenida no siempre es suficiente.

Czerwinski et al. (192) analizaron 100 biopsias procedentes de hígados descartados para TH, encontrando que hasta un 35% de los injertos descartados en base a las características de los donantes mostraron cambios mínimos en el análisis histológico, por lo que podrían haber sido utilizados para trasplante. El estudio mostró que las biopsias con cambios histológicos que contraindicaron el trasplante (necrosis parcheada, esteatosis \geq 60% o fibrosis intersticial) se correlacionó con mayor frecuencia con factores de riesgo en el donante como el antecedente de ingesta de alcohol, hiperbilirrubinemia y aumento de las transaminasas. Sin embargo, el principal inconveniente de dicho estudio fue el momento de la toma de la biopsia, ya que ésta se realizó durante la extracción, obviando el efecto del TIF y de la preservación. *Kazikoe et al* (193) analizaron 87 biopsias hepáticas obtenidas tras la reperusión, sin encontrar ninguna característica que pudiera predecir la funcionalidad del injerto tras el trasplante. *D'Alessandro et al.* (70) examinaron 124 biopsias de donantes hepáticos recogidas durante la extracción y tras la reperusión en el receptor; destacando la

limitación de éstas ya que los cambios morfológicos en histología necesitan tiempo y pueden no ser evidente en el periodo de tiempo en el que se suelen recoger.

Otros estudios destacan la asociación de la esteatosis severa y la aparición de fallo del injerto (73), posiblemente debido a la obstrucción del flujo sanguíneo por las vacuolas de grasa tras la ruptura del hepatocito, en el momento de la reperfusión (194, 195). En nuestro hospital, injertos con una esteatosis macrovesicular >40% son descartados para trasplante. Sin embargo, la esteatosis leve o moderada no parece asociarse con la EAD, pero sí con un aumento de las transaminasas, LDH y amonio a medida que aumenta el grado de esteatosis en la biopsia.

Queda patente que el estudio morfológico del injerto no es suficiente para predecir su evolución tras el trasplante, planteándose la necesidad de evaluar la calidad del hígado donante, valorando diferentes aspectos de su funcionalidad como la capacidad de síntesis y metabolización de las drogas así como la producción de bilis (156). Disponer de un análisis funcional del injerto hepático como sistema de medida que reflejara su capacidad funcional aportaría mayor información que el análisis morfológico del tejido. Por estos motivos, nos planteamos la necesidad de disponer de una herramienta que analice de manera objetiva la calidad del injerto hepático antes del trasplante, ayudándonos a decidir sobre la validez del órgano. Ello permitiría maximizar los recursos existentes, y podría predecir la funcionalidad del órgano tras su implante. Posiblemente así, podríamos optimizar la selección del receptor más adecuado como han intentado otros autores (40) así como utilizar órganos que hasta el momento se han descartado para trasplante o incluso ampliar los criterios extendidos.

Uno de los exámenes descrito para analizar el metabolismo hepático de drogas es el test Monoetilglicinexilidido (MEGX); dicho compuesto es el producto del metabolismo de la lidocaína, el cual es exclusivamente hepático, mediante el citocromo P450 3A4. Pese a la discordancia existente entre diferentes publicaciones, niveles disminuidos de dicho metabolito se han relacionado con la pérdida temprana del injerto (196, 197). Por otro lado, el verde de indocianina (ICG) es uno de los test más utilizados en la valoración de la función hepatocelular (198). Estudios previos han determinado que un aclaramiento del plasma mayor o igual de 200 ml/h tras las primeras 24 horas del TH se correlacionan con una buena evolución postoperatoria (199). Recientemente, se ha demostrado que la medición temprana del ICG mediante pruebas no invasivas, que estiman la tasa de desaparición del ICG del plasma, puede predecir la disfunción severa del injerto (grado IV según la clasificación de *Greig et al.* (56)) y la mortalidad tras el TH (200). Sin embargo, dicho estudio se realiza una vez implantado el órgano por lo que no serviría como herramienta para predecir la funcionalidad del injerto antes de su uso.

La monitorización de la función del injerto, también se ha realizado analizando la cantidad y composición de la bilis obtenida mediante el tubo de Kehr en el receptor, así como la concentración de sales biliares y la actividad colerética (201). Sin embargo, el uso de este test se vería limitado por la progresiva disminución del uso del tubo de Kehr en el trasplante; en nuestra unidad por ejemplo, menos de la mitad de los pacientes llevan Kehr (47.1%). Los niveles de sales biliares en el suero tras el trasplante también se han utilizado para este fin (202).

Otras pruebas utilizadas para examinar la capacidad metabólica hepática son la medición de los nucleótidos de adenina y la carga energética del hígado, el ratio de cuerpos cetónicos arteriales y la espectrometría por resonancia magnética (MRS). La concentración de los nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP),

medidos en biopsias hepáticas por espectrometría líquida de alta resolución durante la preservación hipotérmica del injerto, han sido considerados marcadores de la función inicial del injerto (203). En cambio, otros autores defienden que la capacidad mitocondrial de regenerar el ATP tras la reperfusión se correlaciona mejor con la viabilidad del órgano que la concentración absoluta de dichas sustancias (204). La medición mediante MRS del fosfato 31, también se ha utilizado para evaluar la función hepática a partir de los diferentes espectros de picos resultantes de los diferentes picos de fósforo, según los elementos a los que se asocie (nucleótido monofosfatos, fosfomonoéster,...). Ello refleja un aumento de los productos de degradación de los fosfolípidos de membrana durante la preservación hipotérmica del injerto (205), así como un aumento de los fosfolípidos precursores de membrana y del fosfato inorgánico (206). Sin embargo, algunas de estas pruebas muestran resultados contradictorios entre los diferentes autores (197, 207-210) y se realizan a partir de muestras de sangre o bilis obtenidas del receptor (201, 202, 211) por lo que no servirían para evaluar la calidad del injerto y ayudar en la toma de decisiones sobre su validez para trasplante.

Pese a los múltiples esfuerzos en valorar la calidad del injerto hepático en el donante o prever su funcionalidad una vez implantado, todavía no se ha obtenido un método único y fidedigno que nos ayude a evaluar de una manera objetiva la calidad del injerto antes de su implante, que junto con la valoración del cirujano extractor, nos ayude a tomar la decisión sobre si utilizar ese injerto o no, así como a escoger el receptor más idóneo. Por todo ello, decidimos realizar un análisis metabonómico de biopsias procedentes de injertos hepáticos con el fin de buscar biomarcadores que reflejasen la funcionalidad y/o calidad del órgano antes de su implante.

4.3. Búsqueda de biomarcadores de calidad del injerto hepático mediante el perfilado metabonómico de la biopsia del hígado donante

El fenotipo metabonómico de un órgano consiste en el conjunto de sus metabolitos endógenos, que se encuentran a una concentración específica y en un momento determinado. A este conjunto de metabolitos se le conoce como metabonoma y refleja de una manera muy precisa el estado fisiológico de dicho órgano (136, 165). Partiendo de esta idea, en este proyecto hemos intentado averiguar qué huella metabólica refleja de una forma más fidedigna la calidad del injerto hepático antes de su implante. Para ello analizamos el perfil metabólico de biopsias de tejido hepático obtenidas antes del trasplante mediante UPLC-MS combinando las cromatografías RP e HILIC. El uso conjunto de ambas técnicas cromatográficas nos permitió aumentar la cobertura de metabolitos identificados por muestra analizada (212).

Con el objetivo de identificar los biomarcadores de disfunción, investigamos la relación entre el perfil metabonómico presente en las biopsias hepáticas procedentes de los donantes y su posterior función en el receptor (EAD e IGF) (sección 3.6.). Para ello realizamos el perfilado metabonómico de 119 biopsias. El análisis multivariante de los datos generados, nos permitió descifrar una huella metabonómica capaz de discriminar injertos hepáticos que mostraban EAD de aquellos que mostraron IGF. Además, fuimos capaces de identificar una patrón metabonómico compuesto por 93 metabolitos (**Tabla 27**).

Para facilitar la comprensión de los eventos metabólicos acontecidos en los injertos que mostraban EAD, realizamos un análisis cuantitativo de enriquecimiento funcional. Para ello utilizamos los 93 marcadores identificados así como sus concentraciones relativas (169). Así, los metabolitos detectados en mayor concentración en las biopsias de los injertos que presentaron EAD fueron los resultantes de la degradación de los fosfolípidos (**Figura 21B**), los

implicados en la biosíntesis de sales biliares (**Figura 21C**), así como intermediarios del metabolismo de la histamina (**Figura 21D**). El patrón lipidómico hallado en nuestro estudio, podría ser de interés como herramienta diagnóstica en la práctica clínica (213, 214), ya que la alteración en la homeostasis de los fosfolípidos podría indicar disrupción de la membrana celular desencadenando diferentes mecanismos de muerte celular (215). Se ha demostrado recientemente que las lisofosfatidilcolinas son metabolitos tóxicos generados por la hidrólisis de los fosfolípidos catalizada por la fosfolipasa -A2, que actúan como promotor de la muerte celular, llevando a la apoptosis de los hepatocitos mediada por GSK/JNJ y la activación de las caspasas (216, 217). El acúmulo significativo de lisofosfatidilcolinas observado en el grupo de EAD sugiere una mayor predisposición de estos injertos a la apoptosis lípido-dependiente lo que podría afectar de manera dramática la funcionalidad del injerto tras el trasplante. (**Figura 21B**). Estos resultados están en concordancia con hallazgos previos en los que se estudió el perfil de expresión génica asociado con la isquemia del pre-acondicionamiento durante el proceso de TH, que reveló cambios importantes en los genes involucrados en la biosíntesis lipídica, incluyendo los reguladores clave del metabolismo de los fosfolípidos y su relación potencial con el estrés oxidativo y apoptosis en los injertos hepáticos (218, 219).

De notable relevancia es también el aumento observado en los injertos que mostraron EAD de los niveles de sales biliares, principalmente taurina y conjugados de la glicina (**Figura 21C**). Las sales biliares son moléculas claves de señalización consideradas ligandos fisiológicos del receptor farnesoide X, un sensor intracelular que controla la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos, lipoproteínas y la glucosa (220). En publicaciones previas se ha sugerido que las sales biliares son marcadores potenciales de funcionalidad para monitorizar el TH y el rechazo celular agudo (221). Nuestros

resultados demuestran que las sales biliares juegan un papel importante en el perfil metabonómico de la EAD. La acumulación excesiva de sales biliares y fosfolípidos observada en los injertos de mala calidad podría dificultar el inicio de la excreción de la bilis en el injerto una vez implantado, el cual se considera un signo precoz de funcionalidad del injerto (221, 222). El papel clave de la homeostasis de las sales biliares en la evolución tras el TH está respaldada por estudios previos que han relatado la expresión alterada de numerosos genes relacionados con la síntesis de ácidos biliares y su transporte (por ejemplo: BAAT, CYP7A1, SULTA2, MDR2, BSEP) así como los factores nucleares involucrados en la regulación de dichos genes (por ejemplo: HNF α , FXR, SREBF1) asociados con la disfunción temprana del injerto (218, 219, 223, 224).

Por último, en aquellos injertos que mostraron EAD también encontramos alteraciones significativas en otras rutas metabólicas no relacionadas directamente con el metabolismo de los lípidos, como por ejemplo el metabolismo de la histidina. (**Figura 21D**). Niveles elevados de histamina podrían ser indicativos de la respuesta adaptativa al daño hepático consecuencia del TIF o la preservación del injerto, con el fin de disminuir la liberación de citoquinas a través de la activación del receptor H4 de la histamina (225). También se ha comprobado que la histamina puede actuar vía los receptores H1-H4 para desencadenar la señalización de rutas metabólicas de proliferación y diferenciación de colangiocitos. Estos procesos reguladores están forzados en ambientes colestáticos como los descritos anteriormente en los injertos con EAD (226).

El último objetivo de un modelo predictivo discriminante es clasificar correctamente las muestras. En nuestro caso discriminar entre aquellos injertos que mostraran EAD de los que mostraron IGF. La evaluación del modelo PLSDA desarrollado en base a la firma metabólica comentada anteriormente se evaluó mediante el análisis de 23 biopsias hepáticas que no fueron utilizadas

en el desarrollo del modelo. Los resultados mostraron una sensibilidad, especificidad y precisión adecuadas, confirmando la capacidad para anticipar la función del injerto antes de su implante (**Figura 22B**).

Pese a que sólo disponíamos de 4 biopsias procedentes de pacientes que presentaron PNF debido a la baja incidencia de dicho evento (<2%), estas muestras también fueron utilizadas para evaluar la capacidad predictiva del modelo. Los resultados mostraron que todas fueron clasificadas como EAD severa, tal y como muestra los altos valores de score obtenidos por estas muestras (**Figura 22C**).

En conclusión, las biopsias de los injertos hepáticos siempre se han utilizado para evaluar la calidad del injerto centrándose en el grado de esteatosis o fibrosis. Sin embargo, es difícil predecir el comportamiento del injerto a partir del análisis histológico de la biopsia y los datos demográficos del donante. En cambio, el perfil metabólico de los tejidos detecta cambios no apreciados en el análisis morfológico o a partir de marcadores clínicos básicos. Una de las principales ventajas del análisis metabonómico es la objetividad en el momento de evaluar la calidad del injerto hepático antes de su implante, ayudando a la toma de decisiones si aceptar un hígado o no, así como para mejorar la selección del receptor más adecuado para dicho órgano con el fin de maximizar la supervivencia.

4.4. Valoración cuantitativa de la calidad del injerto

El modelo PLSDA desarrollado es capaz de discriminar entre EAD e IGF, sin embargo resulta mucho más interesante el poder establecer una valoración cuantitativa acerca de la calidad del injerto. Por ello, en esta tesis doctoral se desarrolló un modelo capaz de valorar la función del injerto post-trasplante de un modo continuo MEAF (**sección 3.5**). El siguiente paso consistió en buscar la relación entre dicho score con los perfiles metabonómicos encontrados antes del implante hepático. Para ello desarrollamos un modelo PLS que relacionaba el MEAF score de cada receptor con su perfil metabonómico antes del trasplante. Con este nuevo modelo PLS fuimos, por tanto, capaces de asignar una puntuación continua entre 0 y 10 a cada injerto hepático (**Figura 33**). Obteniendo puntuaciones más altas aquellos injertos hepáticos que mostraron una EAD más severa. Este modelo mostró un ajuste y una capacidad predictiva relativamente aceptable si tenemos en cuenta que se basa en un análisis no dirigido en que las concentraciones de biomarcadores que utilizamos en el modelo son relativas (referenciadas a un patrón interno). Este hecho nos hace pensar que si desarrollamos un método targeted (dirigido) que nos permita realizar una cuantificación absoluta de los niveles de metabolitos comprendidos en la huella metabonómica, el ajuste y la capacidad predictiva del modelo mejorarían sustancialmente.

En este trabajo hemos sido capaces de descifrar una firma metabólica que claramente discrimina entre receptores que sufrían EAD de aquellos que no. Sin embargo esta firma debe ser validada evaluando un mayor número de biopsias provenientes de diferentes Unidades de Trasplante. El análisis propuesto para valorar la calidad del hígado donante también podría ser útil para evaluar la expansión de los criterios de aceptación de los donantes u otras fuentes de injertos como los procedentes de donantes con muerte cardíaca en los que el aspecto macroscópico no es suficiente para evaluar la calidad del mismo. El

objetivo final es aplicar este análisis en rutina clínica, para ello, las biopsias hepáticas deben ser evaluadas lo más pronto posible, en el periodo comprendido entre la extracción del injerto y antes del final del tiempo de isquemia fría. Ello nos permitiría disponer de un tiempo de respuesta y toma de decisiones aceptable. En nuestro laboratorio, estamos desarrollando un método analítico dirigido capaz de cuantificar los biomarcadores de difusión propuestos en menos de 30 minutos.

5. Conclusiones/Conclusions

Análisis metabonómico de muestras de hígado donante

- El análisis metabonómico de biopsias de injertos hepático antes de su implante nos ha permitido encontrar un patrón metabonómico capaz de discriminar entre aquellos injertos que una vez implantados, presentan una función pobre (EAD) de aquellos que mostraran una buena función (IGF).
- La huella metabonómica característica de la EAD está compuesta fundamentalmente por marcadores de origen lipídico entre los que encontramos ácidos biliares, fosfolípidos, fosfatidilcolinas fosfatidiletanolaminas y esfingomielinas entre otros. La presencia de algunos de estos compuestos puede desencadenar fenómenos tóxicos y apoptóticos cuya consecuencia derive en una peor función del órgano una vez implantado.
- El hallazgo de biomarcadores relacionados con la pobre función inicial del injerto nos ha permitido desarrollar un modelo PLSDA predictivo de EAD que presenta una buena sensibilidad, especificidad y exactitud.

Desarrollo de un modelo continuo para evaluar la función temprana del injerto hepático después de su implante (MEAF score)

- Hemos desarrollado un modelo, basado en variables analíticas fácilmente obtenibles (ALT, INR y bilirrubina), capaz de describir la evolución clínica del receptor de un modo continuo, específico y exacto. Este modelo permite la comparación de resultados relacionados con el TH entre los diferentes centros.
- Las ventajas fundamentales del MEAF score residen en su carácter continuo que permite la valoración específica de cada paciente, evitando los errores diagnósticos que tienen las clasificaciones que categorizan la función temprana del injerto en clases (ej. EAD, no-EAD).

5. Conclusiones/Conclusions

- El MEAF score muestra una asociación significativa con la supervivencia tanto del injerto hepático como del paciente para 3-, 6- y 12-meses, lo que pone de relevancia su utilidad clínica en la evaluación de la funcionalidad temprana del injerto.
- EL MEAF score tiene una asociación significativa con determinados factores de riesgo de donante, receptor y cirugía. Estos resultados están en concordancia con hallazgos anteriores y pone de manifiesto, una vez más, el peligro que puede acarrear la concurrencia de varios factores de riesgo en un TH.
- El MEAF score puede ser usado en estudios traslacionales en los que se requiere un criterio de evolución de la función del injerto objetivo y estandarizado.

Puntuación de la calidad del injerto hepático antes de su implante

- El análisis PLS entre biomarcadores de EAD y el MEAF score muestra una buena correlación entre ambos.
- EL modelo PLS de EAD vs. MEAF score, nos permite asignar una puntuación continua y específica, entre 0 y 10, para cada hígado donante; aumentando dicha puntuación según aumenta el grado de severidad de EAD.

CONCLUSIONS

Metabolomic analysis of liver donor biopsies

- The metabolomic analysis of donor liver biopsies before implantation allowed us to find a metabolomic pattern able to discriminate between those grafts that present poor function (EAD) of those who showed good function (IGF) once transplanted.
- The metabolomic fingerprint of EAD is primarily composed of markers from lipid origin such as sphingomyelins, bile acids, phospholipids, phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines among others. The presence of some of these compounds can trigger apoptotic and toxic effects resulting in a worse function of the organ after transplantation.
- The discovery of biomarkers associated with initial poor graft function has enabled us to develop a predictive PLSDA model with good sensitivity, specificity and accuracy

Development of a continuous model to assess early liver graft function after transplantation (MEAF score)

- We have developed a model based on easily available analytical variables (ALT, bilirubin and INR), able to describe the clinical outcome of the recipient in a continuous manner as well as in a more specific and accurate way. This model allows the comparison of the clinical outcomes after LT among different transplant centers.
- The primary advantages of MEAF score lies in their continuous nature to allow specific assessment of each patient, avoiding misdiagnosis with classifications that categorize early graft function in classes (eg EAD, non-EAD).

5. Conclusiones/Conclusions

- The MEAF score shows a significant association with both patient and graft survival 3 -, 6 - and 12-months after LT, which serves to underscore its clinical utility in the evaluation of early graft function.
- The MEAF score has a significant association with certain risk factors related to the donor, the recipient and the surgery. These results are consistent with previous findings and highlights the danger caused with the occurrence of several risk factors in one LT.
- The MEAF score can be used in translational studies in which an objective and standardize criterion to asses graft function is required.

Scoring liver graft quality before implantation

- The PLS analysis between biomarkers of EAD and MEAF score shows a good correlation between the two.
- The PLS model of EAD vs MEAF score allows us to assign a continuous and specific score between 0 and 10 for each donor liver, increasing this score as the severity of the EAD increases.

6. Anexos

PROTOCOLO DE EVALUACIÓN PRE-TRASPLANTE HEPÁTICO

NOMBRE Y APELLIDOS: (o etiqueta identificativa)	DIAGNÓSTICO: GRUPO y RH: PESO (kg): TALLA (cm):
--	--

<i>Observaciones:</i>

En general	Según etiología
------------	-----------------

A. PRUEBAS DE LABORATORIO

- ANALÍTICA : HEMOGRAMA, BIOQUÍMICA, HEMOSTASIA CON INR
- ALFA-FETOPROTEÍNA
- H. TIROIDEAS (T4 libre, TSH)
- AUTOANTICUERPOS (AAN, AAML, AAM, ALKM)
- SEROLOGÍAS VHA, VHB, VHC,
- SEROLOGÍAS CMV, VHS, VVZ, VEB, LÚES, VIH, TOXOPLASMA
- MANTOUX
- SUERO PARA CONGELAR *
- ORINA: S y A
- GRUPO Y ANTICUERPOS IRREGULARES
- HEMOGLOB GLICOSILADA (si diabetes)
- DOCUMENTOS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO *

B. PRUEBAS COMPLEMENTARIAS INTERCONSULTAS

- ECO- DOPPLER HEPÁTICA
- RMN VASCULAR HEPÁTICA
- ECG y ECOCARDIOGRAMA
- RX TÓRAX

- tiene del último año)
- COLONOSCOPIA (si CEP/EICI/polipos)
- RMN CEREBRAL EN CASO DE:
 - Historia de encefalopatía hepática
 - Edad mayor de 60 años
- INTERCONSULTAS:
 - CARDIOLOGÍA
 - NUTRICIÓN (pacientes desnutridos) *
 - PSIQUIATRÍA (si procede)
 - CIR. MAXILOFACIAL*
 - ENDOCRINO (si HbA1c > 8)
 - UNID. RIESGO CARDIOVASCULAR* (si factores de riesgo CV)
 - ANESTESIA*

C. A LOS ANTI-HB_s NEGATIVOS:**VACUNACIÓN ANTI-HEPATITIS B :**

Dosis doble (40 mcg) a los 0-1-2 meses con titulación anti-HB_s al mes de la tercera dosis.

D. CIRROSIS POR ALCOHOL:

- METABOLISMO FÈRRICO (HIERRO, IST, CTFH) Y FERRITINA SÈRICA
- RMN CEREBRAL
- TRANSFERRINA DEFICIENTE EN CARBOHIDRATOS *
- IC A PSIQUIATRIA

E. CIRROSIS VHC:

- METABOLISMO FÈRRICO (HIERRO, IST, CTFH) Y FERRITINA SÈRICA
- GENOTIPO Y CARGA VIRAL

F. CIRROSIS VHB:

- HBeAg, Anti-HBe, Anti-VHD
- CARGA VIRAL

G. CIRROSIS AUTOINMUNE / CBP/ CEP:

- HLA A, B, DR y DQ
- IgA, IgG, IgM.
- p-ANCA (si CEP)
- ESTUDIO EXTENSION: TAC TORACOABDOM
- TTO NEOADYUVANTE (percutáneo / transarter.)*

H. CIRROSIS CRIPTOGÈNICA / EHNA:

- METABOLISMO FÈRRICO (HIERRO, IST, CTFH) Y FERRITINA SÈRICA
- CERULOPLASMINA
- ALFA-1-ANTITRIPSINA Y FENOTIPO Pi.
- HLA A, B y DR
- ARN-VHC (PCR)
- ADN-VHB (PCR)

I. ENF. DE WILSON:

- CERULOPLASMINA Y CUPRURIA 24 H

J. HEMOCROMATOSIS

- METABOLISMO FÈRRICO (HIERRO, IST, CTFH) Y FERRITINA SÈRICA
- MUTACION GEN HEMOCROMATOSIS

K. EN CASO DE CHC:

- TAC HEPATICO CON CONTRASTE (ANGIOTC)
- ECOGRAFIA CON CONTRASTE
- RM HEPATICA
- ARTERIOGRAFIA (si procede) *

- **Datos administrativos**

Fecha inicio protocolo: Fecha inclusión en lista:

Fecha Nacimiento: Edad:

Dirección:

Teléfonos de contacto:

Médico que remite al paciente:

Hospital de origen:

- **Antecedentes personales**

Alergias:

Factores de riesgo cardio-vascular: HTA Obesidad

DM Dislipemia

Tabaco (cantidad y tiempo):

Alcohol (cantidad y tiempo):

Enfermedades extrahepáticas asociadas

(comorbilidades):

Cirugía abdominal:

Tratamiento actual:

Evolución de la enfermedad (incluir respuesta a tratamientos antivirales y del hepatocarcinoma):

Estado nutricional (Bueno / Regular / Malo):

<u>DATOS DE LABORATORIO</u>

Leucos	Anti-VHA (IgG)	AAN
Hemoglobina	<i>VHB</i>	AAM
Plaquetas	- HBsAg	AAML
	- Anti-HBs	AALKM
<i>BIOQUÍMICA</i>	- Anti-HBc	p-ANCA
Glucemia	- HBeAg	
Urea/Creatinina	- Anti-HBe	Inmunoglobulinas
Ac. Urico	- Anti-VHD	IgG
Col/Trgl	-Carga viral VHB (indicar unidades)	IgA
GOT /GPT	-ADN-VHB (PCR)	IgM
GGT / FA	VHC	
BbT/BbD	-Anti-VHC	
Prot Tot / Alb	- Genotipo	Fenotipo Pi
Na / K	- Carga viral VHC (indicar unidades)	
<i>HEMOSTASIA</i>	ARN-VHC (PCR)	Ceruloplasmina
I Quick (%)	OTROS	Cupruria 24 h.
T.Protromb(seg)	- CMV (IgG)	
INR	- VHS (IgG)	
Fibrinógeno	- VHZ (IgG)	
	- VEB (IgG)	
Alfa-Fetoproteína	- VIH	HLA

6. Anexos

	-Toxoplasma(IgG)	
Metabolismo del hierro	- Lúes (rpr)	
Fe	- Mantoux	
IST		
Ferritina		
Hormonas Tiroideas -T4 libre -TSH		

INTERCONSULTAS

	Fecha	Resultado
ESTUDIO CARDIOLÓGICO:		
- Valoración por cardiólogo:		
- Eco-cardio:		
- Cateterismo (si procede):		
ESTUDIO NEUMOLÓGICO		
- Rx tórax:		
- Gasometría arterial (PO ₂ basal):		
- PFR:		
VALORACIÓN PSIQUIÁTRICA:		
VALORACIÓN ANESTÉSICA:		
VALORACIÓN ENDOCRINOLOGÍA:		

EXPLORACIONES COMPLEMENTARIAS

	Fecha	Resultado
Gastroscopia:		
Eco-Doppler hepática	-	
RMN-vascular hepática	-	
RMN- cerebral	-	
En caso de CHC:		

- TAC toraco-abdominal:		
- Ecografía con contraste:		
- RM hepática:		
- TAC hepático con contraste:		
- Biopsia (si procede):		
Tratamientos aplicados:		
▪ Percutáneos (tipo):	-	-
▪ Quimioembolización transarterial:	-	-

Vacuna anti-Hepatitis B: Sí / No / No procede

- Fechas (0-1-2):
- Títulos anti-HBs al mes de la última dosis:

PROTOCOLO 2

INMUNOSUPRESIÓN: PAUTA DE INDUCCIÓN

EN GENERAL

Triple terapia (Neoral® o Prograf® + Esteroides + MMF)

En: Cirrosis autoinmunes, CEP y hepatitis fulminantes en < 45 años.

Doble terapia (Neoral® o Prograf® + MMF)

Se elegirá la inmunosupresión principal de forma aleatoria según NHC, las pares con Neoral® y las impares con Prograf®.

Se iniciarán los anticalcineurínicos antes de las 24 horas del final de la intervención. En los pacientes Child-Pugh C, o MELD > 18 se retrasarán entre 48 y 72 horas.

EXCEPCIONES

Mujeres jóvenes (< 45 años): se realizará con Tacrolimus.

Diabéticos: Pauta con MMF y Neoral®.

HCC con criterios expandidos en la pieza o signos de mal pronóstico:

Iniciar al mes, tratamiento con Rapamicina (Sirolimus®) o Everolimus (Certican®), reduciendo anticalcineurínicos y suprimiendo el tercer inmunosupresor.

MANEJO EN INSUFICIENCIA RENAL

En insuficiencia renal pretrasplante (Creatinina > 1.5 mg/dl)

Iniciar pauta con Simulect®, e introducir anticalcineurínicos a mitad de dosis a partir del 5º día. En caso de no mejoría individualizar el caso y plantear introducción de mTOR (Sirolimus® / Certican®)

En insuficiencia renal postrasplante (Elevación de creatinina más del 50% del valor basal o diuresis postrasplante < 50 ml/h durante 12 horas)

La misma pauta que en IR pretrasplante.

Deterioro de la función renal tras anticalcineurínicos

Suspender los anticalcineurínicos hasta 72 horas y reiniciarlos a mitad de dosis, cuando se resuelva la insuficiencia renal. Plantear mTOR sino se resuelve

MEDICACIÓN INMUNOSUPRESORA

Hora final de intervención:

Inicio de anticalcineurínicos:

En general entre las 12 y 24 horas de finalizada la intervención.

Si MELD > 18 entre 24 y 36 horas

- METILPREDNISOLONA: *No se da en la fase anhepática. En los pacientes con enfermedad autoinmune o jóvenes se inicia en REA con dosis de 20 mg/día.*
- NEORAL® (Ciclosporina A): 10 mg/kg/día, (15 mg en pacientes con Kehr) hasta conseguir niveles entre 250-350 ng/ml en el primer mes repartido en dos dosis.
- PROGRAF® (Tacrolimus): 0.1 mg/kg/día, repartido en dos dosis hasta conseguir niveles entre 5-15 ng/ml el primer mes.
- ADVAGRAF® (Tacrolimus de liberación prolongada):
 - En mantenimiento. Conversión 1:1 en trasplantados estables cada 24 horas.
 - *En inducción. Cuando MELD < 18 con 0.15 mg/kg/día una sola vez al día.*
- CELL-CEPT® (Mofetil micofenolato): 1 g/12h y, en caso de intolerancia digestiva, 0.5 g/6h-8h.
- IMUREL® (Azatioprina): 1-2 mg/kg/día en una dosis única. No iniciarlo con recuento leucocitario < 2.000, o recuento plaquetar < 30.000. En casos especiales
- SIMULECT® (Baxilisimab): 20 mg el día 0 en bolus (en las 6 primeras horas tras el trasplante) y 20 mg el día +4.
- SIROLIMUS® (Rapamicina): 5 mg/día v.o. una sola vez al día, hasta conseguir niveles entre 4-11 ng/ml. Contraindicado en insuficiencia renal con proteinuria y toxicidad hematológica.

- CERTICAN® (Everolimus): Empezar 0.75 mg/12h hasta conseguir niveles entre 3-8 ng/ml. Contraindicado en insuficiencia renal con proteinuria y toxicidad hematológica.
- ALPROSTADIL: Sólo en casos de disfunción inicial del injerto, que no mejore espontáneamente en los primeros controles (al menos tres controles analíticos).

7. Bibliografía

1. National Institute of Health Consensus Development Conference on Liver Transplant Statement. "Liver Transplantation". *Hepatology* 1984;4:107s-110s.
2. Lyons AS, Petrucelli RJ. *Historia de la medicina*. Ed:Doyma libros. Barcelona 1994:590-594.
3. Welch CS. A note on transplantation of the whole liver in dogs. *Transplant Bulletin* 1955;2:54-55.
4. Canon JA. Organs (communication). *Transplant Bulletin* 1956;3:7-9.
5. Moore FD, Wheeler HB, Demessianos HV. Experimental whole-organ transplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet* 1963;38:659-676.
6. Starzl TE, Kaupp HA, Brock DR, Lazarus RE, Johnson RV. Reconstructive problems in canine liver homotransplantation with special reference to the postoperative role of hepatic venous flow. *Surg Gynecol Obstet* 1960;111:733-743.
7. Starzl TE, Machioro TL, Von Kaulla KN, Hermann G, Britain RS, Wadell WR. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet* 1963;117:659-676.
8. Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Gartner JC, Zitelli BJ, Malatack JJ, Schade RR, et al. Evolution of liver transplantation. *Hepatology* 1982;2:614-636.
9. Starzl TE, Marchioro TL, Porter KA, Taylor PD, Faris TD, Herrmann TJ, Hlad CJ, et al. Factors determining short and long-term survival after orthotopic liver homotransplantation in the dog. *Surgery* 1965;58:131-155.
10. McBride RA, Wheeler HB, Smith LL, Moore FD, Dammin GJ. Homotransplantation of the canine liver as an orthotopic vascularized graft. Histologic and functional correlations during residence in new host. *Am J Pathol* 1962;41:501-519.
11. Starzl TE. The donors and the organs. In Starzl TE. *The puzzle people: memoirs of a Transplant Surgeon*. Pittsburg, University of Pittsburg Press 1992:96-105.
12. Brettschneider L, Daloze PM, Huguet C, Porter KA, Groth CG, Kashiwaqi N, Hutchison DE, et al. The use of combined preservation techniques for extended storage of orthotopic liver homografts. *Surg Gynecol Obstet* 1968;126:263-274.
13. Starzl TE, Groth CT, Brettschneider L, Penn I, Fulginiti V, Moon J, Blanchard H, et al. Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg* 1968;168:392-415.
14. Calne RY. Liver transplantation. *Gut* 1968;9:262-265.
15. Pichlmayr R, Broelsch C, Wonigeit K, Neuhaus P, Siegismund S, Schimdt FW, Burdelski M. Experiences with liver transplantation in Hannover. *Hepatology* 1984;4:56S-60S.

16. Lecompte Y, Metreau JM, Sancho HS, Bismuth H. Prediction of mortality in cirrhosis of the liver. *Sur Gynecol Obstet* 1974;139:529-530.
17. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporine A: a new antilymphocyte agent. *Agents action* 1976;6:468-479.
18. Calne RY, Rolles K, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, et al. Cyclosporin A as the only immunosuppressant in 34 patients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreas and 2 livers. *Lancet* 1979;2:1033-1036.
19. Margarit C, Jaurrieta E, Maestre P, Casais L, Fernandez de Sevilla A, Curto JA, Sitges A. Trasplante hepático ortotópico en un paciente con hepatocarcinoma *Rev Esp Enf Ap Digest* 1984;66:234-239.
20. Mir Pallardó J. El trasplante hepático. Ed. Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat. Valencia. 2001.
21. Calne RY, Pegg DE, Pryse-Davies J, Leigh-Brown FL. Renal preservation by ice-cooling. An experimental study relating to kidney transplantation from cadavers. *Br Med J* 1963;2:651-655.
22. Collins GM, Bravo-Shugarman MB, Terasaki PI. Kidney preservation for transplantation: initial perfusion and 30 hours ice storage. *Lancet* 1968;2:1219-1222.
23. Squifflet JP, Pirson Y, Gianello P, Van Cangh P, Alexandre GP. Safe preservation of human renal cadaver transplants by Euro-Collins solution up to 50 hours. *Transplant Proc* 1981;13:693-696.
24. Ploeg RJ, Goossens D, McAnulty JF, Southard JH, Belzer FO. Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution. *Transplantation* 1988;46:191-196.
25. Southard JH, Van Gulik TM, Ametani MS, Vreugdenhil PK, Lindell SL, Pienaar BL, Belzer FO. Important components of the UW solution. *Transplantation* 1990;49:251-257.
26. Starzl TE, Iwatsuki S, Esquivel CO, Todo S, Kam I, Lynch S, Gordon RD, et al. Refinements in the surgical technique of liver transplantation. *Semin Liver Dis* 1985;5:349-356.
27. Tzakis A, Todo S, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation with preservation of the inferior vena cava. *Ann Surg* 1989;210:649-652.
28. Starzl TE, Demetris AJ, Van Thiel DH. Medical progress: liver transplantation. Part I. *N Engl J Med* 1989;321:1014-1022.
29. Broelsch Ch, Emond JC, Whittington PF, Thistlethwaite JR, Baker AL, Lichtor JL. Application of reduced-size liver transplants as Split grafts, auxiliary orthotopic grafts, and living related segmental transplants. *Ann Surg* 1990;212:368-375.
30. Bismuth H, Houssin D. Reduced sized orthotopic liver graft in hepatic transplantation in children. *Surgery* 1984;95:367-370.

31. Bismuth H, Morino M, Castaign D, Gillon MC, Descorps A, Saliba F, Samuel D. Emergency orthotopic liver transplantation in two patients using one donor liver. *Br J Surg* 1989;76:722-724.
32. Fortner JG, Kinne DW, Shiu MH, Howland WS, Kim DK, Castro EB, Yeh SD, et al. Clinical liver heterotopic (auxiliary) transplantation. *Surgery* 1973;74:739-751.
33. ONT. Dossier de la Organización Nacional de Trasplante. 2013.
34. Lo CM, Fan ST, Liu CL, Wei WI, Lo RJ, Lai CL, Chan JK, et al. Adult-to-adult living donor liver transplantation using extended right lobe grafts. *Ann Surg* 1997;226:261-269.
35. Wachs ME, Bak TE, Karrer FM, Everson GT, Shrestha R, Trouillot TE, Mandell MS, et al. Adult living donor liver transplantation using a right hepatic lobe. *Transplantation* 1998;66:1313-1316.
36. Emond JC, Whittington PF, Thistlethwaite JR, Cherqui D, Alonso EA, Woodle ES, Vogelbach P, et al. Transplantation of two patients with one liver. Analysis of a preliminary experience with 'split-liver' grafting. *Ann Surg* 1990;212:14-22.
37. Bruna Esteban M, Lopez Andujar R, Montalva Oron E, Redondo Cano C, Moya Herraiz A, San Juan Rodriguez F, Pareja Ibars E, et al. Donors yesterday and today: have the characteristics of liver donors changed over the last 15 years? *Cir Esp* 2008;83:194-198.
38. Barshes NR, Horwitz IB, Franzini L, Vierling JM, Goss JA. Waitlist mortality decreases with increased use of extended criteria donor liver grafts at adult liver transplant centers. *Am J Transplant* 2007;7:1265-1270.
39. Jimenez C, Clamare M, Manrique A, Moreno E. Concepto de donante marginal. Edad del donante en el trasplante hepático. ¿Cómo condiciona?. *Med Clin Monogr (Barc)* 2006;7:3-7.
40. Cameron AM, Ghobrial RM, Yersiz H, Farmer DG, Lipshutz GS, Gordon SA, Zimmerman M, et al. Optimal utilization of donor grafts with extended criteria: a single-center experience in over 1000 liver transplants. *Ann Surg* 2006;243:748-753.
41. Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Hertl M. Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1994;20:829-838.
42. Hoofnagle JH, Lombardero M, Zetterman RK, Lake J, Porayko M, Everhart J, Belle SH, et al. Donor age and outcome of liver transplantation. *Hepatology* 1996;24:89-96.
43. Cuende N, Miranda B, Cañón JF, Garrido G, Matesanz R. Donor characteristics associated with liver graft survival. *Transplantation* 2005;79:1445-1452.

44. Markmann JF, Markmann JW, Markmann DA, Bacquerizo A, Singer J, Holt CD, Gornbein J, et al. Preoperative factors associated with outcome and their impact on resource use in 1148 consecutive primary liver transplants. *Transplantation* 2001;72:1113-1122.
45. Grazi GL, Cescon M, Ravaioli M, Ercolani G, Pierangeli F, D'Errico A, Ridolfi L, et al. A revised consideration on the use of very aged donors for liver transplantation. *Am J Transplant* 2001;1:61-68.
46. Mor E, Klintmalm GB, Gonwa TA, Solomon H, Holman MJ, Gibbs JF, Watemberg I, et al. The use of marginal donors for liver transplantation. A retrospective study of 365 liver donors. *Transplantation* 1992;53:383-386.
47. Castellvi JM, Xiol X, Guardiola J, Sabaté I, Roca M, Lama C, Figueras J, et al. Pretransplantation risk factors for graft loss after liver transplantation in cirrhotic patients: effect of citomegalovirus serologic status. *Transpl Int* 2004;17:131-137.
48. Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, Dykstra DM, Punch JD, DebRoy MA, Greenstein SM, et al. Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. *Am J Transplant* 2006;6:783-790.
49. Schemmer P, Nickkholgh A, Hinz U, Gerling T, Mehrabi A, Sauer P, Encke J, et al. Extended donor criteria have no negative impact on early outcome after liver transplantation: a single-center multivariate analysis. *Transplant Proc* 2007;39:529-534.
50. Amin MG, Wolf MP, TenBrook JA, Jr., Freeman RB, Jr., Cheng SJ, Pratt DS, Wong JB. Expanded criteria donor grafts for deceased donor liver transplantation under the MELD system: a decision analysis. *Liver Transpl* 2004;10:1468-1475.
51. Busuttill RW, Tanaka K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transplantation* 2003;9:651-663.
52. Greig PD, Forster J, Superina RA, Strasberg SM, Mohamed M, Blendis LM, Taylor BR, et al. Donor-specific factors predict graft function following liver transplantation. *Transplant Proc* 1990;22:2072-2073.
53. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, Sasaki T, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis. *Transplantation* 1993;55:807-813.
54. Briceño J, Ciria R, de la Mata M, Rufián S, López-Cillero P. Prediction of Graft Dysfunction Based on Extended Criteria Donors in the Model for End-Stage Liver Disease Score Era. *Transplantation* 2010;90:530-539.
55. Makowka L, Gordon RD, Todo S, Ohkohchi N, Marsh JW, Tzakis AG, Yokoi H, et al. Analysis of donor criteria for the prediction of outcome in clinical liver transplantation. *Transplant Proc* 1987;19:2378-2382.
56. Greig PD, Woolf GM, Sinclair SB, Abecassis M, Strasberg SM, Taylor BR, Blendis LM, et al. Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E1. *Transplantation* 1989;48:447-453.

57. Deschenes M, Belle SH, Krom RA, Zetterman RK, Lake JR. Early allograft dysfunction after liver transplantation: a definition and predictors of outcome. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Transplantation* 1998;66:302-310.
58. Olthoff KM, Kulik L, Samstein B, Kaminski M, Abecassis M, Emond J, Shaked A, et al. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver Transpl* 2010;16:943-949.
59. McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 1988;46:178-191.
60. Gonzalez FX, Rimola A, Grande L, Antolin M, Garcia-Valdecasas JC, Fuster J, Lacy AM, et al. Predictive factors of early postoperative graft function in human liver transplantation. *Hepatology* 1994;20:565-573.
61. Ben-Ari Z, Weiss-Schmilovitz H, Sulkes J, Brown M, Bar-Nathan N, Shaharabani E, Yussim A, et al. Serum cholestasis markers as predictors of early outcome after liver transplantation. *Clin Transplant* 2004;18:130-136.
62. Nanashima A, Pillay P, Verran DJ, Painter D, Nakasuji M, Crawford M, Shi L, et al. Analysis of Initial Poor Graft Function After Orthotopic Liver Transplantation: Experience of an Australian Single Liver Transplantation Center. *Transplant Proc* 2002;34:1231-1235.
63. Pokorny H, Langer F, Herkner H, Schernberger R, Plochl W, Soliman T, Steininger R, et al. Influence of cumulative number of marginal donor criteria on primary organ dysfunction in liver recipients. *Clin Transplant* 2005;19:532-536.
64. Grande L, Rimola A, Garcia-Valdecasas JC, Mas A, Fuster J, Navasa M, LAcy AM, et al. Recovery of liver graft after initial poor function. *Transplantation* 1992;53:228-230.
65. Silberhumer GR, Pokorny H, Hetz H, Herkner H, Rasoul-Rockenschaub S, Soliman T, Wekerle T, et al. Combination of extended donor criteria and changes in the Model for End-Stage Liver Disease score predict patient survival and primary dysfunction in liver transplantation: a retrospective analysis. *Transplantation* 2007;83:588-592.
66. Furukawa H, Todo S, Inventarza O, Casavilla A, Wu Y, Scotti-Foglieni C, Broznick B, et al. Effect of cold ischemia time on the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution. *Transplantation* 1991;51:1000-1004.
67. Adam R, Bismuth H, Diamond T, Ducot B, Morino M, Astarcioglu I, Johann M, et al. Effect of extended cold ischemia time with UW solution on graft function function after liver transplantation. *Lancet* 1992;340:1373-1376.
68. Briceno J, Marchal T, Padillo J, Solorzano G, Pera C. Influence of marginal donors on liver preservation injury. *Transplantation* 2002;74:522-526.

69. Piratvisuth T, Tredger JM, Hayllar KA, Williams R. Contribution of true cold and rewarming ischemia times to factors determining outcome after orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1995;1:296-301.
70. D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Solinger HW, Hoffman RM, Reed A, Knechtle SJ, Pirsch JD, et al. The predictive value of donor liver biopsies on the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1991;23:1536-1537.
71. Loinaz C, Gonzalez EM. Marginal donors in liver transplantation. *Hepatology* 2000;47:256-263.
72. Adam R, Reynes M, Johann M, Morino M, Astarcioglu I, Kafetzis I, Castaing D, et al. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc* 1991;23:1538-1540.
73. Portman B, Wight DGD. Pathology of liver transplantation (excluding rejection). In: Calne R, ed. *Liver transplantation*. Orlando, FL: Grune & Stratton, 1987:437.
74. Marsman WA, Wiesner RH, Rodriguez L, Batts KP, Porayko MK, Hay JE, Gores GJ, et al. Use of fatty donor liver is associated with diminished early patient and graft survival. *Transplantation* 1996;62:1246-1251.
75. García Ureña MA, Colina Ruiz-Delgado FC, Moreno Gonzalez E, Jiménez Romero C, García García I, Loinzaz Seguro C, Gonzalez Pinto I, et al. Hepatic steatosis in liver transplant donors: Common feature of donor population? *World J Surg* 1998;22:837-844.
76. Fishbein T, Fiel M, Emre S, Cubukcu O, Guy S, Schwartz M, Miller CM, et al. Use of livers with microvesicular fat safely expands the donor pool. *Transplantation* 1997;64:248-251.
77. Takeda Y, Arai S, Kaido T, Niwano M, Moriga T, Mori A, Hanaki K, et al. Morphologic alteration of hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in rat fatty liver during cold preservation and the protective effect of hepatocyte growth factor. *Transplantation* 1999;67:820-828.
78. Fukumori T, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Why is fatty liver unsuitable for transplantation? Deterioration of mitochondrial ATP synthesis and sinusoidal structure during cold preservation of a liver with steatosis. *Transplant Proc* 1997;29:412-415.
79. Lemasters JJ, Peng XX, Bachmann S, Currin RT, Gao W, Thurman RG. Dual role of Kupffer cell activation and endothelial cell damage in reperfusion injury to livers stored for transplantation surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10(suppl 1):S84-S87.
80. Urena MA, Ruiz-Delgado FC, Gonzalez EM, Seguro CL, Romero CJ, Garcia IG, González-Pinto I, et al. Assessing risk of the use of livers with macro and microsteatosis in a liver transplant program. *Transplant Proc* 1998;30:3288-3291.

81. Karatzas T, Olson L, Ciancio G, Burke GW, Spires G, Cravero L, Taukus R, et al. Expanded liver donor age over 60 years for hepatic transplantation. *Transplant Proc* 1997;29:2830-2831.
82. Briceno J, Lopez-Cillero P, Rufian S, Diaz-Iglesias C, Solorzano G, Padillo J, de la Mata M, et al. Impact of marginal quality donors on the outcome of liver transplantation. *Transplant Proc* 1997;29:477-480.
83. Busquets J, Xiol X, Figueras J, Jaurrieta E, Torras J, Ramos E, Rafecas A, et al. The impact of donor age on liver transplantation: influence of donor age on early liver function and on subsequent patient and graft survival. *Transplantation* 2001;71:1765-1771.
84. Jimenez Romero C, Moreno González E, Colina Ruiz F, Palma Carazo F, Loinaz Seguro C, Rodriguez González F, Gonzalez Pinto I, et al. Use of octogenarian livers safely expands the donor pool. *Transplantation* 1999;68:572-575.
85. Popper H. Aging and the liver. *Prog Liver Dis* 1986;8:659-683.
86. Kimura F, Miyazaki M, Suwa T, Kakizaki S. Reduction of hepatic acute phase response after partial hepatectomy in elderly patients. *Res Exp Med (Berl)* 1996;196:281-290.
87. Yersiz H, Shaked A, Olthoff K, Imagawa D, Shackleton C, Martin P, Busuttil RW. Correlation between donor age and the pattern of liver graft recovery after transplantation. *Transplantation* 1995;60:790-794.
88. Mimeault R, Grant D, Ghent C, Duff J, Wall W. Analysis of donor and recipient variables and early graft function after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1989;21:3355.
89. Alexander JW, Vaughn WK. The use of "marginal" donors for organ transplantation. *Transplantation* 1991;51:135-141.
90. Cywes R, Greig PD, Sanabria JR, Clavien PA, Levy GA, Harvey PR, Strasberg SM. Effect of intraportal glucose infusion on hepatic glycogen content and degradation and outcome of liver transplantation. *Ann Surg* 1992;216:235-246.
91. Avolio AW, Agnes S, Magalini SC, Castagneto M. Importance of donor blood chemistry data (AST, serum sodium) in predicting liver transplant outcome. *Transplant Proc* 1991;23:2451-2452.
92. Figueras J, Busquets J, Grande L, Jaurrieta E, Pérez-Ferreiroa J, Mir J, Margarit C, et al. The deleterious effect of donor high plasma sodium and extended preservation in liver transplantation. A multivariate analysis. *Transplantation* 1996;61:410-413.
93. Delaunay L, Denis V, Darmon PL, Catoire P, Bonnet F. Initial cardiac arrest is a risk factor for failure of organ procurement in brain-dead patients. *Transplant Proc* 1996;28:2894.

94. Totsuka E, Fung JJ, Urakami A, Moras N, Ishii T, Takahashi K, Narumi S, et al. Influence of donor cardiopulmonary arrest in human liver transplantation: possible role of ischemic preconditioning. *Hepatology* 2000;31:577-580.
95. Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology* 2003;125:1480-1491.
96. Azoulay D, Del Gaudio M, Andreani P, Ichai P, Sebag M, Adam R, Scatton O, et al. Effects of ten minutes of ischemic preconditioning of the cadaveric liver on the graft's preservation and function: the ying and the yang. *Ann Surg* 2005;242:133-139.
97. Levesque E, Hoti E, Khalfallah M, Salloum C, Ricca L, Vibert E, Azoulay D. Impact of Reversible Cardiac Arrest in the Brain-Dead Organ Donor on the Outcome of Adult Liver Transplantation. *Liver transplantation* 2011;17:1159-1166.
98. Wilson DJ, Fisher A, Das K, Goerlitz F, Holland BK, De La Torre AN, Merchant A, et al. Donors with cardiac arrest: improved organ recovery but no preconditioning benefit in liver allografts. *Transplantation* 2003;75:1683-1687.
99. Rustgi VK, Marino G, Halpern MT, Johnson LB, Umana WO, Tolleris C. Role of gender and race mismatch and graft failure in patients undergoing liver transplantation. *Liver Transpl* 2002;8:514-518.
100. Rao AR, Chui AK, Shi LW, Tsai L, Leon CD, Sheil AG. Is donor obesity related to liver steatosis and liver graft dysfunction in liver transplantation? *Transplant Proc* 2000;32:2103.
101. Youssef W, McCullough AJ. Diabetes mellitus, obesity and hepatic steatosis. *Semin Gastrointest Dis* 2002;13:17-30.
102. Yoo HY, Molmenti E, Tbuluvutb PJ. The Effect of Donor Body Mass Index on Primary Graft Nonfunction, Retransplantation Rate, and Early Graft and Patient Survival After Liver Transplantation. *Liver transpl* 2003;9:72-78.
103. Prieto M, Gomez MD, Berenguer M, Cordoba J, Rayon JM, Pastor M, Garcia-Herola A, et al. De novo hepatitis B after liver transplantation from hepatitis B core antibody-positive donors in an area with high prevalence of anti-HBc positivity in the donor population. *Liver Transpl* 2001;7:51-58.
104. Douglas DD, Rakela J, Wright TL, Krom RA, Wiesner RH. The clinical course of transplantation-associated de novo hepatitis B infection in the liver transplant recipient. *Liver Transpl Surg* 1997;3:105-111.
105. Wachs ME, Amend WJ, Ascher NL, Bretan PN, Emond JC, Lake JR, Meizer JS, et al. The risk of transmission of hepatitis B from HBsAg-, HBcAb+, HBIGM- organ donors. *Transplantation* 1995;59:230-234.
106. Testa G, Goldstein RM, Netto G, Abbasoglu O, Brooks BK, Levy MF, Husberg BS, et al. Long-term outcome of patients transplanted with livers from hepatitis C-positive donors. *Transplantation* 1998;65:925-929.

107. Powelson JA, Cosimi AB, Lewis WD, Rohrer RJ, Freeman RB, Vacanti JP, Jonas M, et al. Hepatic retransplantation in New England: a regional experience and survival model. *Transplantation* 1993;55:802-806.
108. Morel P, Rilo HL, Tzakis AG, Todo S, Gordon RD, Starzl TE. Liver retransplantation in adults: overall results and determinant factors affecting the outcome. *Transplant Proc* 1991;23:3029-3031.
109. Adani GL, Baccarani U, Risaliti A, Sainz-Barriga M, Lorenzin D, Costa G, Toniutto P, et al. A single-center experience of late retransplantation of the liver. *Transpl Proc* 2005;37:2599-2600.
110. Uemura T, Randall HB, Sanchez EQ, Ikegami T, Narasimhan G, McKenna GJ, Chinnakotla S, et al. Liver retransplantation for primary nonfunction: analysis of a 20-year single-center experience. *LiverTranspl* 2007;13:227-233.
111. Varotti G, Grazi GL, Vetrone G, Ercolani G, Cescon M, Del Gaudio M, Ravaioli M, et al. Causes of early acute graft failure after liver transplantation: analysis of a 17-year single-centre experience. *Clin Transpl* 2005;19:492-500.
112. Kamei H, Al-Basheer M, Shum J, Bloch M, Wall W, Quan D. Comparison of short- and long-term outcomes after early versus late liver retransplantation: a single-center experience. *Journal of Surgical Research* 2013;185:877-882.
113. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, et al. United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003;124:91-96.
114. Nair S, Verma S, Thuluvath PJ. Pretransplant renal function predicts survival in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 2002;35:1179-1185.
115. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12:523-534.
116. Benoist S, Panis Y, Alaves A, Valleur P. Impact of obesity on surgical outcomes after colorectal resection. *Am J Surg* 2000;179:275-281.
117. Nair S, Verma S, Thuluvath PJ. Obesity and its effect on survival in patients undergoing orthotopic liver transplantation in the United States. *Hepatology* 2002;35:105-109.
118. Braunfeld MY, Chan S, Pregler J, Pregler J, Neelakanta G, Sopher MJ, Busuttill RW, et al. Liver transplantation in the morbidly obese. *J Clin Anesth* 1996;8:585-590.
119. Sawyer RG, Pelletier SJ, Pruett TL. Increased early morbidity and mortality with acceptable long-term function in severely obese patients undergoing liver transplantation. *Clin Transplant* 1999;13:126-130.

120. LaMattina JC, Foley DP, Fernandez LA, Pirsch JD, Musat AI, D'Alessandro AM, Mezhich JD. Complications associated with liver transplantation in the obese recipient. *Clin Transplant* 2012;26:910-918.
121. Kemmer N, Safdar K, Kaiser TE, Zacharias V, Neff GW. Liver Transplantation Trends for Older Recipients: Regional and Ethnic Variations. *Transplantation* 2008;86:104-107.
122. Platz KP, Mueller AR, Schafer C, Jahns S, Guckelberger O, Neuhaus P. Influence of Warm Ischemia Time on Initial Graft Function in Human Liver Transplantation. *Transplant Proc* 1997;29:3458-3459.
123. Cisneros C, Guillen F, Gomez R, Gutierrez J, Vorwald P, Montero A, Moreno E. Analysis of warm ischemia time for prediction of primary nonfunction of the hepatic graft. *Transplant Proc* 1991;23:1976.
124. Howard TK, Klintmalm GB, Cofer JB, Husberg BS, Goldstein RM, Gonwa TA. The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient. *Transplantation* 1990;49:103-107.
125. Totsuka E, Fung JJ, Hakamada K, Ohashi M, Takahashi K, Nakai M, Morohashi S, et al. Synergistic Effect of Cold and Warm Ischemia Time on Postoperative Graft Function and Outcome in Human Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings* 2004;36:1955-1958.
126. Dalmau A, Sabate A, Koo M, Rafecas A, Figueras J, Jaurrieta E. Prophylactic use of tranexamic acid and incidence of arterial thrombosis in liver transplantation. *Anesth Analg* 2001;93:516.
127. Hendriks HG, Meijer K, de Wolf JT, Klompemaker IJ, Porte RJ, de Kam PJ, Hagenaars AJ, et al. Reduced transfusion requirements by recombinant factor VIIa in orthotopic liver transplantation: a pilot study. *Transplantation* 2001;71:402-405.
128. Porte RJ, Molenaar IQ, Begliomini B, Groenland TH, Januszkiewicz A, Lindgren L, Palareti G, et al. Aprotinin and transfusion requirements in orthotopic liver transplantation: a multicentre randomized double-blind study. EMSALT Study Group. *Lancet* 2000;355:1303-1309.
129. Cacciarelli TV, Keefe EB, Moore DH, Burns W, Busque S, Concepcion W, So SK, et al. Effect of intraoperative blood transfusion on patient outcome in hepatic transplantation. *Arch Surg* 1999;134:25-29.
130. Esmat Gamil M, Pirenne J, Van Malenstein H, Verhaegen M, Desschans B, Monbaliu D, Aerts R, et al. Risk Factors for Bleeding and Clinical Implications in Patients undergoing Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings* 2012;44:2857-2860.
131. de Boer MT, Christensen MC, Asmussen M, Van der Hilst CS, Hendriks HG, Sloof M, Porte RJ. The impact of intraoperative transfusion of platelets and red blood cells on survival after liver transplantation. *Anesth Analg* 2008;106:32-44.

132. Ramos E, Dalmau A, Sabate A, lama C, Llado L, Figueras J, Jaurrieta E. Intraoperative red blood cell transfusion in liver transplantation: influence on patient outcome, prediction of requirements, and measures to reduce them. *Liver Transpl* 2003;9:1320-1327.
133. 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;52:148-155.
134. Rana A, Petrowsky H, Hong JC, Agopian VG, Kaldas FM, Farmer D, Yersiz H, et al. Blood Transfusion Requirement During Liver Transplantation Is an Important Risk Factor for Mortality. *J Am Coll Surg* 2013;216:902-907.
135. Steib A, Freys G, Lehmann C, Meyer C, Mahoudeau G. Intraoperative blood losses and transfusion requirements during adult liver transplantation remain difficult to predict. *Can J Anaesthesia* 2001;48:1075-1079.
136. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999;29:1181-1189.
137. Goldsmith P, Fenton H, Morris-Stiff G, Ahmad N, Fisher J, Prasad KR. Metabonomics: a useful tool for the future surgeon. *J Surg Res* 2010;160:122-132.
138. Beger RD, Sun J, Schnackenberg LK. Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;243:154-166.
139. Hrydziusko O, Silva MA, Perera MT, Richards DA, Murphy N, Mirza D, Viant MR. Application of metabolomics to investigate the process of human orthotopic liver transplantation: a proof-of-principle study. *Omics* 2010;14:143-150.
140. Wu H, Xue R, Dong L, Liu T, Deng C, Zeng H, Shen X. Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2009;648:98-104.
141. Thompson JA, Markey SP. Quantitative metabolic profiling of urinary organic acids by gas chromatography-mass spectrometry: comparison of isolation methods. *Anal Chem* 1975;47:1313-1321.
142. Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM. Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:653-683.
143. Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, Goodacre R. Metabolomic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* 2007;8:1243-1266.
144. Robertson DG. Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicol Sci* 2005;85:809-822.
145. Wishart DS. Metabolomics: a complementary tool in renal transplantation. *Contrib Nephrol* 2008;160:76-87.

146. Wishart DS. Metabonomics: The principles and potential applications to transplantation. *Am J Transplant* 2005;5.
147. Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, Nicholson JK. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers* 2004;9:1-31.
148. Sinclair MC, Lemmi CA, Moore TC. Elevation in urinary excretion of histamine following renal allografting in rats. *J Surg Res* 1974;17:43-44.
149. Saude EJ, Lacy P, Musat-Marcu S, Mayes DC, Bagu J, Man SF, Sykes BD, et al. NMR analysis of neutrophil activation in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *Magn Reson Med* 2004;52:807-814.
150. Zhao Y, Katz NM, Lefrak EA, Foegh ML. Urinary thromboxane B2 in cardiac transplant patients as a screening method of rejection. *Prostaglandins* 1997;54:881-889.
151. Silva MA, Richards DA, Bramhall SR, Adams DH, Mirza DF, Murphy N. A study of the metabolites of ischemia-reperfusion injury and selected aminoacids in the liver using microdialysis during transplantation. *Transplantation* 2007;79:828-835.
152. Gibelin H, Eugene M, Hebrard W, Henry C, Carretier M, Hauet T. A new approach to the evaluation of liver graft function by nuclear magnetic resonance spectroscopy. A comparative study between Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1133-1136.
153. Martin-Sanz P, Olmedilla L, Dulin E, Casado M, Callejas NA, Perez-Peña J, Garutti I, et al. Presence of methylated arginine derivatives in orthotopic human liver transplantation: relevance for liver function. *Liver Transpl* 2003;9:40-48.
154. Singh HK, Yachha SK, Saxena R, Gupta A, Nagana Gowda GA, Bhandari M, Khetrpal CL. A new dimension of ¹H-NMR spectroscopy in assessment of liver graft dysfunction. *NMR Biomed* 2003;16:185-188.
155. Melendez HV, Ahmadi D, Parkes HG, Rela M, Murphy G, Heaton N. Proton nuclear magnetic resonance analysis of hepatic bile from donors and recipients in human liver transplantation. *Transplantation* 2001;72:855-860.
156. Vilca Melendez H, Rela M, Murphy G, Heaton N. Assessment of graft function before liver transplantation: Quest for the lost ark? *Transplantation* 2000;70:560-565.
157. Chen H, Peng CH, Shen BY, Deng XX, Shen C, Xie JJ, Dong W, et al. Multi-factor analysis of initial poor graft function after orthotopic liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007;6:141-146.
158. Angele MK, Rentsch M, Harlt WH, Wittmann B, Graeb C, Jauch KW, Loehe F. Effect of steatosis on liver function and organ survival after liver transplantation. *Am J Surg* 2008;214-220.

159. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60:646-649.
160. Buell JF, Alloway RR, Steve Woodle E. How can donors with a previous malignancy be evaluated? *J Hepatol* 2006;45:503-507.
161. Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 1998;15:246-258.
162. Starzl TE, Hakala TR, Shaw BW, Jr., Hardesty RL, Rosenthal TJ, Griffith BP, Iwatsuki S, et al. A flexible procedure for multiple cadaveric organ procurement. *Surg Gynecol Obstet* 1984;158:223-230.
163. Orbis F, Bonafé S, Artigues E. Técnica quirúrgica en el donante. El trasplante hepático. Ed. Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat 2001:67-85.
164. Juan M, López-Andújar R, Montalvá E. Técnica quirúrgica en el receptor. El trasplante hepático. Ed. Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat. 2001:119-130.
165. Garcia-Canaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A. A comprehensive untargeted metabolomic analysis of human steatotic liver tissue by RP and HILIC chromatography coupled to mass spectrometry reveals important metabolic alterations. *J Proteome Res* 2011;10:4825-4834.
166. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, Hau DD, et al. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D603-610.
167. Fahy E, Sud M, Cotter D, Subramaniam S. LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Res* 2007;35:W606-612.
168. R Core Team. R Foundation for Statistical Computing V, Austria. R: A language and environment for statistical computing. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/> 2012.
169. Xia J, Mandal R, Sinelnikov IV, Broadhurst D, Wishart DS. MetaboAnalyst 2.0--a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Res* 2012;40:W127-133.
170. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Oresic M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 2010;11:395.
171. Calcagno V, Mazancourt C. glmulti: An R Package for Easy Automated Model Selection with (Generalized) Linear Models. *Journal of Statistical Software* 2010;34:1.
172. Dejean S, Gonzalez I, Le Cao KA, Monget P, Coquery J, Yao FZ, Liquet B. mixOmics: Omics Data Integration Project. R package version 4.1-4. 2013.

173. Lee S, Epstein MP, Duncan R, Lin X. Sparse principal component analysis for identifying ancestry-informative markers in genome-wide association studies. *Genet Epidemiol* 2012;36:293-302.
174. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Liver Transplantation. June 20-23. *Hepatology* 1983;4 Suppl 1:107-110S.
175. Avolio AW, Agnes S, Nure E, Gasbarrini A, Siciliano M, Pompili M, Castagneto M. The Nonstandard Liver, a hidden Resource That Cannot Be Overlooked: Implications for the Identification of the Best Recipient. *Transplant Proc* 2006;38:1055-1058.
176. Feng S, Bragg-Gresham JL, Dykstra DM, Punch JD, Greenstein SM, Merion RM. Definitions and outcomes of transplants using expanded criteria donor livers. *Hepatology* 2004;38:S6.
177. SRTR—January 1 tD, 2002.
178. Croome K, Hernandez-Alejandro R, Chandok N. Early Allograft Dysfunction Is Associated With Excess Resource Utilization After Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings* 2013;45:259-264.
179. Salvalaggio P, Carballo Afonso RC, Felga G, Ferraz-Neto BH. A proposal to grade the severity of early allograft dysfunction after liver transplantation. *Einstein* 2013;11:23-31.
180. Merion RM, Goodrich NP, Feng S. How can we define expanded criteria for liver donors? *J Hepatol* 2006;45:484-488.
181. Schaubel D, Sima C, Goodrich N, Feng S, Merion R. The survival benefit of deceased donor liver transplantation as a function of candidate disease severity and donor quality. *Am J Transplant* 2008;8:419-425.
182. Heneghan MA, Sylvestre PB. Cholestatic diseases of liver transplantation. *Semin Gastrointest Dis* 2001;12:133-147.
183. Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W, Schumacher M. Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *Journal of the National Cancer Institute* 1994;86:829-835.
184. Maring JK, Klompmaker IJ, Zwaveling JH, Kranenburg K, Ten Vergert EM, Sloof MJ. Poor initial graft function after orthotopic liver transplantation: can it be predicted and does it affect outcome? An analysis of 125 adult primary transplantations. *Clin Transplant* 1997;11:373-379.
185. Ghobrial RM, Gornbein J, Steadman R, Danino N, Markmann JF, Holt C, Anselmo D, et al. Pretransplant model to predict posttransplant survival in liver transplant patients. *Ann Surg* 2002;236:315-322.
186. Wagener G, Raffel B, Young A, Minhaz M, Emond J. Predicting early allograft failure and mortality after liver transplantation: the role of the postoperative model for end-stage liver disease score. *Liver Transpl* 2013;19:534-542.

187. Halldorson JB, Bakthavatsalam R, Fix O, Reyes JD, Perkins JD. D-MELD, a simple predictor of post liver transplant mortality for optimization of donor/recipient matching. *Am J Transplant* 2009;9:318-326.
188. New York State Department of Health Workgroup. Workgroup on Expanded Criteria Organs for Liver Transplantation. New York State Department of Health Workgroup. *Liver Transplantation* 2005;11:1184-1192.
189. Saab S, Wang V, Ibrahim AB, Durazo F, Han S, Farmer DG, Yersiz H, et al. MELD score predicts 1-year patient survival post-orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 2003;9:473-476.
190. Busuttil RW, Farmer DG, Yersiz H, Hiatt JR, McDiarmid SV, Goldstein LI, Saab S, et al. Analysis of long term outcomes of 3200 liver transplantations over two decades: a single center experience. *Ann Surg* 2005;241:905-916.
191. Schrem H, Reichert B, Frühauf N, Becker T, Lehner F, Kleine M, Bektas H, et al. The Donor-Risk-Index, ECD-Score and D-MELD Score all fail to predict short-term outcome after liver transplantation with acceptable sensitivity and specificity. *Ann Transplant* 2012;17:5-13.
192. Czerwinski J, Perkowska A, Mroz A, Lagiewska B, Adadynski L, Durlik M, Glyda M, et al. Assessment of cadaveric livers discarded from transplantation. A correlation between clinical and histological parameters. *Ann Transplant* 2007;12:30-36.
193. Kazikoe S, Yanaga K, Starlz T, Demetris J. Evaluation of Protocol before Transplantation and after Reperfusion Biopsies from Human Orthotopic Liver Allografts: Considerations of Preservation and Early Immunological Injury. *Hepatology* 1990;11:932-941.
194. Todo S, Demetris AJ, Makowka L, Teperman L, Podesta L, Shaver T, Tzakis A, et al. Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration. *Transplantation* 1989;47:903-905.
195. Selzner M, Clavien PA. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin Liver Dis* 2001;21:105-113.
196. Adam R, Azoulay D, Astarcioglu I, Bao Y, Bonhomme L, Fredj L, Bismuth H. Reliability of the MEGX test in the selection of liver grafts. *Transplant Proc* 1991;23:2470-2471.
197. Reding R, Wallemacq P, de Ville de Goyet J, Lerut J, Hausleithner V, Feyaerts A, Lambotte L, et al. The unreliability of the lidocaine/monoethylglycinexylidide test for assessment of liver donors. *Transplantation* 1993;56:323-326.
198. Jalan R, Plevris JN, Jalan AR, Finlayson DC, Hayes PC. A pilot study of indocyanine green clearance as an early predictor of graft function. *Transplantation* 1994;58:196-200.

199. Plevris JN, Jalan R, Bzeizi KI, Dollinger MM, Lee A, Garden OJ, Hayes PC. Indocyanine green clearance reflects reperfusion injury following liver transplantation and is an early predictor of graft function. *J Hepatol* 1999;30:142-148.
200. Olmedilla L, Perez-Pena JM, Ripoll C, Garutti I, de Diego R, Salcedo M, Jimenez C, et al. Early Noninvasive Measurement of the Indocyanine Green Plasma Disappearance Rate Accurately Predicts Early Graft Dysfunction and Mortality After Deceased Donor Liver Transplantation. *Liver transpl* 2009;15:1247-1253.
201. Vilca Melendez H, Rela M, Murphy G, Heaton N. Liver transplantation and bile analysis: a parallel evolution. *Transplantation* 1998;65:1289-1293.
202. Baumgartner U, Scholmerich J, Kremer B, Streckfuss G, Henne-Bruns D, Mergard BL, Kraemer-Hansen H, et al. Early detection of graft dysfunction after orthotopic liver transplantation in man by serum and biliary bile acid analysis. *Hepatogastroenterology* 1995;42:950-960.
203. Lanir A, Jenkins RL, Caldwell C, Lee RG, Khettry U, Clouse ME. Hepatic transplantation survival: correlation with adenine nucleotide level in donor liver. *Hepatology* 1988;8:471-475.
204. Hickman R, Rose-Innes C, Tyler M, Bracher M, Lotz Z, Fourie J. Energy charge as an indication of liver viability. A comparison of changes in livers that remained intact with those subjected to autografting. *Transplantation* 1992;53:540-545.
205. Davidson BR, Barnard ML, Changani KK, Taylor-Robinson SD. Liver transplantation: current and potential applications of magnetic resonance spectroscopy. *Liver transpl Surg* 1997;3:481-493.
206. Bowers J, Teramoto K, Khettry U, Clouse ME, Clouse M. 31P NMR assessment of orthotopic rat liver transplant viability. The effect of warm ischemia. *Transplantation* 1992;54:604-609.
207. Hamamoto I, Takaya S, Todo S, Fujita S, Van Gulik TM, Nakamura K, Irish WD, et al. Can adenine nucleotides predict primary nonfunction of the human liver homograft? *Transplant Proc* 1993;25:3036-3037.
208. Wolf RF, Haagsma EB, Kamman RL, Mooyaart EL, Sluiter WJ, Sloof MJ. Noninvasive metabolic assessment of human donor livers: prognostic value of 31P-magnetic resonance spectroscopy for early graft function. *Transplantation* 1997;64:147-152.
209. Karayalçın K, Harrison JD, Attard A, Gunson BK, Jones S, Mayer D, Buckels JA, et al. Can effluent hyaluronic acid or creatine kinase predict sinusoidal injury severity after cold ischemia? *Transplantation* 1993;56:1336-1339.

210. Cheema SP, Webster NR, Dunn F, Bellamy MC. Mediators of fibrinolysis in orthotopic liver transplantation. *Clin Transplant* 1996;10:24-27.
211. Goto T, Asano T, Morita T, Sakamoto K, Kenmochi T, Makagohri T, Ochiai T, et al. Experimental studies of hepatic clearance rates of amino acids as an initial function test of the liver graft. *Transplant Proc* 1989;21:2305-2307.
212. Cortes M, Pareja E, Castell JV, Moya A, Mir J, Lahoz A. Exploring mass spectrometry suitability to examine human liver graft metabolomic profiles. *Transplant Proc* 2010;42:2953-2958.
213. Tanaka N, Matsubara T, Krausz KW, Patterson AD, Gonzalez FJ. Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2012;56:118-129.
214. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, Contos MJ, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2009;50:1827-1838.
215. Arora AS, Jones BJ, Patel TC, Bronk SF, Gores GJ. Ceramide induces hepatocyte cell death through disruption of mitochondrial function in the rat. *Hepatology* 1997;25:958-963.
216. Kakisaka K, Cazanave SC, Fingas CD, Guicciardi ME, Bronk SF, Werneburg NW, Mott JL, et al. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;302:G77-84.
217. Han MS, Park SY, Shinzawa K, Kim S, Chung KW, Lee JH, Kwon CH, et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. *J Lipid Res* 2008;49:84-97.
218. Navarro-Sabate A, Peralta C, Calvo M, Manzano A, Massip-Salcedo M, Rosello-Catafau J, Bartrons R. Mediators of rat ischemic hepatic preconditioning after cold preservation identified by microarray analysis. *Liver Transpl* 2006;12:1615-1625.
219. Raza A, Dikdan G, Desai KK, Shareef A, Fernandes H, Aris V, de la Torre AN, et al. Global gene expression profiles of ischemic preconditioning in deceased donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2010;16:588-599.
220. Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, Dent P. Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res* 2009;50:1509-1520.
221. Vilca Melendez H, Rela M, Setchell KD, Murphy GM, Heaton ND. Bile acids analysis: a tool to assess graft function in human liver transplantation. *Transpl Int* 2004;17:286-292.
222. Hedaya MS, El Moghazy WM, Yasutomo Y, Kiyoshi T, Kaido T, Egawa H, Uemoto S, et al. Is biliary bile acid a good predictor for acute cellular rejection in living donor liver transplantation? *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009;8:474-478.

223. Fouassier L, Beaussier M, Schiffer E, Rey C, Barbu V, Mergey M, Wendum D, et al. Hypoxia-induced changes in the expression of rat hepatobiliary transporter genes. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2007;293:G25-35.
224. Defamie V, Cursio R, Le Brigand K, Moreilhon C, Saint-Paul MC, Laurens M, Crenesse D, et al. Gene expression profiling of human liver transplants identifies an early transcriptional signature associated with initial poor graft function. *Am J Transplant* 2008;8:1221-1236.
225. Motoki A, Adachi N, Liu K, Takahashi HK, Nishibori M, Yorozuya T, Arai T, et al. Suppression of ischaemia-induced cytokine release by dimaprit and amelioration of liver injury in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:394-398.
226. Francis H, Meng F, Gaudio E, Alpini G. Histamine regulation of biliary proliferation. *J Hepatol* 2012;56:1204-1206.

8. Artículos Derivados de la Tesis

Los artículos relacionados con la tesis aceptados en revistas internacionales son los siguientes:

1. **Cortes M**, Pareja E, Castell JV, Moya A, Mir J, Lahoz A. Exploring mass spectrometry suitability to examine human liver graft metabonomic profiles. *Transplantation Proceedings* 2010; 42, 2953–2958

ABSTRACT

Introduction: Transplant surgeons still have to rely on morphological aspects of the organ, clinical and/or histological data to decide whether to use the graft. Metabonomics measures the “downstream” products of proteins and genes, these metabolic profiles are particularly good reporters of tissue physiology. Sample preparation and data acquisition are generally considered limiting steps in metabonome analysis because they are an important source of variability. State-of-the-art mass spectrometric technology and multivariate statistical data analysis have been used to explore the suitability of a metabonomic platform as a liver tissue metabolite profiling tool.

Methods: Liquid chromatography coupled to mass spectrometry was used to analyze twenty tissue liver samples from discarded (n=10) and transplanted grafts (n=10). Principal component analysis (PCA) and projection to latent structures – discriminant analysis (PLS-DA) were used for data interpretation.

Results: Standard operating protocols for sample processing (tissue homogenization) and data acquisition have been developed. The quantification of quality compounds present in the test mix show a coefficients of variation (CV) lower than 15%. The PCA scores plot reveals that the sample triplicate cluster was quite close and no outlier was observed. Furthermore, the supervised PLS-DA analysis shows a clear group separation (transplanted vs. discarded) along the first component. Finally, potential group discrimination biomarkers were selected (see the PLS-DA loadings plot).

Discussion: The multivariate data analysis (PCA and PLS-DA) indicate that in-house developed protocols for sample processing and mass spectrometry data acquisition are sensitive (around 1245 features) and reproducible (sample triplicate clusters, test mix quantification) enough to perform liver tissue metabolite profiling. In addition, a reduced set of metabolites has been selected as putative graft functionality biomarkers, although further research is needed to assess unambiguous biomarker identification. The findings reported herein encourage ongoing research into the development of a metabonomic model to assess liver graft quality/functionality prior to transplantation.

2. Cortes M, Pareja E, García-Cañaveras JC, Donato T, Montero S, Mir J, Castell JV, Lahoz A. Metabolomics discloses donor liver biomarkers associated with early allograft dysfunction. *Journal of Hepatology*. In press.

ABSTRACT

Background & Aims. Early allograft dysfunction (EAD) dramatically influences graft and patient outcome after orthotopic liver transplantation and its incidence is strongly determined by donor liver quality. Nevertheless, objective biomarkers, which can assess graft quality and anticipate organ function, are still lacking. This study aims to investigate whether there is a preoperative donor liver metabolomic biosignature associated with EAD.

Methods. A comprehensive metabolomic profiling of 124 donor liver biopsies collected before transplantation was performed by mass spectrometry coupled to liquid chromatography. Donor liver grafts were classified into two groups: showing EAD and immediate graft function (IGF). Multivariate data analysis was used to search for the relationship between the metabolomic profiles present in donor livers before transplantation and their function in recipients.

Results. A set of liver graft dysfunction-associated biomarkers was identified. Key changes include significantly increased levels of bile acids, lysophospholipids, phospholipids, sphingomyelins and histidine metabolism products, all suggestive of disrupted lipid homeostasis and altered histidine pathway. Based on these biomarkers, a predictive EAD model was built and further evaluated by assessing 24 independent donor livers, yielding 91% sensitivity and 82% specificity. The model was also successfully challenged by evaluating donor livers showing primary non-function (n=4).

Conclusions. A metabolomic biosignature that accurately differentiates donor livers, which later showed EAD or IGF, has been deciphered. The remarkable

8. Artículos Derivados de la Tesis

metabolomic differences among between donor livers before transplant can relate to their different quality. The proposed metabolomic approach may become a clinical tool for donor liver quality assessment and for anticipating graft function before transplant.

3. Pareja E, **Cortes M**, Hervas D, Mir J, Castell JV, Lahoz A. A score model for the continuous grading of early allograft dysfunction severity.

ABSTRACT

Early allograft dysfunction (EAD) is an independent risk factor for graft and patient survival. Lack of consensus in EAD diagnosis hinders comparisons of liver transplant outcomes and recipients managements. We aimed to develop a model for the continuous assessment of early allograft function (MEAF) after transplantation.

A single-center retrospective study with 1,026 consecutive liver transplants was performed. Multivariate data analysis was used to pick adequate postoperative variables for modelling EAD. The empirical cumulative distribution function assigned a score value to each selected clinical variable. The patient survival and factors associated with EAD were studied by Cox regression and multivariable regression modelling, respectively.

A model, based on easily obtainable clinical parameters (i.e., ALT, INR and bilirubin), which scores liver function from 0 to 10 was built. The MEAF score showed a significant association with patient survival for the 3, 6 and 12-month follow-up. ICU and hospital stays, hepatic steatosis and age for donors; cold and warm ischemia times and post-reperfusion syndrome for surgery; MELD score, Child-Pugh, BMI and fresh frozen plasma transfusion for recipients were factors significantly associated with EAD.

Conclusion: A continuous EAD severity score has been developed for the first time. The MEAF is a predictor of recipient and graft survival and provides more accurate assessment than the current categorical classifications, which may help clinicians to make decisions, early enough, concerning the benefit of retransplantation. The standardisation of the criteria used to define EAD may allow the reliable comparison of recipients' treatments, postoperative outcomes and results among and within Centers.

9. Índice de Tablas y Figuras

ÍNDICE TABLAS:

Tabla 1. Resumen de las diferentes definiciones de disfunción del injerto

Tabla 2. Factores de riesgo de disfunción del injerto tras el TH

Tabla 3. Hospitales de la Comunidad de Valencia de los que proceden los donantes

Tabla 4. Variables relacionadas con los donantes del estudio metabonómico

Tabla 5. Parámetros analíticos recogidos en los donantes y receptores del estudio metabonómico

Tabla 6. Variables relacionadas con los receptores del estudio metabonómico.

Tabla 7. Variables relacionadas con la cirugía en el análisis metabonómico

Tabla 8. Gradiente de elución utilizado en el análisis de fase reversa en el modo ESI positivo

Tabla 9. Gradiente de elución utilizado en el análisis de fase reversa en el modo ESI negativo

Tabla 10. Gradiente de elución utilizado en el análisis HILIC

Tabla 11. Caracterización de las variables relacionadas con el donante

Tabla 12. Caracterización de las variables relacionadas con el receptor

Tabla 13. Caracterización de las variables relacionadas con la cirugía

Tabla 14. Caracterización de las variables relacionadas con la evolución postoperatoria

Tabla 15. Parámetros clínicos del receptor utilizados para la selección inicial de las variables

Tabla 16. Donantes excluidos para trasplante hepático

Tabla 17. Receptores excluidos del estudio

Tabla 18. Información relacionada con el donante utilizada para la creación del modelo

Tabla 19. Información relacionada con el donante utilizada para la validación externa

- Tabla 20.** Información relacionada con el receptor para la creación del modelo
- Tabla 21.** Información relacionada con el receptor para la validación externa.
- Tabla 22.** Información relacionada con la cirugía para la creación del modelo.
- Tabla 23.** Información relacionada con la cirugía para la validación externa
- Tabla 24.** Información relacionada con el donante de los pacientes que presentaron PNF
- Tabla 25.** Información relacionada con los receptores que presentaron PNF.
- Tabla 26.** Información relacionada con la cirugía de los pacientes que presentaron PNF
- Tabla 27.** Biofirma metabólica discriminante
- Tabla 28.** Pacientes excluidos para el diseño del score y casusas de exclusión
- Tabla 29.** Resumen de la información de los donantes incluidos en la creación del score
- Tabla 30.** Resumen de la información relacionada con los receptores incluidos en la realización del score
- Tabla 31.** Resumen de la información relacionada con los 839 TH llevados a cabo en 829 receptores con los receptores incluidos en la realización del score.
- Tabla 32.** Importancia estimada de los parámetros relacionados con el donante mediante el promedio modelado
- Tabla 33.** Importancia estimada de los parámetros relacionados con la cirugía mediante el promedio modelado
- Tabla 34.** Importancia estimada de los parámetros del receptor mediante el promedio modelado
- Tabla 35.** Características del donante con riesgo de fallo del injerto

ÍNDICE FIGURAS:

Figura 1. Evolución de la lista de espera del trasplante hepático

Figura 2. Número total y tasa anual (p.m.p.) de donantes de órganos. España 1993-2012

Figura 3. Causas de muerte de los donantes de hígado

Figura 4. Edad media de los donantes de hígado

Figura 5. Flujo de trabajo en un estudio metabonómico

Figura 6. Datos relacionados con el donante

Figura 7. Datos relacionados con la cirugía y complicaciones tras el TH

Figura 8. Datos relacionados con el receptor antes y después del TH.

Figura 9. Datos analíticos del receptor

Figura 10. Biopsia hepática

Figura 11. Criovial donde se guarda la muestra de tejido hepático

Figura 12. Flujo de trabajo propuesto para el análisis del tejido hepático

Figura 13. Flujo de trabajo propuesto para el análisis de los datos

Figura 14. Los valores obtenidos para el tiempo de retención (RT, expresado en minutos) para los diferentes compuestos incluidos en el poolmix QC

Figura 15. Los valores obtenidos para el pico área (expresados en unidades arbitrarias) para los diferentes compuestos incluidos en el poolmix QC

Figura 16. Los valores obtenidos para el error de masas (expresado in ppm) para los diferentes compuestos incluidos en el poolmix QC

Figura 17. Los valores obtenidos para el tiempo de retención (panel superior), área pico (panel del medio) y el error de masas (panel inferior) para los dos estandares internos (leucina enkephalina y rifampicina) añadidos a las muestras problema

Figura. 18. Score plots de PCA, uno para cada condición analítica

Figura 19. Análisis multivariante del perfil metabonómico de los donantes. (A) Los gráficos de score del PCA muestran una tendencia a la separación entre los

pacientes que muestran disfunción inicial del injerto (EAD, rojo) y buena función inicial (IGF, verde). (B) El gráfico de score del PLSDA muestra una separación completa entre los grupos (EAD, IGF). (C) Validación del modelo de PLSDA mediante el test de permutación de clases

Figura 20. Distribución de las clases de metabolitos en la bioasignatura metabólica

Figura 21. Visualización de la bioasignatura metabólica en las rutas bioquímicas. (A) Tabla resumen del análisis de enriquecimiento de los metabolitos donde las rutas metabólicas se ordenan según su impacto. (B) La homeostasis alterada de los fosfolípidos deriva en la ruptura de la membrana y provoca efecto tóxico desencadenado por la acumulación de LPC. (C) El metabolismo alterado de los lípidos provoca la alteración de la biosíntesis de los ácidos biliares y su acumulación deriva en efectos tóxicos y en la activación del receptor FXR.(D) La alteración en el metabolismo de la histidina como respuesta al daño hepático

Figura 22. Realización del modelo PLSDA (A) El score plot de PLSDA muestra como se separan los pacientes que muestran disfunción inicial del injerto (EAD, rojo) y buena función inicial (IGF, verde). (B) La predicción de clase mediante PLSDA en la validación externa (n=23), los pacientes **que aparecen** en la parte sombreada, las áreas del gráfico señaladas están correctamente clasificadas (C) Predicción de clase mediante el modelo PLSDA para la evaluación del fallo primario (PNF) (n=4)

Figura 23. Círculo de correlación del análisis de componentes principales (sPCA)

Figura 24. Análisis de correlación entre las variables clínicas del receptor seleccionadas por el PCA

Figura 25. Evolución del valor de ALT en dos pacientes

Figura 26. (A) Representación de los valores del pico de ALT versus ALTAUC durante la primera semana tras el TH, mostrando una alta colinearidad entre las

variables. (B) Representación de los valores del pico de ALT versus ALTAUC/ALTpeak, mostrando que el ratio es una variable independiente respecto al pico de ALT.

Figura 27. Modelado de las variables clínicas seleccionadasEl score se calculó utilizando cada función de regresión, para ALTpico (A), INRpico (B) y Bb7DPO (C) el rango del score se estableció entre 0 y 3, mientras que para ALTpico/AUCALT (D) se estableció entre 0 y 1.

Figura 28. Ecuación del MEAF score

Figura 29. Comparación entre el MEAF score y la clasificación de EAD de *Olthoff et al.*

Figura 30. Estimación de la supervivencia a los 3 meses en función del MEAF score

Figura 31. Relación entre el MEAF score y días en la UCI

Figura 32. Relación entre el MEAF score y días de hospitalización

Figura 33. Gráfica de valores predichos del MEAF score frente valores reales

