



Tesis Doctoral

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTIOXIDANTE N-ACETILCISTEÍNA EN LOS PACIENTES TRASPLANTADOS DE HÍGADO

Concepción Gómez i Gavara
Médico especialista en
Cirugía General y Aparato
Digestivo

2018
Universidad de Valencia



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Programa de Doctorado:

— CIRUGÍA Y SUS ESPECIALIDADES
Departamento de Cirugía
Facultad de Medicina y Odontología

Universidad de Valencia

2018

Tesis Doctoral

Esta tesis ha sido realizada en la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplantes del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia y en la Unidad Analítica Mixta del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

DEPARTAMENT DE CIRURGIA

Concepción Gomez i Gavara



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA



Instituto de
Investigación
Sanitaria



ALBERT CHENEVIER - JOFFRE-DUPUYTREN
EMILE ROUX - GEORGES CLEMENCEAU

D. RAFAEL LÓPEZ ANDÚJAR

D. ÁNGEL MOYA HERRAIZ

D. AGUSTÍN LAHOZ RODRÍGUEZ

CERTIFICAMOS:

Que la Licenciada en Medicina y Cirugía Dña. CONCEPCIÓN GÓMEZ I GAVARA, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado:

“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA ADMINISTRACIÓN DEL
ANTIOXIDANTE N-ACETILCISTEÍNA EN LOS
PACIENTES TRASPLANTADOS DE HÍGADO”

Por lo que, AUTORIZAMOS:

Su lectura y defensa ante el Tribunal correspondiente. Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Valencia el 1 de mayo del año 2017.



Fdo. Dr.
Rafael López Andújar
Rodríguez



Fdo. Dr.
Ángel Moya Herraiz



Fdo. Dr.
Agustín Lahoz

A Dani, l'amor de la meua vida.

Als meus pares, a Pilar i a Esteban, que són els meus referents.

A Frangi, Maria Elena, Tatiana i Rafa, amics incondicionals.

A Matti, per fer-me votar murs dels que no veia el cim.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis el haberme facilitado la realización, corrección y tutorización de esta tesis.

Doy las gracias a todos los miembros de la Unidad Hepatobiliopancreática y Trasplantes del Hospital La Fe, por colaborar durante estos cuatro años con su actividad diaria, a que pueda llevarse a cabo este estudio.

Reconozco que ha sido fundamental la colaboración de todas/os los/las enfermeros/as de la Unidad, por recopilar cada paso y cada muestra en todos los trasplantes.

A coordinación, gracias, por anotar y aleatorizar cada donante de manera responsable.

Los residentes, que me han ayudado en el transporte y rellenado de las bombonas de nitrógeno y han sido un apoyo incondicional de este duro camino, os lo agradezco de corazón.

A David Hervás, por los buenos ratos que he pasado aprendiendo estadística y enseñándole a tener paciencia.

A M. Daniel Azoulay y Chetana Lim, por enseñarme a ser y escribir cada día de manera más crítica.

A Chady Salloum por enseñarme a trasplantar, corregir esta tesis y darme fuerzas para conseguir mis sueños.

A mi padre, muchísimas gracias, por ayudarme a transportar de la nueva a la vieja Fe tantas y tantas muestras en el coche a 20 kilómetros por hora.

Winners never quit; quitters never win

Napoleon Hill

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	11
ÍNDICE	17
ÍNDICE DE FIGURAS	23
ÍNDICE DE TABLAS	27
ABREVIATURAS	29
INTRODUCCIÓN	33
1 Problemática actual en el trasplante hepático	35
2 El daño por isquemia/reperfusión hepático	43
2.1 Fisiopatología del daño por isquemia/reperfusión	43
2.2 Implicación de las especies reactivas de oxígeno en el daño isquemia-reperfusión	47
2.3 Consecuencias clínicas del daño de la isquemia / reperfusión.	49
3 Disfunción del injerto	54
3.1 Disfunción primaria del injerto (DPI)	54
4 Preservación del injerto: hipotermia y soluciones de preservación	75
4.1 La hipotermia	75
4.2 Soluciones de preservación: principios	77
4.3 Tipos de soluciones de preservación hepática	80
5 Antecedentes de N-acetilcisteína	87
6 Metabómica: Definición y Aplicaciones	106
6.1 Fases de un estudio metabólico y sus plataformas de análisis	107
6.2 Aplicación de la metabómica en hepatología	113

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	119
1 Hipótesis.	121
2 Objetivos	123
2.1 Objetivo principal.	123
2.2 Objetivos secundarios.	123
MATERIAL Y MÉTODOS	125
1 Diseño del estudio	127
2 Criterios de inclusión y exclusión	130
2.1 Criterios de inclusión del hígado donante	130
2.2 Criterios de inclusión de los receptores para trasplante hepático	130
2.3 Criterios de exclusión del hígado donante	131
3 Criterios de exclusión de los receptores para trasplante hepático	132
4 Criterios previstos para la retirada de los sujetos del estudio	133
5 Criterios para detener el protocolo	134
6 Aleatorización	135
7 Descripción de los tratamientos del ensayo	136
7.1 Rama experimental (Grupo NAC SI)	136
7.2 Rama control (Grupo NAC NO)	138
8 Enmascaramiento	140
9 Ficha técnica de n-acetilcisteína	141
9.1 Composición cualitativa y cuantitativa	141
9.2 Forma farmacéutica	141
9.3 Autorización de la comercialización	141
10 Adquisición, acondicionamiento y etiquetado de la medicación	142
11 Almacenamiento y dispensación de la medicación	143
12 Características de la población de estudio	144
13 Técnica quirúrgica en el trasplante hepático ortotópico	147

13.1	Protocolo de actuación en el donante	147
13.2	Protocolo de la cirugía de banco del injerto	152
13.3	Protocolo de actuación en el paciente receptor	152
14	Cronograma de seguimiento tras el trasplante hepático	
	154	
15	Protocolo de tratamiento postoperatorio en el receptor	
	155	
15.1	Pauta de inmunosupresión	155
15.2	Profilaxis antibiótica	158
15.3	Profilaxis tromboembólica	158
15.4	Profilaxis citomegalovirus	159
15.5	Profilaxis antifúngica	160
15.6	Aspergilosis	161
15.7	Profilaxis infección VHB	161
15.8	Protocolo de cuidados postoperatorios	162
16	Base de datos para la recogida de las variables relacionadas con los donantes, receptores y cirugía para la realización del estudio	163
17	Definición de las variables empleadas en el estudio	164
17.1	Variables relacionadas con el donante	164
17.2	Variables quirúrgicas consideradas en el estudio	170
17.3	Variables relativas al receptor	174
18	Toma de muestras de tejido hepático para estudio anatomopatológico	185
19	Recogida de muestras de tejido hepático para el análisis metabólico	189
20	Análisis metabólico dirigido de las muestras	190
20.1	Productos químicos	190
20.2	Preparación de las soluciones estándar	190
20.3	Preparación de las muestras para el análisis	191
20.4	Análisis UPLC-MS/MS	194
20.5	Optimización de la determinación de MDA y GSH	196
20.6	Validación del método UPLC-MS/MS	197
21	Estudio estadístico	203
21.1	Estadística descriptiva	203
21.2	Estadística comparativa	203
21.3	Análisis de supervivencia del paciente y del injerto	204
21.4	Análisis subgrupos	204

RESULTADOS	205
1 Características demográficas de la serie	207
1.1 Análisis de distribución de los pacientes en función del sexo	207
1.2 Análisis de distribución de los pacientes en función de la edad	207
1.3 Análisis de distribución de los pacientes en función del grupo sanguíneo	208
1.4 Análisis de distribución de los pacientes en función del índice de masa corporal	208
1.5 Análisis de distribución de los pacientes en función del MELD	209
1.6 Análisis de distribución de los pacientes en función de la etiología que los llevó al trasplante	209
1.7 Distribución de los pacientes en función de la serología viral	210
1.8 Distribución de carcinoma hepatocelular	210
1.9 Análisis de distribución de los pacientes en función del estadio Child-Pugh	210
1.10 Análisis de distribución de las morbilidades derivadas de la enfermedad hepática	211
1.11 Análisis de la distribución de los pacientes en función de las comorbilidades asociadas	211
2 Análisis de variables del donante	215
2.1 Sexo del donante	215
2.2 Edad del donante	215
2.3 Índice de masa corporal del donante	215
2.4 Causa de la muerte del donante	216
2.5 Estancia en Unidad de cuidados intensivos del donante	216
2.6 Presencia de comorbilidades en el donante	217
2.7 Utilización de drogas vasoactivas en el donante	217
2.8 Esteatosis hepática en el donante	217
2.9 Variantes vasculares en el donante	218
3 Análisis de variables del receptor	220
3.1 Distribución de los pacientes en función del sexo en los grupos de estudio	220
3.2 Edad del receptor en los grupos de estudio	220
3.3 Índice de masa corporal del receptor en los grupos de estudio	220
3.4 Distribución MELD en los grupos de estudio	220

3.5	Distribución de la serología viral en los grupos de estudio	221
3.6	Distribución de carcinoma hepatocelular en los grupos de estudio	221
3.7	Análisis de la distribución de las comorbilidades en los grupos de estudio	222
4	Análisis de variables del acto quirúrgico del trasplante	223
4.1	Tiempo de cirugía	224
4.2	Tiempo de isquemia fría	224
4.3	Tiempo de isquemia caliente	224
4.4	Tiempo de demora arterial	225
4.5	Tiempo de isquemia total	225
4.6	Recuperación por medio de salvacélulas	225
4.7	Concentrados de hematíes transfundidos	226
4.8	Unidades de plasma transfundidas	226
4.9	Concentrados de plaquetas transfundidas	227
4.10	Síndrome postreperusión	227
4.11	Presencia de trombosis portal	227
4.12	Tipo de anastomosis biliar	227
4.13	Resultados del análisis bioquímico postoperatorio de las pacientes	228
4.14	Morbi-mortalidad postoperatorias	236
4.15	Retrasplante	240
4.16	Reintervención	240
4.17	Estancia en Unidad de cuidados intensivos	240
4.18	Días de estancia hospitalaria	241
4.19	Complicaciones tardías	241
5	Análisis subgrupos	243
5.1	Análisis de la disfunción primaria del injerto	243
5.2	Evaluación de DPI en donantes en función de la edad del donante	244
5.3	Evaluación de la DPI en donantes con esteatosis hepática	245
5.4	Análisis de donantes de riesgo	246
6	Asociación de parámetros bioquímicos con tiempos de isquemia	248
7	Resultados del análisis anatómico-patológico de las muestras	251
8	Análisis de supervivencia del injerto	259
9	Análisis de supervivencia del paciente	261
10	Resultados del análisis metabonómico de las muestras	263

DISCUSIÓN	271
1 Aumentar el número de donantes	273
2 Mejorando el <i>pool</i> de donantes: administración de NAC	278
3 Resultados de la n-acetilcisteína en el daño hepático	281
4 De la isquemia reperusión al fallo primario del injerto	287
5 Incidencia de disfunción primaria del injerto del estudio 290	
6 Impacto de la n-acetilcisteína sobre morbilidad global	294
7 N-acetilcisteína en la supervivencia del injerto	298
8 Cambios histológicos de la adición de NAC	302
9 NAC en las soluciones de preservación	304
10 Aplicación de la metabonómica en el daño por isquemia- reperusión hepático	307
CONCLUSIONES	311
1 Conclusiones	313
ANEXOS	315
BIBLIOGRAFÍA	319

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Actividad de trasplantes hepáticos en el mundo	39
Figura 2. Evolución por fecha de trasplante de la edad del donante 1984-2014	41
Figura 3. Evolución por fecha de trasplante de la causa de muerte del donante 1984-2014	42
Figura 4. Fisiopatología del daño por isquemia/reperfusión	46
Figura 5. Fórmula y forma molecular de la NAC	88
Figura 6. Biopsias hepáticas en criovial	137
Figura 7. Diagrama CONSORT para ensayos clínicos	146
Figura 8. Extracción hepática con las muestras en cuña de tejido hepático en lóbulo hepático izquierdo	151
Figura 9. Criovial donde se conservan las muestras de tejido hepático	189
Figura 10. Tubos Precellys kit CK14	193
Figura 11. Biomarcadores del OS detectados en muestras de tejido hepático de donantes sanos y donantes NASH.	201
Figura 12. Distribución de los pacientes del estudio en función del grupo sanguíneo	208
Figura 13. Etiología del trasplante en los pacientes de la serie	209
Figura 14. Valores de GOT en U/L en el 1º día postoperatorio de los pacientes en los grupos analizados	229
Figura 15. Valores de GPT en U/L en el 1º día postoperatorio de los pacientes en los grupos analizados.	230
Figura 16. Diagrama de cajas. Niveles de bilirrubina en mg/dl el 7º día postrasplante de los pacientes de los grupos analizados.	231

Figura 17. Niveles de INR en el 7º día postoperatorio en los pacientes de los grupos analizados	232
Figura 18. Evolución de la bilirrubina en mg/dl durante la primera semana postoperatoria de los pacientes en los grupos analizados	233
Figura 19. Evolución de los niveles de GOT en UI/L durante la primera semana postoperatoria de los pacientes de los grupos analizados	234
Figura 20. Evolución de los niveles de GPT en UI/L durante la primera semana postoperatoria de los pacientes de los grupos analizados.	235
Figura 21. Evolución de los niveles de INR en UI/L durante la primera semana postoperatoria de los pacientes de los grupos analizados.	236
Figura 22. Complicaciones postoperatorias por grupos de tratamiento mediante la clasificación Dindo-Clavien.	239
Figura 23. Evaluación de la DPI en pacientes donantes con esteatosis hepática	245
Figura 24. Análisis de los pacientes por grupos de tratamiento en función de donantes de riesgo	246
Figura 25. Relación del tiempo de isquemia fría-valores de GPT de la primera semana postrasplante	249
Figura 26. Relación del tiempo de isquemia fría-valores de GPT de la primera semana postrasplante	249
Figura 27. Relación GPT media 2º día postoperatorio - TIF por grupos de tratamiento.	250
Figura 28. Presencia de dilatación sinusoidal en las biopsias pre-reperusión en los grupos analizados	252
Figura 29. Presencia de dilatación sinusoidal en las biopsias post-reperusión en los grupos analizados	253

Figura 30. Grado de macroesteatosis en las biopsias pre-reperusión en los grupos analizados	254
Figura 31. Grado de macroesteatosis en las biopsias post-reperusión en los grupos analizados	254
Figura 32. Evaluación de los cambios en el grado de microesteatosis en los grupos analizados	255
Figura 33. Grado de balonización en las biopsias pre-reperusión en los grupos analizados	256
Figura 34. Grado de balonización en las biopsias pre-reperusión en los grupos analizados	257
Figura 35. Evaluación de los cambios en el grupo de binucleación en los grupos analizados	258
Figura 36. Supervivencia del injerto en los grupos analizados	259
Figura 37. Supervivencia del injerto en relación con la disfunción postoperatoria	260
Figura 38. Supervivencia del paciente en los grupos analizados	261
Figura 39. Supervivencia del paciente en relación con la disfunción postrasplante	262
Figura 40. Diagrama de cajas. Niveles de GSH en pmol/mg en la primera biopsia para los pacientes de los grupos analizados.	264
Figura 41. Diagrama de cajas. Niveles de GSH en pmol/mg en la segunda biopsia para los pacientes de los grupos analizados.	265
Figura 42. Diagrama de cajas. Niveles de GSH en pmol/mg en la segunda biopsia para los pacientes de los grupos analizados.	266
Figura 43. Ratio GSH/GSSG en el grupo de tratamiento	267
Figura 44. Ratio GSH/GSSG en el grupo control	267

- Figura 45.** Comparación de las medias del ratio GSH/GSSG de los pacientes incluidos en el estudio metabólico 268
- Figura 46.** Niveles de ácido oftálmico en la tercera biopsia en pmol/mg en los pacientes de los grupos analizados 269
- Figura 47.** Número de pacientes en lista de espera al final de cada año en España (1993-2008). 274
- Figura 48. Diagrama de cajas de los marcadores del estrés oxidativo de tejido hepático de pacientes NASH y pacientes control. 308

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados del estudio del V.K. Rustgi et al. (95).....	62
Tabla 2. Componentes de las soluciones de preservación UW e IGL-1	85
Tabla 3. Componentes de las diferentes soluciones de preservación.	86
Tabla 4. Diseño y resumen de los estudios experimentales que evalúan NAC en el daño de IR (n=21).....	91
Tabla 5. Diseño y resumen de los estudios experimentales que evalúan NAC en modelos de hígado aislado y perfundido (n=7)	96
Tabla 6. Diseño y resumen de los estudios experimentales que evalúan NAC en transplante hepático (n=4)	98
Tabla 7. Diseño y resumen de los estudios clínicos que evalúan NAC en TH(n=11)	101
Tabla 8. Hospitales de la Comunidad Valencia acreditados para donación.....	129
Tabla 9. Administración de tratamiento	138
Tabla 10. Donantes excluidos durante el período de estudio	144
Tabla 11. Receptores excluidos del estudio.....	145
Tabla 12. Variables relacionadas con los donantes.....	164
Tabla 13. Parámetros analíticos recogidos en los donantes y receptores del estudio	169
Tabla 14. Variables quirúrgicas consideradas en el estudio	170
Tabla 15. Variables relativas al receptor antes y después del TH..	175
Tabla 16. Variables postoperatorias determinadas en el estudio..	178

Tabla 17. Preparación de las muestras antes del análisis UPLC-MS/MS.....	194
Tabla 18. MRM de los parámetros seleccionados para los 16 biomarcadores del OS y 2 ISs	196
Tabla 19. Resultados obtenidos tras evaluar la exactitud del método UPLC-MS/MS	199
Tabla 20. Variables relacionadas con el receptor por grupos de tratamiento.	213
Tabla 21. Comparación de las variables relativas al donante en los grupos de estudio.	219
Tabla 22. Variables relacionadas con la cirugía.....	223
Tabla 23. Tipos complicaciones postoperatorias por grupos de tratamiento	238
Tabla 24. Distribución de complicaciones tardías de los pacientes de los grupos analizados.....	242
Tabla 25. Análisis de DPI por grupos de tratamiento	243
Tabla 26. Tabla de distribución de la disfunción primaria del injerto por grupos de edad del donante en los pacientes de los grupos analizados.	244
Tabla 27. Tabla de estudio clínicos tras la administración de NAC en el trasplante epático con repercusión bioquímica en el receptor.....	285

ABREVIATURAS

8-OHdG = 8-hidroxideoxiguanosina

UCI = unidad de cuidados intensivos

ACV = accidente cerebrovascular

AFP = alfa-fetoproteína

AMPc = adenosín monofosfato cíclico

ARNm = ácido ribonucleico mensajero

ATP = adenosin trifosfato

AZA = azatioprina/Imurel

BSO = L-butionina-S, R-Sulfoxamina

CCL4 = carbón tetracloruro

CsA = ciclosporina/Sandimmun neoral

DE = desviación típica

DM = diabetes mellitus

DPO = día postoperatorio

DPI = disfunción primaria del injerto

ECOHEP = ecografía hepática

ESI = ionización por electro spray

FA = fosfatasa alcalina

FPI = función primaria del mismo

GGT = gamma glutamil transpeptidasa

GOT = transaminase glutámico oxalacética

GPT = transaminasa glutámico-pirúvica

GSH = glutatión reducido

GSSG = glutatión oxidado

GSTs alfa = enzima glutations transferasa alfa

H = horas

HOCl = ácido hipocloroso

HBP = hepatobiliopancreaticos

HTA = hipertensión arterial

HTK = histidina-triptófano-cetoglutarato

IM = intramuscular

iNOS = óxido nítrico sintasa inducible

IV = intravenoso

IR = isquemia/reperfusión

LE = lista de espera

MELD = sistema de puntuación para medir la severidad de la enfermedad hepática crónica

MDA = malondialdehído

Min = minutos

MMF = micofenolato/Cellcept

MMP = metaloproteinasa de la matriz

MS = espectrometría de masas

NF-kB = factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras

kappa de las células B activadas

OH = alcohol

ONT = Organización Nacional de Trasplantes

Opht A = ácido oftálmico

OS = estrés oxidativo

PCA = análisis de los componentes principales

PDN = Esteroides/Metilprednisolona iv o Prednisona oral

PGE = prostaglandina E

PLS-DA = análisis discriminante de regresión de mínimos cuadros

P.O. = postoperatorio

RME = error de medición relativa

RMN = resonancia magnética nuclear

RCT = randomized clinical trial

RNS = especies reactivas de nitrógeno

ROS = especies reactivas de oxígeno

S = segundos

SC = subcutáneo

SH = grupo tiol nucleofílico libre

STOCSY = métodos estadísticos de correlación

TCE = traumatismo craneoencefálico

TAC = tacrolimus liberación normal/retard Prograf o Advagraf

TH = trasplante hepático

THO = trasplante hepático ortotópico

TIF = tiempo de isquemia fría

TIC = tiempo de isquemia caliente

TLR 2-4 = toll-like receptor 2-4

TNE = tumor neuroendocrino

TNFalfa = factor de necrosis tumoral

UCH = unidad de concentrados de hematíes

UCI = unidad de cuidados intensivos

UPLC-MS/MS = método de ultra-rendimiento de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem

UW = Universidad de Wisconsin

VHB = virus de la hepatitis B

VHC = virus de la hepatitis C

VIH = virus de la inmunodeficiencia humana

VM = vena mesentérica

INTRODUCCIÓN

1 Problemática actual en el trasplante hepático

El trasplante hepático (TH) es el tratamiento de elección de las enfermedades terminales del hígado (1). El 23 de diciembre de 1954, en el Hospital Peter Brigham de Boston (Estados Unidos) se realizó el primer trasplante de órganos en humanos con éxito por los doctores J. Murray y D. Thomas. R. Herrick donó uno de sus riñones a su hermano gemelo univitelino Richard, permitiéndole vivir 8 años más (2).

Este triunfo de J. Murray estuvo precedido de un extenso trabajo experimental que tuvo continuidad no sólo en el estudio de la técnica quirúrgica, sino también en la investigación del sistema inmune que envuelve al trasplante, consiguiendo así importantes progresos, motivo por lo cual fue laureado en el año 1990 con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina (3).

A pesar de que no fue hasta el año 1954 cuando el trasplante de órganos se hizo realidad, el desarrollo científico que lo hizo posible se inició medio siglo antes. El requisito técnico fundamental para el desarrollo del trasplante de órganos fue el perfeccionamiento de las técnicas de sutura de los vasos sanguíneos.

En 1902 A. Carrel publicaba su primer artículo sobre anastomosis vasculares. Los métodos que el cirujano francés,

natural de Sainte-Foy-lés-Lyon, desarrolló siguen estando vigentes en nuestros días (4). El interés sobre las anastomosis vasculares pudo haberse despertado en A. Carrel a raíz del asesinato del presidente S. Carnot en su visita a Lyon. Siendo asesinado por un anarquista italiano, los cirujanos que lo atendieron fueron incapaces de suturar la vena porta que había sido lesionada. A. Carrel inició sus experimentos en la Facultad de Medicina de la Universidad de Lyon. Trasplantó la glándula tiroides en un perro, realizando una anastomosis termino-lateral a la arteria carótida y a la vena yugular, restableciendo la circulación. Posteriormente realizó un trasplante renal en un perro. En esta ocasión la anastomosis fue término-terminal entre arteria renal-carotidea y entre la vena renal-yugular, abocando el uréter a la piel y consiguiendo, a las pocas horas, observar la secreción de orina a través de la piel.

Sin embargo, previo al experimento de A. Carrel, se atribuye a E. Ullmann en el año 1902, el primer trasplante de riñón experimental en la ciudad de Viena (5).

En 1904 A. Carrel abandonó Francia y se estableció en Montreal donde desarrolló múltiples estudios, anastomosis arterio-venosas, distintos tipos y técnicas de suturas, haciendo hincapié en la esterilidad en todo momento (6) y junto con C. Guthrie trasplantaría el corazón de un perro a otro (7). A. Carrel desarrolló así mismo procesos fundamentales para el futuro del trasplante, tal como el “parche de Carrel” para vasos

pequeños (8), el cual seguimos utilizando en la actualidad. Finalmente fue galardonado con el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en 1912 (9).

Sin embargo, no fue hasta una década más tarde cuando se realizó el primer TH en humanos, el día 1 de marzo del año 1964, en Denver (Estados Unidos), por T. Starzl (10). Había iniciado seis años antes un intenso trabajo de investigación utilizando el modelo canino de TH (11). En su metodología analizaba tanto la técnica quirúrgica como parámetros bioquímicos y anatómo-patológicos con la finalidad de intentar comprender mejor el problema del rechazo del injerto (12).

En Europa, el primer TH se realizó por R. Calne en Cambridge, en 1968 (13). Anteriormente también había realizado múltiples trasplantes renales experimentales en el modelo canino con resultados poco satisfactorios debido a la alta toxicidad del procedimiento. Basándose en las publicaciones de Schwartz y Dameshek en los cuales se demostraba que la 6-mercaptopurina suprimía la formación de anticuerpos, comenzó a investigar los distintos fármacos inmunosupresores disponibles en aquel momento (14). Tras importantes avances en el tratamiento inmunosupresor, R. Calne recibió una beca en Harvard en el Hospital Peter Bent Brigham con F. Moore y J. Murray. Es allí donde comenzaron a probar la Azatioprina. Observaron que tenía mejor índice terapéutico que la 6-mercaptopurina y fueron ellos quienes realizaron la primera

serie de trasplantes renales de la historia utilizando este tipo de inmunosupresor (15).

Sin embargo, la primera época de los trasplantes viene marcada por unos resultados desesperanzadores en todo el mundo, con tasas de supervivencia al año que no superaban el 30% (15).

T. Starzl y R. Calne trabajaron intensamente en la búsqueda de soluciones para las complicaciones quirúrgicas, la preservación del órgano y la inmunosupresión, problemas que habían contribuido considerablemente en los fracasos previos. En el año 1967, T. Starzl reabre el programa de TH en Denver. En esta ocasión, las supervivencias de los pacientes con el nuevo régimen de inmunosupresión (prednisona/azatioprina) superaron el año (16). En Cambridge, R. Calne abre el primer programa de trasplante en Europa, justo un año después (13). A él le siguen la apertura de 3 programas de trasplante europeos a principios de los 70.

En España, el primer TH se lleva a cabo en 1984, en Barcelona, en el Hospital de Bellvitge, por C. Margarit y E. Jaurrieta (17). En 1991 se realizó en el Hospital La Fe el primer trasplante de hígado de la Comunidad Valenciana bajo la dirección del Dr. J. Mir Pallardó (18).

Gracias a la perseverancia de personas como T. Starzl y R. Calne, actualmente el total de trasplantes de órganos sólidos

efectuados en todo el mundo se eleva a 112.631 en el último año. De ellos, 76.118 fueron de riñón, 23.721 de hígado, 5.741 de corazón, 4.278 de pulmón, 2.564 de páncreas y 209 de intestino. (Datos obtenidos del Registro Mundial de Trasplantes, que gestiona la ONT desde hace 7 años en colaboración con la OMS) (19)(Figura 1).

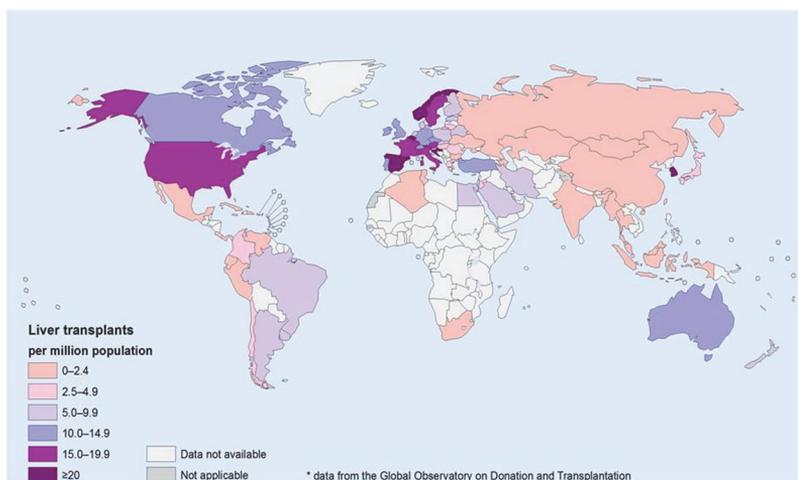


Figura 1. Actividad de trasplantes hepáticos en el mundo

En 2015 se registraron un total de 1.851, lo que supone un aumento del 10% respecto al año anterior, con 4.769 intervenciones. De todos ellos, 2905 fueron de riñón, **1162 de hígado**, 299 de corazón, 294 de pulmón, 97 de páncreas y 12 de intestino, según datos del registro que gestiona la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) (19).

Nuestros problemas actuales nada tienen que ver con los problemas iniciales del TH.

A día de hoy, las complicaciones técnicas se han reducido considerablemente:

i) Las complicaciones biliares se estiman entre 5-32% (20), siendo tratables la mayoría de ellas por procedimientos radiológicos intervencionistas o endoscopia retrógrada.

ii) Las complicaciones vasculares (principalmente condicionada por la existencia de trombosis arterial) tienen una incidencia inferior al 5% (21).

iii) Las tasas de rechazo no superan el 25% (22) y además responden de manera satisfactoria en la mayoría de los casos al tratamiento corticoideo.

Desde el establecimiento de La nueva Ley de Seguridad Vial en el año 2005, los donantes fallecidos tras sufrir un accidente de tráfico en el año 2015 se sitúan en un 4,2%, este tipo de donantes por accidentes de tráfico se ha reducido en un 70%.

En España, al igual que en la mayoría de países, el principal problema actual es la disparidad entre el número de donantes y receptores, con un número creciente de candidatos en lista de espera (LE) pero con una tasa de donantes estabilizada 35,12 por millón de habitantes, la posibilidad de ser trasplantado que no supera el 50% (23).

Este hecho ha motivado que se consideren donantes potenciales aquellos que previamente eran considerados no candidatos. Los donantes marginales, desestimados años atrás para la donación, actualmente son aceptados en los nuevos protocolos de expansión de criterios, a pesar de sus peores resultados (24).

Según la ONT en el año 2013 (19) más de la mitad de nuestros donantes eran mayores de 60 años.

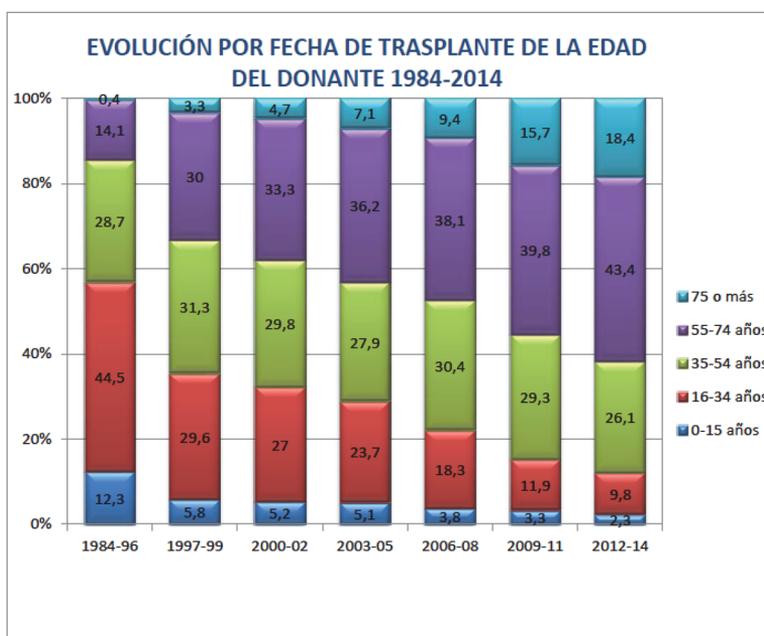


Figura 2. Evolución por fecha de trasplante de la edad del donante 1984-2014

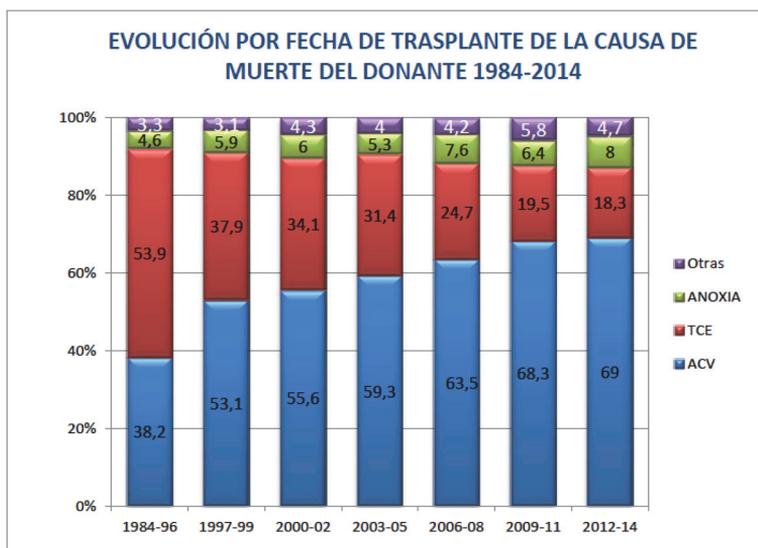


Figura 3. Evolución por fecha de trasplante de la causa de muerte del donante 1984-2014

2 El daño por isquemia/reperfusión hepático

2.1 Fisiopatología del daño por isquemia/reperfusión

Comprender los mecanismos que envuelven el daño de la isquemia/reperfusión (IR) es fundamental para poder diseñar estrategias terapéuticas que ayuden a mejorar los resultados del trasplante (Figura 4).

La lesión por IR es una causa importante de daño hepático que ocurre durante los distintos momentos del acto quirúrgico. Representa la principal causa de disfunción del injerto tras el trasplante. Durante la IR se producen una serie de procesos bioquímicos y celulares que son complejos y que siguen sin comprenderse completamente en la actualidad.

La IR consiste en un fenómeno bifásico mediante el cual se produce daño celular debido a la hipoxia, que se acentúa con la restauración del suministro de oxígeno. Los eventos que contribuyen al daño hepatocelular son diversos e implican la interacción entre los hepatocitos, células endoteliales y células *Kupffer*, así como la infiltración por neutrófilos, macrófagos y plaquetas (25–27).

La hipoxia y el déficit energético que se genera tras iniciarse la isquemia del injerto hace que el metabolismo celular se transforme de aerobio a anaerobio. El metabolismo anaeróbico junto con un aumento del ácido láctico local hace que se

produzca acidosis metabólica que condiciona alteraciones del gradiente transmembrana celular el cual impide el mantenimiento de la homeostasis de la célula incrementándose el calcio y el sodio citosólicos (28,29).

Los iones de sodio entran en la célula arrastrando con ellos el agua suficiente para mantener la homeostasis con el espacio intersticial y al mismo tiempo se produce la salida de potasio al mismo. Estos cambios se acompañan de la activación de la fosfolipasa mitocondrial, de la pérdida de fosforilación oxidativa y de la posterior disminución de producción de adenosin trifosfato (ATP).

El aumento del calcio intracelular activa proteasas citosólicas que catalizan la conversión de xantina deshidrogenosa a xantina oxidasa. Ésta es una enzima que genera precursores de especies reactivas de oxígeno (ROS)(30,31).

El principal mecanismo que interviene en la detoxificación es la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), el cual es catalizado por la enzima glutatión peroxidasa (32,33).

Por otra parte, el GSH tiene también la función de aumentar la capacidad de las células de regenerar ATP, a través del mantenimiento de la integridad de la membrana celular y de actuar como buffer de grupos sulfhidrilo. La depleción de GSH, acaba produciendo la muerte celular (daño de la membrana y

de las mitocondrias). La acumulación de células apoptóticas, genera entre otros efectos, la llegada de leucocitos y de plaquetas, que se concretiza con la vasoconstricción y finalmente en isquemia (32,34).

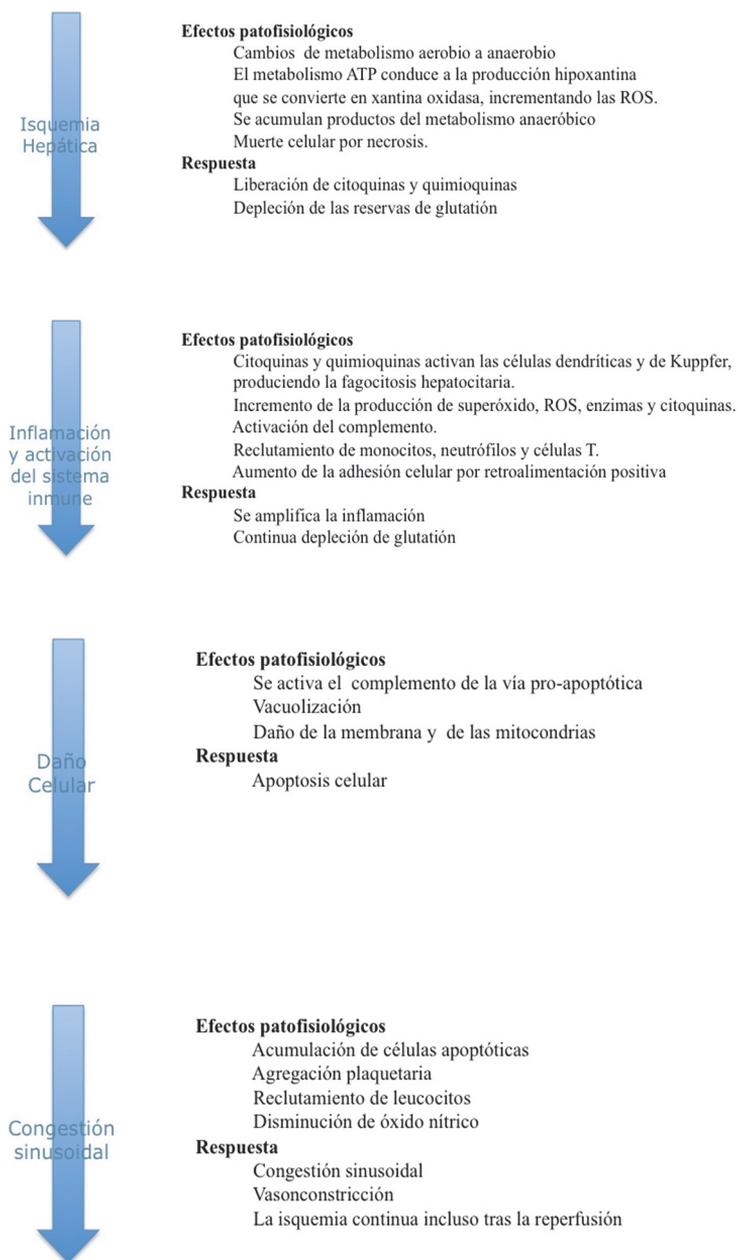


Figura 4. Fisiopatología del daño por isquemia/reperfusión

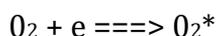
2.2 Implicación de las especies reactivas de oxígeno en el daño isquemia-reperfusión

El estrés oxidativo (OS), con la consecuente producción de ROS, tiene su origen en el daño IR (27,35,36). Durante la IR se produce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) / especies reactivas de nitrógeno (RNS), que conducen a la lesión celular a través de la citotoxicidad y la inflamación (37,38).

El OS (39) se provoca por la formación de gran cantidad de ROS o moléculas que contienen radicales libres, las cuales se hacen presentes durante la isquemia fría y la manipulación del injerto comprometiendo la viabilidad de los hepatocitos.

Los radicales libres son sustancias químicas que poseen un electrón desapareado y también podrían definirse como fragmentos de una molécula. Pueden ser neutros o tener carga eléctrica positiva o negativa. Los más importantes son los derivados del oxígeno (39):

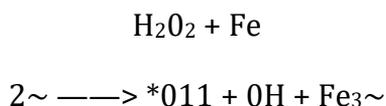
El radical superóxido es un radical libre, de carácter aniónico, que se forma debido a la reducción del oxígeno por la transferencia de un electrón:



No es el más lesivo. Su función principal es la de ser precursor del peróxido de hidrógeno así como ser reductor de iones metálicos (reducción de ion cúprico a cuproso, o de férrico a ferroso).

En situaciones de acidosis se transforma en el radical perhidroxilo (HO_2^*), el cual es más reactivo, pero su concentración relativa en condiciones fisiológicas es menor del 1%.

El radical hidroxilo, es el más peligroso, sin embargo tiene una vida media muy corta y un radio de acción limitado alrededor de su lugar de producción:



Por último señalar al peróxido de hidrógeno, agente oxidante, aunque no especialmente reactivo, cuya mayor importancia reside en ser la fuente de radicales hidroxilo en presencia de iones de metales de transición (hierro, cobre). En ausencia de estos metales tanto el superóxido como el peróxido de hidrógeno se eliminan rápidamente y sin provocar daño.

La mayoría de las moléculas biológicas pueden ser atacadas por los ROS, pero los lípidos son significativamente más susceptibles. Las membranas celulares poseen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados y su oxidación (peroxidación lipídica) es muy lesiva. La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados genera un radical alquilo que por la acción del oxígeno se transforma en un radical peroxilo capaz de oxidar nuevos ácidos grasos, dando lugar a otros precursores de ROS.

La detección directa de ROS, o de sus consecuencias adversas en los sistemas biológicos, ha sido motivo de especial preocupación durante muchos años (40,41).

En un estado fisiológico normal, los radicales libres junto con otras especies químicas altamente reactivas están presentes a menudo en concentraciones muy bajas y son de corta duración, hechos que dificultan su detección directa. Una alternativa para la detección directa de dichas especies consiste en la medición de las lesiones provocadas por su presencia. Esto se puede lograr mediante la determinación de biomarcadores del OS que pueden ser aislados tanto *in vitro* como en los sistemas biológicos *in vivo*.

Estos productos moleculares, formados a partir de reacciones no enzimáticas entre moléculas biológicas y ROS se consideran en general más estables que los propios ROS (42).

2.3 Consecuencias clínicas del daño de la isquemia / reperfusión.

La propia lesión isquémica es un proceso de trastornos metabólicos celulares resultado del consumo de glucógeno, falta de oxígeno y depleción de ATP, mientras que la reperfusión tiene una primera fase inicial de lesiones (2 horas (h) después de la reperfusión) y una segunda fase, más tardía

(6-48 después de la reperfusión) que agravan las lesiones de la isquemia inicial (43,44).

Los hepatocitos y las células sinusoidales son las que más se afectan por el daño producido por IR, sin embargo muestran sensibilidades diferentes en función del tiempo de isquemia al que se ven sometidas (45,46). Aunque todos los tipos de isquemia comparten mecanismos comunes, la isquemia fría se caracteriza por lesionar las células del endotelio sinusoidal y de interrumpir la microcirculación, mientras que la isquemia caliente lesiona los hepatocitos mediante moléculas citotóxicas derivadas de las células *Kupffer* (44).

2.3.1 Fase inicial de isquemia / reperfusión

La lesión inicial de la IR hepática durante el trasplante afecta principalmente al plexo arterial peribiliar. Tras la afectación de las células endoteliales se desencadenan una cascada de eventos que conducen a la trombosis microvascular, trastornos en la microcirculación y, de nuevo, a la isquemia con la consiguiente formación de estenosis biliar postrasplante que puede conducir de manera progresiva al fallo del injerto (47-50).

Las células *Kupffer* están situadas dentro de la luz del sinusoides y por tanto se encuentran en contacto directo con la superficie

endotelial. Cuando se produce la IR las células *Kupffer* afectadas por la depleción de oxígeno, liberan ROS, citoquinas proinflamatorias, factor de necrosis tumoral y oxidantes a la circulación sistémica, a las células endoteliales y a los hepatocitos cercanos, produciendo daño celular que, en su mayor grado, conduce a la muerte de la célula (51).

Por otra parte el GSH que se encuentra también presente en la bilis y puede evitar lesiones del colangiocito al contrarrestar los efectos de las ROS dentro del tracto biliar (50). El GSH desempeña igualmente un papel importante en la modulación del flujo biliar. La disminución en la excreción biliar de GSH disminuye la resistencia de los colangiocitos al OS e inducen a la apoptosis celular (52–54).

2.3.2 Fase tardía de la isquemia / reperfusión

En la fase tardía de la IR, los mediadores inflamatorios derivados tanto de las propias células hepáticas como de la circulación sistémica promueven la invasión de polimorfonucleares (PMN) en el intersticio, contribuyendo a la lesión de la vía biliar (55).

Se ha observado una clara relación entre los hallazgos de la biopsia postreperfusión (el grado de PMN y necrosis hepatocelular) y las complicaciones biliares tras el TH (48). Los hepatocitos producen bilis, que se filtra a través de los conductos biliares intrahepáticos. Durante este viaje, los

colangiocitos modifican la bilis a través de los procesos de secreción y absorción que proporcionan el agua y la alcalinidad adicional a la bilis (56,57). El OS genera un daño estructural en los canalículos biliares que altera el transporte de los ácido biliares durante la isquemia. La consiguiente pérdida de la vellosidades y la atonía canalicular conducen a la disminución del flujo de bilis con la posterior colestasis (58,59).

La colestasis intrahepática después de un trasplante de hígado es común y generalmente subclínica. Sin embargo, cuando es grave, la colestasis puede estar asociada con daño hepático irreversible y necesidad de retrasplante. Una de las principales causas de colestasis intrahepática después del trasplante es la lesión por isquemia fría y caliente que produce el deterioro de la estructura de los canalículos biliares. La mayoría de clasificaciones de disfunción o mal función del injerto incluyen la colestasis en su definición.

La IR causa aproximadamente un 10% de fallo primario del injerto (FPI) y además incrementa la incidencia de rechazo inmunitario agudo o crónico posterior debido a la lesión celular e igualmente de la matriz extracelular (56,60).

La IR representa así mismo la principal causa de disfunción del injerto postrasplante, independientemente de las características basales del hígado, siendo aún más relevante cuando se utilizan donantes con criterios expandidos (61).

3 Disfunción del injerto

3.1 Disfunción primaria del injerto (DPI)

Se define disfunción como la alteración cualitativa o cuantitativa de una función orgánica (62).

Se entiende por mala función del injerto hepático a la síntesis hepática deteriorada de forma temporal o bien irreversible. El injerto hepático puede presentar, durante la primera semana postrasplante, una producción escasa de factores de coagulación asociada a citolisis (aumento de transaminasas).

A pesar de ser un tema de controversia, la mayoría de autores coinciden en definir DPI como la detección durante la primera semana de un aumento de transaminasas (GPT > 2000-2500 UI/L y GOT > 1500-3000 UI/L).

Ahondando en este concepto, L. Makowka (60) en 1987 describe a los pacientes con DPI, como aquellos pacientes en los que se detecta GPT > 2500 IU/L o GPT > 3500 UI/L durante el período precoz del TH, mientras que E. Mor (63) se basa en el pico de transaminasas (GOT > 2000 UI/L) teniendo en cuenta tan sólo el primer día postoperatorio (DPO).

P.D. Greig (64) añade al concepto de DPI, la pobre producción biliar y las alteraciones de la coagulación.

R.J. Ploeg (65) considera que sufren DPI aquellos injertos que

presentan cifras de GOT superiores a 2000 UI/L, tiempo de protrombina mayor a 14 segundos (s) y niveles de amonio en sangre superiores a 50 nmol/L durante la primera semana.

Finalmente, S.M. Strasberg (66) en 1994 sintetiza los estudios anteriores y redefine DPI como un aumento de GOT >1500 UI/L y tiempo de protrombina superior a 20 s durante la primera semana postoperatoria.

Posteriormente, F.X. González (67) en 1994 modifica este concepto y define la DPI por la presencia de un pico de GOT > de 2500 UI/L, un tiempo TP < 60 % o una producción de bilis inferior a 40 ml/día durante las primeras 72 H postrasplante.

M. Deschênes (68) en 1998 considera la DPI cuando se evidencia la presencia de una de las siguientes variables en los días 2º al 7º del DPO: BT mayor a 10 mg/dl, TP superior a 17 s y/o encefalopatía hepática.

En el siglo XXI han seguido publicándose nuevas definiciones para la DPI. A. Nanashima (69) en 2002 considera la existencia de un pico de GOT/GPT > 1500 UI/L durante los tres primeros días postrasplante como definición de disfunción.

H. Pokorny (70) en 2005 describe DPI la necesidad de transfusión de plasma superior a 2 días o GPT > 2500 UI/L durante los 5 primeros días postrasplante.

La definición de K. Olthoff (71) en el año 2010, es la primera

definición de DPI que se realiza en la era MELD. Establece DPI si existen GOT/GPT > 2000 UI/L en cualquier día de la primera semana postrasplante y/o BT > 10 mg/dl y/o INR > 1.6, siendo las dos últimas variables evaluadas el día siete postrasplante. Obtiene unas tasas de DPI del 23% en su grupo.

El Score MEAF para la DPI publicado por E. Pareja (72) en 2015, basado en GPT, INR y BT, parece que presenta ventajas frente al resto de definiciones previas debido a su carácter continuo permitiendo una valoración específica para cada paciente, evitando así errores diagnósticos de las anteriores clasificaciones que categorizan la función en grupos.

Es importante diferenciar la DPI del FPI. La diferencia reside en la duración de este mal funcionamiento después del trasplante y de la necesidad de retrasplante urgente.

El FPI se definió inicialmente por R.J. Ploeg et al. (65) como la pobre función del injerto que requiere retrasplante urgente o que produce la muerte dentro de los 7 primeros días después del trasplante sin causa identificable.

Posteriormente T. Uemura et al. (73) redefinió de manera más precisa el FPI. Se produce por la citolisis hepática y el rápido aumento de las transaminasas, la ausencia de producción de bilis, el déficit grave de coagulación, la hipoglucemia, los altos niveles de lactato y la inestabilidad hemodinámica hepática. Sin

embargo, Olthoff consideró la FPI como el subtipo más grave de DPI (71).

Finalmente, la *United Network for Organ Sharing* (UNOS) (74) establece FPI como la no función del injerto que requiere el reemplazo del hígado de manera urgente durante los primeros 10 días después del trasplante. Se caracteriza por una GOT \geq 5000 UI / L, INR \geq 3,0, y la acidosis (pH \leq 7.3 y / o la concentración de lactato \geq 2 \times normal).

3.1.1 Factores relacionados con disfunción primaria del injerto relativos al donante

Existen factores de riesgo conocidos en el donante que condicionan el fallo o retraso de la función del injerto: pacientes mayores de 50 años, género femenino, hipernatremia, hospitalización prolongada, más de 8h de isquemia fría, utilización de vasopresores, esteatosis hepática y el uso de donantes a corazón parado (75). A pesar de los conocidos factores de riesgo, hasta en un 30% de los casos de disfunción, no encontramos ningún factor de riesgo (75).

iv) Edad del donante

Históricamente, la edad se ha considerado como una contraindicación relativa para el donante de órganos. El uso de donantes añosos para el trasplante de hígado sigue siendo

controvertido debido al temor a obtener peores resultados. De acuerdo con los resultados de la UNOS, la proporción de donantes de mayor edad ha ido aumentando con los años (76).

En el Registro Español de TH existen 18.568 pacientes trasplantados. En este registro se observa que la mediana de edad del donante y el receptor ha aumentado: de 25 años y 47 años respectivamente en el período 1984-1994 y a 59 años y 55 años en el período 2010-2012 (77).

En general, en los donantes mayores, el volumen hepático se reduce entre un 20-40%. La reducción de volumen puede llegar a ser más marcada en las mujeres que en los varones (78). Este hecho viene condicionado por el descenso del flujo hepático en el anciano entre un 35-50% (79,80). Los hepatocitos ancianos contienen compartimentos corporales más densos, como son los lisosomas secundarios y la lipofuscina, que los hepatocitos de sujetos más jóvenes (80). Este acúmulo de lipofuscina se ha relacionado con el OS crónico y la incapacidad de degradar proteínas dañadas y desnaturalizadas. Además la evidencia acumulada sugiere que la lipofuscina interfiere en la viabilidad celular debido a su capacidad para atrapar cationes de metal y facilitar la formación de ROS (81,82).

El envejecimiento celular se ha asociado también con la activación aberrante de oncogenes debido al deterioro de la vigilancia inmune, lo cual se ha relacionado con el desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC) en pacientes ancianos (83).

Aunque existen diferencias interindividuales las funciones hepáticas se preservan relativamente bien en los individuos ancianos. La bilirrubina total y la producción de enzimas hepáticas se mantiene estable (84), aunque se ha observado que existe un descenso de los niveles GPT tanto en hombres como en mujeres (85).

Sin embargo, la experiencia de la utilización de los hígados donantes ancianos, ha demostrado que si éstos no presentan ningún otro factor de riesgo adicional pueden proporcionar un resultado equivalente en cuanto respecta a la supervivencia del paciente y del injerto. Aunque estos casos presentan inicialmente una mayor incidencia de disfunción (86), debido a que tienen mayor tendencia a presentar mayor esteatosis siendo más susceptibles a la isquemia fría prolongada (75).

Adicionalmente, puede aparecer un incremento del riesgo de recurrencia de virus hepatitis C (VHC) más agresivo en el injerto.

En el estudio publicado por M. Berenguer et al., realizado en la población de receptores de TH del Hospital La Fe, se identificó que el único factor contribuyente para reducir la supervivencia del paciente y del injerto en receptores VHC positivos después del trasplante fue la edad del donante superior a 60 años (87).

En un estudio publicado en D. Ghinolfi et al. (88) se analizaron un total de 842 donantes entre los años 2001 y 2011. De los

cuales, 233 (27,7%) eran donantes entre 70-79 años y 85 (10,1%) fueron mayores de 80 años. En sus resultados no se observaron diferencias entre los grupos en pérdida del injerto (≤ 30 días), ni en la supervivencia del mismo a 1 y 5 años. La supervivencia del injerto al año y 5 años fue de: 90,5% y 78,6% para los injertos < 60 años; 88,6% y 81,3% para los injertos de 60-69 años; 87,6% y 75,1% para los injertos de 70-79 años y el 84,7% y el 77,1% para los injertos ≥ 80 años ($p = 0,065$). Sin embargo, en el grupo ≥ 80 años, la supervivencia del injerto a los 5 años fue menor para el grupo VHC-positivo frente a los receptores-VHC negativo de manera significativa (62,4% vs. 85,6%, $p = 0,034$).

Este escenario está cambiando muy rápidamente en la actualidad. Con los nuevos tratamientos combinados de *sofosbuvir* y *ribavirina*, la recurrencia del VHC postrasplante no será un problema tal y como lo fue en los años anteriores. El tratamiento con este nuevo fármaco consigue una respuesta virológica sostenida 12 semanas (sem) después del tratamiento en más del 70% de los pacientes (89).

De acuerdo con la literatura publicada la utilización de donantes añosos, evitando utilizar aquellos que tengan factores de riesgo añadidos, puede realizarse en la práctica clínica habitual. La isquemia fría conviene que sea lo más breve posible en ellos y así mismo es importante seleccionar

receptores que puedan soportar un retraso en la función inicial del injerto, lo cual suele ser frecuente en este tipo de donantes.

v) Género y raza

La diferencia de género y raza entre donantes y receptores juega un papel importante en el campo del trasplante.

En general, la falta de coincidencia no es ventajosa para el trasplante (90–93). Esto se ha evidenciado en muchas investigaciones biológicas sobre la inmunogenicidad de antígeno HY (94).

En un análisis de la UNOS (95) sobre los trasplantes hepáticos realizados entre los años 1992 al 2000 ($n = 32.514$), se constató que los pacientes no coincidentes en el género ($n = 13.992$) tuvieron mayor probabilidad de fracaso del injerto en comparación con los emparejados ($p = 0,013$). Se obtuvieron los peores resultados cuando el receptor masculino recibe un donante de género femenino ($p = 0,0003$). Este mismo estudio analizó la incidencia de fracaso del injerto entre la compatibilidad de raza entre donante y receptor encontrando un aumento del riesgo de fracaso del injerto ($p = 0,0001$) cuando el donante es negro. Se evidenció que el desajuste del *mismatch* por raza aumenta el riesgo del fracaso del injerto hepático independientemente de muchos factores de riesgo conocidos.

Tabla 1. Resultados del estudio del V.K. Rustgi et al. (95)

Donante/receptor	N	FPI	Valor p
Blanco-blanco	19330	11.5%	
Negro-blanco	2582	15.1%	<0,0001
Negro-negro	504	16.5%	
Blanco-negro	1915	14.5%	0,274

vi) Esteatosis hepática-Índice de masa corporal

La esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) es el acúmulo de grasa por encima del 5% del peso del hígado cuando el consumo de alcohol está por debajo de 10 gramos en mujeres y 20 gramos en los hombres en ausencia de infección viral o cualquier otra patología hepática específica (37). La existencia de esteatosis hepática no es sinónimo de inflamación-toxicidad aunque entre un 10-20% de los casos se desarrolla inflamación, fibrosis y en consecuencia EHNA (96).

Encontrar esteatosis en el hígado donante es relativamente común, incluso en personas asintomáticas y su incidencia va en aumento en la población general (97,98). Su prevalencia en países europeos se estima entre un 25-40% (37). Suele asociarse con la obesidad (30-100%), la edad avanzada, el abuso de alcohol y la diabetes (10-75%) (37,75).

Se han planteado muchas teorías respecto al mecanismo por el cual el acúmulo de grasa contribuye a la pérdida del injerto. La presencia de depósitos de esteatosis juega un papel importante, bien incrementando la presencia de radicales

libres, dañando las mitocondrias o produciendo acúmulo de grasa en el citoplasma de los hepatocitos. Por lo tanto, obstruyendo el espacio sinusoidal lo cual conlleva a una reducción del flujo sanguíneo que altera la microcirculación (75,99).

Estudios recientes han demostrado que la presencia de ácidos grasos libres promueven el daño hepático, la obesidad y la resistencia a la insulina. Cuando existe un incremento de la afluencia de ácidos grasos libres al hígado, después de que se realice la betaoxidación o esterificación de los mismos con glicerol se forman triglicéridos (TG), lo que finalmente resulta en la acumulación de esteatosis hepática (100).

La acumulación de TG en el hígado lo hace más sensible al OS, se liberan citoquinas proinflamatorias, se produce estrés en el aparato retículo endoplásmico y se acaba produciendo fibrosis hepática y muerte celular (37).

Otras teorías apoyan que el primer paso para la esteatosis hepática es la resistencia a la insulina y a sus trastornos metabólicos asociados. Esto aumenta la lipogénesis hepática de novo y deteriora la inhibición de la lipólisis del tejido adiposo, que acaba produciendo un incremento de los ácidos grasos del tejido adiposo al hígado (96,101).

Una amplia variedad de teorías etiológicas las cuales se concretizan en el mismo punto, la histología del paciente con

esteatosis hepática. Histológicamente, se denomina microesteatosis a la presencia de vacuola grasa pequeña (de tamaño inferior al núcleo celular) distribuida de manera difusa en los hepatocitos. Por otra parte, el patrón combinado de depósitos de vacuolas grasas grandes y pequeñas, se define como macroesteatosis. La primera gradación de esteatosis hepática fue propuesta por A.M. D'Alessandro et al. (102), en ella se consideró que si la proporción de grasa respecto al hepatocito era inferior al 33%, se clasificaría como esteatosis mínima, moderada entre el 33-66% y severa si era superior a 66%.

En el mismo año, el equipo de R. Adam et al. (103) propuso una clasificación similar, aunque más fácil de manejar, que es la que se sigue utilizando a día de hoy en la mayoría de los centros. Definieron esteatosis leve cuando es inferior al 30% y severa cuando es mayor al 60%.

En los trasplantes de donante cadáver, la presencia de macroesteatosis (>60%) se ha asociado con DPI (97,102,104).

En algunas series publicadas, la supervivencia del paciente y del injerto se reduce cuando se utilizan donantes con esteatosis severa. Se han descrito incidencias de FPI del 5% cuando existe esteatosis moderada y alrededor del 9% si es severa (97). Sin embargo, también existen estudios en los que no se observa mayor incidencia de FPI con la utilización de injertos con esteatosis moderada (103,105).

Si bien, la existencia de microesteatosis, incluso en grado moderado (> 30%), no se ha asociado con peores resultados. No disminuye la supervivencia del injerto ni del paciente. En un estudio de T.M. Fishbein et al. (106), se biopsiaron los injertos de todos los potenciales donantes antes de la tomar la decisión de validez (n = 426). Se identificaron 40 injertos con >30% de microesteatosis, la cual se evidenció que había desaparecido en la mayoría de los pacientes mediante biopsias seriadas al año del trasplante.

El índice de masa corporal (IMC) definido como peso en kilogramos dividido por la altura en metros al cuadrado, es el parámetro más simple y fiable para la determinación de la existencia de esteatosis hepática y de su extensión (107–109).

En el estudio de M.E. Rinella et al. (108), se analizaron en donantes vivos hepáticos: el valor predictivo del IMC, los parámetros bioquímicos, las pruebas de imagen por resonancia magnética (RM) y tomografía computarizada (TC) y los hallazgos histológicos. Tanto la TC como la RM presentaron una especificidad de un 100% para la detección de esteatosis, pero ambos fracasaron en su diagnóstico en un cuarto de los pacientes. El IMC superior a 28 fue el parámetro más fiable para la determinación de la existencia o a la ausencia de esteatosis.

Por otro lado, la inspección del cirujano en el momento de la laparotomía parece ser fiable únicamente para la detección de

grados severos de esteatosis, con un valor predictivo positivo de 71, 46 y 17% para graves, moderados y leves grados de esteatosis respectivamente (103).

Hoy en día, la presencia de esteatosis hepática *per se* no se considera una contraindicación para la aceptación del injerto hepático, aunque sí que se considera como un factor de riesgo añadido a tener en cuenta antes de la aceptación del órgano.

vii) Días de UCI-Uso de drogas vasoactivas

Realizar una declaración precoz de muerte encefálica (110), gestionar ágilmente los consentimientos para la donación y aceptar de manera rápida un potencial donante de órganos afecta a la estancia hospitalaria en la unidad de cuidados intensivos, influyendo en todo el procedimiento del trasplante y en sus resultados.

Se ha especulado que la estancia prolongada en UCI condiciona mayor número de episodios de hipotensión, principalmente en pacientes que ya presentan muerte encefálica. Estos pacientes por su mayor inestabilidad hemodinámica tienen más riesgo para desarrollar FPI (68,111). Sin embargo, otros estudios no han encontrado ningún impacto al respecto (112,113).

E. Mor et al. (63) observaron en un total de 365 donantes que una presión arterial sistólica menor de 90 mmHg, junto con el uso de altas dosis de dopamina (DA) (mayor de 15 microgramos / mg / min), se asocia con una tasa

significativamente superior de daño hepatocelular ($P < 0,001$). Aunque el 70% de las lesiones hepatocelulares son reversibles, el restante 30% finaliza en FPI.

En el año 2003 la UNOS (114) revisó los 5150 trasplantes de hígado y analizó las características del donante, receptor y cirugía. Al realizar el análisis multivariante, observaron que permanecer más de 6 días en UCI supone un factor de riesgo independiente para la donación (RR 1,21). Esto se justificó por el uso de la nutrición parenteral, la presencia de infecciones y la inestabilidad hemodinámica a mayor número de días en UCI..

Por otra parte, la utilización de noradrenalina (NA) durante el mantenimiento del donante actúa como factor protector (RR 0,79). Después de la muerte encefálica se establecen unos niveles endógenos de NA disminuidos, los cuales conducen a la hipoperfusión. Con la administración de NA exógena se puede mejorar ese déficit y por tanto la perfusión, de ahí el efecto protector de la administración de NA. Sin embargo, si se utiliza también DA a dosis superiores a 15 g/kg/min se observa el efecto opuesto.

De acuerdo con la literatura publicada, los donantes que han estado en UCI más de 6 días con inestabilidad hemodinámica y han precisado la administración de DA superior a 15 g/kg/min presentan mayor incidencia de FPI.

viii) Bioquímica del donante: hipernatremia

En los estudios realizados las alteraciones en los parámetros analíticos del donante (transaminasas y bilirrubina), no se han identificado como factores de riesgo para la donación si presentan su tendencia al descenso (63,66). Sin embargo, la existencia de hipernatremia en el donante en el momento de iniciar la cirugía ha sido descrita como causa de disfunción hepática postrasplante (115,116).

Una hipótesis propuesta establece que en estados de hipernatremia, los hepatocitos generan osmoles idiogénicos para equilibrar la osmolaridad entre el compartimento extracelular e intracelular. Los cambios bruscos en la osmolaridad extracelular, durante la reperfusión del injerto, generan la afluencia de agua libre al interior del hepatocito que finaliza en inflamación y disfunción celular (116,117).

E. Totsuka et al. (115,116), evaluaron una serie de 208 trasplantes y demostraron que la existencia de sodio sérico en el donante superior a 155 mEq/ml en el momento de la extracción hepática se asociaba con una peor evolución del injerto, en comparación con aquellos donantes que presentaban valores séricos de sodio normales.

Curiosamente, la corrección agresiva de la hipernatremia a valores inferiores de 155 mEq/ml antes de iniciar la cirugía del donante ha demostrado ser beneficiosa para la función del

injerto después del trasplante. De hecho, la función del aloinjerto de los donantes cuyo sodio sérico se corrige por debajo de 155 mEq/ml es comparable a aquellos de los órganos de donantes normonatremicos (118).

En un estudio multicéntrico, dirigido por J. Figueras et al. (119), se analizaron los factores de riesgo del donante (n = 649) para el retrasplante y la supervivencia del injerto durante el primer mes postrasplante. En él se observó que el sodio en plasma mayor de 155 mmol / L fue el único parámetro que afectó significativamente a la supervivencia del injerto (p = 0,03).

En la práctica habitual los anestesiólogos / médicos intensivistas procuran normalizar los parámetros de sodio en el donante antes de iniciar la cirugía, dada la incidencia de FPI que tiene éste parámetro como factor de riesgo de manera individual.

3.1.2 Factores relacionados con disfunción primaria del injerto relativos al receptor

Se han descrito múltiples factores relacionados con el receptor que pueden condicionar DPI: la edad, la gravedad de la enfermedad en el receptor y el MELD entre otros factores.

La edad del receptor parece tener una contribución dudosa para la DPI (120). A. Cameron et al. (121) al revisar sus

resultados de 1000 trasplantes afirmaron que el emparejamiento por edad donante-receptor minimiza el riesgo de FPI. Además, los receptores de mayor edad y los casos de indicación de trasplante urgente, aumentaban significativamente el riesgo de muerte. Sin embargo, otros estudios como el de R.J. Ploeg et al. (65) sugieren lo contrario. Se obtuvieron mayores incidencias de DPI y FPI cuando el receptor es más joven. Alegan que el receptor suele recibir cada vez con mayor frecuencia un injerto de menor volumen, lo cual influye en la función primaria del injerto.

El grado de severidad de la enfermedad en el receptor juega un papel ineludible en la DPI. La severidad de la enfermedad condiciona mayor transfusión de sangre y hemoderivados, niveles de creatinina y bilirrubina más elevados, junto con tiempos de protombina alterados.

El MELD Score (122) que utilizamos para priorizar los pacientes en lista de espera de TH es un predictor de mortalidad, que puede condicionar malos resultados de supervivencia del paciente. No se ha identificado un punto de corte en la escala MELD a partir del cual aumente la DPI. Únicamente el grupo de J. Briceño et al. (123) reportan la escala MELD como factor de riesgo cuando es ≥ 20 .

Otros factores como el estado del paciente, la necesidad de medidas de soporte, el uso de fármacos inotrópicos, la mecánica ventilatoria, la insuficiencia renal previa al

trasplante, la hemodiálisis y un IMC superior a 25, se han identificado como factores de riesgo para desarrollar DPI después del trasplante (65,73,124,125).

3.1.3 Factores relacionados con disfunción primaria del injerto relativos al procedimiento quirúrgico

Los factores de riesgo para la DPI producidos durante la cirugía de extracción hepática y en el implante son complejos de identificar. La mayoría de los factores están asociados con el procedimiento de IR (véase 1.2) y son de carácter técnico (66,67,113,123,126–129). Respecto a los factores de riesgo identificados, el tiempo de la isquemia fría y caliente juegan un papel central para el posterior desarrollo de DPI (130).

i) Tiempo de isquemia fría

El tiempo de isquemia fría (TIF) se define como el tiempo transcurrido desde el inicio de la perfusión hepática en el donante hasta el momento en el que el injerto se extrae de las maniobras de preservación en frío para su cirugía en el receptor. Se ha identificado como un factor de riesgo independiente para la DPI y FPI (70,111).

La disminución de la temperatura en el ambiente del injerto puede provocar daño celular, a través de la liberación de proteasas, lo que conduce a alteraciones en la homeostasis del

calcio, modificaciones del citoesqueleto y la destrucción del tejido local. La conservación en frío también induce varios cambios en los hepatocitos tales como, edema celular, acidosis intracelular, pérdida de la función mitocondrial y la disminución de ATP (131).

El punto de corte para TIF no es uniforme, se trata de un factor de riesgo que aumenta su efecto de manera progresiva, aunque S. Johnson et al. (124) y A. Cameron et al. (121) relacionaron a los TIF > 10h con malos resultados después del TH.

En un estudio de J. Briceño et al. (111) se observó, al analizar su serie de 400 trasplantes, que el aumento del TIF se relaciona directamente con la aparición de daño de preservación en el injerto (OR 0 1,109 / por hora).

H. Pokorny et al. (70) identificaron que aquellos donantes marginales en los que se acumulaban más de tres factores de riesgo, la tasa de DPI aumentaba hasta el 36%. Sin embargo, una isquemia fría de tiempo > 10 h (odds ratio (OR) 0,56; IC del 95%: 0,32 a 0,98) y el pico de sodio en el donante > 155 mEq / L (OR 0,44; IC del 95%: 0,26 hasta 0,77), se consideraron como factores de riesgo independientes al realizar el análisis multivariante.

ii) Tiempo de isquemia caliente

M. Silva et al. (132), estudiaron que mientras las células sinusoidales son más susceptibles a la isquemia fría, los hepatocitos se lesionan más fácilmente por el tiempo isquemia caliente (TIC).

A. Nanashima et al. (69) al analizar sus resultados de DPI sugirieron que el TIC debe ser inferior a 60 minutos (min), debido a un aumento de DPI cuando los tiempos de isquemia caliente superan la hora de duración.

A. Ijtsma et al. (125) hace referencia que durante la fase anhepática la lesión por IR se produce debido al aumento en la temperatura del aloinjerto. Cuando este período persiste durante más de 100 min, puede producirse posteriormente FPI. Por otra parte, los niveles de GOT y GPT aumentan en la IR. El receptor sufre simultáneamente cambios hemodinámicos agudos y un metabolismo hepático alterado, así como la acumulación de citoquinas, metabolitos y de toxinas en el sistema esplácnico (125).

El grupo de E. Totsuka et al. (133) analizaron el efecto sinérgico de los tiempos de isquemia fría y caliente, de manera que cuando el TIF > 12 h y el TIC > 45 min, se producía una incidencia de pérdida del injerto hasta en un 43% de los casos.

Finalmente, como se evidencia en la literatura publicada, en los centros de trasplante, en la práctica habitual se tiende a

minimizar al máximo los tiempos de isquemia para intentar disminuir la incidencia de DPI.

Determinar cuál es la mejor estrategia para prevenir el daño por IR y su consecuente DPI vs FPI es un tema controvertido. Se trata de un proceso fisiológico complejo que sigue sin comprenderse completamente. Las técnicas de preservación del injerto propuestas para mejorar los efectos del daño IR se limitan a lo siguiente:

- i) Realizar la preservación en hipotermia de manera adecuada (134).
- ii) Preservar órganos provenientes de donantes en asistolia mediante máquinas de perfusión normotérmica exvivo (135).
- iii) Utilizar intervenciones farmacológicas que contrarresten los efectos del daño IR: soluciones de preservación que contengan electrolitos, alopurinol, adenosina y antioxidantes como la n-acetilcisteína (NAC) entre otros.

4 Preservación del injerto: hipotermia y soluciones de preservación

4.1 La hipotermia

Preservar de la manera más segura el injerto hepático durante las maniobras de extracción y su posterior almacenamiento, es de vital importancia para la prevención del daño de la IR.

El método más comúnmente utilizado para la preservación del hígado donante es su almacenamiento en frío (136). Los hígados se vacían in situ con la solución de preservación refrigerada infundida por la arteria aorta y/o vena porta.

La hipotermia, una de las claves en la preservación, disminuye la velocidad a la cual los enzimas intracelulares degradan los componentes celulares esenciales para la viabilidad del órgano. La hipotermia no detiene el metabolismo, lo que hace es enlentecer el ritmo de las reacciones químicas y la muerte celular hasta que, finalmente el órgano cesa de funcionar y pierde su viabilidad. La eficacia de la hipotermia puede ser deducida según cómo afecte ésta al metabolismo. La mayoría de los enzimas de los animales normotérmicos muestran una disminución de la actividad en su actividad de 1,5 a 2 veces por cada 10°C de descenso de la temperatura (43).

La mayoría de los órganos toleran la isquemia caliente de 30 a 60 min sin una pérdida completa de su función. Así pues, el

enfriamiento de un órgano desde 37°C a 0°C alargaría el tiempo de preservación a unas 12-13h aproximadamente.

El enfriamiento del órgano (perfusión hipotérmica) se realiza mediante soluciones a 4°C con una composición bioquímica dirigida a evitar los efectos deletéreos de la IR, debido a que a esta temperatura concreta se consigue un menor consumo celular de energía como pudo demostrarse en los estudios del grupo de Howard et al. (137).

Junto a la hipotermia era necesario la administración de sustratos energéticos que mantuvieran al injerto ausente de aporte sanguíneo, para lo cual se diseñaron las soluciones de preservación.

Por tanto, esta estrategia de combinación de soluciones de preservación e hipotermia ha conseguido buenos resultados mediante:

- i) Reducción del TIC.
- ii) Reducción de los cambios celulares durante el TIF.
- iii) Reducción del daño por reperfusión una vez restaurado el flujo sanguíneo en el receptor.

4.2 Soluciones de preservación: principios

4.2.1 Minimizar el edema celular

El edema celular se produce como consecuencia del paso de iones a favor de los gradientes de concentración a uno y otro lado de la membrana celular, como resultado de la disminución de la actividad de la Na^+ / K^+ ATPasa. Para evitar en lo posible esta translocación iónica, las soluciones de preservación intentan disminuir estos gradientes asemejándose en su contenido iónico a la composición de iones del medio intracelular (rico en K^+ y pobre en Na^+). Además, para evitar el paso de agua al interior de la célula, contienen sustancias osmóticamente activas como azúcares (glucosa, sucrosa, manitol), lactobionato, trisacáridos, rafinosa, entre otros (138-141).

4.2.2 Minimizar las acidosis intracelular

La acidosis intracelular se produce como resultado de la glucólisis anaerobia. La hipotermia, en parte, disminuye esa glucólisis. Para contrarrestar la acidosis, las soluciones de preservación constan de sustancias tampón que mantienen el pH, como bicarbonato, citrato, fosfatos, lactobionato e histidina. La inclusión de glucosa como sustancia osmótica en las soluciones de preservación puede ser perjudicial en tejidos

con gran capacidad glucolítica (como el hígado), ya que estimula la glucólisis anaerobia y, por tanto, aumenta la acidosis (138–141).

4.2.3 Prevenir el efecto de los radicales libres de oxígeno

Las ROS a destacar dentro del daño IR son los radicales superóxido e hidroxilo. Otras moléculas son el óxido nítrico, el peróxido de hidrógeno y los radicales cuyo núcleo es un metal, como el perferril.

La alta reactividad de estas moléculas condiciona que su lugar de acción esté próximo al lugar de su formación, provocando la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática, la desnaturalización de proteínas estructurales y de enzimas, y la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN).

Se añaden sustancias antioxidantes con actividad *scavenger* para frenar el efecto de los ROS, como glutatión, manitol, dimetiltiourea, quelantes de hierro (desferroxamina). También se pueden añadir enzimas como la superóxido dismutasa, que metaboliza iones superóxido. A nivel de la génesis de radicales libres por la vía de la degradación de las bases purínicas se puede actuar añadiendo inhibidores de la xantina oxidasa como el alopurinol (138–141).

4.2.4 Suministrar sustratos energéticos

En referencia al metabolismo energético, la adenosina trifosfato (ATP) se degrada rápidamente durante la hipotermia y los productos finales de su degradación (adenosina, inosina e hipoxantina) son permeables a la membrana plasmática. La reperfusión del órgano necesita una regeneración rápida de la actividad de la bomba de sodio y de otros procesos que requieren energía en forma de ATP, por esto, la disponibilidad de precursores de ATP es primordial para que la preservación del órgano sea correcta (138-141).

4.2.5 Disminuir la entrada de calcio durante la reperfusión

La entrada de calcio es muy perjudicial porque activa la fosfolipasa citosólica que ataca a la membrana celular. Por eso se añaden sustancias bloqueantes de los canales de calcio como verapamilo, nifedipino o diltiazem. A este nivel, también se puede actuar con sustancias inhibitoras de la calmodulina (trifluoperacina), que es la proteína citosólica receptora de calcio (138-141).

4.2.6 Aportar sustancias protectoras de la membrana celular

Las soluciones de preservación pueden incluir también corticoides (dexametasona) o clorpromacina, que han demostrado sus cualidades protectoras de membrana (138-141).

4.2.7 Aportar sustancias vasoactivas

Para mejorar la perfusión del injerto, se pueden añadir sustancias vasoactivas. Así, las soluciones de preservación pueden contener isoproterenol, dopamina, antagonistas de los receptores de la endotelina, entre otras.

A pesar de que las soluciones de preservación se rigen por los principios descritos anteriormente, los datos indican que el daño producido por un tiempo de preservación prolongado continúa representando un importante factor de riesgo que influye en la incidencia de FPI, sobre todo cuando se trasplantan órganos procedentes de donantes “subóptimos” (111,142,143).

4.3 Tipos de soluciones de preservación hepática

Las soluciones de preservación comercializados pueden diferir en coste y también en su composición, de forma que pueden

tener diferencias considerables en cuanto a sus combinaciones de electrolitos, *bufferings*, la osmolalidad y la viscosidad.

La solución *Euro-Collins*® se desarrolló en los años 70, como una solución de alto contenido en potasio-sodio (como la composición intracelular) que no contenía agentes oncóticos pero sí glucosa. Dado que la glucosa es impermeable a células renales, esta solución de conservación era adecuada para la preservación renal. Sin embargo, la permeabilidad a la glucosa de las células hepáticas y pancreáticas conduce a la pérdida del efecto osmótico. Esta es la razón por la que la glucosa fue posteriormente sustituida por otras moléculas de mayor tamaño tales como lactobionato y rafinosa presentes en la solución de Wisconsin, que permanecen en el espacio extracelular y conservan su efecto beneficioso. El uso de esta solución de preservación mejoró el tiempo de preservación del órgano de 6 a 16 h (144).

El desarrollo de la solución de preservación de la Universidad de Wisconsin (UW) fue anunciada por Jamieson et al. (145), en una conferencia internacional celebrada sobre el trasplante en Pittsburg en 1987.

La eficacia de la solución UW está basada en la prevención de edema por impermeabilizantes (rafinosa, lactobionato), la adición de un precursor de ATP (adenosina) y antioxidantes (alopurinol, glutatión reducido). Las desventajas incluyen la

presencia de hidroxietil almidón como soporte oncótico, que se adhiere a la sangre y es de elevada viscosidad, lo que condiciona la saturación de los tejidos con la solución de preservación y la presencia de elevados niveles de potasio, que obliga al lavado del injerto previo a su implante en el receptor (146,147).

Con el uso de la solución de UW se demostró al compararse con las soluciones de preservación previas como el *Euro-Collins*® que sus resultados eran mejores e incluso podía soportar mayores tiempos de isquemia fría (136,148). La solución de UW se convirtió desde aquel momento en la más utilizada, seguido de la solución de histidina-triptófano-cetoglutarato (HTK) (149).

La solución HTK (150) se desarrolló para la preservación cardíaca, extendiéndose posteriormente para la perfusión del resto de órganos. Su composición extracelular de electrolitos contiene bajo contenido en potasio comparado con UW. La menor viscosidad de HTK y su potencial mejoría en la microcirculación hepática incitó su uso en el TH. El uso de HTK en Europa ocurre a finales de 1980. En EEUU no se utilizó hasta el año 2002, en la Universidad de Pittsburgh.

Magnus et al. (151) comparó los resultados de 174 donantes en los que se utilizó HTK como solución de preservación, con su serie histórica de controles en 204 pacientes con solución de UW. A pesar de que existía un pico de transaminasas y

bilirrubina superior para el grupo de HTK, sus resultados de supervivencia del injerto al mes, 6 meses y al año eran similares en ambos grupos. Estos resultados junto con el menor coste de la preservación con HTK, resultó muy atractivo para las unidades de trasplante de gran volumen, principalmente.

En 1994, el *Celsior*® comenzó a comercializarse (152). El *Celsior*® también se desarrolló inicialmente como solución de preservación cardíaca, extendiéndose su uso hasta día de hoy para los pulmones y el hígado. El desarrollo del *Celsior*® se llevó a cabo siguiendo los mismos principios que UW. *Celsior*® contiene manitol en vez de rafinosa, glutamato en lugar de adenosina y no contiene coloides. Se especula que los prometedores resultados de su uso serían debido a su baja viscosidad, que resulta en un mejor lavado durante la obtención del injerto, junto con su composición de electrolitos de tipo extracelular, lo cual es beneficioso para la preservación del corazón y el páncreas al no provocar vasoespasmo. La preservación del hígado (153,154) y el páncreas (155,156) con *Celsior*®, ausente de alopurinol, no afecta la supervivencia del injerto en los estudios experimentales realizados.

Cuando se comparó HTK con UW, HTK resultó ser superior inhibiendo metaloproteinasa de la matriz (MMP) en experimentos in vitro (32). El componente que inhibía primariamente las MMP era el GSH, pero también el ácido

lactobiónico, histidina y citrato (32). Todos ellos son ligandos para metales pesados actuando como cofactores de las MMP.

El ácido lactobiónico y GSH son componentes fundamentales que contienen tanto UW como *Celsior*®.

En un estudio prospectivo realizado por el grupo de R. López-Andújar (157) en 196 pacientes trasplantados hepáticos, se comparó la utilización de las soluciones de preservación de UW y *Celsior*® en cuanto a DPI, FPI, sangrado y complicaciones arteriales y/o biliares, demostrándose que ambas soluciones de preservación son igual de efectivas para preservar el hígado.

En el año 2005 aparecen las primeras publicaciones del uso de la solución de preservación del Instituto Georges López (IGL-1) (158). Consiste en la solución de UW modificada. En él se invierten las concentraciones de Na⁺ y K⁺ y se sustituye el hidroxietil almidón por polietilenglicol (Tabla 2). Con la utilización de IGL-1 como solución de preservación hepática se han observado menores niveles de transaminasas, malondialdehído, glutamato deshidrogenasa y una mayor producción de bilis (99).

Tabla 2. Componentes de las soluciones de preservación UW e IGL-1

Componentes	UW	IGL-1
Hidroxietil alimidón (mmol/L)	0,25	-
PEG (mmol/L)	-	0,03
Sodio (mmol/L)	30	125
Potasio (mmol/L)	125	30
Ácido lactobiónico (mmol/L)	100	100
Rafinosa (mmol/L)	30	30
MgSO ₄ (mmol/L)	5	5
KH ₂ PO ₄ (mmol/L)	25	25
Glutation (mmol/L)	3	3
Adenosina (mmol/L)	5	5
Alopurinol (mmol/L)	1	1
Ph (mmol/L)	7.2-7.4	7.2-7.4

Es escasa la literatura existente comparando los distintos tipos de soluciones de preservación o mejorando sus características (157,159). En un metanálisis de O'Callaghan et al. (160) se evidencia que en los 16 ensayos clínicos revisados no hay diferencia entre las soluciones UW, HTK y *Celsior*® en términos de la disfunción precoz, disfunción primaria, retrasplante, supervivencia del paciente o supervivencia del injerto, aunque los propios autores reconocen que los datos disponibles eran limitados. En la (tabla 3) puede encontrarse los distintos componentes de las soluciones de preservación más utilizadas.

Tabla 3. Componentes de las diferentes soluciones de preservación.

Componentes	Euro-Collins® 1970	UW 1980	HTK 1990	Celsior® 1993	IGL-1 2000	Scot 2000
Agente osmótico	Glucosa	Rafinosa Lactobinato	Manitol	Manitol Lactobinato	Rafinosa Lactobinato	Glucosa
Buffer	PO4 HCO3	PO4	Histidina	Histidina	PO4	HCO3
Agente oncótico	-	HES*	-	-	PEG** 35 (1 g/L)	PEG 20 (30 g/L)
Viscosidad "centistokes"	-	2.4	+/-1	+/-1	1.2 (0.7 a 20°C)	2.2 (1.6 a 20°C)
Agente antioxidante	-	Glutation Adenosina Alopurinol	Ketoglutarato Triptófano	Glutation	Glutation Adenosina Alopurinol	-
Composición Na+/K+	Alto K+ Bajo Na+ Intracelular	Alto K+ Bajo Na+ Intracelular	Bajo K+ Bajo Na+	Bajo K+ Alto Na+ Extracelular	Bajo K+ Alto Na+ Extracelular	Bajo K+ Alto Na+ Extracelular

*HES: hidroxietil almidón

** PEG: polietilenglicol

5 Antecedentes de N-acetilcisteína

Con la finalidad de disminuir los resultados de DPI se han testado innumerables productos y técnicas, entre ellas el antioxidante n-acetilcisteína (161-163).

La adición de la n-acetilcisteína, ha sido motivo de estudio por muchos cirujanos hepatobiliopancreáticos. Sin embargo, el hecho de que se haya utilizado por distintas vías de administración, con una dosificación distinta y en distintos momentos, ha condicionado una amplia variedad de resultados que ha hecho plantear a muchos profesionales el nivel de eficacia de este producto.

La mayor fuente de ROS procede de la activación de la enzima xantin-oxidasa y de la acumulación intracelular de xantina e hipoxantina durante el almacenamiento del órgano. Por ello, es aconsejable añadir a la solución de preservación sustancias que protejan contra la formación de ROS (allopurinol) o limpiadores (superóxido dismutasa, quelantes del hierro, manitol, dimetilnitrosamina) (18). A pesar de que la mayoría de soluciones de preservación contienen antioxidantes, éstos han resultado ser poco efectivos para evitar completamente el daño producido por los ROS en la IR .

La NAC es el derivado N-acetil del aminoácido L-Cisteína. NAC se metaboliza en N-acetil cisterna N,N-diacetilcisteína y L-

cisteína. Esta última se metaboliza en glutatión, taurina y sulfato (Figura 5).

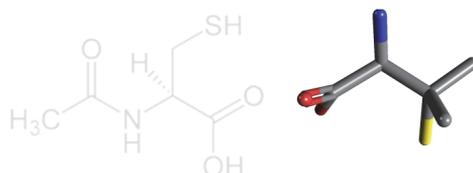


Figura 5. Fórmula y forma molecular de la NAC

La NAC ejerce una acción antioxidante directa al estar provista de un grupo *thiol* nucleofílico libre (SH) capaz de interaccionar directamente con los grupos electrofílicos de los radicales oxidantes. Además, su estructura molecular permite que la acetilcisteína atraviese fácilmente las membranas celulares. Dentro de las células, la acetilcisteína sufre una deacetilación produciendo L-cisteína, un aminoácido indispensable para la síntesis de glutatión. Esta sustancia es un tripéptido muy reactivo, distribuido de forma ubicua en los distintos tejidos del organismo, que es esencial para el mantenimiento de la capacidad funcional de las células así como para su integridad morfológica.

La NAC fue inicialmente utilizada como agente mucolítico para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica hace alrededor de 60 años. Su efecto se produce gracias a su capacidad de romper los puentes de disulfuro de las glicoproteínas de alto peso molecular del moco reduciendo su viscosidad (164,165).

La NAC ha sido testada en pacientes con insuficiencia renal que precisan hemodiálisis periódica, observándose que los pacientes tratados conservan mejores índices de filtración glomerular frente al grupo placebo (166). El mismo resultado se produce con el pretratamiento de los pacientes con insuficiencia renal que van a recibir cateterismos (167) o contrastes radiológicos (168).

Su actividad hepatoprotectora es debida a que es capaz de servir de precursor de GSH. La función más importante del GSH es la de mantener el potencial oxidación-reducción (redox) del hígado. Un estado redox normal es de vital importancia en la función hepática. Dicho efecto es debido a su capacidad de proteger la membrana celular de la peroxidación lipídica y de la oxidación de proteínas, así como de mejora de la perfusión hepática (169,170). Constituye el mecanismo de defensa intracelular más importante frente a los radicales oxidantes, tanto exógenos como endógenos y frente a diversas sustancias citotóxicas, incluyendo el paracetamol. El paracetamol ejerce su acción citotóxica a través de un empobrecimiento progresivo de los niveles de glutatión. Para el tratamiento de la sobredosis por acetaminofén se utiliza la administración NAC por vía intravenosa. La utilización de la NAC por su actividad hepatoprotectora ha sido ampliamente evaluada en estudios preclínicos en animales, en los cuales se ha observado que su utilización provoca descensos en los niveles de transaminasas, mejorías de macrocirculación y disminución de la disfunción

primaria. Los múltiples estudios experimentales sobre la utilización de NAC en el daño producido por IR que se reflejan en la Tabla 4. En algunos estudios la NAC se administra antes de la inducción de la isquemia, en otros experimentos después del evento isquémico y otros la utilizan antes y después de la isquemia y la reperfusión. La mayoría de los estudios utilizan una dosis de 150 mg/kg y la vía de elección mayoritaria es el bolo intravenoso.

En términos de efectividad en la Tabla 4 se refleja que en 17 de los 21 estudios se observa un efecto beneficioso de la administración de NAC, reduciendo el daño por IR. En 7 de los estudios se determinó el efecto de la NAC valorando los niveles plasmáticos de transaminasas y/o proteínas como factor de necrosis tumoral (TNFalfa), como objetivo principal para la reducción del daño IR. Tres estudios observan una mejoría de la microcirculación hepática tras la adición de NAC. La reducción de radicales libres de oxígeno se documenta en 2 estudios. En el estudio de Galhardo et al. se muestra que la NAC reduce la necrosis hepática y el edema pulmonar. En 4 estudios no se observa beneficio de la adición de NAC en los marcadores de daño de IR.

Tabla 4. Diseño y resumen de los estudios experimentales que evalúan NAC en el daño de IR (n=21)

Autor Año	Tipo	Modelo experimental	Intervención NAC	End-point
Fukuzawa et al. 1995 (171)	Cerdo	2 h de isquemia caliente - clampaje hiliar con shunt portocava seguido de reperfusión	150 mg/kg NAC (20%) en perfusión continua. Pre y post isquemia	↓ AST, LDH y ↑ ATP y producción biliar en el grupo NAC
Koeppel et al. 1996 (172)	Rata	70 min isquemia caliente (hígado izquierdo) seguido de reperfusión	400 mg/kg iv 20 min antes de la isquemia	Mejora de la microcirculación hepática
Demir et al. 1998 (173)	Rata	30 min isquemia caliente (lóbulo hepático izquierdo - medio) seguido de reperfusión	500 mg/kg 20 min antes de la isquemia (un grupo con pentoxifilina-NAC)	NAC reduce los marcadores de daño oxidativo No se observa efecto sinérgico con pentoxifilina
Chavez-Cartaya et al. 1999 (174)	Rata	45 min isquemia caliente (lóbulo hepático izquierdo y medio) seguido de reperfusión	300 mg/kg IM 30 min antes de la isquemia	No se observa efecto de NAC
Hur et al. 1999 (175)	Rata	45 min isquemia caliente (lóbulo hepático	20 mg/kg NAC en bolo 10 min antes de la reperfusión	NAC inhibe la expresión de ARNm

		izquierdo y medio) con medición de la expresión del gen iNOS		de iNOS e hiperactiva NF-kB
Sener et al. 2003 (176)	Rata	45 min isquemia caliente(isquemia hepática completa)	150 mg/kg NAC (un grupo con Melatonina-NAC) 15 min antes de la isquemia, inmediatamente antes de la reperusión	NAC reduce el daño IR. Se observa efecto sinérgico con la adición de Melatonina
Rudiger et al. 2003 (177)	Ratón	75 min isquemia caliente (isquemia hepática completa - parcial)	100 mg/kg NAC en el pre-condicionamiento	NAC revierte los efectos protectores de la técnica del preconditionamiento
Glantzounis et al. 2004 (178)	Conejo	60 min isquemia caliente seguido 7 h reperusión	150 mg/kg NAC iv previa a la reperusión	NAC mejora la microcirculación hepática
Montero et al. 2005 (179)	Rata	Isquemia caliente +/- pre-condicionar +/- exclusión biliar selectiva	150 mg/kg NAC iv 15 min antes de la isquemia	No se observa beneficio de la NAC en el daño IR
Okay et al. 2005 (180)	Rata	Hepatectomía parcial	400 mg/kg NAC iv en bolo antes de la resección y	NAC atenúa la translocación

Introducción

			2 días de tratamiento con NAC	bacteriana y el daño pulmonar
Smyrniotis et al. 2005 (181)	Rata	60 min isquemia caliente (lóbulo hepático izquierdo y medio)	300 mg/kg NAC iv en bolo antes de la isquemia	NAC atenúa el daño IR hepática (↓ GOT ↓ GPT, ↓ GSTs alfa), genera menor agregación plaquetaria y ↑ AMPc. Menos cambios necróticos hitológicos.
Fusai et al. 2005 (182)	Conejo	60 min isquemia caliente (lóbulo hepático izquierdo y medio)	150 mg/kg NAC iv en bolo antes y durante la reperusión	NAC desciende el daño IR sobretodo en la reperusión tardía y ↑ la microcirculación hepática.
Chen et al. 2005 (183)	Rata	40 min isquemia caliente (isquemia hepática completa)	20 mg/kg NAC 20 min antes de la isquemia	↓ MMP9 en la reperusión
Glantzounis et al. 2007 (184)	Conejo	60 min isquemia lobar y 7 h de reperusión	150 mg/kg NAC previo y durante la reperusión	NAC previene el ↑ de RNS
Jin et al. 2007 (185)	Ratón	60 min de isquemia hepática parcial Medición de TLR2-4	Pre-tratamiento con 150 mg/kg NAC	NAC desciende el daño por IR inhibiendo la activación de TLR

				2/4 y la inducción de TNFalfa
Galhardo et al. 2007 (186)	Rata	10 min pre-condicionar + 40 min de isquemia caliente	150 mg/kg bolo iv previamente a la isquemia	NAC reduce la necrosis, apoptosis y microesteatosis hepática
Baumann et al. 2008 (187)	Perro	60 min de isquemia caliente	150 mg/kg bolo iv 2 min antes de la isquemia	No se observan beneficios de la NAC en el daño por IR
Keles et al. 2008 (188)	Rata	90 min de isquemia caliente lóbulo izquierdo + 90 min de reperfusión	250 mg/kg NAC bolo previamente a la isquemia	NAC ↓ la formación de 8-OHdG y la peroxidación lipídica
Silva et al. 2012 (189)	Ratón	Hepatectomía parcial, 30 min de isquemia caliente + 60 de reperfusión	150 mg/kg NAC iv 15 min antes de la isquemia + 5 min antes de la reperfusión	↓ GPT después de la reperfusión, ↑ células binucleadas y ↑ de la actividad mitogénica
Sun et al. 2014 (190)	Ratón	90 min isquemia caliente (lóbulo hepático izquierdo y medio)	300 mg/kg NAC ip 2 h antes de la isquemia	↓ apoptosis antes de la reperfusión ↓ ROS retículo endoplásmico
Cai et al. 2015 (191)	Rata	1 ml/kg CCl ₄ ip durante 4 sem	50, 100 o 200 mg/kg de NAC (según grupo) ip en el momento de CCL ₄	↓ GOT, GOT, MDA ↑ GSH y SOD en el grupo NAC

Existen 7 estudios en los que se evalúa el papel de la NAC en la perfusión de hígado aislado y se resumen en la Tabla 5. En todos los protocolos se realiza una isquemia fría prolongada previa a la reperfusión y en todos los estudios se administra NAC antes de la hepatectomía aunque variando la vía de administración:

i) En 5 estudios NAC se administra intraportal o en vena mesentérica.

ii) En 1 estudio se administra vía intraperitoneal.

iii) En 1 estudio se administra vía subcutánea.

La concentración más utilizada es la de 150 mg/kg. En términos de efecto de la NAC, los 7 estudios mostraron algún efecto beneficioso de la NAC en la mejora del daño IR.

En el estudio de Nakano et al se observa que la administración de NAC en previa a la isquemia atenúa el daño hepático, efecto que se pierde cuando la NAC se administra en la reperfusión.

Tabla 5. Diseño y resumen de los estudios experimentales que evalúan NAC en modelos de hígado aislado y perfundido (n=7)

Autor Año	Tipo	Modelo experimental	Intervención NAC	End-point
Vivot et al. 1993 (192)	Rata	Perfusión de hígado aislado con NAC pre, post, pre-post	100 mg/kg NAC pre-tratamiento, 20 mg/dl NAC en la perfusión en post-tratamiento	↓ transaminasas y ↑ de la producción de bilis
Dunne et al. 1994 (193)	Rata	Perfusión de hígado aislado. Isquemia fría y caliente secuencial	100 mg/kg NAC sc previa hepatectomía, 100 mmol/l en la solución de UW	NAC induce mejoría transitoria de la perfusión sanguínea y biliar del hígado
Nakano et al. 1995 (194)	Rata	Perfusión de hígado aislado. 48 h de isquemia y 2 h de reperfusión	Inyección de 150 mg/kg NAC pre-hepatectomía intraportal.	NAC ↑ cisteína hepática y protege a las células de Kupffer
Nakano et al. 1996 (195)	Rata	Perfusión de hígado aislado después de 24 h de isquemia fría	Inyección portal de 150 mg/kg de NAC ± BSO antes del aislamiento y perfusión	La administración de NAC pre-isquemia atenúa el daño hepático. El efecto protector se pierde cuando NAC

				se administra en reperfusión
Nakano et al. 1997 (196)	Rata	Perfusión de hígado aislado (24 h de isquemia fría + 120 min de reperfusión)	150 mg/kg de NAC en VM 15 min antes de la extracción hepática	NAC antes de la isquemia fría mejora las transaminasas y la producción biliar en hígados esteatósicos
Nakano et al. 1998 (197)		Perfusión de hígado aislado (24 h de isquemia fría en UW seguido de 120 min de reperfusión)	150 mg/kg NAC en VM antes de la extracción	NAC antes de la extracción hepática previene del daño IR en hígados esteatósicos (GPT, secreción biliar y niveles tisulares de GSH)
Nagasaki et al. 1998 (198)		Perfusión de hígado aislado (48 h de isquemia y 120 min de reperfusión)	150 mg/kg NAC en VM antes de la extracción	Aumento de la producción biliar en el grupo NAC de manera significativa

En 4 estudios experimentales se evalúa el efecto de la administración de NAC en el TH y se encuentran resumidos en la Tabla 6. En 2 de ellos se utiliza el modelo de la rata y en los otros 2 el modelo porcino. El momento de la administración y la dosis de NAC varía en los 4 estudios. En dos estudios se observan beneficios y en otros 2 no se observan ninguna

mejora. En los estudios en los que se observan progresos la dosis de NAC y el tiempo de administración previa a la isquemia son mayores.

Tabla 6. Diseño y resumen de los estudios experimentales que evalúan NAC en trasplante hepático (n=4)

Autor Año	Tipo	Modelo experimental	Intervención NAC	End-point
Walcher et al 1995 (199)	Rata	Hígado almacenado con UW 20 h y TH ortotópico	Donantes 150 mg/kg + 80 mg/kg al inicio de la operación receptor	Sin cambios en la perfusión microvascular temprana después del trasplante
Koepfel et al 1996 (200)	Rata	TH ortotópico tras 24 h de isquemia fría con UW	400 mg/kg NAC antes de la hepatectomía y después de la reperfusión en el receptor	NAC reduce la mala perfusión microvascular temprana e incrementa la secreción biliar
Regueira et al 1997(201)	Cerdo	Ensayo clínico de NAC en THO	3 g de NAC en el donante 1 h antes de isquemia caliente	↓ pico GOT, mejora la coagulación, mejora OS y ↓ PNF.
Manika et al (202)	Cerdo	RCT en THO	150 mg/kg NC iv al donante y al receptor	Sin efectos de NAC en histología hepática o OS.

En 11 estudios clínicos se ha evaluado el rol de la NAC en el TH y se encuentran recogidos en la Tabla 7.

En ninguno de estos estudios se resume adecuadamente el procedimiento de aleatorización ni de ciego, además de que presentan un seguimiento corto. En algunos de ellos la administración de NAC es en el donante, en otros es en el receptor. La vía de administración mayoritariamente utilizada es la venosa.

La utilización de NAC en el TH se utilizó inicialmente en Anestesiología y Reanimación. En 1995 se publicó en el *British Journal of Anesthesia* por Browley et al. (203) un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y placebo, en el que se administraba NAC en el receptor (150 mg/kg en bolo seguido 12.5 mg/kg durante 4h en la cirugía y 6.25 mg/kg de recuerdo en la cirugía) constatando que, sin obtener diferencias en morbi-mortalidad, la administración de NAC parecía tener algún efecto sobre la oxigenación celular aunque de difícil interpretación. Posteriormente en 1997 el grupo de Regueira et al. (201) publicó un estudio comparativo de dos brazos (NAC frente no NAC). Se administraban 6 g de NAC en el donante una hora antes del trasplante, en ninguno de los dos grupos se produjo fallo primario del injerto, aunque sí existieron diferencias en DPI entre ambos grupos. En 1998 se publicaron dos ensayos clínicos aleatorizados, en ambos se administra la NAC en el receptor. El primero, lo realizaron el grupo de Thies et al. (204)

en el cual se administraban 150 mg/kg antes de la reperfusión + 50 mg cada 4h, en sus resultados se observaron diferencias, aunque no significativas en los niveles de transaminasas. El segundo ensayo clínico aleatorizado se publicó por Steib et al. (205), en éste se infundían 150 mg/kg en el momento de la anastomosis + 50 mg/kg cada 4 h + 100 mg /kg a las 16h, tampoco se encontraron diferencias clínicamente significativas en los niveles de transaminasas.

En el año 2001 Bucuvalas et al. (206) publicaron un estudio comparativo no aleatorizado en 25 receptores hepáticos pediátricos (administraban 70 mg/kg en la reperfusión, en dosis única junto con Prostaglandina E1) observando niveles inferiores de transaminasas en el grupo tratado con NAC, aunque sin diferencias significativas.

Estudios más recientes como el de Amico et al. (207), publican resultados muy sorprendentes tras la administración de NAC intravenosa (30 mg/kg una hora antes de la cirugía) y en la solución de preservación del donante (300 mg de NAC), observándose una supervivencia del injerto superior y una reducción en la incidencia de complicaciones postrasplante en el grupo de tratamiento con NAC. En dicho estudio se administra 300 mg vía portal y 30 mg/kg/iv en el donante.

Clásicamente, en los estudios experimentales la NAC se ha administrado en el receptor a excepción de los estudios de Regueira et al. y de Amico et al. en los cuales su administración

es en el donante. Únicamente en dichos estudios se observa una mejoría de la supervivencia del injerto.

Tabla 7. Diseño y resumen de los estudios clínicos que evalúan NAC en TH(n=11)

Autor Año	Tipo	Intervención NAC	Nº NAC - / Nº NAC+	End-point
Bromley et al. 1995 (203)	RCT Doble ciego	150 mg/kg NAC 15 min seguido 12.5 mg/kg/4 h + 6.25 mg/kg de recuerdo	25/25	NAC ↑ GOT 6º DPO
Regueira et al. 1997 (208)	Cohortes sin/con NAC	6 g NAC al donante 1 hora antes del trasplante	25/37	GOT : 825 control GOT: 353 NAC DPI n = 5 control DPI n = 0 NAC
Steib et al. 1998 (205)	RCT	150 mg/kg NAC durante 30 min + 50 mg/kg durante 4 h	30/30	GOT NAC 773 ± 133 vs control 1102 ± 225 U/L
Thies et al. 1998 (204)	RCT	150 mg/kg NAC durante las anastomosis	30/30	Sin diferencias entre grupos en transaminasas ni en PNF.

		+ 50 mg/kg durante 4 h + 100 mg/kg durante 16 h		
Bucuvalas et al. 2001 (206)	Estudio comparativo no aleatorio	70 mg/kg en la reperusión y cada 12 h durante 6 días (junto con PGE)	12/13	Pico GPT 499 UI/L NAC vs 867 UI/L en control. OS a los 3 meses 100% en ambos grupos.
Taut et al. 2001 (170)	Estudio caso-control no aleatorio	150 mg/kg NAC en reperusión + 50 mg/kg durante 4 h + 100 mg/kg durante 16 h	9/10	No definido
Weigand et al. 2001 (209)	RCT	Hígados perfundidos con 1 L de Ringer + 1000 mg/L NAC + 150 mg/kg NAC antes de la reperusión	10/10	Sin diferencias en transaminasas ni bilirrubina total.

Introducción

		+ perfusión continua de 50 mg/kg durante 4 h + 100 mg/kg NAC a las 16 h		
Khan et al. 2005 (210)	RCT	150 mg/kg de NAC antes de la parada cardíaca + 75 mg/kg durante isquemia fría. Los receptores no reciben NAC.	9/9	Sin diferencias en transaminasas.
Santiago et al. 2010 (211)	RCT	100 mg/kg tras 15 min de iniciar la fase anhepática seguidos de 50 mg/kg infusión durante 24 h.	25/25	Disminución del ph en el grupo NAC tras la reperusión.
Hilmi et al. 2010 (212)	RCT	140 mg/kg en la	47/46	Sin diferencias en daño por

		inducción anestésica + 70 mg/kg cada 4 h /12 dosis		isquemia/reperfusión hepatorenal. Aumento de los niveles de GSH en NAC.
Amico et al. 2013 (207)	RCT	30 mg/kg NAC en el donante 1 h antes de la cirugía + 300 mg en vena porta antes del clampaje	71/69	Menor DPI en grupo NAC cuando DRI > 1.8 OS del injerto > en el grupo NAC

Además de los estudios experimentales con NAC centrados en la función hepática, la NAC ha demostrado ser un fármaco seguro, ampliamente administrado, tanto vía oral como intravenosa (213) cuya utilización ha sido también evaluada en estudios clínicos respecto a otros órganos. El estudio de Carbonell et al. (214) infundía 600 mg de NAC intravenosa diluida en 50 ml de suero salino, obteniendo importantes beneficios clínicos a corto plazo en los pacientes renales con alto riesgo, sometidos a angiografía coronaria, sin observarse efectos tóxicos.

Recientemente, Santiago et al. (211) publican resultados significativos disminuyendo los valores de ph intraoperatorio,

tras la administración de NAC (100 mg/kg/iv) en la fase anhepática en el receptor.

La Universidad de Pittsburgh (212) evaluó, en un estudio aleatorizado realizado en 100 pacientes, si la administración de NAC intravenosa (70 mg/kg con una dosis inicial 140 mg/kg) cada cuatro horas postrasplante en el receptor, disminuía la incidencia de disfunción renal postoperatoria. Llegaron a la conclusión de que a pesar de la dosis intravenosa administrada, no se disminuía la disfunción renal en los pacientes tratados con NAC. Sin embargo, observaron que en los pacientes que conseguían aumentar los niveles de GSH se producían menos casos de fracaso renal agudo.

Existe una amplia variedad de publicaciones que han intentado demostrar la utilidad de NAC en el daño IR hepático. Sin embargo, todos los estudios utilizan medidas analíticas indirectas para demostrar su beneficio sin encajar el daño generado por el OS, sin determinar los metabolitos producidos en la IR y sin profundizar en los mecanismos moleculares por los que la NAC consigue atenuar daño celular.

Actualmente, con el desarrollo de la metabolómica, se puede analizar la presencia de los distintos metabolitos celulares en un determinado momento, lo cual nos permite intentar enlazar cada una de las fases del proceso del OS en el daño IR.

6 Metabonómica: Definición y Aplicaciones

La metabonómica también conocida como metabolómica (215), es la última ciencia *-ómica*, que se ha desarrollado después de la genómica y la proteómica.

Esta ciencia estudia el conjunto de metabolitos que existen en un sistema biológico, principalmente en biofluidos como sangre, orina, saliva y tejidos o cultivos celulares, entre otros. Los metabolitos son moléculas de bajo peso molecular, menos de 1.5 kDa, como son los carbohidratos, lípidos, aminoácidos, vitaminas, metabolitos de la microbiota, etc. (216). Su presencia, ausencia o niveles alterados, nos indica cómo está funcionando un determinado órgano o un ser vivo en momento concreto. El análisis metabolómico es un fiel reflejo de la función de la expresión de determinados genes, así como de la influencia de factores externos como puede ser la dieta, el estilo de vida y el uso de fármacos entre otros. La metabolómica permite la clasificación de muestras, identificar biomarcadores, cuantificar metabolitos en distintas situaciones y en general, entender mejor los procesos bioquímicos que acompañan a una determinada función fisiológica o patológica.

En el año 1989 Nicholson et al. acuñaron por primera vez el término metabonoma, en este estudio utilizaron la RMN como plataforma de análisis y ratas como modelo experimental (217).

6.1 Fases de un estudio metabolómico y sus plataformas de análisis

6.1.1 Diseño del experimento

En el momento de diseñar un análisis metabolómico hay que definir el número de muestras mínimo a analizar para poder alcanzar resultados significativos. En ocasiones, el tamaño muestral óptimo es difícil de alcanzar, además existe una gran variabilidad biológica entre las muestras que hay que considerar. En esta etapa es necesario decidir qué tipo de muestra biológica se va a recoger y como se analizará. Por ejemplo, hay que decidir si queremos realizar un estudio para establecer un mecanismo molecular o lo que buscamos son biomarcadores de un determinado proceso, en el primer caso se necesitarían modelos celulares o tejido de pacientes, mientras que en el segundo sería ideal encontrar marcadores en muestras poco invasivas como sangre, orina, por ejemplo. Todos estos factores han de ser considerados en el diseño experimental para que los resultados obtenidos en el análisis metabolómico sean reflejo de un cambio biológico/bioquímico y no de sesgos artificiales como por ejemplo la conservación o el procesamiento de la muestra.

6.1.2 Medición de analíticas

En metabolómica la obtención de perfiles de metabolitos se basa fundamentalmente en el uso de dos plataformas analíticas: la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS), pudiendo ésta última acoplarse a distintos tipos de cromatografía como la de gases (CG) o líquida (CL).

La espectroscopia por RMN de alta resolución requiere poca preparación de la muestra, ofrece alta eficacia en el rendimiento de las muestras (10-15 min por muestra con una sonda convencional de detección) y es de alta reproducibilidad. Adicionalmente ofrece, además de elucidar las estructuras moleculares, el prospecto para holística y simultáneamente perfilar metabolitos sin selección *a priori*. Esta técnica no sólo se utiliza para identificar perfil de fluidos biológicos, sino que también se emplea para el perfilado metabólico de biopsias de tejido, requiriéndose en tal caso de la RMN de alta resolución. La RMN presenta la característica de asegurar la integridad de las muestras biológicas, sin embargo, su sensibilidad y cobertura metabólica es muy limitada con respecto a la MS.

La MS se puede utilizar para el perfilado global (análisis no dirigido) y para el análisis dirigido requiriéndose una preparación específica de la muestra según el tipo de análisis que se vaya a realizar y el método de separación de los metabolitos (p.ej, CG o LC). Cuando la MS se acopla a métodos cromatográficos puede generar perfiles de miles de señales

(variables o *features*), lo que permite la detección de un gran número de metabolitos en un amplio rango de concentraciones desde nanomolar hasta milimolar. La MS junto con el método de separación adecuada pueden obtenerse perfiles de gran selectividad y cobertura metabólica. Sin embargo, el tratamiento de la muestra por MS es más complejo. En la práctica suele combinarse el análisis de la muestras mediante ambas plataformas (RMN y MS), lo que aumenta la cobertura metabolómica obtenida y por tanto las probabilidades de éxito a la hora de encontrar marcadores discriminantes entre clases de muestras (p.ej. sanos, enfermos).

6.1.3 Procesado de la señal

En primer lugar, hay que realizar un pre-procesado de la señal para posteriormente poderla analizar en los sistemas informáticos. El pre-procesado consiste en el ajuste de la línea de base, alineación de picos cromatográficos, normalización y selección de variables principales.

Una vez procesados los datos se realizará un análisis estadístico multivariante mediante la utilización de métodos no supervisados, análisis de los componentes principales (PCA) y métodos supervisados, análisis discriminante de regresión de mínimos cuadrados (PLS-DA) (218). En los métodos no supervisados, el modelo se construye sin tener información

previamente disponible sobre las muestras, mientras que en los métodos supervisados se dispone de información previa de las muestras (hígados esteatósicos frente a no esteatósicos), pudiendo entrenar al modelo para identificar las variables que mejor describan las diferencias de estas muestras.

Con la finalidad de reducir la dimensionalidad de cada muestra (cada una de ellas contiene miles de variables), se realiza el PCA, escogiendo las direcciones de máxima varianza de los datos generando así unas nuevas dimensiones. Los diagramas de scores de un análisis PCA permiten observar cómo se agrupan las muestras en función de la similitud o diferencia de su espectro de RMN y por ende de su metaboloma, mientras que los diagramas de *loadings*, indican cuales son las variables responsables de tal separación.

Para el análisis de los resultados, actualmente está generalizando el uso de métodos estadísticos de correlación (STOCSY), los cuales nos permiten conocer qué metabolito o conjunto, están correlacionados entre sí (219).

6.1.4 Identificación de biomarcadores

Para identificar los metabolitos de interés, se precisa que el espectrómetro de masas trabaje con una buena exactitud y resolución para poder comprar las señales obtenidas con

anotaciones en bases de datos y de este modo identificar los metabolitos que corresponde a cada señal. Si las señales coinciden se propone una identidad, que ha de ser confirmada con la inyección de estándares puros.

TOMA DE MUESTRAS



ADQUISICIÓN DE DATOS
ESPECTROMETRÍA DE MASAS
ESPECTROSCOPIA RMN



ALINEACIÓN DE PICOS



NORMALIZACIÓN/SELECCIÓN DE VARIABLES

DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES



GENERACIÓN DE LA HIPÓTESIS
VALIDACIÓN ESTADÍSTICA
VALIDACIÓN BIOLÓGICA Y/O EXTERNA

6.2 Aplicación de la metabolómica en hepatología

Utilizada como herramienta analítica, la metabolómica ha demostrado tener un gran poder de cribado en la identificación de biomarcadores metabólicos, ayudándonos a describir las vías metabólicas y a interpretar el funcionamiento de sistemas biológicos complejos. La metabolómica se ha ido aplicando cada vez más al estudio de las distintas enfermedades hepáticas. En la enfermedad del hígado graso no alcohólico, en estudios experimentales (220) se han identificado que los niveles anormales en suero de glucosa, lactato, glutamato y glutamina son los principales biomarcadores de dicha enfermedad. En el TH, el grupo de Silva et al. (221) realizaron un estudio de perfil metabolómico durante la IR hepática. Para ello, realizaron la inserción de un catéter de diálisis en el injerto tras la reperusión y determinaron los distintos metabolitos implicados en el proceso de la IR. Otros grupos han identificado también como marcadores de rechazo la presencia de niveles aumentados de glutamina y reducidos de urea tanto en orina como en suero (222).

Para realizar un análisis metabolómico se pueden analizar como hemos comentado anteriormente, tanto biofluidos como tejidos biológicos. Los biofluidos se utilizan con mayor frecuencia porque se pueden obtener con mayor facilidad y mediante técnicas menos invasivas. Sin embargo, hay que tener algunas precauciones, por ejemplo en el caso de la sangre, al

tratarse de un sistema de transporte, donde tanto materiales endógenos como exógenos son transportados e intercambiados por los diferentes órganos, la presencia de lesiones en otros órganos puede afectar a la metabolómica del plasma, es decir, podemos encontrar marcadores no específicos de la patología/condición bajo estudio. Por tanto, en ocasiones el análisis de muestras de tejido del órgano diana es más adecuado que el análisis de biofluidos ya que puede reflejar de un modo más directo y fidedigno las respuestas patofisiológicas del proceso de la enfermedad o función (223).

En un estudio de experimentación animal realizado por Feng et al. (224) se identificó cambios en un gran número de los metabolitos estudiados incluyendo: azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y ácidos orgánicos presentaron cambios significativos en el grupo de fallo hepático agudo, sin embargo, estos resultados diferían en cuanto a los cambios observados en plasma en comparación con las muestras de tejido hepático. En este estudio, los animales que habían recibido tratamiento con D-galactosamina/ lipopolisacáridos presentaban alteraciones en el metabolismo hepático con distintos resultados a los observados en los metabolitos plasmáticos.

En el año 2006 el grupo de Soga et al. (225) realizaron un estudio de experimentación animal en el que se determinaba el perfil metabolómico en hígado después de la inducción de hepatotoxicidad por acetaminofén. Identificaron 1859 picos de

metabolitos, entre los cuales se incluía la activación de la biosíntesis de la vía del ácido oftálmico (Opht A) a partir de 2-aminobutirato. Entre la glutamylcisteína y la glutatión sintasa, se produce una cascada de reacciones químicas que conduce a cambios en el nivel del Opht A. Consecuentemente el cambio en los niveles del Opht A indica el consumo de GSH. Posteriormente, se han publicado diversos artículos que corroboran el incremento de los niveles de Oph A de manera inversamente proporcional al consumo de GSH (226).

Para el estudio del OS se han testado también múltiples marcadores directos (como especies reactivas del oxígeno). La dificultad radica en que estas especies son muy inestables, por tanto se recurre a la medida de marcadores indirectos como por ejemplo el GSH, el Opht, MDA (malondialdehído) entre otros muchos (227).

Dado que muchos de los marcadores mencionados anteriormente están presentes en niveles bajos en las matrices biológicas, se necesitan técnicas altamente sensibles para su cuantificación. La cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS / MS) ha demostrado que es una técnica analítica potente para la determinación simultánea de gran número compuestos a baja concentración (228). Existen múltiples parámetros que son específicos y determinan individualmente cada una de las modificaciones oxidativas a distintos niveles biológicos como

ADN, proteínas y lípidos. En este sentido, A. Carretero et al. (229) desarrollaron una estrategia para determinar la homeostasis oxidativa y daños de origen oxidativo a diferentes niveles biológicos, es decir, en el ADN, proteínas y lípidos. Para ello, seleccionaron un conjunto de marcadores biológicos conocidos del OS y se analizaron mediante el método de rendimiento de ultra cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS). Este método dirigido, incluye los siguientes metabolitos:

- i) Sustancias que contienen azufre, como el glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) (230), S- (5-adenosil) -Lmethionine cloruro (SAM) y S- (adenosil) -L-homocisteína (SAH) (231).
- ii) Marcadores del daño oxidativo de proteínas: Fenilalanina (Phe) (232) y tirosinas (3- yodo-L-tirosina (I-Tyr), 3-nitro-tirosina (N-Tyr), 3-cloro-Ltyrosine (Cl-Tyr), DL-o-tirosina (o-Tyr), DL-m-tirosina (m- Tyr) y L-tirosina (p-Tyr))(42,233).
- iii) Marcadores del daño de ADN: 8-hidroxi-2 'desoxiguanosina (8-OHdG) y 2-desoxiguanosina (2-DG)(234).
- iv) Marcadores de peroxidación lipídica: Malondialdehído (MDA) y 8- isoprostaglandina-F2a (8-IsoPGF) (235,236).

También se incluyó en el conjunto de biomarcadores del OS al Oph A (225). El método analítico se validó siguiendo la guía para bioanálisis de la FDA. La ventaja fundamental de este método es que evalúa 16 biomarcadores del OS con un único procedimiento.

Con la aplicación de la metabolómica puede conocerse que metabolitos están implicados por ejemplo, en el daño producido por la IR, obteniendo una información más completa que aporta un mayor conocimiento de cada una de las fases implicadas en el OS que acontece al proceso del trasplante. El hecho de que parte de nuestros donantes actuales sean mayores, obesos, junto con la aceptación de donantes con criterios expandidos (61) ha llevado a que nos encontremos un mayor número de alteraciones biológicas o bioquímicas y por tanto una peor función del injerto. Actualmente, se utilizan hígados con factores de riesgo, significativamente más sensibles al daño por IR, lo cual aumenta la incidencia de DPI y su sobrevida. Nuestro trabajo consiste en intentar entender todos los mecanismos implicados en el proceso de OS que ocurre en el tiempo comprendido entre la extracción y el implante del órgano, para de este modo poder mejorar los resultados en este espectro de donantes, para ello nos ayudamos de las nuevas tecnologías como la metabolómica, y en concreto del método para determinar marcadores de OS anteriormente descrito (229).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1 Hipótesis.

La perfusión de NAC en vía venosa periférica, en vena mesentérica y en la solución de preservación de órganos en el donante ejerce un efecto protector sobre el hígado, con la consiguiente reducción de la incidencia de disfunción primaria del injerto.

2 Objetivos

2.1 Objetivo principal.

El objetivo principal del estudio es evaluar el efecto de la administración de n-acetilcistina en el injerto hepático mediante la determinación de la incidencia de disfunción primaria del injerto, de acuerdo con la clasificación de Olthoff (71).

2.2 Objetivos secundarios.

- i) Determinar y comparar los cambios bioquímicos, hematológicos y hemostáticos en ambos grupos de tratamiento.
- ii) Evaluar mediante el análisis metabolómico dirigido el potencial efecto protector de NAC en el daño de la IR del injerto.
- iii) Analizar la incidencia de complicaciones postoperatorias en ambos grupos de tratamiento.
- iv) Estudiar y comparar la existencia de cambios histopatológicos de IR en los dos grupos de estudio.
- v) Determinar la supervivencia del injerto y del paciente en ambos grupos de tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 Diseño del estudio

Se diseñó un ensayo clínico fase III, unicéntrico, aleatorizado, controlado, de grupos paralelos a fin de valorar la eficacia de la adición de NAC en el donante de órganos.

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó la incidencia de disfunción publicada por Olthoff (71), que se corresponde a un 23%, siendo similar a lo analizado previamente en nuestra serie (157). Considerando un descenso del 18% en la disfunción aguda postrasplante tras la administración de n-acetilcisteína en nuestro grupo y aceptando un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta inferior al 20%, en un contraste bilateral, se necesitan 107 sujetos en el primer grupo y 107 sujetos en el segundo para detectar como estadísticamente significativo la diferencia entre dos proporciones. Se estimó una tasa de pérdidas de seguimiento del 5%. Se usó la aproximación de ARCSINUS. Para su cálculo se utilizó la calculadora de tamaño muestral GRANMO versión 7.12. de Can Antaviana.

Se definieron dos grupos de estudio:

Grupo A (NAC SÍ): pacientes en los que se realizó la adición de NAC vía intravenosa periférica, en la vena mesentérica inferior y en la solución de preservación Celsior® .

Grupo B (NAC NO): sin adición de antioxidante ni placebo.

El análisis fue por protocolo, es decir que sólo aquellos

pacientes que completaron al menos un seguimiento de 4 meses fueron incluidos en el análisis final.

El estudio fue aprobado el 7 de abril del año 2011 por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe y la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, de acuerdo a la legislación vigente, el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos (EUDRACT 2011-000030-11) y registrado en <http://www.clinicaltrials.gov/> con el número ID#NCT01866644.

Todos los pacientes incluidos fueron previamente informados sobre el procedimiento y dieron por escrito su consentimiento a la entrada en el estudio.

Los injertos hepáticos que se incluyeron en el estudio fueron extraídos de los hospitales de nuestra comunidad que se encuentran acreditados (Tabla 8).

Tabla 8. Hospitales de la Comunidad Valencia acreditados para donación

Hospitales de la Comunidad Valenciana acreditados para donación

Hospital San Juan de Alicante
Hospital de Torrevieja
Hospital Vega Baja de Orihuela
Hospital General Universitario de Elche
Hospital General de Alicante
Hospital General de Elda
Hospital Clínico San Juan de Alicante
Hospital Marina Baixa de Villajoiosa
Hospital Virgen de los Líríos de Alcoi
Hospital de Denia
Hospital Lluís Alcanyís de Xàtiva
Hospital Francesc Borja de Gandia
Hospital La Ribera
Hospital de Requena
Hospital de Manises
Hospital Dr. Peset
Hospital Universitari i Politècnic la Fe
Hospital General Universitario de Valencia
Hospital Arnau de Vilanova
Hospital Clínico Universitario de Valencia
Hospital de Sagunto
Hospital de La Plana
Hospital Provincial de Castellón
Hospital Comarcal de Vinaroz

2 Criterios de inclusión y exclusión

2.1 Criterios de inclusión del hígado donante

i) Injertos considerados válidos para trasplante por el cirujano/a extractor (ausencia de fibrosis, esteatosis macrovesicular > 40%, arteriosclerosis de la arteria hepática, mala perfusión del injerto, tumor maligno) perfundidos con solución de preservación Celsior®.

2.2 Criterios de inclusión de los receptores para trasplante hepático

i) Pacientes de ambos sexos con edad superior a 18 años que se encuentran en lista de espera de TH o de hígado-riñón en la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia en el periodo de tiempo señalado.

ii) Pacientes que han firmado el consentimiento del estudio aceptando participar voluntariamente antes de realizar cualquier procedimiento del ensayo.

iii) Aloinjertos totales hepáticos procedentes de donante cadáver.

- iv) Aloiinjertos destinados al TH primario.

2.3 Criterios de exclusión del hígado donante

- i) Donantes con alergia conocida a NAC.
- ii) Donantes en asistolia.
- iii) Donantes hepáticos con patología amiloidótica.
- iv) Donantes hepáticos vivos.
- v) Donantes hepáticos en los que se va a realizar injertos reducidos o *split*.
- vi) Donantes procedentes de otros equipos de trasplante.

3 Criterios de exclusión de los receptores para trasplante hepático

- i) Pacientes receptores con alergia conocida a NAC.
- ii) Pacientes receptores con fallo hepático fulminante.
- iii) Pacientes receptores que precisen retrasplante.
- iv) Pacientes que colaboren en otro ensayo clínico.
- v) Pacientes que no estén dispuestos a colaborar en el estudio.

4 Criterios previstos para la retirada de los sujetos del estudio

De acuerdo con lo descrito en el real decreto, Declaración de Helsinki, los pacientes podían retirar su consentimiento para su participación, en cualquier momento, sin perjuicio, tenían derecho a retirarse del estudio en cualquier momento y por cualquier motivo.

Adicionalmente, el investigador podía retirar a un sujeto si, según la opinión clínica del investigador, estuviera en el mejor interés del sujeto o si el sujeto no podía cumplir con los requisitos del protocolo. El promotor también podía interrumpir el protocolo en cualquier momento justificándose tal acción.

5 Criterios para detener el protocolo

- i) Abandono voluntario del paciente.
- ii) Por incumplimiento o violación de las normas contenidas en protocolo
- iii) Cuando el paciente dejara de cumplir los procedimientos necesarios del ensayo podía ser retirado a criterio del investigador responsable.

Si se retiraba prematuramente a un paciente del ensayo, el investigador debía proporcionar la razón principal de la suspensión y como indican las normas de Buena Práctica Clínica, seguir los procedimientos según protocolos habituales de tratamiento de su patología.

6 Aleatorización

Aquellos pacientes que cumpliendo los requisitos y firmado el consentimiento entraron en el estudio fueron aleatorizados para evitar sesgos. El método de aleatorización utilizado fue el método de asignación aleatoria simple mediante una tabla de aleatorización obtenida por sistema informático. Los pacientes fueron asignados aleatoriamente al brazo experimental (NAC SÍ) o brazo control (NAC NO) en una ratio 1:1 mediante un software específico (ActionScript 3.0® tecnología Adobe Flex/Air) que genera una secuencia de números aleatorios por bloques (n=10).

De acuerdo con el tamaño muestral predeterminado, se generó una tabla de aleatorización. Cuando existía un posible donante, la coordinadora de trasplantes, que poseía la tabla de aleatorización, informaba al cirujano/a extractor/a y al enfermero/a que realizaba la perfusión de si es el donante era asignado al grupo NAC SÍ o NAC NO.

En dicha tabla de aleatorización, la coordinadora de trasplantes fue recogiendo el código de donante, el número de historia clínica del paciente receptor, la validez del hígado y asimismo, existía también un espacio para recoger los comentarios pertinentes.

7 Descripción de los tratamientos del ensayo

7.1 Rama experimental (Grupo NAC SI)

En el momento de iniciar la extracción del injerto, se realizaba la biopsia hepática con el nombre de NAC0-Código del donante. La biopsia se introducía en menos de 30 s en la nevera de nitrógeno líquido. A continuación, por vía periférica se administraban 30 mg/kg de NAC solución inyectable al 10% en un gotero 250 ml de suero glucosado al 5% preparado por la/el enfermero/a que realizaba la perfusión en el momento de iniciar la extracción. p.e. paciente de 80 kg, $30 \text{ mg} \times 80 \text{ kg} = 2400 \text{ mg}$ 1 ampolla = 300 mg Flumil® = 3 ml ; $2400 / 300 = 8$ ampollas.

Una vez finalizada la perfusión de NAC por vía periférica, se realizaba la biopsia hepática NAC1-Código del donante, se introducía igualmente en la nevera de nitrógeno líquido en menos de 30 s. A continuación el/la cirujano/a extractor/a, inyectaba con una jeringa de insulina estéril (aguja naranja, diámetro 0,5ml) en la vena mesentérica inferior, 1 ampolla NAC= 3 ml = 300 mg NAC, solución inyectable al 10%. En el primer gotero de solución de preservación (debido al escaso efecto de NAC en el injerto frío), se inyectaba otra ampolla de NAC únicamente por vena porta. Una vez finalizada la perfusión completamente (2000ml por porta y 4000 por aorta), se realizaba la biopsia hepática NAC2-Código de

donante que se introducía en menos de 30 s en la nevera de nitrógeno líquido.

Al final del implante, antes de iniciar el cierre de pared, se tomaba la biopsia NAC 3-Código del donante. Las 4 biopsias se marcaban con el código del donante biopsia 0, 1, 2 y 3 (Figura 6).



Figura 6. Biopsias hepáticas en criovial

7.2 Rama control (Grupo NAC NO)

Una vez disecada la vena mesentérica inferior, se realizaba la biopsia NAC1- Código del donante, que se introducía en la nevera de nitrógeno líquido en un tiempo inferior a 30 s.

Una vez finalizada la perfusión completamente (2000ml por porta y 4000 por aorta), se realizaba la biopsia hepática NAC2- Código de donante, (en menos de 30 s se introducía en la nevera de nitrógeno).

Al final del implante, antes de iniciar el cierre de pared, se tomaba la biopsia NAC 3-Código del donante, que se introducía en la nevera de nitrógeno líquido rápidamente.

Las biopsias eran 3 y se marcaban con el código del donante biopsia 1, 2 y 3.

Tabla 9. Administración de tratamiento

BRAZO EXPERIMENTAL	BRAZO CONTROL
Biopsia NAC0 injerto donante	----
NAC solución inyectable al 10% vía iv periférica 30 mg/kg	----
Biopsia NAC1 injerto donante	Biopsia NAC1 injerto donante
NAC vía vena mesentérica 300 mg, 1 ampolla de 3 ml solución inyectable al 10%	----
NAC 1 ampolla de 3 ml solución inyectable al 10% en el primero gotero de solución de preservación	----

Material y Métodos

hepática	
Biopsia NAC2 injerto donante	Biopsia NAC2 injerto donante
Biopsia NAC3 injerto en paciente receptor	Biopsia NAC3 injerto en paciente receptor

8 Enmascaramiento

En este ensayo clínico se realizó un ciego simple como enmascaramiento. Los/as cirujanos/as que realizaban el implante desconocían el grupo al cual había sido asignado el injerto. No se pudo realizar doble ciego debido a la complejidad de llevarlo a cabo en un acto tan complejo como es el TH.

9 Ficha técnica de n-acetilcisteína

9.1 Composición cualitativa y cuantitativa

Cada ampolla de 3 ml contiene 300 mg de acetilcisteína. Cada ml de solución inyectable contiene: Principio activo: 100 mg de acetilcisteína Excipientes: Edetato de disodio, 3 mg Hidróxido de sodio, pH 6,5.

9.2 Forma farmacéutica

Solución inyectable.

Aspecto de la solución: Solución transparente e incolora con un leve olor sulfúreo.

Ampollas de vidrio topacio con una solución transparente e incolora. Cada envase contiene 5 ampollas de vidrio topacio.

9.3 Autorización de la comercialización

Titular de la autorización de la comercialización: ZAMBON.

Fecha de la primera autorización: 1 de septiembre de 1965

Fecha de la última renovación de la autorización: 6 de septiembre de 2005.

10 Adquisición, acondicionamiento y etiquetado de la medicación

Las ampollas de NAC al 10% solución inyectable que se utilizaron en este ensayo clínico se depositaron en el almacén de fármacos situado en los quirófanos, cumplimentando las condiciones necesarias para su correcto almacenamiento. Cada ampolla utilizada fue etiquetada con su correspondiente código de donante al que fue destinado. Dichos envases fueron almacenados junto con el archivo del investigador hasta su correspondiente monitorización.

11 Almacenamiento y dispensación de la medicación

Las ampollas de NAC utilizadas en este estudio se almacenaron en botes codificados en el área de Ensayos Clínicos del Servicio de Farmacia; junto con la medicación de los ensayos clínicos, identificados con el código del proyecto.

La medicación se dispensó en el Servicio de Farmacia y se llevó un registro de dispensación.

12 Características de la población de estudio

Se incluyeron pacientes trasplantados en la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia, durante el periodo de tiempo comprendido entre el 25 de noviembre del año 2011 al 8 de junio del año 2015. Fueron valorados donantes hepáticos en los distintos hospitales de la Comunidad Valenciana (Tabla 8). De los 280 hígados valorados por el equipo de la Unidad HBP y Trasplante del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, 66 casos fueron excluidos por los motivos que se expresan en la siguiente tabla.

Tabla 10. Donantes excluidos durante el período de estudio

Causa	n
Esteatosis macrovesicular > 40%	30
Fibrosis	21
Arteriosclerosis significativa de la arteria hepática	6
Mala perfusión del injerto	1
Tumor abdominal con histología de malignidad durante la extracción	4
Utilización de solución de preservación distinta al <i>Celsior</i> ®*	4
Total	66

*Donantes excluidos del estudio pero no para la donación

Durante el período de estudio se realizaron en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe 315 trasplantes. Se excluyeron 101 pacientes por los motivos que se detallan a continuación.

Tabla 11. Receptores excluidos del estudio

Causa	n
Trasplantes pediátricos	27
Retrasplantes	27
Hígados reducido o Split	8
Donante vivo	2
Donante dominó	2
Negativa a participar en el estudio	1
Alérgico a NAC	1
Participar en otro ensayo clínico	27
Extracción realizada por otro grupo	6
Total	101

De ellos, 214 fueron incluidos en el estudio y aleatorizados en dos grupos. En el grupo A (NAC SÍ) se incluyeron 113 pacientes aleatorizados a la rama de tratamiento con NAC y en el grupo B (NAC NO) se incluyeron 101 pacientes que no recibieron ningún tratamiento adicional al protocolo habitual.

Para facilitar la lectura e interpretación del presente ensayo clínico, se muestra un diagrama para ilustrar el flujo de pacientes participantes en el estudio siguiendo el CONSORT statement (*Consolidated Standards of Reporting Trials*) (237)(Figura 7).

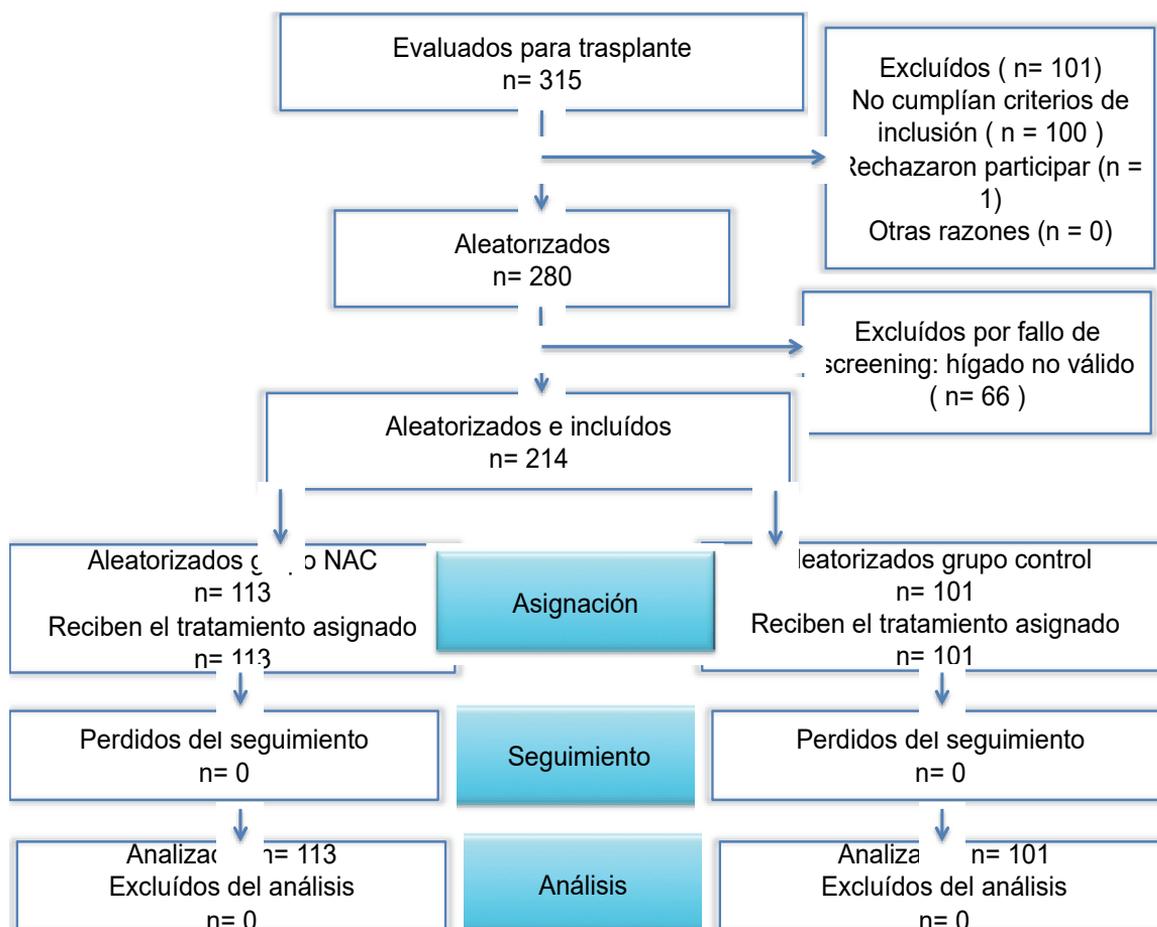


Figura 7. Diagrama CONSORT para ensayos clínicos

13 Técnica quirúrgica en el trasplante hepático ortotópico

El procedimiento del trasplante de hígado de donante cadáver fue realizado por seis cirujanos de la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante del Hospital Universitari y Politècnic La Fe de Valencia. El TH es una intervención quirúrgica mayor altamente estandarizada y que comprende los siguientes pasos:

13.1 Protocolo de actuación en el donante

Tan pronto se reconocen los posibles candidatos a la donación (110) se informa del suceso a la coordinación de trasplantes, a la vez que se inician los estudios para la emisión de tejidos y serología vírica.

Se atiende minuciosamente al donante con el fin de conservar de manera lo más fisiológica posible el estado de los órganos hasta el momento de su extracción. Para la extracción y preservación hepática se utiliza el procedimiento clásico de extracción múltiple de órganos descrito por T. Starzl et al. (238).

En la inducción anestésica se administra como profilaxis antibiótica una dosis de amoxicilina-clavulámico, o la antibioticoterapia que recomienden los estudios microbiológicos previos.

Se inicia la cirugía mediante la realización de una laparotomía media supra-umbilical amplia que permita la revisión completa de la cavidad abdominal junto con la realización de esternotomía. A continuación se explora la cavidad abdominal de manera completa mediante visualización y palpación bimanual de todos los órganos para descartar la existencia posibles lesiones tumorales. En el hígado se realiza la valoración de su morfología, coloración y consistencia a la presión de sus características macroscópicas junto con realización de una biopsia hepática, para la determinación histológica del grado de validez en caso de que el cirujano/a extractor/a lo considere necesario.

En el caso de que el donante sea aleatorizado como grupo de tratamiento (NAC SI), se realizará la primera biopsia hepática mediante tru-cut, en el segmento III de Couinaud, que se llamará NAC 0-código de donante e irá marcada como NAC0 seguida del número de código del donante, la cual que se introduce rápidamente en la nevera de nitrógeno líquido portable.

Una vez realizada la primera biopsia, en el grupo de tratamiento, se administra por vía venosa periférica 30 mg/kg de NAC solución inyectable al 10% en un gotero 250 ml de suero glucosado al 5% preparado por la/el enfermero/a que realiza la perfusión. Los pacientes NAC NO, carecen de administración de cualquier fármaco o placebo.

Se continua con la disección sistematizada habitual, hasta el momento de la disección de la vena mesentérica inferior, para la cual, se separa el duodeno del mesenterio del colon transverso, y se dispone este último horizontalmente orientando el colon ascendente hacia su posición original, se identifica el borde pancreático inferior y teniendo como referencia la 3ª y 4ª porción duodenal; cuidadosamente se disecciona la vena mesentérica inferior la cual se referencia con dos sedas. En el momento en que termina la perfusión periférica de NAC se realiza la segunda biopsia, en el segmento III de Couinaud, que se llama NAC1-código del donante. Tras realizar la segunda biopsia se administra una ampolla de 300 mg de solución inyectable al 10% (1 ampolla de 3 ml) directamente en la vena mesentérica inferior con una aguja de insulina.

En el caso del paciente aleatorizado sea asignado al brazo control como NAC NO, esta será la primera biopsia a realizar, tras referenciarse la vena mesentérica inferior. Todas las biopsias se introducen en la nevera de nitrógeno líquido portable rápidamente.

Tras identificarse los elementos del tronco celíaco, descartar variantes vasculares y realizar la colecistectomía si precisa, se procede al lavado de la vía biliar con suero fisiológico. Seguidamente se administran 3 mg/kg de peso de heparina sódica. Tras 3 min de infusión de heparina se inician las maniobras de canulación, clampaje de la aorta supracelíaca y

apertura de aurícula derecha y se inicia la hipotermia del hígado con hielo. La perfusión de solución de preservación (Celsior®) suele ser en una cantidad mínima de 4000 mililitros a nivel aórtico y 3000 mililitros a nivel portal. En el primer litro de solución de preservación portal se añade una ampolla de NAC (300 mg) en el caso del grupo de tratamiento (NAC SÍ), sin añadir ningún tratamiento adicional en el caso de que el paciente corresponda con el brazo de grupo control (NAC NO).

Cuando se finaliza de manera completa la perfusión de la solución de preservación, se realiza la última biopsia en el donante, que se realiza en el segmento III de Couinaud y va señalizada como NAC2-código de donante (Figura 8).



Figura 8. Extracción hepática con las muestras en cuña de tejido hepático en lóbulo hepático izquierdo

13.2 Protocolo de la cirugía de banco del injerto

En este momento se completa la disección de las estructuras del injerto para su implante en el receptor. A una temperatura de 4°C se disecan la vena cava supra e infradiafragmática con identificación y ligadura de venas diafragmáticas de drenaje previamente seccionadas. Se prepara la vena porta con perfusión de solución de preservación por la misma y también se realiza disección de tronco celíaco e identificación de arteria hepática y variantes vasculares.

13.3 Protocolo de actuación en el paciente receptor

Se realiza una incisión subcostal ampliada a la izquierda. Se seccionan los ligamentos y se identifican las estructuras a nivel del hilio hepático.

En primer lugar se realiza la ligadura de la arteria hepática y sus ramas, disección sin sección de la vena porta. A continuación se realiza la identificación y sección de la vía biliar. Mediante la técnica de “piggy-back” o de preservación de vena cava se completa la hepatectomía. Se seccionan entre ligaduras las venas retrohepáticas y el ligamento hepatocava hasta llegar a las venas suprahepáticas que se disecan en su totalidad. Se finaliza con la ligadura y sección proximal de vena porta junto con clampaje vascular y sección de las venas

suprahepáticas, confección de un orificio suprahepático común y extracción del hígado enfermo del receptor.

Se sigue con el implante hepático. En primer lugar se realiza anastomosis de la vena cava suprahepática del donante a la boca común de las venas suprahepáticas del receptor. Se continua con la anastomosis de la vena porta, al mismo tiempo que se realiza lavado por la misma con suero fisiológico. Tras completar la anastomosis portal se sutura la vena cava infrahepática y se procede al desclampaje de la vena cava suprahepática y de la porta seguidamente. Se sigue con la anastomosis arterial y biliar con la colocación de tubo en T de Kehr (López Andújar et al (239)). En los casos en que no se puede realizar anastomosis biliar por problemas técnicos o indicación (colangitis esclerosante primaria) se realiza anastomosis en Y de Roux.

Una vez finalizada la cirugía del implante, se realiza la última biopsia del estudio, también en el segmento III de Couinaud, antes de iniciar el cierre de pared, se rotula como NAC 3-Código del donante y se introduce en la nevera de nitrógeno líquido rápidamente, como las anteriores. Finalmente, se procede a la colocación de los drenajes, cierre de la pared abdominal y de la piel.

14 Cronograma de seguimiento tras el trasplante hepático

A todos los pacientes se les realizó pruebas analíticas de función hepática diariamente durante la primera semana tras la cirugía, cada 48 H en la segunda semana si seguían ingresados.

El seguimiento posterior se realizó en las consultas externas de la Unidad de Hepatología y Trasplante del Hospital Universitario La Fe de Valencia con analíticas semanales hasta la estabilización de los niveles de inmunosupresión. Las visitas de seguimiento se realizaron a los 15 días, mensual hasta los 3 meses, y trimestral hasta el año.

En aquellos pacientes en los que durante el seguimiento se sospechara alguna complicación biliar, el estudio de la vía biliar se completó con el estudio Doppler con el fin de descartar una posible complicación vascular. Como pruebas complementarias, en caso de ser necesarias, se dispuso de la angiografía por TC y de la arteriografía.

15 Protocolo de tratamiento postoperatorio en el receptor

15.1 Pauta de inmunosupresión

Todos los pacientes trasplantados hepáticos del Hospital Universitari i Politècnic La Fe siguen el siguiente protocolo de inmunosupresión en el postoperatorio inmediato.

En los pacientes con buena función hepática (MELD < 18 o Child B/C) se inicia la inmunosupresión con tacrolimus (TAC) + micofenolato (MMF). Se inician los anticalcineurínicos sobre las 24h del final de la intervención (18-30 h). Se añaden Esteroides (triple terapia) en las indicaciones de etiología autoinmunes y hepatitis fulminantes.

Excepciones a esta situación:

- i) En CHILD C o MELD > 18 se retrasa el inicio de los anticalcineurínicos al 3º día, a mitad de dosis. Se inicia con perdnisona (PDN) y MMF.
- ii) En situaciones con insuficiencia renal, pre/posttrasplante inmediato: aclaramiento de Creatinina < 60 o Creatinina >1.3 antes de iniciar anticalcineurínicos (diuresis postrasplante < 50 ml/h durante 6h, o elevación de Creatinina > 0,3 respecto a la basal en las primeras 24h), se inicia la pauta con basiliximab, PDN y MMF y se introducen

los anticalcineurínicos a mitad de dosis a partir del 4^o-7^o día. En caso de que no se observe mejoría de la misma, se individualiza el caso y se plantea la introducción de mTOR (Everolimus®). Si se produce deterioro de la función renal tras anticalcineurínicos éstos se suspenden y se reinician a mitad de dosis, una vez resuelta la insuficiencia renal. Se mantiene la doble terapia (MMF+PDN). Si no se resuelve a las 72h se discute y se individualiza cada caso.

Se inició la pauta inmunosupresora el primer día del trasplante con las siguientes dosis:

I.TAC (Prograf®): en pacientes con Child C o MELD ≥ 18 la dosis inicial de 0,10 mg/kg/día/sonda-oral, repartido en dos dosis a las 09 y 21h.

II.TAC de liberación prolongada (Advagraf® (ADV)): en pacientes con Child A/B o MELD < 18. No se puede dar por sonda, no aplicable cuando el paciente no puede tragar por estar intubado o por otro motivo. La dosis inicial es de 0,15 mg/kg/día/oral una sola vez al día 09h. Los niveles de TAC o ADV se ajustan entre 5-8 ng/ml.

III. Metilprednisolona: no se administra en la fase anhepática. Se inicia en la unidad de reanimación con dosis de 20 mg/día/iv a las 09h.

IV. Ciclosporina A (CsA): 10 mg/kg/día/sonda-oral en dos tomas diarias, (15 mg en pacientes con Kehr) a las 09 y 21 H. Los niveles de CsA se ajustan entre 200-250 ng/ml.

V. MMF: 1 g/12h/iniciar i.v. y se administra vía oral cuando existe tolerancia oral. Se mantiene la dosis a pesar de pancitopenia.

VI. Azatioprina: 1-2 mg/kg/día en una toma diaria. No se inicia cuando el recuento leucocitario es < 2.000 por mm^3 , o recuento plaquetar $< 30,000$ por microlitro de sangre.

VII. Basiliximab: 20 mg el día 0 en bolus y 20 mg el día + 4. En situaciones de insuficiencia renal.

VIII. Everolimus: se inicia con una dosis de 1 mg/12h/oral hasta conseguir niveles entre 3-8 ng/ml. Está contraindicado administrarlo en situaciones de insuficiencia renal con proteinuria y toxicidad hematológica.

15.2 Profilaxis antibiótica

Se realiza con amoxicilina/clavulánico que se inicia en quirófano antes de la incisión de piel y se mantiene 48-72h; excepto en casos de alergia, que se administra ciprofloxacino o en enfermos con sepsis biliar (estenosis biliares múltiples sean isquémicas (trombosis arterial) o no, con cefalosporina de tercera generación (ceftriaxona) si no hay cultivo o antibiograma previo.

15.3 Profilaxis tromboembólica

Se inicia cuando el Índice de Quick sea $> 50\%$ y no existan signos de sangrado posoperatorio, durante un mes, con clexane 40 mg/día. Se mantiene seis meses en casos de trombosis portal previa.

En caso de trombofilia se mantiene con acenocumarol y se siguen las pautas indicadas por la Unidad de Hemostasia.

En casos de pobre arteriolización (flujo < 100 ml/min) o dificultad técnica, se opta por tratamiento antiagregante con 100 mg/día de aspirina.

15.4 Profilaxis citomegalovirus

i) Profilaxis universal

Si el donante es CMV + / receptor CMV - : ganciclovir (Cymevene®) 5 mg/kg/24h i.v., ajustando la dosis según función renal, y pasar a oral con Valgancyclovir (Valcyte®) 900 mg/24h manteniendo el tratamiento 3 meses.

ii) Profilaxis selectiva

En casos de riesgo (terapia con Basiliximab (Simulect®) o tratamiento del Rechazo Celular Agudo con bolos de corticoides). Se sigue la misma pauta que para la profilaxis universal, pero sólo durante 14 días.

iii) Profilaxis anticipada

En el resto de casos, si existe una carga viral > 5000 U/ml. Se realiza profilaxis, según carga viral de citomegalovirus (CMV), realizando para ello control semanal durante su hospitalización (todos los lunes). Se sigue la misma pauta hasta negativizar la carga viral.

15.5 Profilaxis antifúngica

i) Candidiasis

Se realiza la profilaxis con fluconazol 4 mg/kg/día (dosis habitual 200 mg/día, no superando la dosis máxima de 400 mg/día) durante 30 días, en los casos de riesgo elevado cuando cumplan al menos 3 de los siguientes criterios:

Creatinina > 2,0 mg/dl.

Apertura de tubo digestivo o

hepaticoyeyunostomía. Utilización

perioperatoria de > 30 unidades de

hemoderivados (en las primeras 48h desde el inicio de la intervención).

Estancia hospitalaria previa en UCI.

Estancia postoperatoria en REA > 7 días.

Reintervención, durante su estancia hospitalaria.

Excepción:

Hepatitis fulminante siempre,

independientemente de los demás factores.

En todos los casos inicialmente se reduce los anticalcineurínicos a la mitad, y se controla la dosis según

niveles, debiendo volver a su dosis inicial en cuanto se retire el fluconazol.

15.6 Aspergilosis

Se realiza con Equinocandinas (Anidulafungina o Micafungina) a los pacientes cuando:

- i) Indicación por retrasplante, salvo el retrasplante urgente (antes del 7º día).
- ii) Disfunción inicial del injerto grave (ALT > 2000 U/l y índice de Quick < 40%) que no se normalice al quinto día.
- iii) Insuficiencia renal con necesidad de Diálisis o Ultrafiltrado continuo.

15.7 Profilaxis infección VHB

- i) Receptor HbsAg +
- ii) Pauta con Gammaglobulina 1.000 U (NIULIVA) en la fase anhepática y del día +1 a +7. Iniciar terapia antiviral con la que ya llevara el paciente previamente. Si no fuera así iniciar según nº historia: las pares con Entecavir (0,5 mg/día) y las impares con Tenofovir (300 mg/día) y ajustar según función renal.

- iii) Donante HbcAc + / Receptor HbcAc y HbsAc
- iv) Pauta con Lamivudina (Zeffix®) 100 mg/día, en cuanto inicie ingesta oral.

15.8 Protocolo de cuidados postoperatorios

Todos los pacientes siguen el mismo protocolo de tratamiento en el postoperatorio como se detalla a continuación:

- i) Nistatina bucal en suspensión 60 ml/8 h.
- ii) Clorhexidina tópica oral 12 ml/8 h.
- iii) Mupirocina nasal PDA 2% intranasal 3 gr/12 h.
- iv) Paracetamol iv 1 gr/8 h.
- v) Pantoprazol 40 mg iv/24 h.
- vi) Fisioterapia respiratoria.
- vii) Glucemias digitales por turno.

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

La recogida de variables clínicas y analíticas relacionadas con el donante, receptor y la cirugía del trasplante se diseñó una base de datos con el sistema IBM SPSS® Statistics (versión 20,0, IBM Corp, Armonk, New York). También fueron recogidas las complicaciones postoperatorias, el momento de su aparición y el tratamiento requerido para resolverlas.

17 Definición de las variables empleadas en el estudio

17.1 Variables relacionadas con el donante

De todos los donantes que fueron aceptados según los criterios de inclusión y exclusión descritos con anterioridad, se realizó una revisión completa de la anamnesis, medidas antropométricas y pruebas analíticas.

Las variables que se tuvieron en cuenta están reflejadas en la siguiente tabla (Tabla 12).

Tabla 12. Variables relacionadas con los donantes

Variables
Edad (años)
Sexo (masculino/femenino)
IMC (Kg/m ²)
Grupo sanguíneo (A/B/0)
Estancia en UCI (días)
PCR
Utilización de drogas vaso activas (si/no; tipo; dosis)
Na (mEq/L)
Bilirrubina (mg/dl)
GPT (U/L)
GOT (U/L)
Esteatosis (leve/moderada/severa)
INR

IMC: índice de masa corporal; INR: ratio normalizado internacional; Na: sodio; PCR: parada cardiorespiratoria; UCI: unidad de cuidados intensivos.

i) Edad

Registro de la edad del donante en el momento de la extracción. Variable cuantitativa continua, medida en número de años.

ii) Sexo

Registro del sexo del donante. Variable cualitativa nominal dicotómica registrada como masculino o femenino.

iii) Grupo sanguíneo

Registro del grupo sanguíneo del donante. Variable cualitativa nominal.

iv) Peso

Registro del peso del donante. Variable cuantitativa continua, medida en unidad de kilogramos de peso.

v) Talla

Registro de la talla del donante. Variable cuantitativa continua, medida en unidad de centímetros.

vi) Índice de masa corporal (IMC)

Registro del IMC del donante. Variable cuantitativa discreta que registra el IMC del donante calculado según la fórmula: $IMC = \text{peso (kilogramos)} / \text{altura}^2 \text{ (metros}^2\text{)}$.

vii) Causa del *exitus letalis*

Registro de la etiología de la muerte del donante.
Variable cualitativa nominal.

viii) Comorbilidades

Evaluación de la presencia de cardiopatía, hipertension arterial, diabetes mellitus, antecedentes de enfermedad oncológica y hábitos tóxicos.

Variable cualitativa nominal que registra la presencia y el tipo de patologías asociadas del donante.

ix) Estancia en unidad de cuidados intensivos

Variable cuantitativa continua, que registra el número de horas de estancia en la unidad de cuidados intensivos/reanimación del donante previas a la extracción del injerto.

x) Presencia de hipotensión durante la estancia en UCI

Registro de la presencia de episodio/s de hipotensión (tensión arterial $\leq 90/60$ mm Hg) en el donante durante la estancia en la unidad de cuidados intensivos. Variable cualitativa nominal dicotómica registrada como sí o no.

xi) Presencia de parada cardíaca

Registro de la presencia de episodio/s de parada cardíaca en el donante durante la estancia en la unidad de cuidados intensivos. Variable cualitativa nominal dicotómica registrada como sí o no.

xii) Presencia esteatosis hepática ecográfica

La clasificación de la esteatosis hepática en el donante se realiza mediante la ecografía en el donante el día de la donación, pudiendo ser:

Leve: el hígado es levemente hiperecogénico

Moderada: el parénquima hepático es más ecogénico y existe una ligera disminución de la visualización de los vasos intrahepáticos y una leve atenuación posterior del sonido.

Severa: la ecogenicidad está muy aumentada, lo que produce un hígado muy brillante y existe una visualización muy pobre de los vasos

intrahepáticos, un borramiento del diafragma y una marcada atenuación posterior del sonido.

xiii) Aspecto macroscópico del hígado

Valorado por el/la cirujano/a extractor/a en el momento de la extracción hepática.

Bueno: ausencia de esteatosis macroscópica, textura homogénea.

Regular: presencia de esteatosis o congestión a la exploración.

La determinación de los valores analíticos de los donantes se realizó en el laboratorio de bioquímica del hospital de procedencia del donante, siguiendo los métodos habituales de extracción, conservación y determinación de resultados. Las variables analítica con sus respectivos valores de normalidad se representan en Tabla 13.

Tabla 13. Parámetros analíticos recogidos en los donantes y receptores del estudio

VARIABLES ANALÍTICAS	VALORES DE NORMALIDAD
BIOQUIMICA	
Albúmina	3.3-5 g/dl
GPT	0-31 U/L
GOT	0-31 U/L
Bilirrubina	0,1-1.1 mg/dl
Creatinina	0,51-0,95 mg/dl
Urea	10-50 mg/dl
Glucosa	76-110 mg/dl
Na	135-150 mEq/L
K	3.5-5.5 mEq/L
Proteínas totales	6.6-8.7 g/dl
HEMOGRAMA	
Hematocrito	37-47 %
Hemoglobina	12-16 g/dl
Leucocitos	4.5 -10,8 x 10 ³ / μl
Plaquetas	150-400 x 10 ³ / μl
COAGULACIÓN	
TTPA	23-35 s
Fibrinógeno	170-437 mg/dl
INR	1-1.25
Índice de Quick	70-100 %
Tiempo de protombina	14.9

GPT: transaminasa glutámico pirúvica; GOT: transaminasa glutámico oxalacética; Na: sodio; K: potasio; INR: ratio normalizado internacional; TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activado.

17.2 Variables quirúrgicas consideradas en el estudio

Las variables quirúrgicas consideradas en el estudio se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 14. Variables quirúrgicas consideradas en el estudio

Variables
Duración de la cirugía (min)
TIF (min)
TIC (min)
TDA (min)
Anomalías vasculares del injerto
Salvacélulas (ml)
UCH (unidades)
UPFC (unidades)
UP (unidades)
Síndrome postreperfusión
Tipo de anastomosis biliar (Kehr/no Kehr/hepaticoyeyunostomía)

TIF: tiempo de isquemia fría; TIC: tiempo de isquemia caliente; TDA: tiempo de demora arterial; UCH: unidades de concentrados de hematíes transfundidos; UPFC: unidades de plasma fresco congelado transfundidas; UP: unidades de plaquetas transfundidas.

17.2.1 Tiempo de isquemia fría

Período de tiempo desde la perfusión del injerto con la solución de preservación en el donante, hasta el momento en el que se extrae el órgano de la nevera con hielo para comenzar el

implante en el receptor. Variable cuantitativa continua, registrada en unidad de min.

17.2.2 Tiempo de isquemia caliente

Período desde la extracción del injerto de la preservación con hielo hasta la reperfusión sanguínea portal, una vez realizadas las anastomosis venosas. Variable cuantitativa continua, registrada en unidad de min.

17.2.3 Tiempo de demora arterial

Período transcurrido desde la reperfusión sanguínea venosa hasta la reperfusión arterial. Variable cuantitativa continua, registrada en unidad de min.

17.2.4 Tiempo de isquemia total

Suma de todos los tiempos de isquemia fría y caliente. Variable cuantitativa continua, registrada en unidad de min.

17.2.5 Síndrome de reperfusión

Registro del diagnóstico de dicho síndrome definido como la caída del 30% de la presión arterial media del receptor mantenida durante más de 1 minuto, en los 5 min siguientes a

la reperfusión del injerto. Variable cualitativa nominal dicotómica registrada como sí o no.

17.2.6 Colación de tubo en T en la anastomosis biliar

Registro de la utilización del tutor biliar. Variable cualitativa nominal dicotómica registrada como sí o no.

17.2.7 Volumen de hematíes recuperados por salvacélulas

Variable cuantitativa continua, registrada en unidad de mililitros de hematíes recuperados con Cell Saver® Elite® Autotransfusion System Haemonetics Corporation, USA.

17.2.8 Concentrados de hematíes transfundidos

Registro de la cantidad de concentrados de hematíes transfundidos al receptor durante el procedimiento quirúrgico. Variable cuantitativa discreta registrada en número de unidades de concentrados de hematíes.

17.2.9 Unidades de plasma transfundidas

Registro de la cantidad de plasma transfundidas al receptor durante el procedimiento quirúrgico. Variable cuantitativa discreta registrada en número de unidades de concentrados de plasma.

17.2.10 Unidades de plaquetas transfundidas

Registro de la cantidad de unidades de plaquetas transfundidas al receptor durante el procedimiento quirúrgico. Variable cuantitativa discreta registrada en número de unidades de plaquetas.

17.3 Variables relativas al receptor

A todos los receptores presentes en lista de espera de trasplante tras haber sido aceptada su inclusión en el comité multidisciplinar de trasplante, se les realizó un protocolo pretrasplante (Protocolo trasplante, se adjunta en documento anexo). En este protocolo se recogen los antecedentes médico-quirúrgicos personales de cada paciente, la indicación del trasplante y las pruebas complementarias necesarias para su inclusión en lista de espera.

Las variables relativas al receptor antes y después del TH se describen en la siguiente tabla.

Tabla 15. Variables relativas al receptor antes y después del TH

Variables
Edad (años)
Sexo (masculino/femenino)
IMC (Kg/m ²)
MELD Score
CHILD-PUGH Score
CHC
Etiología-trasplante
VHB
VHD
VHC
VIH
OH
Poliquistosis
Autoimmune
TNE
DM
HTA
Encefalopatía
Grado I-V
Ascitis
Nº episodios
Paracentesis
Nº episodios
HDA
PBE
Tratamiento pre-trasplante
B-bloqueantes
Diuréticos
Antiviral
Urea/creatinina preTH (mg/dl)
AFP

IMC: índice de masa corporal; INR: ratio normalizado internacional; MELD: model for end stage liver disease; UCI: Unidad de cuidados intensivos; DM: diabetes mellitus; HTA: hipertensión arterial; HDA: episodios de hemorragia digestiva aguda; PBE: episodios de peritonitis bacteriana; TNE:

tumor neuroendocrino; TH: trasplante hepático; AFP: alfafetoproteína.

i) Edad

Registro de la edad del receptor en el momento de la extracción. Variable cuantitativa continua, medida en número de años.

ii) Sexo

Registro del sexo del receptor. Variable cualitativa nominal dicotómica registrada como masculino o femenino.

iii) Peso

Registro del peso del receptor. Variable cuantitativa continua, medida en unidad de kilogramos de peso.

iv) Talla

Registro de la talla del receptor. Variable cuantitativa continua, medida en unidad de centímetros.

v) Índice de masa corporal (IMC)

Registro del IMC del receptor. Variable cuantitativa discreta que registra el IMC del donante calculado según la fórmula: $IMC = \text{peso (kilogramos)} / \text{altura}^2 \text{ (metros}^2\text{)}$.

vi) Estadio Child

Cálculo a partir de la clasificación modificada Child-Pugh de gravedad de enfermedad hepática. Se realizó teniendo en cuenta los parámetros: grado de ascitis, concentraciones plasmáticas de bilirrubina y albúmina, tiempo de protrombina, y grado de encefalopatía. Variable cualitativa ordinal registrada como A, B, C.

vii) MELD

Modelo matemático de predicción de la supervivencia de una persona con enfermedad hepática terminal basado en valores de laboratorio rutinarios (bilirrubina, INR y creatinina). Es más objetivo y más preciso que la clasificación de Child-Pugh. A menor puntuación, menor probabilidad de mortalidad.

Fórmula matemática: $9.57 \times \ln(\text{creatinina (mg/dl)}) + 3.78 \times \ln(\text{bilirrubina (mg/dl)}) + 11.2 \times \ln(\text{INR}) + 6.43$.

viii) Etiología que llevó al trasplante

Variable cualitativa nominal que registra las causas que llevaron a la indicación del TH en cada paciente.

17.3.1 Variables consideradas en el seguimiento de los pacientes

A todos los pacientes se realizaba un control analítico a las 07:00 a.m. desde el primer día postrasplante, durante los 7 primeros días postoperatorios. Las variables analíticas consideradas incluían la determinación sanguínea de: hematocrito, hemoglobina, leucocitos, neutrófilos, plaquetas, bilirrubina total, GOT, GPT, FA, GGT, LDH, sodio, potasio, urea, creatinina, glucosa, colesterol, triglicéridos, albúmina, proteínas totales, índice de quick, tiempo de protombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, fibrinógeno e INR.

Además en el seguimiento de los pacientes incluidos en ambos grupos de estudio se determinaron las siguientes variables reflejadas en la siguiente tabla.

Tabla 16. Variables postoperatorias determinadas en el estudio

Variables del receptor en el período postoperatorio
Infusión de PG
Tipo de inmunosupresión
Retrasplante
Complicaciones Dindo-Clavien
Grado I-V
Rechazo
Tiempo en UCI (días)
EMH (días)

Exitus

PG: prostaglandinas; UCI: unidad de cuidados intensivos; EMH: estancia media hospitalaria.

i) Infusión de prostaglandinas (PG)

Variable cualitativa nominal que registra la necesidad de infusión de prostaglandinas por DPI en el postrasplante hepático inmediato.

ii) Tipo de inmunosupresión

Variable cualitativa nominal que registra el tipo de inmunosupresión recibida en cada paciente.

iii) Retrasplante

Definido como la función hepática insuficiente para mantener con vida al paciente.

Se puede clasificar en precoz (ocurre en los primeros 90 días tras el trasplante) o tardío (ocurre pasados los 90 primeros días) (240).

iv) Estancia hospitalaria

Variable cuantitativa continua que registra en número de días la estancia hospitalaria del paciente una vez realizado el TH.

v) Complicaciones arteriales

Presencia de complicación: variable cualitativa dicotómica

registrada como sí o no. Refleja la presencia o ausencia de las complicaciones arteriales. Tipo de complicación: variable cualitativa nominal que registra las complicaciones arteriales. Pueden ser precoces, sucedidas en el periodo postoperatorio inmediato (0-90 días postrasplante) o tardías (sucedidas tras el 90 día postrasplante). Podrán ser completas (trombosis arterial) o parciales (estenosis de la arteria hepática):

Trombosis arterial: flujo arterial ausente constatado mediante ecografía Doppler en las primeras 48h. Si el flujo arterial no es patente, la realización de una arteriografía es obligada para confirmar el diagnóstico de ausencia de flujo.

Estenosis de la arteria hepática: el diagnóstico de sospecha se establece por ecografía Doppler y se confirma por CRM o TC con estudio vascular. Se considera estenosis cuando existe una reducción de más del 50% de la luz arterial.

vi) Complicaciones venosas

Presencia de complicación: variable cualitativa dicotómica

registrada como sí o no. Refleja la presencia o ausencia de las complicaciones venosas. Tipo de complicación: variable cualitativa nominal que registra las complicaciones venosas.

Trombosis venosa: el diagnóstico se realiza mediante la realización de ecografía Doppler abdominal y se confirma con la realización de una TC con estudio vascular.

Estenosis venosa: el diagnóstico se realiza mediante la realización de ecografía Doppler abdominal y se confirma con la realización de una TC con estudio vascular.

vii) Complicaciones biliares

Presencia de complicación biliar: variable cualitativa dicotómica registrada como sí o no. Refleja la presencia o ausencia de las complicaciones biliares. Tipos de complicación biliar: variables cualitativas dicotómicas registradas como sí o no. Refleja la presencia o ausencia de complicaciones biliares.

viii) Clasificación de gravedad de complicaciones quirúrgicas

Complicaciones acontecidas en los 90 primeros días postrasplante. variable cualitativa dicotómica registrada como sí o no. La clasificación de gravedad de

complicaciones postoperatorias que se utilizó fue la de Dindo-Clavien descrita en el año 2004 (241) y se detalla a continuación.

Grado I : desviación del postoperatorio normal, que no requiere de tratamiento farmacológico, quirúrgico o endoscópico o intervenciones radiológicas. Como fármacos permitidos se aceptan antieméticos, antipiréticos, analgésicos, diuréticos, electrolitos y la fisioterapia.

Grado II: se requiere tratamiento farmacológico con drogas diferentes a las permitidas en la complicaciones grado I. Incluye transfusiones y nutrición parenteral.

Grado III: complicación que requiere intervención quirúrgica, radiológica o endoscópica.

IIIA: no requiere anestesia general.

IIIB: requiere anestesia general.

Grado IV: complicación que amenaza la vida del paciente que requiere ingreso en UCI.

IV a: disfunción de un órgano (incluye diálisis)

IVb: fallo multiorgánico

Muerte del paciente.

ix) Control y seguimiento de los pacientes analizados

Conjunto de variables que registran el proceso de seguimiento de los pacientes estudiados.

Reintervención: variable cualitativa nominal dicotómica que mide la presencia de reingresos de los pacientes estudiados. Registrada como sí o no.

Número de reintervenciones: variable cuantitativa discreta que registra el número total de reingresos de cada paciente.

Rechazo: presencia de signos de rechazo diagnosticado mediante biopsia. Variable cualitativa nominal dicotómica que mide la existencia de rechazo celular del injerto. Puede ser precoz del día 0 al 90 postrasplante o tardía tras los 90 primeros días del trasplante.

Recidiva de VHC del injerto mediante biopsia: variable cualitativa nominal dicotómica que mide la existencia de reinfección del injerto por VHC.

17.3.2 Disfunción primaria del injerto

La variable principal a analizar es la disfunción. De las múltiples opciones para evaluar la disfunción, en este ensayo se ha optado por evaluar las principales definiciones de disfunción descritas en la literatura:

- i) Makowka (60): GPT > 2500 IU/L o GOT > 3500 UI/L en el p.o. inmediato.
- ii) Mor (63): GOT > 2000 UI/L el primer día p.o.
- iii) Nanashima (69): GOT/GPT > 1500 UI/L durante los tres primeros días p.o.
- iv) Olthoff (71) se considerará disfunción hepática, la presencia de un valor de transaminasas > 2000 UI/L del día 1-7 postoperatorio o bilirrubina total (BT) > 10 mg/dl o international normalized ratio (INR) > 1.6, ambos únicamente en el 7º día p.o. (véase 1.2.2).
- v) MEAFscore (72): GPT_{máx 3º día p.o.} + score INR máx 3º día p.o. + score bilirubin 3º día p.o.

18 Toma de muestras de tejido hepático para estudio anatomopatológico

De acuerdo con el protocolo de extracción hepática habitual, se realizaron 2 biopsias hepáticas mediante realización de tru-cut o cuña en lóbulo hepático izquierdo. La primera biopsia se realizó pre-perfusión hepática y la segunda post-reperfusión hepática. Fueron introducidas en formol y remitidas al servicio de anatomía patológica para la realización de un análisis diferido.

Estas muestras se fijaron en formol durante 60 min aproximadamente. Posteriormente, se deshidrataron por alcoholes de 70, 96 y 100 grados, con una duración de 60 min cada uno. A continuación, se pasaron por xilol (dimetilbenceno) y se incluyeron en parafina.

Seguidamente se realizaron cortes a 2-3 micras con micrótomo y se realizó tinción con Hematoxilina-Eosina.

En el caso de las biopsias post-reperfusión, se efectuó también técnica de histoquímica de Tricromo de Masson, con cortes a 4 micras, en las muestras previamente procesadas.

Estas biopsias fueron evaluadas por dos patólogos dedicados al estudio de la patología hepatobiliopancreática y trasplante.

Se recogieron las siguientes variables:

- i) Tamaño de la biopsia en centímetros (cm)
- ii) Presencia de dilatación sinusoidal:
 - a. Leve: afectación centrolobulillar en 1/3 del lobulillo.
 - b. Moderada: afectación centrolobulillar en 2/3 del lobulillo.
 - c. Grave: afectación de todo el lobulillo.
- iii) Existencia de balonización (242): marcada/leve. Se describe balonización como el aumento del volumen celular, pudiendo ser fisiológico o como respuesta al OS. Morfológicamente se observan células más grandes, 2 ó 3 veces el tamaño normal de un hepatocito, con amplio citoplasma claro, vacuolado. Ultraestructuralmente se traduce en edema mitocondrial con proyecciones de la membrana celular. Este cambio puede verse aisladamente, en grupos celulares o ser una manifestación difusa.
- iv) Evaluación del grado de esteatosis hepática (macro y micro), según esquema de Brunt (243):

Grado 1: menos del 5%

Grado 2 : del 5-33%

Grado 3: de 33-66%

Grado 4: mayor del 66%

v) Valoración de la existencia de binucleación hepatocitaria en 10 campos a 40x (189):

- a. Inferior a 3
- b. De 3 a 6
- c. De 6 a 10
- d. Superior de 10

vi) Determinación de la fibrosis hepática, según sistema de METAVIR (244) o Scheuer simplificada (245):

- a. Fibrosis 0: portal sin expansión
- b. Fibrosis 1: expansión fibrosa
- c. Fibrosis 2: fibrosis con septos
- d. Fibrosis 3: puentes de fibrosis porto-portales
- e. Fibrosis 4: cirrosis

vii) Evaluación de la exudación de neutrófilos a nivel hepatocitario, iniciándose a nivel perivenular y extendiéndose a zonas medias y zonas portales.

Teniendo el cuidado y la precaución de no confundir los agregados de neutrófilos presentes a nivel sinusoidal, signos histológico frecuentes en las hepatitis post quirúrgicas secundario al efecto de la anestesia.

viii) Presencia de daño severo de IR, evaluado mediante la presencia de necrosis coagultiva o hemorragia, principalmente en zonas centrales.

19 Recogida de muestras de tejido hepático para el análisis metabólico

El protocolo de recogida de la muestra fue el siguiente:

- i) Tras la toma de las biopsias correspondientes descritas en el apartado 2.2.1 y 2.2.3. El tamaño de las biopsias suele oscilar entre 4-8 mm x 4-8 mm con un peso entre 20 y 100 mg.
- ii) Estas muestras son introducidas en crioviales como se muestra en la siguiente imagen.

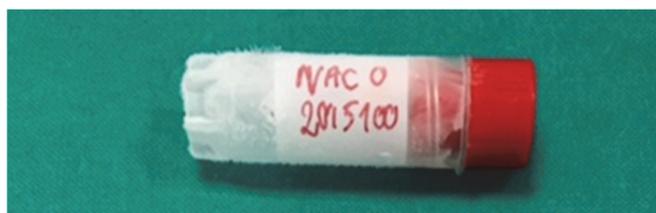


Figura 9. Criovial donde se conservan las muestras de tejido hepático

- iii) Tras rotular el criovial con el código de donante se deposita en un tanque de nitrógeno líquido.

El tanque de nitrógeno es transportado al Instituto para la investigación del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, donde la técnica de laboratorio se encarga de la recepción, registro y almacén de muestras en otro tanque de nitrógeno hasta su análisis por MS.

20 Análisis metabolómico dirigido de las muestras

20.1 Productos químicos

Como estándares analíticos se utilizaron: GSSG, GSH, SAM, HSA, I-Tyr, 8-OH-DG, 2-DG, MDA, NTyr, Cl-Tyr, o-Tyr, Tyr-m, p-Tyr, Phe procedían de Sigma-Aldrich (Madrid, España), Opht A de Bachem (Bubendorf, Suiza), y 8-IsoPGF de Cayman Chemical (Michigan, EE.UU.) se utilizaron como patrones analíticos. Los estándares internos (IS) se fueron: L-phenylalanine- d5 (Phe-d5) de CIL (Andover, EE.UU.) y 8 Isoprostaglandina-F2a-d4 (8-IsoPGF-d4) de Cayman Química (Michigan, EE.UU.). El ácido fórmico (FA), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), N-etil-maleimida (NEM), e hidroperóxido de cumeno de Sigma-Aldrich, hidróxido de sodio (NaOH) a partir de Merck, y medio de células de cultivo de Gibco (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido) también se utilizaron. LC-MS de grado metanol (MeOH), agua y acetonitrilo (ACN) fueron adquiridos de Fisher Scientific (Loughborough del Reino Unido).

20.2 Preparación de las soluciones estándar

Las soluciones stock estándar para cada uno de los marcadores del OS e IS se prepararon a una concentración de 1 mg/mL en el disolvente adecuado, siguiendo las recomendaciones

indicadas por el fabricante. Se preparó una solución mixta de todos los analitos testados mediante una solución tamponada con fosfato a un pH de 7 (PBS) a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada compuesto. Las muestras siguientes de los analitos se prepararon mediante soluciones seriadas 1:2 (v/v) con 1 mM DNPH y 10 mM NEM en PBS con rangos de concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las soluciones para la calibración de IS se prepararon añadiendo 100 μg de la solución stock (0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 100 μg de cada solución de estudio, por tanto, se mantiene un nivel de concentración de IS de 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en todos los puntos de calibración. Para la validación del método, se realizaron controles de calidad (QC) a concentraciones baja (25 ng/mL), media (100 ng/mL) y alta (500 ng/mL) en PBS bajo condiciones experimentales, incluyendo IS a 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 mM DNPH y 10 mM NEM.

20.3 Preparación de las muestras para el análisis

La homogenización y extracción de los metabolitos a partir de las muestras de tejido hepático se realizó de acuerdo con el protocolo que se detalla a continuación, que ha sido previamente publicado (228).

- i) Tras la correcta descongelación del tejido hepático (20-100 mg) se coloca el mismo en tubos de 2

ml que contienen bolsas de cerámica (Precellys kit CK14, France), como se muestra en la siguiente imagen.

ii) Se añaden de manera secuencial los siguientes compuestos: 6 volúmenes de PBS (m/v) que contenían 50 mM de NEM.

iii) El tejido hepático se homogeneiza en dos ocasiones de 25 s de duración a 6000 revoluciones por minuto en un sistema Precellys 24 Dual equipado con sistema de refrigeración Cryolys.

iv) Una vez homogeneizado el tejido es centrifugado durante 5 min a 3000 revoluciones por minuto (3000 g). El sobrenadante que se produce, se transfiere a un tubo Eppendorf limpio de 2 ml.

v) De los pellets de tejido sólido se vuelve a extraer muestra tras añadir 4 volúmenes de PBS que contienen 50 mM de NEM.

vi) Se realiza una segunda centrifugación y los nuevos sobrenadantes, se mezclan con los previos. Los extractos de tejido hepático se almacenan en tubos Eppendorf de 2ml a -80°C hasta su análisis.

vii) Previamente al análisis, las muestras líquidas de tejido hepático se descongelan en hielo,

centrifugándose durante 5 min a 10000 g y transferidas a continuación a viales de UPLC.



Figura 10. Tubos Precellys kit CK14

Para realizar la determinación correcta de los biomarcadores en las distintas matrices biológicas se prepara la muestra en 3 diferentes fracciones diferentes:

- i) Fracción I: para metabolitos diluidos se realiza una concentración previa. Los metabolitos determinados en esta fracción son SAM, SAH, 8-OH-dG, 2-dG, 8-IsoPGF, I-Tyr, N-Tyr, Tyr-Cl, o-Tyr, y m-Tyr.
- ii) Fracción II: para metabolitos concentrados, se realiza una dilución, los metabolitos de alta concentración Phe y p-Tyr.
- iii) Fracción III: obtenido después de una hidrólisis básica y un paso de derivación (246) para determinar

específicamente MDA dada su inestabilidad. Los analitos restantes (es decir, GSH, GSSG, y Opht A) se analizaron en cualquier fracción I o fracción II, dependiendo de la matriz de la muestra ya que sus niveles de concentración puede variar considerablemente.

Tabla 17. Preparación de las muestras antes del análisis UPLC-MS/MS

BIOLOGICAL MATRIX	SAMPLE PRE-TREATMENT	FRACTION I	FRACTION II	FRACTION III
 <p>LIVER TISSUE</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Weigh 50-100 mg of frozen tissue. 2. Homogenize with 10 vol. (w/v) of 50 mM NEM in PBS. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Add 800 μL of MeOH to 200 μL of sample and incubate at -20°C for 20 min. 2. Centrifuge^a. 3. Evaporate the supernatant to dryness. 4. Reconstitute in PBS (50 μL) containing IS (200 ng/mL). 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Add 245 μL of MeOH to 5 μL of sample and keep at -20°C for 20 min. 2. Centrifuge^a. 3. Mix 50 μL of supernatant with 50 μL of PBS plus IS at 400 ng/mL. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Add 25 μL of 6 M NaOH to 100 μL of sample and incubate at 60°C for 30 min. 2. Add 60 μL of PCA 35% (v/v). 3. Centrifuge^a. 4. Mix the supernatant (185 μL) with 15 μL of PBS containing IS (2660 ng/mL) and 5 mM DNPH and incubate at 37°C for 60 min.

20.4 Análisis UPLC-MS/MS

A partir del tejido hepático se adquieren los perfiles metabólicos mediante un cromatógrafo Acquity UPLC (ultra performance liquid chromatography) de Waters (HMDS Waters, UK), conectado a un espectrómetro de masas de tipo TQ-S Waters Xevo también de Waters y la obtención de los datos se realizó mediante el software Masslynx v4.1.

La columna analítica fue un T3 Acquity UPLC HSS 1,8 m (2,1 ×

100 mm) también de Waters. Las fases móviles A y B consistieron en agua desionizada y ACN, respectivamente, ambos con 0,1% de FA. Las bombas suministraron la siguiente gradiente en 60 °C a una velocidad de flujo de 0,3 mL / min: 0-2 min, 5% en fase B; 2-3.5 min gradiente lineal de 5 a 95% de fase B, retenida durante 2 min; 5.5-6 min gradiente lineal de 5% de fase B, que fue retenida durante 1 min, proporcionando así un tiempo de ejecución de 7 min. La inyección de volumen fue a 5 µl y la temperatura que se fijó en el automuestreador fue de 4 ° C. El nitrógeno fue suministrado por un generador de alta pureza de Teknokroma (Barcelona, España), que se utiliza como gas de fuente. El argón (99,9999%) de Air Liquide (Valencia, España) fue utilizado como el gas de colisión. Los analitos fueron determinados por ionización por electrospray (ESI) utilizando monitorización de reacción múltiple (MRM) tanto en los modos de iones positivos como negativos, dependiendo del analito. La temperatura de la fuente fue de 150 ° C, la temperatura de desolvatación fue de 380 °C y el flujo de gas de desolvatación fue fijado en 800 L se utilizaron / h. Los parámetros MS adicionales, las transiciones MRM, así como los voltajes de colisión, se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 18. MRM de los parámetros seleccionados para los 16 biomarcadores del OS y 2 ISs

Compound	ESI mode ^a	MRM transition: (<i>m/z</i>) precursor->(<i>m/z</i>) product	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
GSSG	+	613.2>355.0	60	15
GSH	+	433.1>201.0	20	20
SAM	+	398.9>136.0	22	17
SAH	+	385.1>136.0	35	25
I-Tyr	+	308.1>291.0	40	15
Opht A	+	290.2>161.1	15	15
8-OH-dG	+	284.0>168.0	30	15
2-dG	+	268.0>152.0	25	15
MDA	+	235.0>159.0	30	30
N-Tyr	+	227.1>181.0	25	10
Cl-Tyr	+	216.0>170.0	30	15
<i>o</i> -Tyr	+	182.1>136.0	20	10
<i>m</i> -Tyr	+	182.1>136.0	20	10
<i>p</i> -Tyr	+	182.1>136.0	20	10
Phe	+	166.1>120.1	20	20
8-IsoPGF	-	353.2>193.3	35	25
Phe-d5 (IS) ^b	+	171.1>125.1	20	20
8-IsoPGF-d4 (IS) ^b	-	357.2>197.3	35	25

20.5 Optimización de la determinación de MDA y GSH

Dada la inestabilidad del GSH y del MDA se requirió realizar una etapa de derivatización para la determinación de estos metabolitos más lábiles, ya que la derivatización mejora la estabilidad del compuesto, su detección y cuantificación. De este modo, MDA y GSH fueron determinadas después de una reacción con DNPH (246) y NEM, respectivamente. Para optimizar el procedimiento de derivatización, se prepararon soluciones MDA y de GSH por separado en PBS (1 mg / mL) y se analizaron después de la reacción con el reactivo de derivatización correspondiente a diferentes concentraciones

(es decir, 0,25 a 2 mM DNPH y 2.5 a 50 mM NEM). Para MDA, el mejor rendimiento derivatización se obtuvo utilizando 0,5-2 mM de DNPH, mientras que la mejor respuesta para GSH se obtuvo usando NEM dentro del intervalo de 5-10 mM. Por lo tanto, para asegurar la derivatización completa de MDA y GSH en el matrices biológicas analizadas, se seleccionaron 1 mM DNPH y NEM 10 mM. Además, las posibles interferencias derivadas del uso de los reactivos de derivatización en la determinación se verificaron con los otros analitos. Con este fin, las distintas soluciones que contienen todos los analitos diana (que van desde 0,125 a 1 mg / ml) fueron tratados con 1 mM DNPH (a), 10 mM NEM (b), ambos mM DNPH 1 mM y NEM 10 (c), o sin ningún reactivo de derivatización (d). Además de MDA y GSH, la respuesta de los analito no se vió significativamente afectada por la presencia o ausencia de la derivatización de los reactivos seleccionados.

20.6 Validación del método UPLC-MS/MS

El método bioanalítico desarrollado fue validado en términos de linealidad, límite inferior de cuantificación (LLOQ), exactitud, y precisión siguiendo los criterios de cumplimiento establecidos en la "Guía para la industria-Bioanalítica Validación de métodos" "Food and drug administratition" (FDA) (247). Para tener en cuenta los posibles efectos de la matriz, se agruparon muestras de tejido hepático (pool de

muestras), para ser luego fortificada a tres concentraciones diferentes de cada compuesto (es decir, baja (25 ng / ml), medio (100 ng / ml) y alta (500 ng / mL)), de acuerdo con el procedimiento descrito por Matuszewski et al (248).

Las muestras agrupadas fortificadas y los blancos (muestras agrupadas no fortificadas) fueron analizadas por medio del método UPLC-MS / MS, evaluándose las recuperaciones que se obtuvieron.

Los efectos de la matriz variaron de 80,0 a 124,2% para todos los compuestos en todas las matrices biológicas ensayadas, por lo tanto ni la mejora de ionización ni la supresión de la ionización afectó a la determinación de los analitos diana en las condiciones analíticas descritas.

La precisión y la exactitud se evaluaron mediante la aplicación del método desarrollado para analizar las muestras de control de calidad enriquecidos con las cantidades conocidas de los biomarcadores diana. La siguiente tabla 19 muestra los resultados obtenidos en el estudio de precisión.

Tabla 19. Resultados obtenidos tras evaluar la exactitud del método UPLC-MS/MS

Analyte	Accuracy ^a								
	Batch 1			Batch 2			Batch 3		
	% (H)	% (M)	% (L)	% (H)	% (M)	% (L)	% (H)	% (M)	% (L)
GSSG	3.3	-6.5	-2.5	4.5	-7.3	-7.1	1.7	-5.4	-1.8
GSH	9.9	12.8	8.8	9.4	-6.5	-1.5	3.7	-8.2	-5.2
SAM	-9.2	-8.0	-15.6	-3.5	-5.4	-14.6	-12.5	-4.3	-13.7
SAH	0.7	-1.5	-3.2	1.8	-8.4	-9.4	1.3	-0.6	-6.5
I-Tyr	-0.3	6.3	6.5	4.2	0.5	13.1	-12.9	-6.1	-0.5
Opht A	-2.5	-8.2	-9.0	9.9	9.1	12.9	6.5	13.0	11.7
8-OH-dG	2.4	-2.1	-16.6	-8.9	1.1	13.9	-11.2	1.3	19.8
2-dG	6.2	-5.8	-7.3	-2.8	5.7	-1.2	-2.8	5.7	-1.2
MDA	9.4	-0.5	5.3	-5.8	-15.0	3.4	3.1	-1.5	-5.2
N-Tyr	-3.1	-10.4	-11.3	-6.7	-7.7	2.5	-13.3	-12.4	-4.8
Cl-Tyr	-0.8	-5.1	-9.0	-1.3	-3.9	-7.6	-6.8	-10.0	-15.8
o-Tyr	-1.6	-2.4	-5.6	-2.3	-4.0	-6.1	-6.3	-7.3	-9.0
m-Tyr	-0.5	-3.0	-10.6	0.5	-2.5	7.0	-5.6	-1.0	18.8
p-Tyr	-3.0	-5.8	-7.3	-8.6	-8.5	-14.8	-7.2	-8.7	-17.4
Phe	0.9	-2.5	-6.7	-3.9	-2.6	-6.4	-4.2	-3.4	-5.9
8-IsoPGF	-9.1	-1.1	12.7	-5.8	-8.4	7.5	-6.1	-0.8	10.2

^a Expressed as relative measurement error (RME, %), which was calculated as the ratio of (the calculated concentrations/nominal concentrations) to the nominal concentration, multiplied by 100 (mean values, n=5). Nominal concentrations were 500 ng/mL (high concentration), 100 ng/mL (medium concentration), and 25 ng/mL (L. concentration)

H high concentration, M medium concentration, L low concentration

El error de medición relativa (RME) fue desde -16.6 a 19,8%, mostrando que no existían diferencias significativas entre los valores de concentración encontrados y los obtenidos. Además, como se ve en la Tabla 19, tanto la repetitividad y la reproducibilidad fueron determinadas a los tres niveles de concentración niveles (n=5) para todos los analitos, proporcionando así unos valores de desviación estándar inferiores a 17,2 y 16% y unos valores de desviación estándar (RSD) inferiores a 17,2 y 16,0%, respectivamente.

Las curvas de calibración fueron lineales para todos los biomarcadores en un rango de concentración de 2 ó 3 órdenes de magnitud, dependiendo del compuesto, con un coeficiente de regresión superior a 0,994 en todos los casos. El límite de

detección (LOD), el LLOQ, y el límite superior de cuantificación (ULOQ) de la metodología también se determinaron (Tabla 19).

Cabe señalar que los bajos valores LLOQ obtenidos, iban desde 1.2 a 19,5 ng / mL, dependiendo del compuesto. La aplicación del método UPLC-MS/ MS fue desarrollada tanto in vitro como en sistemas biológicos in vivo.

El método fue validado mediante el análisis de distintas muestras biológicas problema. A continuación se presentan los resultados de la determinación de los distintos marcadores del OS en muestras de tejido hepático procedentes de donantes sanos y donantes con patología NASH.

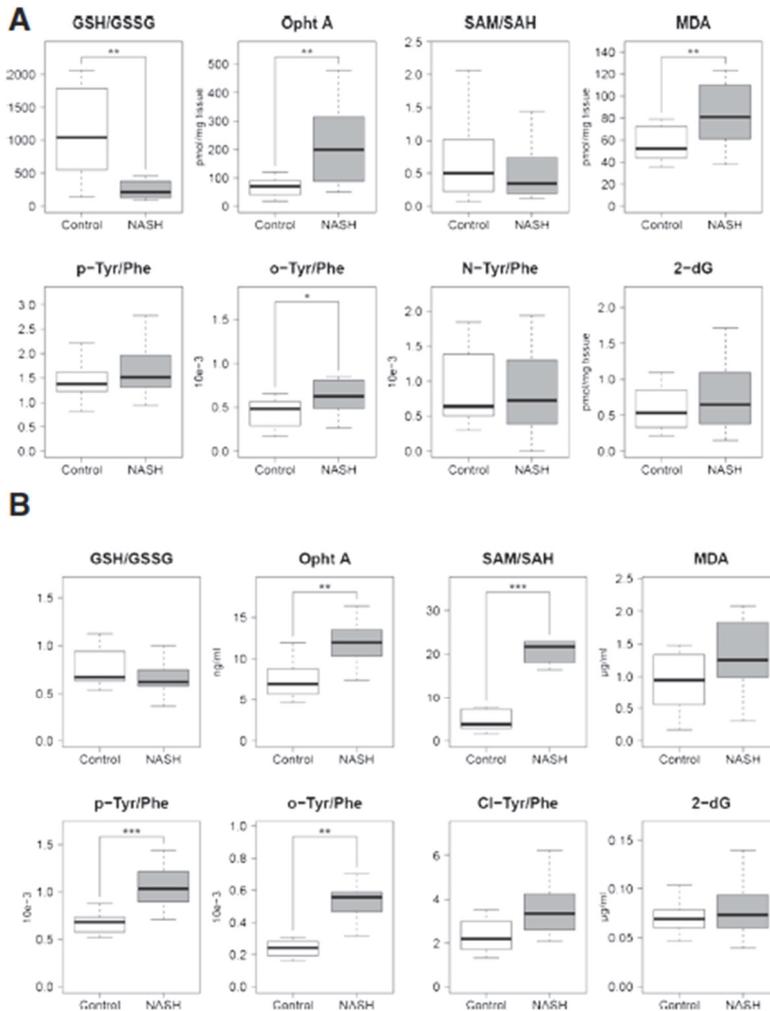


Figura 11. Biomarcadores del OS detectados en muestras de tejido hepático de donantes sanos y donantes NASH.

Las cajas señalan los rangos intercuartílicos, las líneas señalan las medianas y los bigotes señalan los percentiles 10 y 90, A) tejido hepático humano procedente de donantes controles (n=16) y NASH (n=17). B) Muestras de suero de controles (n=7) y pacientes NASH (n=10). El valor estadístico p se realizó

utilizando el test de U de Mann Withney * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$,
*** $p < 0,001$.

21 Estudio estadístico

21.1 Estadística descriptiva

Se realizó un análisis descriptivo de las características iniciales de los grupos en función de si pertenecían al grupo de tratamiento o control. Para las variables los estadísticos descritos fueron la mediana, desviación típica, primer y tercer cuartil.

La distribución se ha representado mediante diagramas de cajas/tablas de distribución.

Para las variables cualitativas realizamos tablas de distribución de la frecuencia de cada variable de cada uno de los dos grupos, con su porcentaje.

21.2 Estadística comparativa

Para contrastar la evolución de los diferentes parámetros de función hepática se efectuó un análisis de medidas repetidas, contrastando si había cambiado en la evolución del parámetro y si ésta era diferente en función de si había recibido o no tratamiento con NAC.

Las variables continuas se expresan en medias \pm desviación estándar y medianas junto con el primer y tercer cuartil. Las variables cualitativas se expresan en porcentaje. Se utilizaron

el Test de t de Student o test de Rangos de Wilcoxon's, el Test de Chi-cuadrado y el análisis de la varianza ANOVA.

21.3 Análisis de supervivencia del paciente y del injerto

Se efectuó un análisis de supervivencia ajustando las curvas de Kaplan-Meier hasta la muerte del receptor del trasplante o hasta la pérdida del injerto y se compararon en función de si habían recibido o no tratamiento utilizando el log Rank test, con un nivel de significación de 0,05.

21.4 Análisis subgrupos

Para el análisis subgrupos se asociaron los factores de riesgo conocidos para el desarrollo de DPI y se compararon en función de si habían recibido o no tratamiento con NAC mediante un modelo de regresión logística en el que se incluyeron los factores de riesgo como co-variables.

El modelo de regresión logística se realizó con el software R 3.2.2. y se ha representado mediante una gráfica de efectos.

RESULTADOS

1 Características demográficas de la serie

Los 214 pacientes completaron el seguimiento. Del total de pacientes, 113 fueron incluidos en el grupo A (NAC SÍ) y 101 en el grupo B (NAC NO).

La mediana de seguimiento fue de 28 (4-47) meses.

1.1 Análisis de distribución de los pacientes en función del sexo

En la serie, 164 pacientes (76,6%) eran hombres y 50 pacientes eran mujeres (23,4%) (Tabla 20).

1.2 Análisis de distribución de los pacientes en función de la edad

La media de edad de los pacientes de la serie completa fue de 54,7 años (DE 9,5) con una mediana de 56 años (Tabla 20).

1.3 Análisis de distribución de los pacientes en función del grupo sanguíneo

Un total de 105 (49,1 %) pacientes de la serie eran del grupo sanguíneo A, 25 (11,7 %) del grupo B, 2 (0,9 %) del grupo AB, y 82 (38,3 %) del grupo sanguíneo 0 (Figura 12) (Tabla 20).

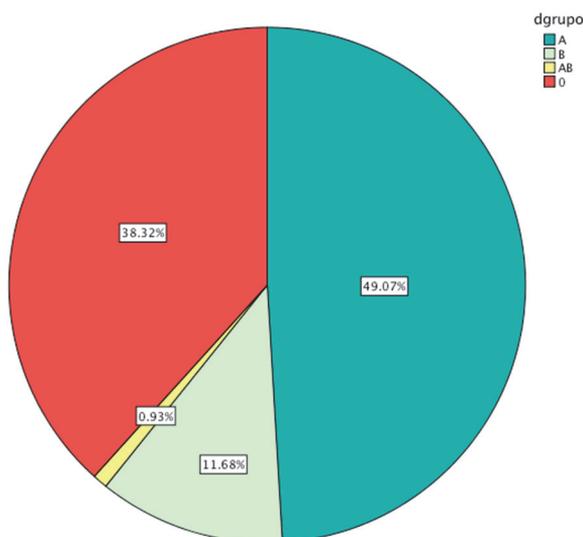


Figura 12. Distribución de los pacientes del estudio en función del grupo sanguíneo

1.4 Análisis de distribución de los pacientes en función del índice de masa corporal

La media de IMC de los pacientes analizados en la serie completa fue de 27,4)(Tabla 20).

1.5 Análisis de distribución de los pacientes en función del MELD

La media de score MELD obtenido fue de 16,2 (DE 6,8) y una mediana de 16,0 (10-20) (Tabla 20).

1.6 Análisis de distribución de los pacientes en función de la etiología que los llevó al trasplante

La distribución de las indicaciones del trasplante de los pacientes en la serie completa se representan en la (Figura 13).

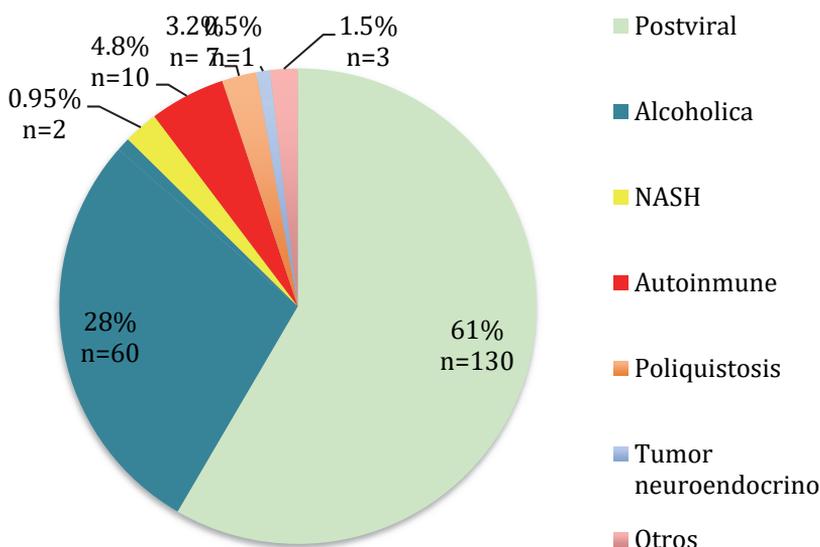


Figura 13. Etiología del trasplante en los pacientes de la serie

1.7 Distribución de los pacientes en función de la serología viral

En 108 (50,5%) pacientes el VHC era positivo. En 22 (10,3%) pacientes el VHB fue positivo. De éstos, presentaban coexistencia VHC-VHB en 5 (2,3%) pacientes, se observó VHB-VHD en 7 (3,3%) pacientes y VIH-VHC en 15 (7%) pacientes (Tabla 20).

1.8 Distribución de carcinoma hepatocelular

Un total de 101 pacientes (47,2%) presentaban carcinoma hepatocelular (CHC), en 58 (27,1%) casos fue en VHC positivo, en 49 (22,9%) en cirrosis por alcohol, en 11 (5,1%) sobre VHB positivo. El CHC apareció en pacientes donde coexistían VHC-OH positivo en 3 (1,4%), en 2 (0,9%) casos con VHC-VIH positivo, VHC-VHB en 2 (0,9%) casos y VHB-VHD en 2 (0,9%) pacientes (Tabla 20).

1.9 Análisis de distribución de los pacientes en función del estadio Child-Pugh

Un total de 60 pacientes (28,0%) fueron clasificados como estadio A. En 63 (29,5%) pacientes como estadio B, 78 (36,5%) como C y no aplicaba realizar esta escala en 13 (6,0%).

1.10 Análisis de distribución de las morbilidades derivadas de la enfermedad hepática

Presentaban ascitis 113 (52,8%) pacientes, de los cuales se había realizado paracentesis en 65 (30,4%), precisando paracentesis periódicas un total de 39 (18,2%).

Habían presentado episodios de encefalopatía un total de 67 pacientes (31,3%), de los cuales eran grados I-II en 64 (30%) pacientes y grados III-IV en 6 (2,8%).

Eran portadores de TIPS 17 (8%) pacientes.

Habían presentado episodios de hemorragia digestiva aguda (HDA) 39 (18,2%) pacientes.

En 21 (9,8%) pacientes se desarrollaron episodios de peritonitis bacteriana espontánea previos al trasplante.

Un total de 93 (43,5%) pacientes precisaban tratamiento betabloqueante y 142 (66,4%) tratamiento diurético (Tabla 20).

1.11 Análisis de la distribución de los pacientes en función de las comorbilidades asociadas

Entre las comorbilidades registradas, la hipertensión arterial (HTA) estaba presente en 61 pacientes (28,5%), la diabetes mellitus (DM) en 56 pacientes (26,2%) y el síndrome hepatorenal en 29 (13,6%) pacientes.

En 59 pacientes se había realizado cirugía abdominal previa, de los cuales, 22 pacientes habían sido intervenidos de hernias, 10 colecistectomizados, 6 caso de cirugía ginecológica, 5 resecciones colónicas y 1 caso de colecistectomía.

Resultados

Tabla 20. Variables relacionadas con el receptor por grupos de tratamiento.

Variable	Global (n = 214)	NAC NO (n = 101)	NAC SI (n = 113)
Sexo (♂)	76.6%	78.2%	75.2%
Edad (años)			
Media (DE)	54.7 (9.5)	54.8 (9.8)	54.6 (9.3)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	56.0 (49.0-63.0)	56.0 (50.0-62.0)	55.0 (49.0-63.0)
IMC (kg/m ²)			
Media (DE)	27.4 (6.5)	27.1 (4.7)	27.7 (7.7)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	26.4 (23.4-30.2)	26.7 (23.1-30.2)	26.2 (23.5-30.0)
MELD Score			
Media (DE)	16.2 (6.8)	15.6 (6.2)	16.7 (7.3)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	16 (10-20)	16 (11-19)	16.5 (20-21)
CHC*	47.2%	51.5%	43.4%
Tamaño del mayor			
Media (DE)	1.6(1.8)	2.09(2.2)	1.3(1.39)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	1.5(0-3.0)	2.0(0-3.0)	1.0(0-2.0)
AFP (UI/l)			
Media (DE)	27.5(69.1)	21.0(47.3)	33.4(84.1)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	5.3(2.8-17.7)	4.0(2.4-18.0)	6.8(3.3-17.5)
Etiología-trasplante			
VHB	10.3%	9.9%	10,6%
VHB	3.3%	2%	4.4%
VHD	50.5%	49.5%	51.3%
VHC	7%	5.9%	8%
VIH	45.8%	48.5%	43.8%
OH**			
Otras			
Ascitis	52.8%	49.5%	55.8%
Paracentesis	30.4%	32.7%	29.2%
Encefalopatía			
Grado I	31.3%	31.7%	31%
Grado II	67.1%	60.6%	73%
Grado III	24.3%	21.2%	27%
Grado III	7.1%	15.2%	0%
Grado IV	1.5%	3%	0%

HDA***	18.3%	16.8%	19.6%
PBE****	9.8%	8.9%	10.6%
Tratamiento pre-trasplante	81.3%	76.2%	85.8%
B-bloqueantes	43.5%	42.6%	44.2%
Diuréticos	66.4%	62.4%	69.9%
Urea preTH (mg/dl)	43.1(29.3)	46.5(34.5)	40,0(23.4)
Media (DE)	33.5 (26.0-	34(26.0-48.0)	33(26.0-44)
Mediana (1º-3ºQ)	46.95)		
Creatinina preTH (mg/dl)			
Media (DE)	1.01(0,78)	1.14(1.06)	0,89(0,38)
Mediana (1º-3ºQ)	0.8(0.66-1.08)	0.8(0.66-1.11)	0.8(0.69-1.01)
DM	26.2%	24.8%	27.4%
HTA	28.5%	32.7%	24.8%

*CHC: carcinoma hepatocelular.

**OH: etiología alcohólica del trasplante.

***HDA: hemorragia digestiva aguda.

**** PBE: peritonitis bacteriana espontánea.

2 Análisis de variables del donante

Atendiendo a las características de los donantes, en el estudio estadístico realizado no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$), tanto para los donantes que recibieron tratamiento con NAC como para los donantes que no recibieron ningún tratamiento adicional (Tabla 21).

2.1 Sexo del donante

En el grupo NAC SÍ, 164 pacientes 65 (57,5%) eran hombres y 55 (54,5%) en el grupo NAC NO (Tabla 21).

2.2 Edad del donante

La media de edad del grupo NAC SÍ fue de 63,1 (DE 13,3) años con una mediana de 65 (55-73) años. En el grupo NAC NO la media fue de 62,6 (15,7) y una mediana de edad de 64 (54-74) años ($p=0,84$) (Tabla 21).

2.3 Índice de masa corporal del donante

El valor medio de IMC en los donantes con NAC SÍ fue de 27,4 (DE 4,4) y su mediana de 27,3 (24,2-29,4) kg/m². En el grupo de NAC NO la media fue de 26,7(3,1) y su correspondiente mediana de 26 (24,5-28,9) (p=0,48) (Tabla 21).

2.4 Causa de la muerte del donante

En la etiología del fallecimiento del donante se puede observar que el accidente cerebrovascular (ACV) fue la causa más frecuente con un 75,3%, seguido del traumatismo craneoencefálico (TCE) en un 15,4% de los casos, sin diferencias entre ambos grupos del estudio (p=0,542) (Tabla 21).

2.5 Estancia en Unidad de cuidados intensivos del donante

La media de tiempo que estuvieron los pacientes ingresados en UCI fue de 2,9 (DE 2,8) días con una mediana de 2 (1-3) días. Si lo analizamos por cada uno de los grupos de 3 observamos que la media de días para el grupo de NAC SÍ fue de 2,9 (DE 2,9) días con una mediana de 2 (1-4) días y para el grupo NAC NO fue de 2,8 (DE 2,6) días y una mediana de 2 (1-3) días (p=0,920).

2.6 Presencia de comorbilidades en el donante

Existía HTA 52 (46%) donantes del grupo NAC SÍ y en 52 pacientes (51,5%)($p=0,49$). Presentaban DM 23 (20,4%) pacientes del grupos NAC SÍ frente a 17 (16,8%) del grupo NAC NO ($p=0,59$). Treinta (26,5 %) donantes eran cardiópatas en el grupo NAC SÍ, 27 (26,7%) pacientes en el grupo NAC NO ($p>0,99$) (Tabla 21).

2.7 Utilización de drogas vasoactivas en el donante

Se administraron drogas vasoactivas en 91 (80,5%) pacientes del grupo NAC SÍ y en 87 (86,1%) pacientes del grupo NAC NO ($p=0,36$). La NA fue la más frecuentemente utilizada en 88 (77,9%) pacientes en el grupo NAC SÍ y en 84 (83,2%) pacientes en el grupo NAC NO ($p=0,39$) (Tabla 21).

2.8 Esteatosis hepática en el donante

En 49 donantes se identificó la presencia de esteatosis ecográfica en grado leve-moderado. De ellos, 25 (22,3%) pertenecían al grupo de NAC SÍ y 24 (23,8%) al grupo NAC NO ($p=0,87$) (Tabla 21).

2.9 Variantes vasculares en el donante

Se encontraron anomalías arteriales en 32 (28,3%) donantes del grupo NAC SÍ y en 37 (36,6%) del grupo NAC NO ($p=0,24$) (Tabla 21).

Resultados

Tabla 21. Comparación de las variables relativas al donante en los grupos de estudio.

Variable	Global (n = 214)	NAC NO (n = 103)	NAC SI (n = 111)
Sexo (♂)	56.1 %	54.5 %	57.5 %
Edad (años)			
Media (DE)	62.9 (14.4)	62.6 (15.7)	63.1 (13.3)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	65.0 (55.0-73.8)	64.0 (54.0-74.0)	65.0 (55.0-73.0)
IMC (kg/m ²)			
Media (DE)	27.0 (3.9)	26.7 (3.1)	27.4 (4.4)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	26.7 (24.2-29.3)	26.0 (24.5-28.9)	27.3 (24.2-29.4)
Causa †			
TCE	15.4%	14.9%	15.9%
ACV	75.3%	72.2%	77.9%
Otros	9.3%	12.9%	6.2%
Días en UCI			
Media (DE)	2.9 (2.8)	2.8(2.6)	2.9 (2.9)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	2 (1-3)	2(1-3)	2 (1-4)
HTA	48.6%	51.5%	46%
DM	18.7%	16.8%	20.4%
Cardiopatía	26.6%	26.7%	26.5%
Hipotensión	37.9%	40,6%	35.4%
Parada cardíaca	17.3%	17.8%	16.8%
Drogas	83.2%	86.1%	80,5%
NA	80,4%	83.2%	77.9%
DA	6.1%	6.9%	5.3%
A	0,5%	0%	0,9%
ECOH*			
Normal	77%	76.2%	77.7%
Esteatosis	23%	23.8%	22.3%
Aspecto macroscópico** (Bueno/Regular)	90,2%	88%	92%

*ECOH: ecografía hepática.

**Aspecto macroscópico del hígado: aspecto macroscópico del hígado evaluado por cirujano/a que realiza la cirugía de extracción.

3 Análisis de variables del receptor

3.1 Distribución de los pacientes en función del sexo en los grupos de estudio

Ochenta y cinco receptores (75,2%) del grupo NAC SÍ, frente a 79 (78,2%) del grupo NAC NO, eran varones ($p=0,63$)(Tabla 20).

3.2 Edad del receptor en los grupos de estudio

La media de edad del grupo NAC SÍ fue de 54,6 (DE 9,3) años con una mediana de 55 (49-63) años. En el grupo NAC NO la media fue de 54,8 (DE 9,8) y una mediana de edad de 56 (50-62) años ($p=0,86$)(Tabla 20).

3.3 Índice de masa corporal del receptor en los grupos de estudio

La media de IMC de los pacientes analizados en el grupo de NAC SÍ fue de 27,7 (DE 7,7), siendo su mediana de 26,2 (23,5 - 30). Por otro lado el grupo de NAC NO tenía una media de IMC de 27,1 (DE 4,7) y una mediana de 26,7 (23,1-30,2) ($p=0,47$) (Tabla 20).

3.4 Distribución MELD en los grupos de estudio

La media de *score* MELD obtenido para el grupo de NAC SÍ fue de 16,7 (DE 7,3) y una mediana de 16,5 (20-21). En el grupo de NAC NO la media fue de 15,6 (DE 6,2) y una mediana de 16(11-19) ($p=0,81$) (Tabla 20).

3.5 Distribución de la serología viral en los grupos de estudio

En 58 (51,3%) pacientes del grupo NAC SÍ y 50 (49,5%) del grupo NAC NO el VHC era positivo ($p=0,89$). En 12 pacientes (10,6%) del grupo NAC SÍ y en 10 (9,9%) del grupo NAC NO, el VHB fue positivo ($p>0,99$). De éstos, presentaban coexistencia VHB-VHD en 5 (4,4%) del grupo NAC SÍ y en 2 (2%) del grupo NAC NO ($p=0,45$) y VIH-VHC en 9 (8%) del grupo NAC SÍ y en 6 (5,9%) del grupo NAC NO ($p=0,60$) (Tabla 20).

3.6 Distribución de carcinoma hepatocelular en los grupos de estudio

Un total de 49 pacientes (43,4%) del grupo NAC SÍ y 52 (51,5%) del grupo NAC NO presentaban carcinoma hepatocelular (CHC) ($p=0,27$) (Tabla 20).

3.7 Análisis de la distribución de las comorbilidades en los grupos de estudio

La diabetes estaba presente en 31 pacientes (27,4%) de los pacientes del grupo NAC SÍ y 25 (24,8%) del grupo NAC NO ($p=0,75$). Un total de 28 pacientes (24,8%) del grupo NAC SÍ y 33 (32,7%) del grupo NAC NO eran hipertensos ($p=0,22$). Treinta y cinco pacientes (31%) del grupo NAC SÍ y 32 (31,7%) del grupo NAC NO habían presentado episodios de encefalopatía ($p>0,99$). La mayoría presentaron grado I de encefalopatía, 27 (73%) en el grupo NAC SÍ y 20 (60,6%) en el grupo NAC NO ($p=0,06$). En el momento del trasplante presentaban ascitis 63 pacientes (55,8%) en el grupo NAC SÍ y 50 (49,5%) en el grupo NAC NO ($p=0,41$). De ellos, 19 pacientes (30,1%) del grupo NAC SÍ y 20 (40%) del grupo NAC NO, precisaban paracentesis evacuadoras periódicas en el período pretrasplante ($p=0,71$). Habían presentado episodios de HDA 22 (19,6%) pacientes del grupo NAC SÍ y 17 (16,8%) pacientes del grupo NAC NO ($p=0,72$). En 12 pacientes (10,6%) del grupo NAC SÍ y en 9 (8,9%) del grupo NAC NO, se había presentado al menos un episodio de peritonitis bacteriana espontánea (PBE) ($p=0,81$). Un total de 50 (44,2%) pacientes del grupo NAC SÍ y de 43 (42,6%) del grupo NAC NO, precisaban tratamiento betabloqueante ($p=0,89$). Un total 79 pacientes (69,9%) del grupo NAC SÍ y 63 (62,4%) del grupo NAC NO, tomaban tratamiento con diuréticos ($p=0,25$) (Tabla 20).

4 Análisis de variables del acto quirúrgico del trasplante

En la Tabla 22 se exponen las variables analizadas entre los grupos de estudio relacionadas con el procedimiento quirúrgico.

Tabla 22. Variables relacionadas con la cirugía.

Variable	Global (n = 214)	NAC NO (n = 101)	NAC SI (n = 113)
Duración cirugía (min)			
Media (DE)	288.8 (73.2)	288.8 (73.2)	285.6(53.7)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	270,0 (240,0-320,0)	270,0 (240,0-320,0)	280,0(245.0-310,0)
TIF (min)			
Media (DE)	255.9(114.3)	253.65 (124.1)	258.0(105.3)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	223.0(180,0-291.25)	215.0 (180,0-277.5)	230,0(182.5-302.5)
TIC (min)			
Media (DE)	45.8(16.7)	46.5(19.6)	45.1(13.7)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	45.0(35.0-50,0)	43.0(35.0-50,0)	45.0(35.0-50,0)
TAA (min)			
Media (DE)	51.0(24.8)	49.7(21.15)	52.1(27.82)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	45.0(35.0-60,0)	45.0(35.0-60,0)	45.0(35.0-59,0)
Salvacélulas (ml)			
Media (DE)	794.8(800,0)	802.6(952.8)	787.7(637.7)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	617.5(435.5-917,0)	522.0(412.2-900)	608.5(447.2-968,0)
UCH (unidades)			
Media (DE)	3.1(2.8)	2.8(2.8)	3.4(2.8)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	3.0(1.0-4.0)	2.0(0,0-4.0)	3.0(1.0-5.5)
UPFC (unidades)			
Media (DE)	2.2(1.7)	2.0(1.7)	2.4(1.7)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	2.0(1.0-4.0)	2.0(1.0-2.0)	2.0(2.0-4.0)
UP (unidades)			
Media (DE)	1.8(1.3)	1.7(1.4)	1.8(1.3)
Mediana (1 ^o -3 ^o Q)	2.0(1.0-2.0)	2.0(1.0-2.0)	2.0(1.0-2.0)
Síndrome postreperusión	11.6%	5.1%	6.5%

Trombosis portal	24.3%	11.7%	12.6%
Tipo de anastomosis biliar			
Kehr	52.3%	56.4%	48.7%
NoKehr	41.6%	37.6%	45.1%
Hepaticoyeyunostomía	5.6%	5%	6.2%

4.1 Tiempo de cirugía

El análisis de los tiempos de cirugía nos muestra que en el grupo de NAC SÍ la media fue de 285,5 (DE 53,7) min y una mediana de 280 (245-50) min. En el grupo de NAC NO la media fue de 288,8 (DE 73,2) min y una mediana de 270 (240-320) min (p=0,78)(Tabla 22).

4.2 Tiempo de isquemia fría

La media de duración de TIF en el grupo de NAC SÍ fue de 258 (DE 105) min y una mediana de 230 (182,5 - 302,5) min. En el grupo de NAC NO la media fue de 253.65 (DE 124.1) min y una mediana de 215 (180 - 277,5) min (p=0,43) (Tabla 22).

4.3 Tiempo de isquemia caliente

En los tiempos de isquemia caliente se pudo observar que en el grupo de NAC SÍ la media fue de 45,1 (DE 13,7) min y una mediana de 45.0 (35.0-50,0) min. En el grupo de NAC NO la

media fue de 46,5 (DE 19,6) min y una mediana de 43 (35-50) min ($p=0,41$)(Tabla 22).

4.4 Tiempo de demora arterial

La media de duración de tiempo de demora arterial en el grupo de NAC SÍ fue de 52,1 (DE 27,8) min y una mediana de 45 (35-59) min. En el grupo de NAC NO la media fue de 49,7 (DE 21,4) min y una mediana de 45 (35-60) min ($p=0,57$)(Tabla 22).

4.5 Tiempo de isquemia total

Con los tiempos de isquemia total se pudo observar que en el grupo de NAC SÍ la media fue de 303,1 (DE 110,9) min y una mediana de 272,5 (100,0-670,0) min. En el grupo de NAC NO la media fue de 298,7 (DE 129,4) min y una mediana de 270,0 (100,0-920,0) min ($p=0,81$)(Tabla 22).

4.6 Recuperación por medio de salvacélulas

Al observar los resultados obtenidos la media de recuperación por medio de salvacélulas en los pacientes del grupo NAC SÍ fue de 787,7 (DE 637,7), con un mediana de 608,5 (447,2-968). En

el grupo NAC NO la media de recuperación fue de 802,6 (DE 952,8), con una mediana de 522 (412,2-900)($p=0,84$)(Tabla 22).

4.7 Concentrados de hematíes transfundidos

La media del número de unidades de concentrados de hematíes transfundidos (UCH) en los pacientes del grupo NAC SÍ durante la intervención fue de 3,4 (DE 2,8) unidades y una mediana de 3 (1 - 5,5). En los pacientes del grupo NAC NO la media del número de unidades de concentrados transfundidos fue de 2.8 (DE 2.8) con una mediana de 2 (0-4) ($p=0,51$)(Tabla 22).

4.8 Unidades de plasma transfundidas

La media del número de unidades de plasma fresco congelado transfundidas (UPFC) en los pacientes del grupo NAC SÍ durante la intervención fue de 2,4 (DE 1,7) unidades y una mediana de 2 (1 - 4). En los pacientes del grupo NAC NO la media del número de unidades de plasma transfundidas fue de 2 (DE 1,7) con una mediana de 2 (1-2) ($p=0,42$)(Tabla 22).

4.9 Concentrados de plaquetas transfundidas

La media del número de unidades de plaquetas transfundidas (UP) en los pacientes del grupo NAC SÍ durante la intervención fue de 1,8 (DE 1,3) unidades y una mediana de 2 (1 - 2). En los pacientes del grupo NAC NO la media del número de unidades de plaquetas transfundidas fue de 1,7 (DE 1,4) con una mediana de 2 (1-2) ($p=0,38$)(Tabla 22).

4.10 Síndrome postreperfusión

La incidencia de síndrome postreperfusión de los pacientes del grupo NAC SÍ durante la intervención fue de 14 (6,5%). En los pacientes del grupo NAC NO fue de 11 (5,1%) ($p=0,73$) (Tabla 22).

4.11 Presencia de trombosis portal

La incidencia de trombosis portal en los pacientes del grupo NAC SÍ fue de 27 (12,6%). En los pacientes del grupo NAC NO fue de 25 (11,7%) ($p=0,88$)(Tabla 22).

4.12 Tipo de anastomosis biliar

En todos los pacientes se utilizó el mismo tipo de tubo en T (Kehr) de goma, de 2,5 mm (Teleflex medical. Willy Rüschi

GmbH®), excepto en un paciente del grupo NAC NO en el que debido al diámetro inferior a 3 mm de la vía biliar del injerto se utilizó tubo en T pediátrico de látex de 6 Fr (Portex Ltd. Hythe Kent CT21 6JL UK®).

Se realizó anastomosis biliar término-terminal colédoco-coledociana con drenaje intrabiliar en 55 pacientes (48,7%) del grupo NAC SÍ y en 57 (56,4%) del grupo NAC NO; anastomosis anastomosis biliar término-terminal colédoco-coledociana sin drenaje intrabiliar en 51 pacientes (45,1%) del grupo NAC SÍ y 38 (37,6%) del grupo NAC NO; anastomosis mediante hepático-yeyunostomía término-lateral en 7 pacientes (6,2%) del grupo NAC SÍ y en 5 (5%) del grupo NAC NO ($p=0,45$)(Tabla 22).

4.13 Resultados del análisis bioquímico postoperatorio de las pacientes

Desde el primer DPO al séptimo se determinaron los parámetros de hematocrito, hemoglobina, leucocitos, neutrófilos, plaquetas, bilirrubina total, GOT, GPT, FA, GGT, LDH, sodio, potasio, urea, creatinina, glucosa, colesterol, triglicéridos, albúmina, proteínas totales, índice de Quick, tiempo de protombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, fibrinógeno e INR sin encontrar diferencias entre ambos grupos.

La media de GOT el primer DPO en el grupo NAC SÍ 723,2 (DE

714.4) U/L y la mediana fue de 493 U/L. En el grupo NAC NO la media de GOT del primer DPO fue de 868,2 (DE 1238,6) U/L y la mediana fue de 427 U/L ($p=0,40$) (Figura 14).

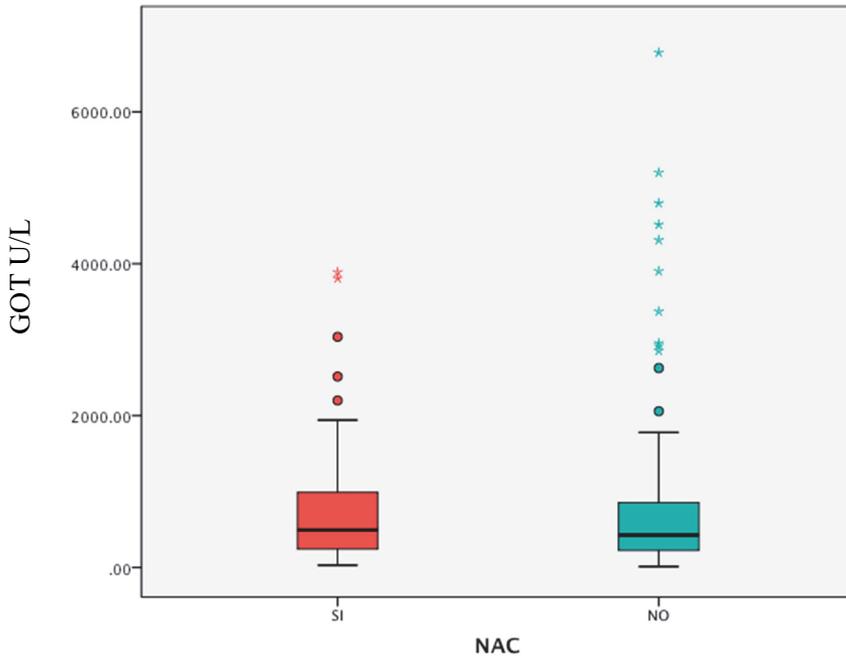


Figura 14. Valores de GOT en U/L en el 1º día postoperatorio de los pacientes en los grupos analizados

La media de GPT el primer DPO en el grupo NAC SÍ 521,2 (DE 482,3) U/L y la mediana fue de 414 U/L. En el grupo NAC NO la media de GPT del primer DPO fue de 675,5 (DE 915,1) U/L y la mediana fue de 342 U/L ($p=0,421$) (Figura 15).

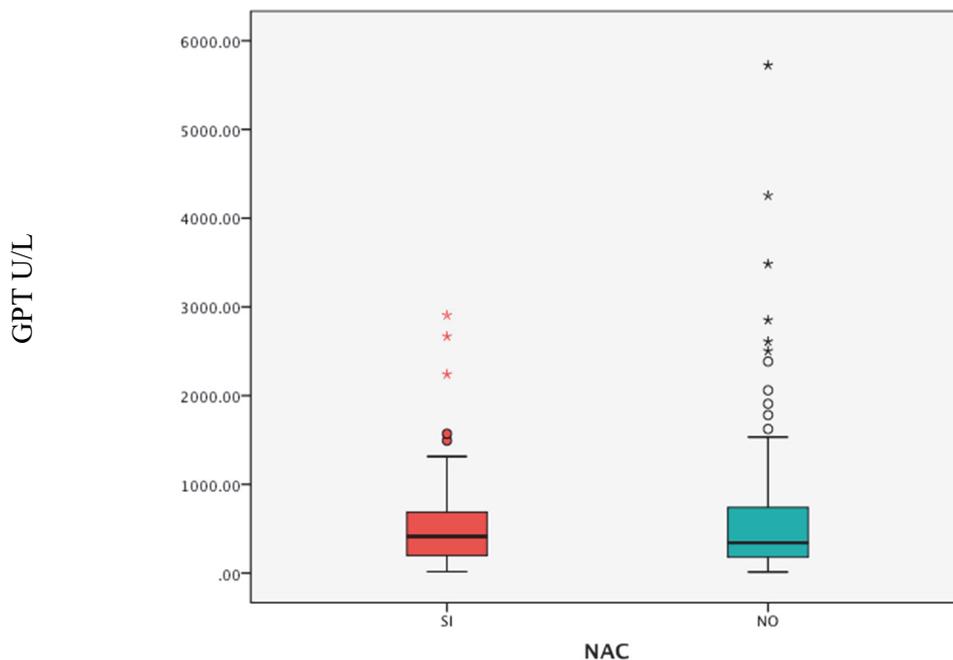


Figura 15. Valores de GPT en U/L en el 1º día postoperatorio de los pacientes en los grupos analizados.

La media de bilirrubina total el séptimo DPO en el grupo NAC SÍ fue de 7,7 (DE 7,0) mg/dl y la mediana de 5,5 mg/dl. En el grupo NAC NO la media de bilirrubina total fue de 7,6 (DE 7,8) mg/dl y la mediana fue de 4,8 mg/dl ($p=0,42$) (Figura 16).

Resultados

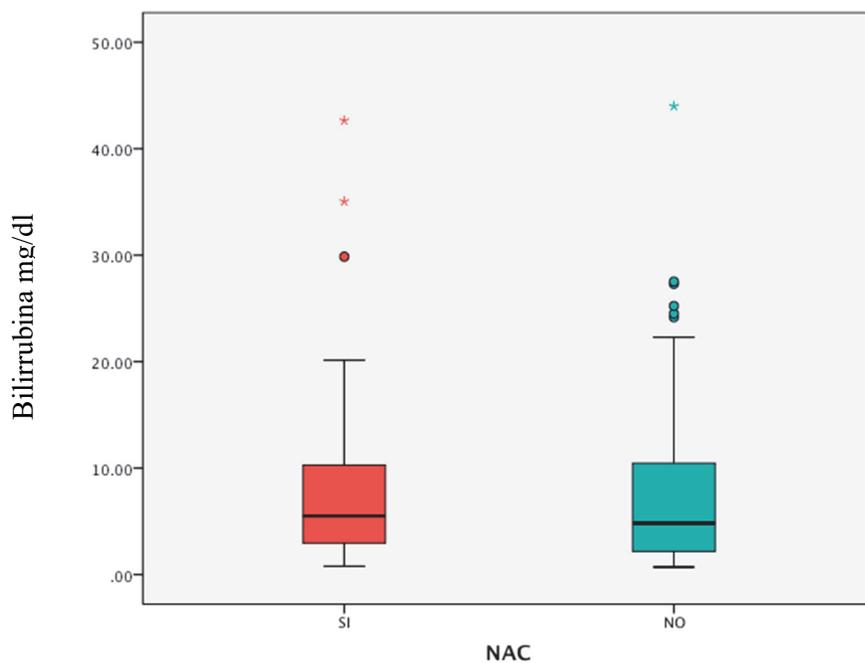


Figura 16. Diagrama de cajas. Niveles de bilirrubina en mg/dl el 7^o día postrasplante de los pacientes de los grupos analizados.

La media de INR el séptimo DPO en el grupo NAC SÍ fue de 1,24 (DE 0,2) y la mediana fue de 1,1. En el grupo NAC NO la media de INR 1,21 (DE 0,2) y la mediana fue de 1,1 ($p=0,65$)(Figura 17).

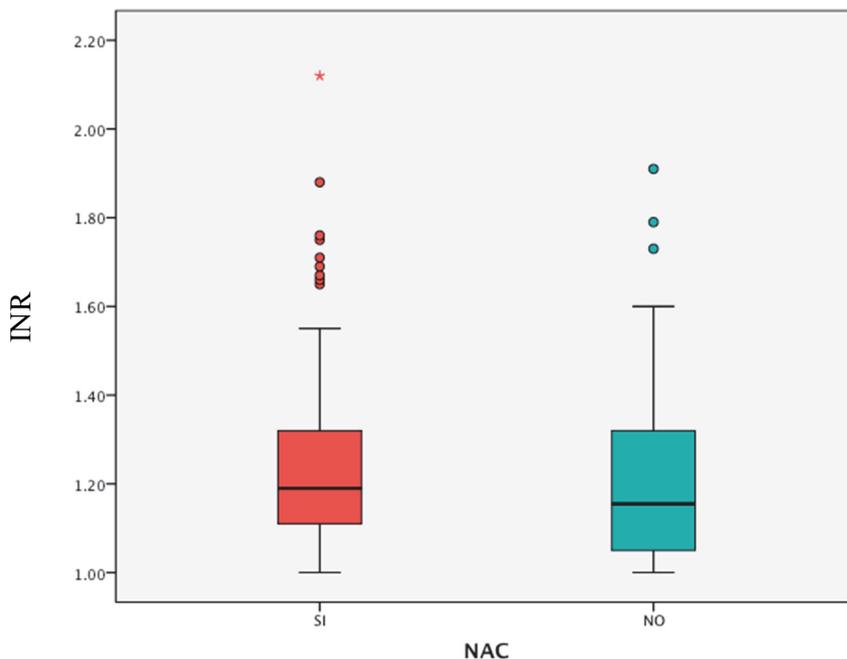


Figura 17. Niveles de INR en el 7º día postoperatorio en los pacientes de los grupos analizados

Si analizamos la evolución de la bilirrubina durante la primera semana postoperatoria entre ambos grupos de estudio tampoco se observan diferencias entre ellos ($p=0,47$) (Figura 18).

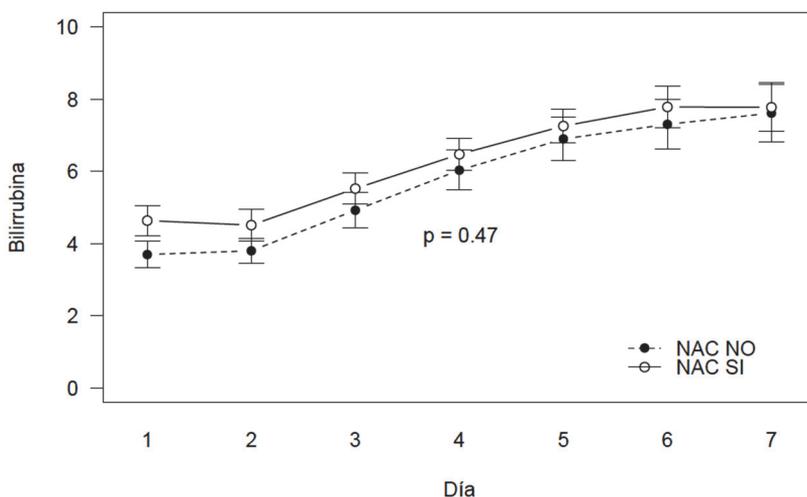


Figura 18. Evolución de la bilirrubina en mg/dl durante la primera semana postoperatoria de los pacientes en los grupos analizados

Al evaluar la evolución de los niveles de GOT durante la primera semana postoperatoria no se observaron diferencias entre ambos grupos de estudio ($p=0,92$)(Figura 19).

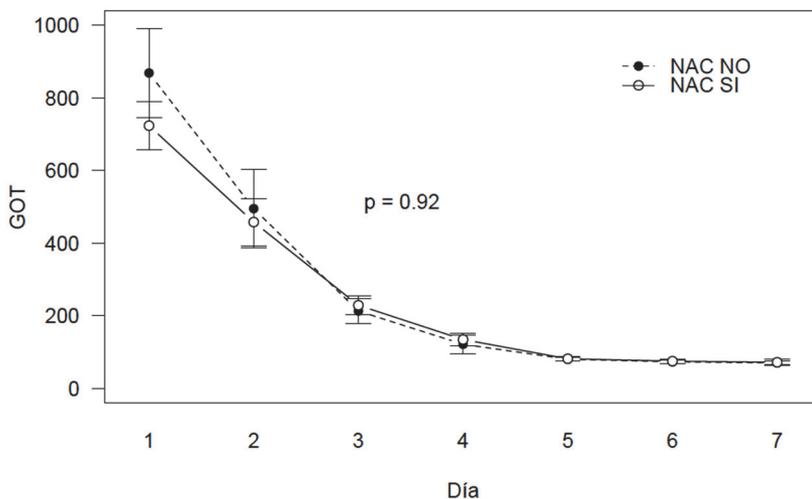


Figura 19. Evolución de los niveles de GOT en UI/L durante la primera semana postoperatoria de los pacientes de los grupos analizados

Al evaluar la evolución de los niveles de GPT durante la primera semana postoperatoria tampoco se observaron diferencias entre ambos grupos de estudio ($p=0,71$)(Figura 20).

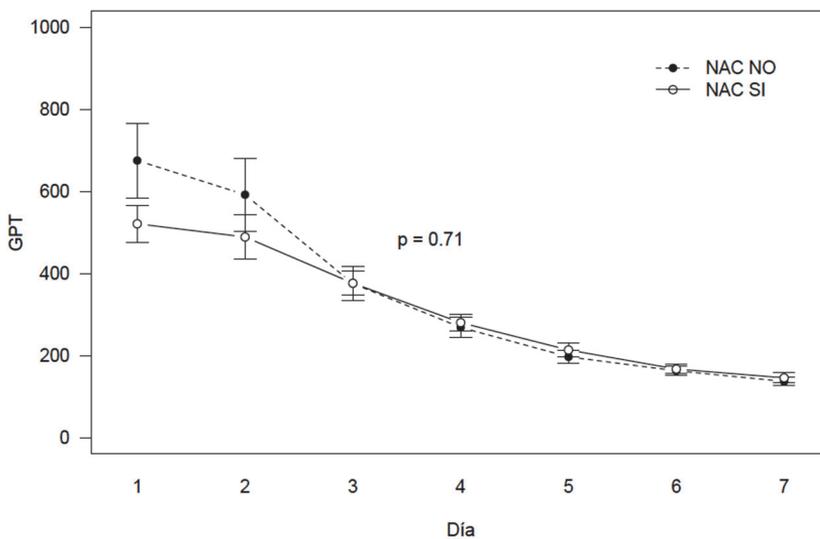


Figura 20. Evolución de los niveles de GPT en UI/L durante la primera semana postoperatoria de los pacientes de los grupos analizados.

Cuando se determinó la evolución de INR durante la primera semana postoperatoria tampoco se observaron diferencias entre ambos grupos de estudio ($p=0,29$)(Figura 21).

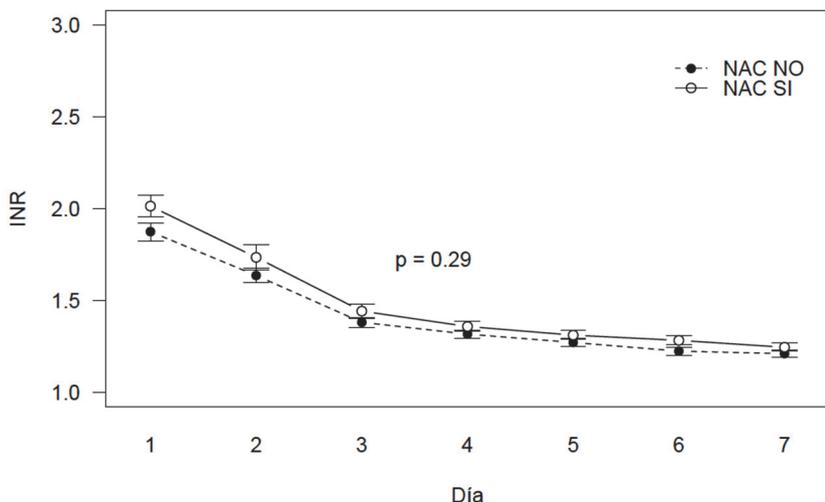


Figura 21. Evolución de los niveles de INR en UI/L durante la primera semana postoperatoria de los pacientes de los grupos analizados.

4.14 Morbi-mortalidad postoperatorias

No se observó ninguna complicación en el postoperatorio inmediato en 68 pacientes (60,2%) del grupo NAC SÍ y en 34 pacientes del grupo NAC NO (33,6%)(Tabla 23).

La presencia de hemoperitoneo se evidenció en 7 (6,2%) pacientes del grupo NAC SÍ y en 11 pacientes del grupo NAC NO (10,9%)(Tabla 23).

Presentaron complicaciones biliares 1 (0,88%) paciente del grupo NAC SI en forma de coleperitoneo que obligó al drenaje

por radiología intervencionista y 1 (0,99%) paciente en el grupo NAC NO, presentó fuga biliar anastomótica que obligó a la apertura del tubo de drenaje biliar (Tabla 23).

Presentaron recurrencia precoz confirmada por biopsia (< 90 días) de VHC 6 (5,3%) pacientes del grupo NAC SÍ y 5 (4,9%) pacientes del grupo NAC NO (Tabla 23).

Se observaron complicaciones neurológicas que obligaron al cambio de tratamiento inmunosupresor en 8 (7%) pacientes del grupo NAC SÍ y en 8 (8%) pacientes del grupo NAC NO (Tabla 23).

Presentaron insuficiencia renal postoperatoria 8 (7%) pacientes del grupo NAC SI y 10 pacientes del grupo NAC NO (10%)(Tabla 23).

Se observaron complicaciones respiratorias en 3 (2.6%) pacientes del grupo NAC SÍ y en 6 (6%) pacientes del grupo NAC NO (Tabla 23).

En 0,99% (n=1) paciente del grupo NAC NO presentó IAM como complicación cardíaca postoperatoria (Tabla 23).

En 0,99% (n=1) paciente del grupo NAC NO presentó trombosis de la vena suprahepática derecha que precisó tratamiento anticoagulante a dosis terapéutica (Tabla 23).

Tabla 23. Tipos complicaciones postoperatorias por grupos de tratamiento

Complicación	NAC NO (n = 101)	NAC SI (n =113)	Grado de gravedad (Dindo- Clavien)	Total (n=214)
Ninguna	34 (33.6%)	68 (60%)	-	102 (47.6%)
Renal	10 (9.9%)	8 (7.07%)	I	18 (8.4%)
Infecciosa	9 (8.9%)	5 (4.4%)	II	14 (6.5%)
Recurrencia	5 (4.9%)	6 (5.3%)	II	11 (5.1%)
VHC				
Trombosis venosa	1 (0.9%)	0 (0%)	II	1 (0.4%)
Neurológica	8 (7.9%)	8 (7.0%)	II	16 (7.4%)
Respiratoria	6 (5.9%)	3 (2.6%)	IIIa	9 (4.2%)
Biliar	1 (0.9 %)	1 (0.8%)	IIIa	2 (0.9%)
Hemoperitoneo	11 (10.9%)	7 (6.1%)	IIIb	18 (8.4%)
Retrasplante	6 (5.9%)	1 (0.8%)	IVa	7 (3.2%)
Cardiaca	1 (0.9%)	0 (0%)	IVa	1 (0.4%)
Muerte	8 (7.9%)	7 (6.2%)	V	15 (7%)

La complicaciones postoperatorias se evaluaron de acuerdo con la escala de gravedad de Dindo-Clavien. Se observó morbilidad de grado menor (Grados 1-2 de Dindo-Clavien) similar entre ambos grupos, en 33 (32,6%) y en 27 (23,8%) pacientes del grupo NAC NO y NAC SÍ, respectivamente ($p>0,99$). La morbilidad de grado mayor (Grados 3-4 de Dindo-

Resultados

Clavien) en el grupo NAC NO fue de 25 (24,7%) pacientes frente a 12 (10,6%), pacientes en el grupo NAC SÍ ($p=0,003$).

Se observó una mayor morbilidad postoperatoria global en el grupo de pacientes NAC NO en el 57,4% ($n=58$) y en 34,5% ($n=39$) pacientes del grupo NAC SI ($p=0,001$).

La mortalidad postoperatoria fue similar entre ambos grupos, 8 (7,9%) pacientes en el grupo NAC NO y 7 (6,1%) pacientes en el grupo SÍ ($p=0,79$).

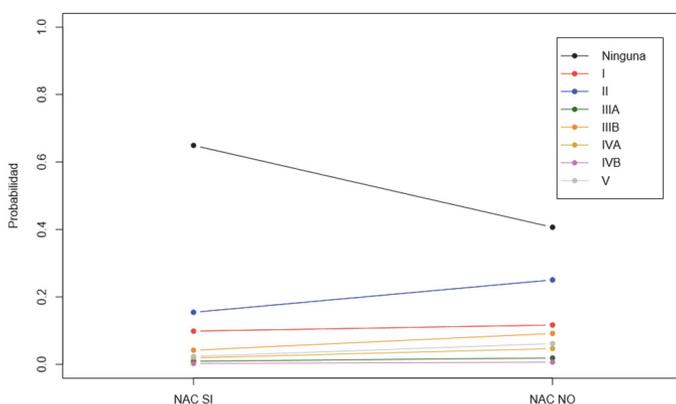


Figura 22. Complicaciones postoperatorias por grupos de tratamiento mediante la clasificación Dindo-Clavien.

4.15 Retrasplante

Se realizaron un total de 7 (3,2%) retrasplantes hepáticos entre los días 1-7 postoperatorios. De los 7 retrasplantes, 1 (0,88%) fue en el grupo NAC SÍ y 6 (5,9%) en el grupo NAC NO ($p=0,05$). En 4 casos la causa del trasplante fue por trombosis arterial, en 3 casos por DPI en relación con severos signos de IR. Los 3 casos de retrasplante por DPI se encontraban en el grupo NAC NO ($p=0,1$).

4.16 Reintervención

Excluyendo los retrasplantes, se realizaron un total de 18 reintervenciones en el postoperatorio inmediato, todas ellas fueron por hemoperitoneo ($p=0,21$). En 7 casos ocurrieron en el grupo NAC SÍ y en 11 casos ocurrieron en el grupo NAC NO.

4.17 Estancia en Unidad de cuidados intensivos

La media de días en la unidad de cuidados intensivos en los pacientes del grupo NAC SÍ fue de 5,7 (DE 7,3), con una mediana de 4 (2-6) y una moda de 2. En el grupo NAC NO la media de días fue de 7,2 (DE 10), con una mediana de 4 (2,5-6,5) y una moda de 3 ($p=0,27$).

4.18 Días de estancia hospitalaria

Los pacientes del grupo NAC SÍ tuvieron una media de estancia hospitalaria de 17,2 (DE 12,1), con un mediana de 14 (10-19) y una moda de 10. Mientras que en el grupo NAC NO la media de días fue de 18,9 (DE 12,4), con una mediana de 15 (10-22) y una moda de 10 ($p=0,40$).

4.19 Complicaciones tardías

Se compararon las complicaciones aparecidas durante el seguimiento (superior a 90 días postrasplante). Excluyéndose las muertes acontecidas en los primeros 90 días (Tabla 24).

Las estenosis biliares anastomóticas aparecieron en 3 (2,9%) pacientes del grupo NAC NO y en un (0,88%) paciente del grupo NAC SÍ (Tabla 23). Un paciente con estenosis biliar del grupo NAC SÍ se realizó retrasplante por trombosis arterial tardía (día 730 postrasplante).

La recidiva del CHC en 4 (3,9%) pacientes del grupo NAC NO y en 3 (2,6%) pacientes del grupo NAC SÍ (Tabla 24).

El rechazo ocurrió en 8 (7,9%) pacientes del grupo NAC NO y en 6 (5,3%) pacientes del grupos NAC SÍ (Tabla 24). En un paciente del grupo NAC NO con rechazo crónico se llevó a cabo el retrasplante en el día 900 postrasplante.

Se observaron 3 (2,9%) tumores de novo en el grupo NAC NO y 3 (2,6%) tumores de novo en el grupo NAC SÍ (Tabla 24).

Tabla 24. Distribución de complicaciones tardías de los pacientes de los grupos analizados.

Complicación	NAC NO (n = 93)	NAC SI (n =106)	p	Total (n=199)
Estenosis biliar	3 (3.2%)	1 (0.94%)	0.34	4 (2.01%)
Recidiva CHC	4 (4.3%)	3 (2.8%)	0.70	7 (3.5%)
Rechazo	8 (8.6%)	6 (5.6%)	0.58	14 (7.0%)
Tumor novo	3 (3.2%)	3 (2.8%)	> 0.99	6 (3.0%)

5 Análisis subgrupos

5.1 Análisis de la disfunción primaria del injerto

Tras evaluar la función hepática de cada uno de los injertos incluidos en el estudio tras el TH, siguiendo los criterios de K.Olthoff mencionados (sección 3.1), se observó que la incidencia de DPI en nuestra población de pacientes trasplantados se aproximaba al 34%.

Al comparar la incidencia de disfunción entre ambos grupos no se identificaron diferencias significativas (Tabla 25).

También se determinó la incidencia de DPI mediante las clasificaciones Makowka, Mor, Nanashima y MEAF sin encontrar diferencias entre los grupos (Tabla 25).

Tabla 25. Análisis de DPI por grupos de tratamiento

Clasificación Disfunción	NAC NO (n=101)	NAC SI (n=113)	p
Makowka			
No	92 (91,1%)	109 (96,5%)	p = 0,17
Si	9 (0,9%)	4 (3,5%)	
Mor			
No	89 (88,1%)	108	p = 0,07
Si	12 (11,9%)	(95,57%) 5 (4,43%)	
Nanashima			
No	84 (83,2%)	98 (86,7%)	p = 0,59
Si	17 (16,8%)	15 (13,8%)	
Olthoff			
No	63 (62,3%)	78 (69,0%)	p = 0,38
Si	38 (37,4%)	35 (31,0%)	
MEAF	3.14	3.54	p = 0,10

5.2 Evaluación de DPI en donantes en función de la edad del donante

Al analizar la incidencia de DPI siguiendo la definición de K. Olthoff, se observó una incidencia global del 34,1% (n=73). También se evaluó la incidencia de DPI por subgrupos de edad del donante, viéndose que el subgrupo de edad más frecuente fue el de donantes con edad superior a 70 años. De los 73 pacientes que desarrollaron DPI, en 30 (41%) casos la edad de los donantes era superior a 70 años.

Tabla 26. Tabla de distribución de la disfunción primaria del injerto por grupos de edad del donante en los pacientes de los grupos analizados.

Edad subgrupo (años)	DISFUNCION NO (n = 141)	DISFUNCION SI (n =73)	Total (n=214)
< 60	61 (43.2%)	20 (27.4%)	81 (37.9%)
NAC SI	36 (59%)	8 (40%)	44 (54.4%)
NAC NO	25 (41%)	12 (60%)	37 (45.6%)
60-70	32 (22.7%)	23 (31.5%)	55 (25.7%)
NAC SI	20 (62.5%)	9 (39.1%)	29 (52.7%)
NAC NO	12 (37.5%)	14 (60.9%)	26 (47.3%)
> 70	48 (34.1%)	30 (41.1%)	78 (36.4%)
NAC SI	26 (54.2%)	14 (46.6%)	40 (51.3%)
NAC NO	22 (45.8%)	16 (53.4%)	38 (48.7%)

Se analizó la incidencia de DPI en función de los subgrupos de edad de los donantes; no se observaron diferencias en la incidencia de DPI entre ambos grupos de estudio en función de la edad del donante (p=0,92).

5.3 Evaluación de la DPI en donantes con esteatosis hepática

Se evaluó la incidencia de DPI (de acuerdo con la puntuación de K. Olthoff (71)) entre ambos grupos en función de si existía esteatosis en el donante. A pesar de que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0,19$), se puede observar cierta tendencia a menor DPI en el grupo de pacientes tratados con NAC que presentaban esteatosis leve-moderada (Figura 23).

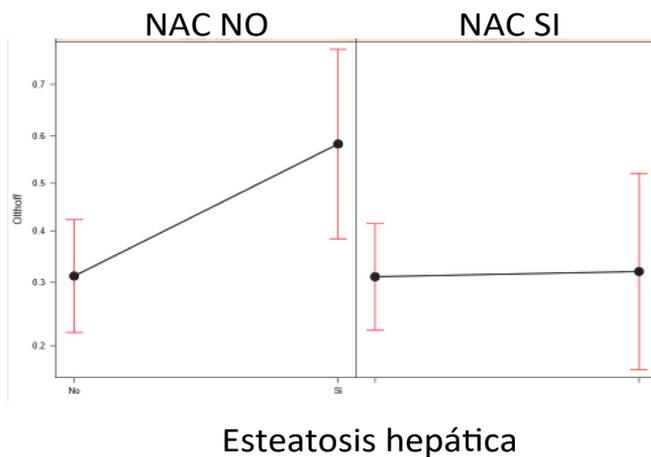


Figura 23. Evaluación de la DPI en pacientes donantes con esteatosis hepática

5.4 Análisis de donantes de riesgo

Se realizó el análisis de los pacientes por grupos de tratamiento en función de si habían recibido donantes de riesgo, *donor risk index* (DRI) (249) > 1.8.

En el grupo NAC SÍ se identificaron 20 donantes de DRI > 1.8, en el grupo NAC NO fueron 12.

Al analizar la incidencia de DPI en los pacientes que habían recibido donantes con DRI > 1.8 no se identificaron diferencias entre ambos grupos ($p=0,49$)(Figura 24).

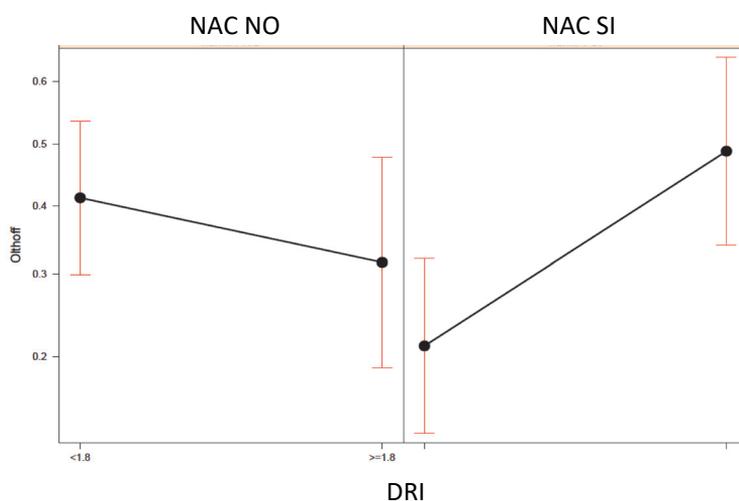


Figura 24. Análisis de los pacientes por grupos de tratamiento en función de donantes de riesgo

Se analizaron también los donantes clasificados de acuerdo con la puntuación de J. Briceño et al. (250) para donantes marginales. Se identificaron 27 (12.6%) donantes marginales

en el grupo NAC Sí y 25 (11.6%) en el grupo NAC NO, sin observarse diferencias estadísticamente significativas en este subgrupo en cuanto a DPI ($p=0,89$).

6 Asociación de parámetros bioquímicos con tiempos de isquemia

Al analizar el TIF y relacionarlo con los valores de transaminasas postoperatorias, concretamente los niveles postoperatorios de GPT durante la primera semana postoperatoria, se observó que para los tiempos de isquemia más pequeños de la serie, tiempos de isquemia fría menores de 150 min, los niveles de GPT son inferiores a 600 UI/L en el postrasplante inmediato en ambos grupos de estudio (Figura 25 - Figura **26**).

Sin embargo, en el grupo NAC NO se produce un pico de transaminasas en el postrasplante inmediato, para los tiempos de isquemia fría mayores de la serie. Este comportamiento no se objetiva en el grupo de pacientes tratados con NAC (Figura 25 - Figura **26**).

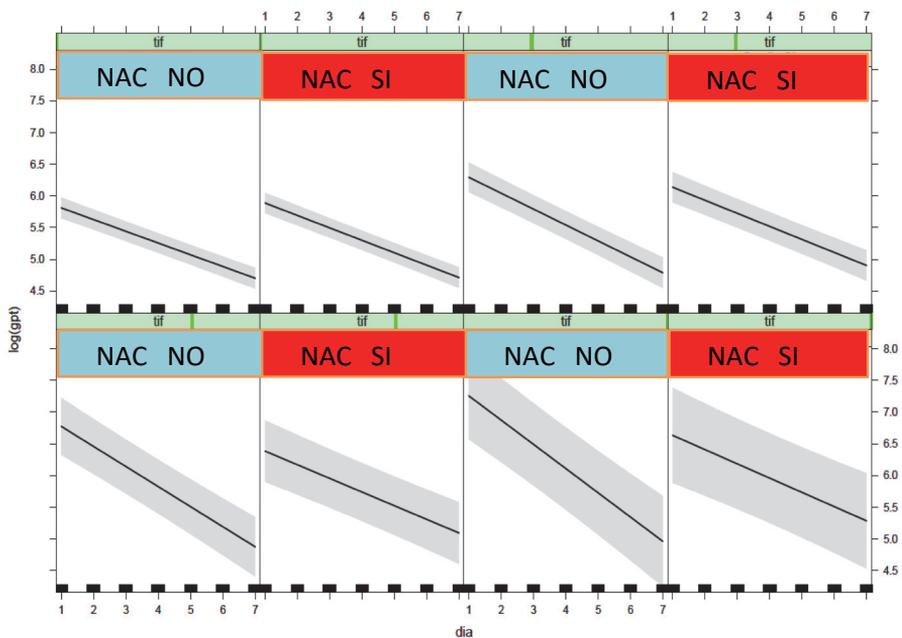


Figura 25. Relación del tiempo de isquemia fría-valores de GPT de la primera semana postrasplante

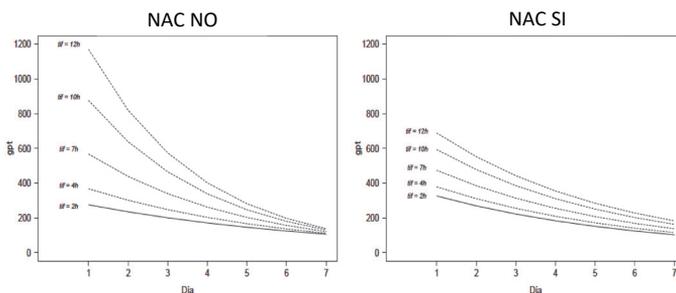


Figura 26. Relación del tiempo de isquemia fría-valores de GPT de la primera semana postrasplante

A mayor TIF se observan mayores niveles de GPT postrasplante. En la figura 27 se puede observar como la GPT aumenta de forma lineal a TIF en los pacientes que han sido

tratados con NAC, con una disminución significativa ($p=0,0125$) respecto a los que no han sido tratados, a partir de 6h de isquemia fría.

En el caso de los pacientes que no han sido tratados con NAC el crecimiento de GPT es exponencial transcurridas estas 6h de isquemia fría (Figura 27).

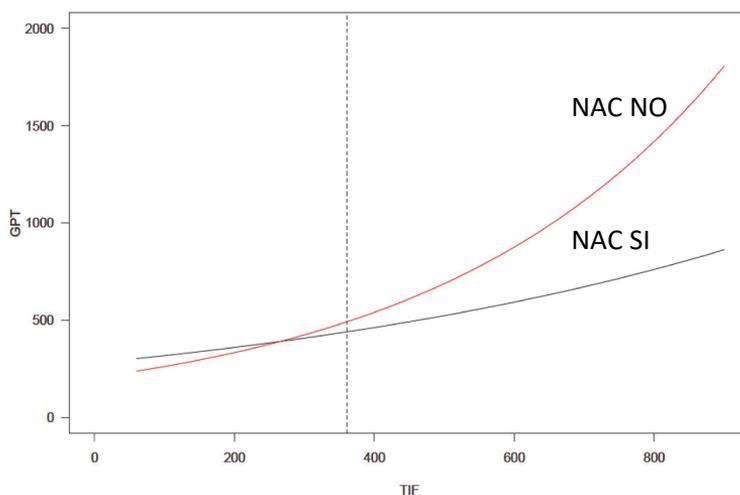


Figura 27. Relación GPT media 2º día postoperatorio - TIF por grupos de tratamiento.

7 Resultados del análisis anatómico-patológico de las muestras

En el estudio anatomopatológico se analizaron un total de 109 injertos con biopsias pre y postreperfusión (n=218).

El tamaño medio de las biopsias fue de 1,30 cm (DE 0,58).

Se analizó la presencia y grado de dilatación sinusoidal entre ambos grupos de estudio en las biopsias pre y post-reperfusión sin observarse diferencias entre ambos grupos de estudio (p=0,63)(Figura 28 y Figura 29).

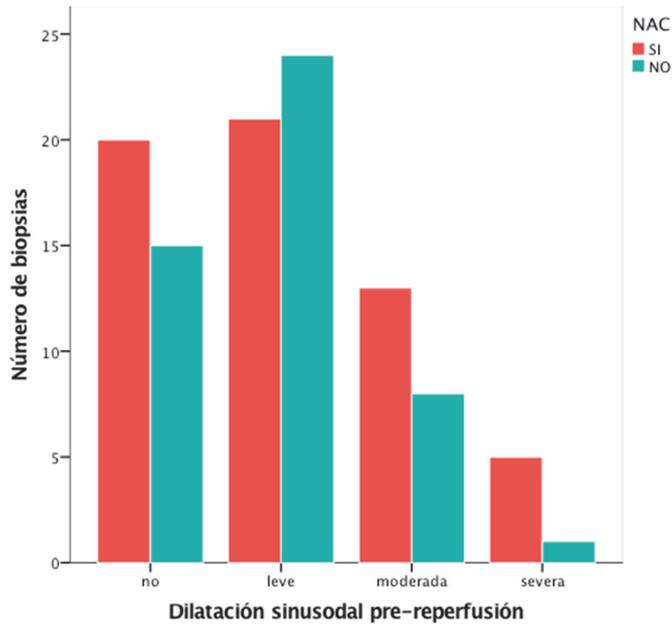


Figura 28. Presencia de dilatación sinusoidal en las biopsias pre-reperusión en los grupos analizados

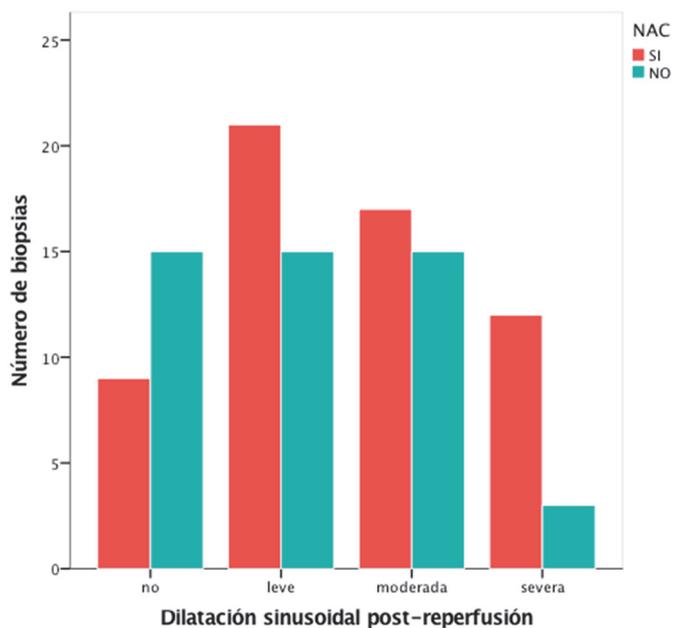


Figura 29. Presencia de dilatación sinusoidal en las biopsias post-reperfusión en los grupos analizados

Se evaluó la presencia y grado de macroesteatosis entre ambos grupos de estudio en las biopsias pre y postreperfusión sin observarse diferencias entre ambos ($p=0,46$) (Figura 30 y Figura 31).

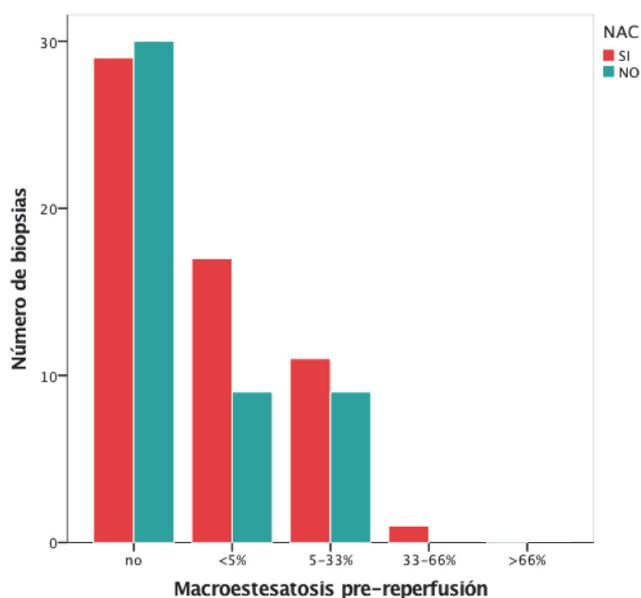


Figura 30. Grado de macrosteatosis en las biopsias pre-reperfusion en los grupos analizados

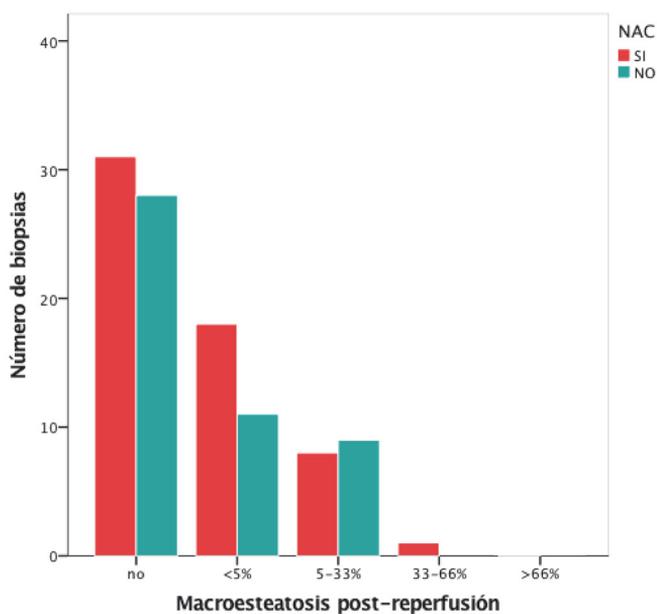


Figura 31. Grado de macrosteatosis en las biopsias post-reperfusion en los grupos analizados

Se determinó la presencia y grado de microesteatosis entre ambos grupos de estudio en las biopsias pre y postreperfusión sin observarse diferencias entre ambos ($p=0,12$)(Figura 32).

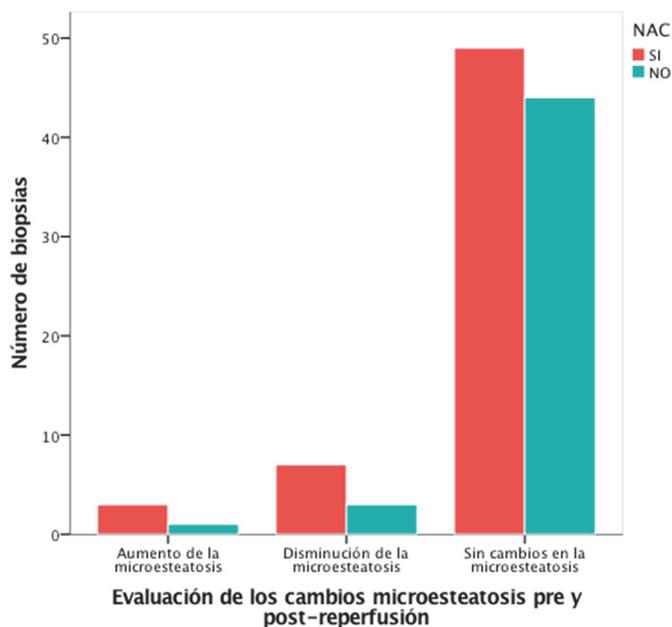


Figura 32. Evaluación de los cambios en el grado de microesteatosis en los grupos analizados

Se estudió la presencia y grado de balonización entre ambos grupos de estudio en las biopsias pre y postreperfusión sin observarse diferencias entre ambos ($p=0,50$) (Figura 33 y Figura 34).

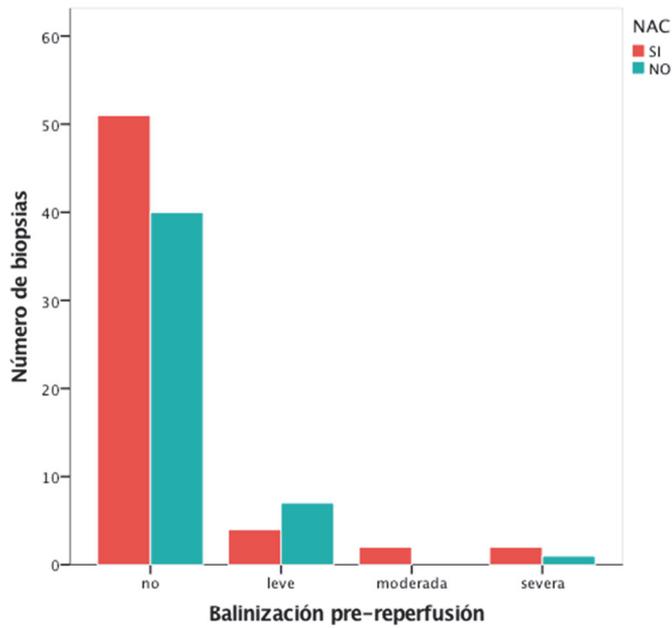


Figura 33. Grado de balonización en las biopsias pre-reperfusión en los grupos analizados

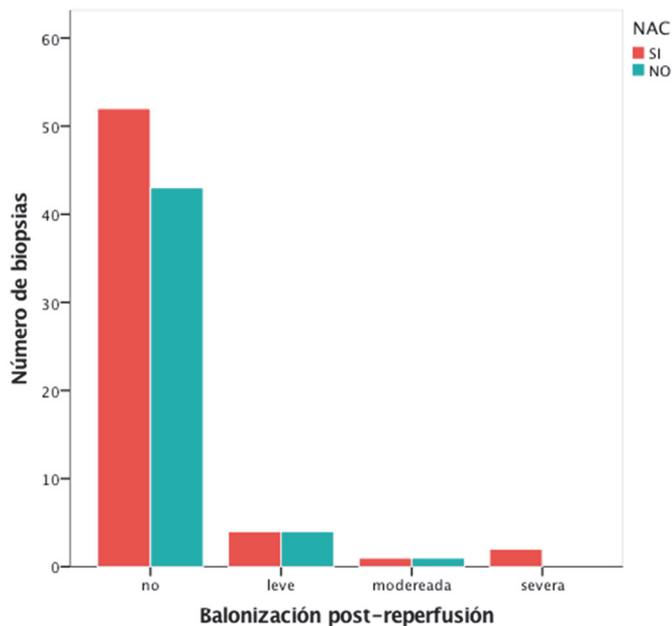


Figura 34. Grado de balonización en las biopsias pre-reperusión en los grupos analizados

Se comprobó la presencia y grado de binucleación entre ambos grupos de estudio en las biopsias pre y postreperusión sin observarse diferencias entre ambos ($p=0,50$) (Figura 35).

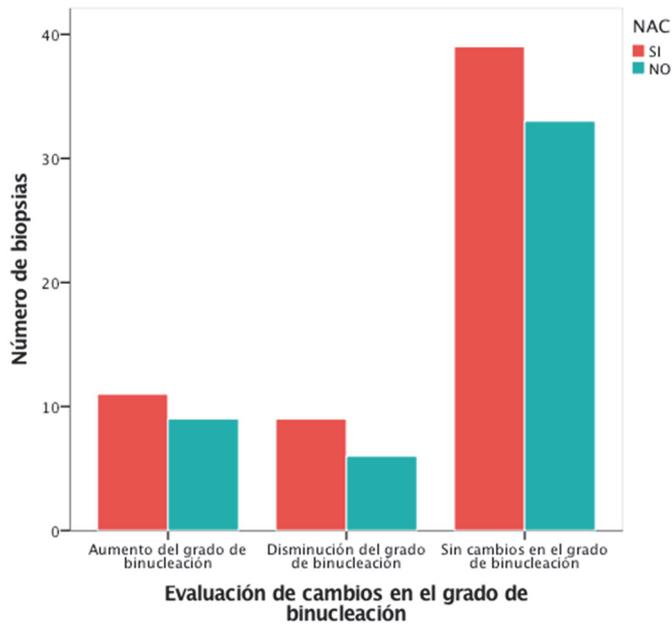


Figura 35. Evaluación de los cambios en el grupo de binucleación en los grupos analizados

8 Análisis de supervivencia del injerto

Se analizó la supervivencia del injerto en función de si los pacientes habían recibido o no tratamiento, sin encontrarse diferencias entre ambos grupos a los 3 años del trasplante ($p=0,54$). La supervivencia del injerto al año y a los tres años es de 89% y 87% en el grupo NAC SÍ y 85% y 84% en NAC NO, respectivamente, sin diferencias entre ambos grupos (Figura 36).

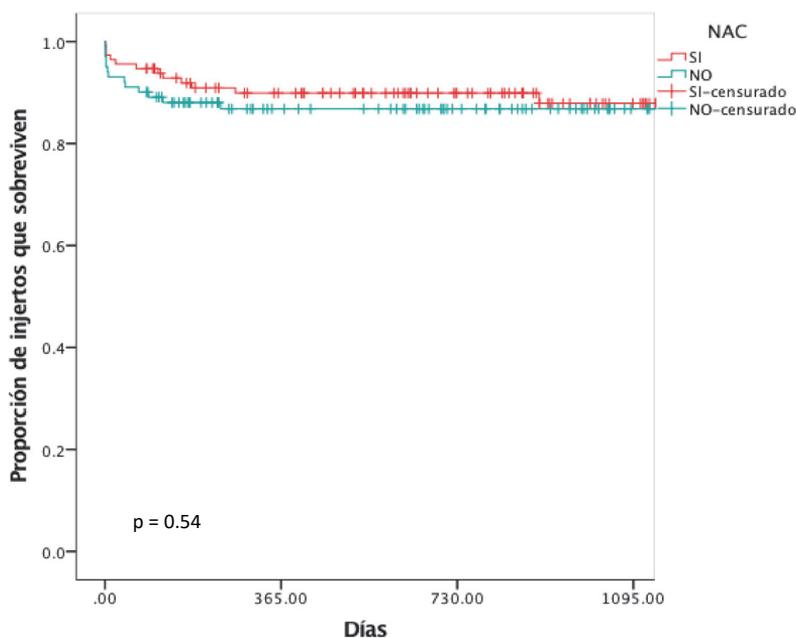


Figura 36. Supervivencia del injerto en los grupos analizados

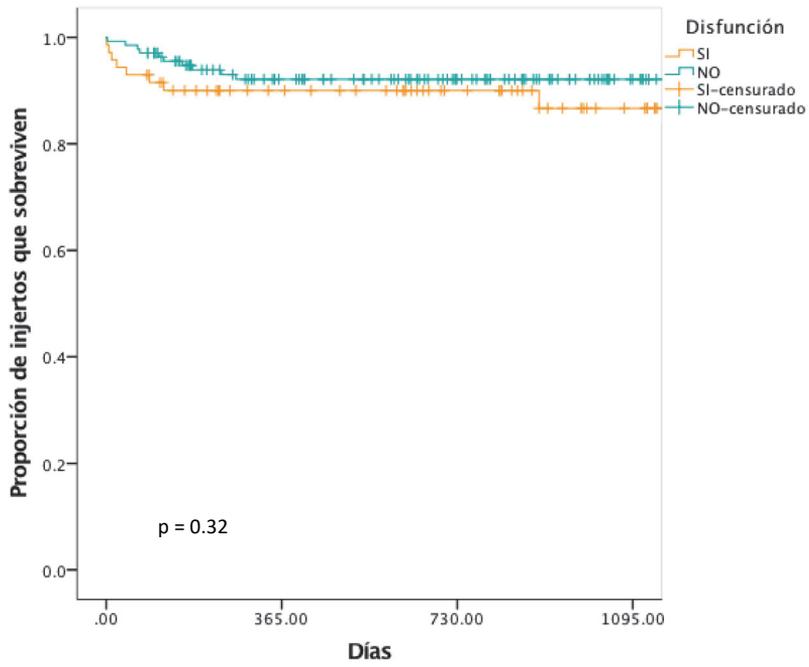


Figura 37. Supervivencia del injerto en relación con la disfunción postoperatoria

9 Análisis de supervivencia del paciente

Se analizó la supervivencia global del paciente en función de si habían recibido o no tratamiento, sin encontrarse diferencias entre ambos grupos al año y a los 3 años del trasplante ($p=0,69$). La supervivencia global al año y a los tres años fue de 89% y 87% en NAC SÍ 89% y 88% en NAC NO (Figura 38).

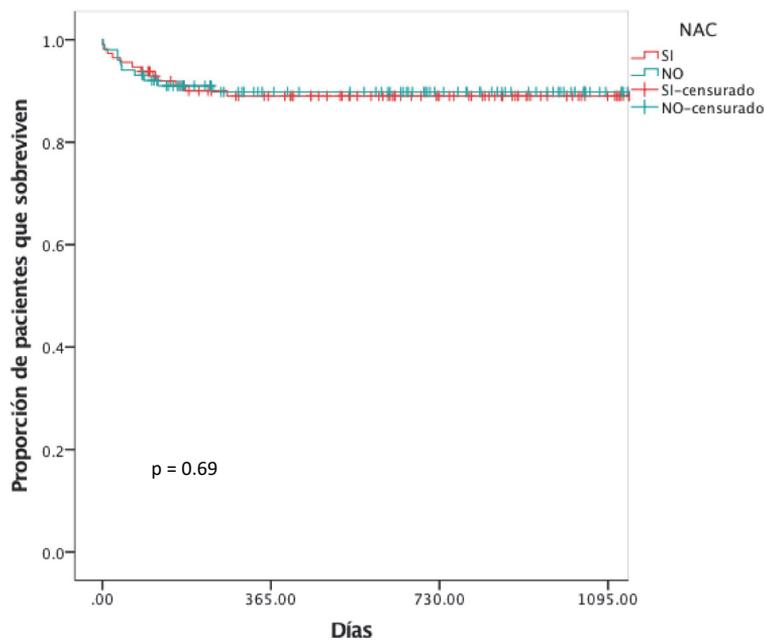


Figura 38. Supervivencia del paciente en los grupos analizados

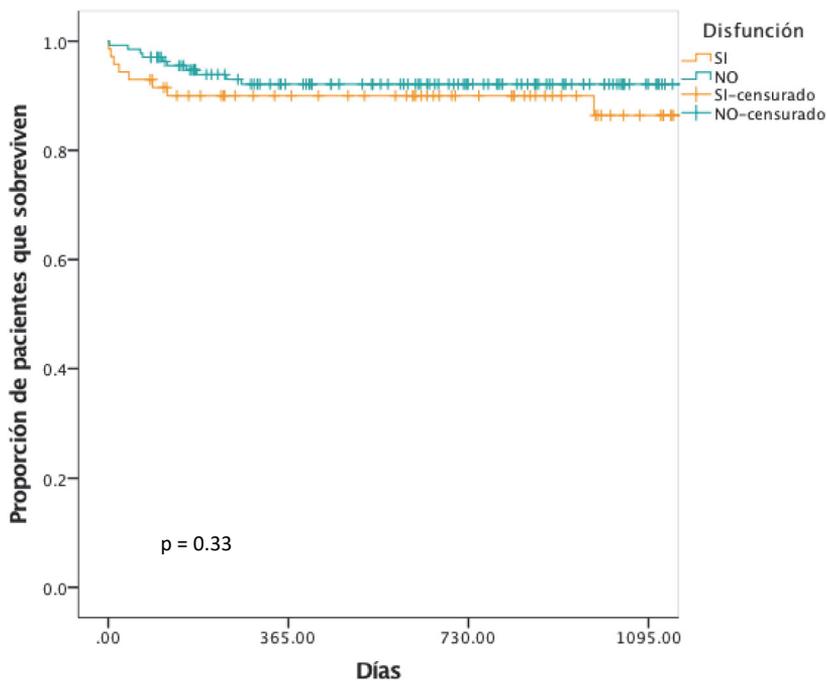


Figura 39. Supervivencia del paciente en relación con la disfunción postrasplante

10 Resultados del análisis metabonómico de las muestras

De los pacientes incluidos en el estudio se analizaron un total de 76 muestras para el análisis metabonómico, de las cuáles, 41 eran del grupo NAC SÍ y 36 del grupo NAC NO.

Las muestras de tejido hepático recogidas fueron analizadas siguiendo el método validado para la determinación de marcadores del OS (n=16)(229). No se obtuvieron cambios significativos asociados a la presencia/ausencia de NAC para ningún marcador. De todos estos marcadores analizados el GSH, GSSG y el OphA, presentaron tendencias de cambio, tal y como se ve en los diagramas de cajas y bigotes representados a continuación, sin embargo, los resultados no son significativos desde un punto de vista estadístico.

Los niveles medios de GSH expresados en pmol/mg determinados en la primera biopsia (tras inyección de NAC iv periférico vs placebo) fueron de 734,7 (728,4) y su mediana fue de 374,6 en el grupo NAC SÍ. En el grupo NAC NO la media de los niveles de GSH en pmol/mg en la primera biopsia fue de 608,20 (581,9) y su mediana fue de 372,9 (p=0,47) (Figura 40).

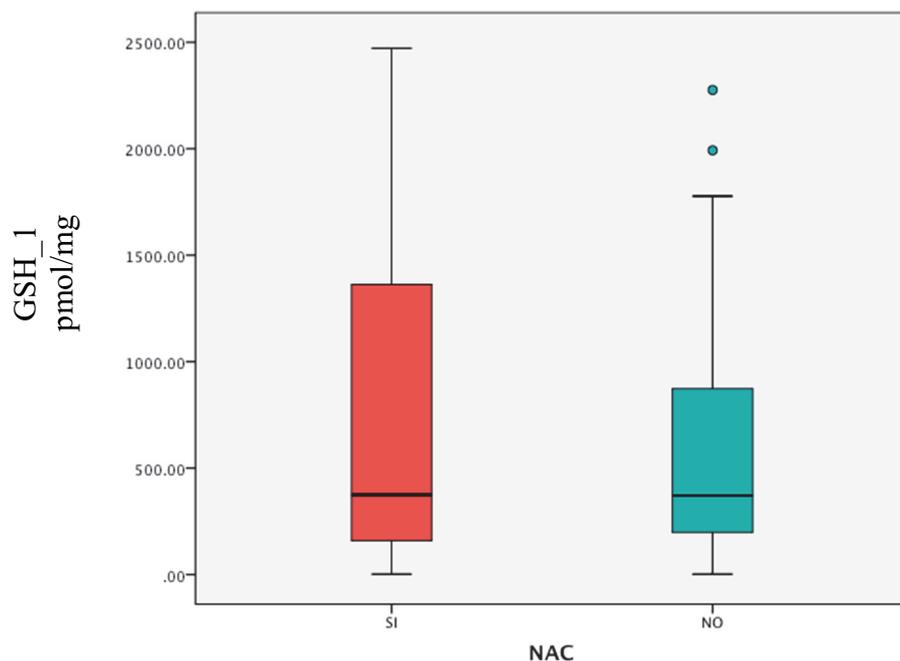


Figura 40. Diagrama de cajas. Niveles de GSH en pmol/mg en la primera biopsia para los pacientes de los grupos analizados.

Los niveles medios de GSH en pmol/mg determinados en la segunda biopsia (tras la inyección de NAC portal y en la solución de preservación) fueron de 886,1 (828,0) y su mediana fue de 650,6 en el grupo NAC SÍ. En el grupo NAC NO la media de los niveles de GSH en pmol/mg en la segunda biopsia fue de 678,7 (525,9) y su mediana fue de 540,5 ($p=0,44$) (Figura 41).

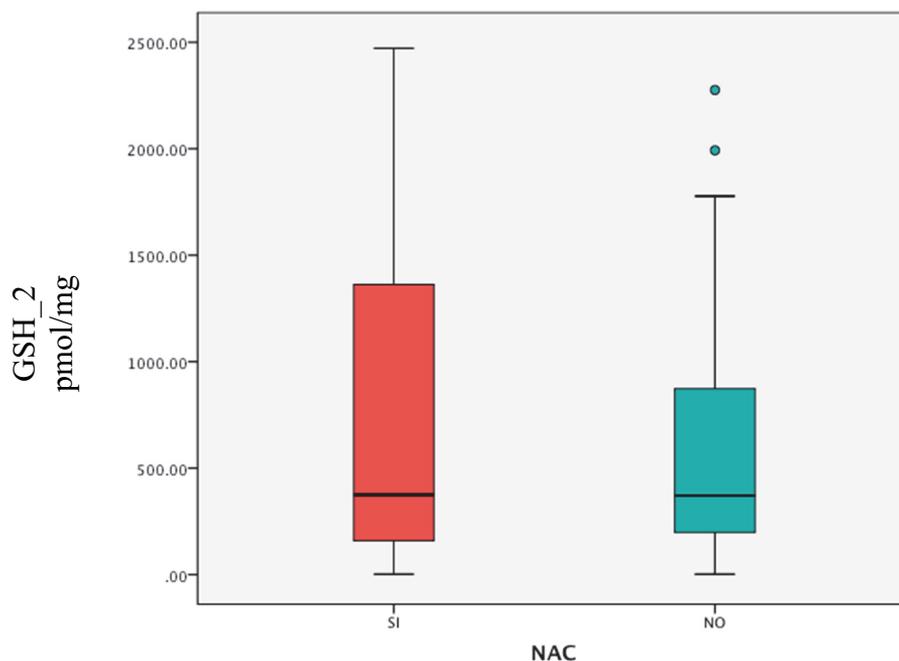


Figura 41. Diagrama de cajas. Niveles de GSH en pmol/mg en la segunda biopsia para los pacientes de los grupos analizados.

Los niveles medios de GSH en pmol/mg determinados en la tercera biopsia (al final del implante) fueron de 537,2 (575,5) y su mediana fue de 270,5 en el grupo NAC SÍ. En el grupo NAC NO la media de los niveles de GSH en pmol/mg en la tercera biopsia fue de 440,1 (587,6) y su mediana fue de 255,5 (p=0,414) (Figura 42).

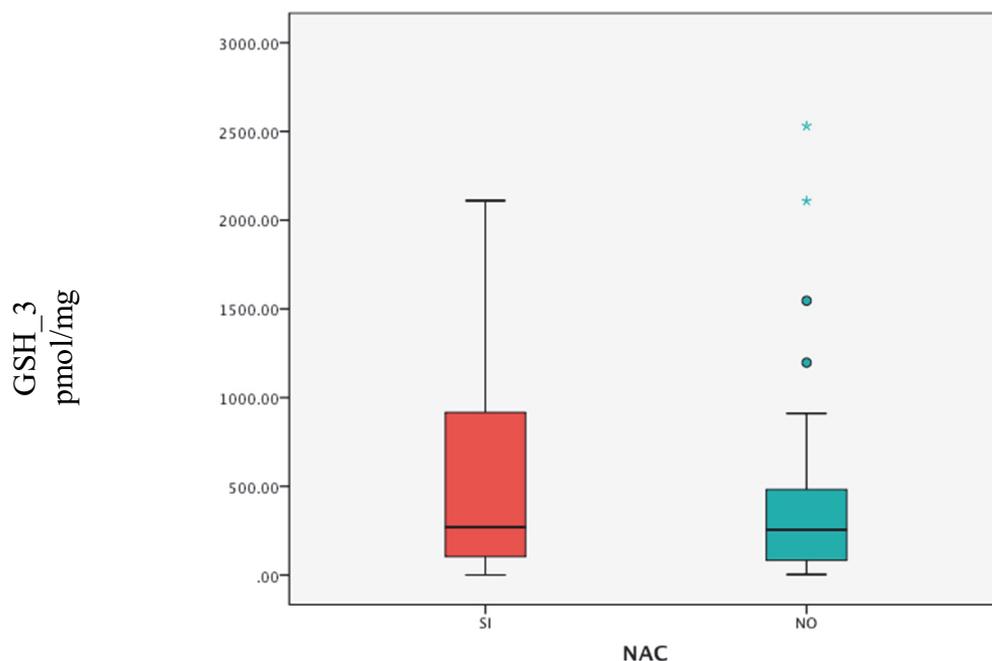


Figura 42. Diagrama de cajas. Niveles de GSH en pmol/mg en la segunda biopsia para los pacientes de los grupos analizados.

En las muestras analizadas encontramos un grupo de pacientes (n=15) con aumento de los niveles de GSH de manera progresiva en el grupo NAC SÍ, que no se produce en el grupo control (n=8)(Figura 43 Figura 44).

Cuando realizamos el ratio GSH/GSSG observamos que en los pacientes tratados se produce un aumento del ratio mientras que en los pacientes control no se observa dicho aumento, generándose un ambiente más oxidado, y por tanto menos reductor.

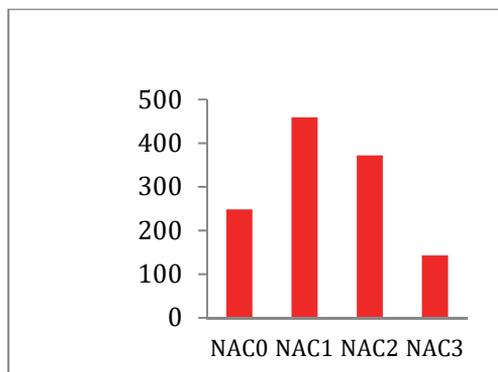


Figura 43. Ratio GSH/GSSG en el grupo de tratamiento

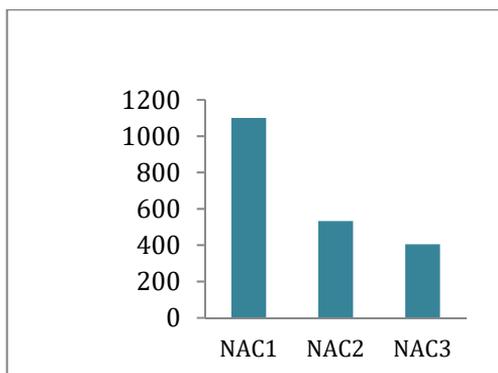


Figura 44. Ratio GSH/GSSG en el grupo control

Al analizar todos los pacientes incluidos se observa un mayor ratio GSH/GSSG en el grupo de tratamiento, ambiente menos oxidativo, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,23$) (Figura 45).

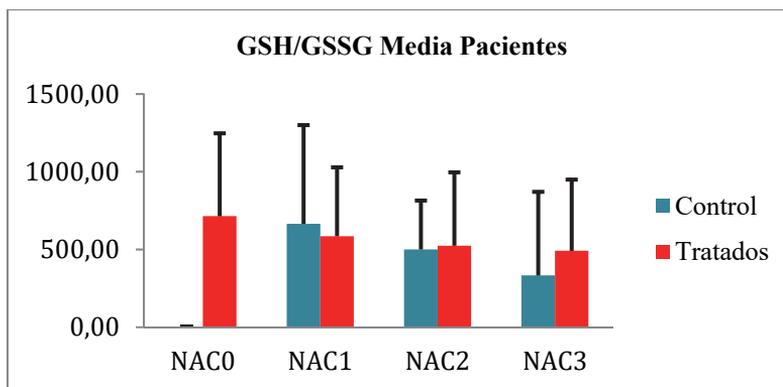


Figura 45. Comparación de las medias del ratio GSH/GSSG de los pacientes incluidos en el estudio metabólico

Los niveles medios de OphA en pmol/mg fueron de 46,5 (86,3) y una mediana de 15,5 en el grupo NAC SÍ y de 63,24 (87,1) y una mediana de 23,3 en el grupo NAC NO. Al analizar los niveles de OphA entre ambos grupos se evidenció que el grupo de pacientes del grupo control presentaban mayores niveles de OphA, lo cual indica mayor tendencia al consumo de GSH, entorno de mayor oxidación, aunque sin diferencia estadística entre ambos grupos ($p=0,51$)(Figura 46).

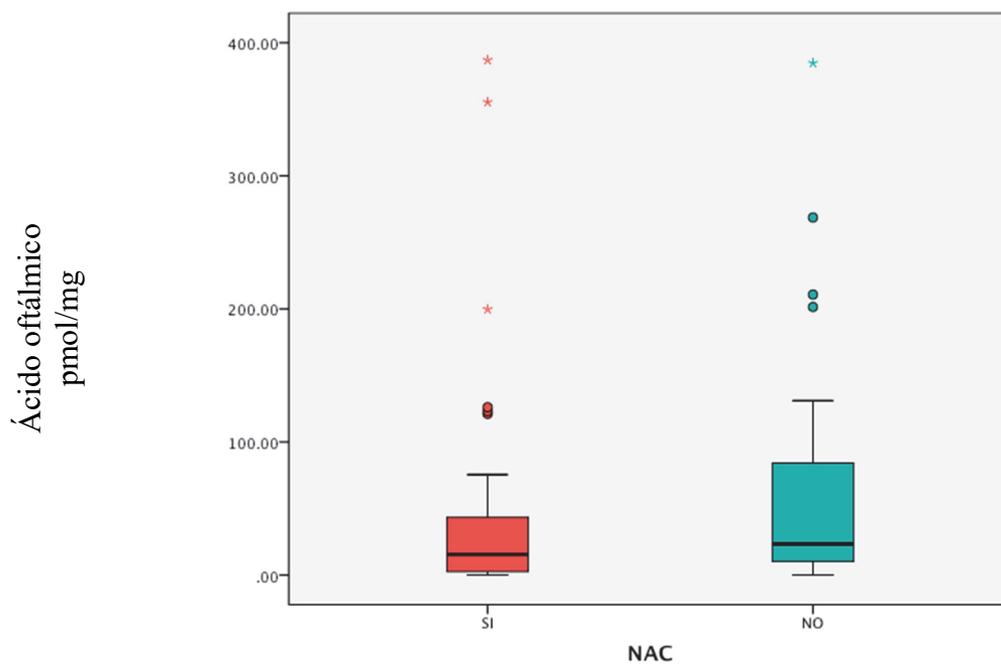


Figura 46. Niveles de ácido oftálmico en la tercera biopsia en pmol/mg en los pacientes de los grupos analizados

DISCUSIÓN

1 Aumentar el número de donantes

Aunque es en 1963 cuando se realiza el primer TH en humanos en la Universidad de Colorado (10), es 20 años después en Bethesda (Maryland) cuando se celebra la conferencia de consenso en la que se declara el TH como el tratamiento de elección de las enfermedades hepáticas en estadio terminal (251). Posteriormente, el número de pacientes que opta a recibir un TH ha ido progresivamente incrementándose a lo largo de los años. Se han ampliado las indicaciones, el límite de edad para acceder al TH ha ido aumentando de forma progresiva y a su vez se ha conseguido incrementar la supervivencia después del trasplante (126,252). El inconveniente es que no se dispone de suficientes donantes para las demandas requeridas en las listas de espera (19). En el año 2008 el tiempo de espera medio nacional para el TH era de 124 días con una mortalidad en lista de espera entre 7-8% (253)(Figura 47).

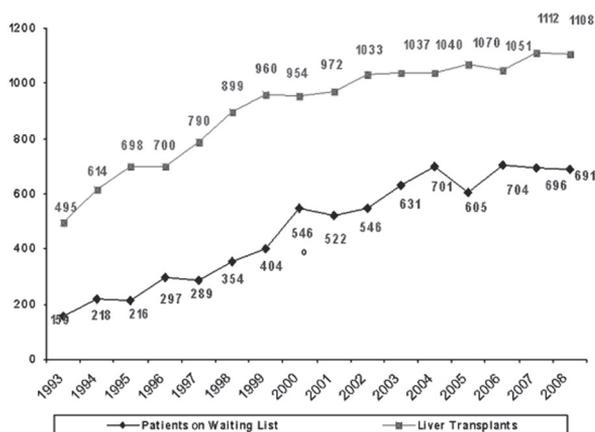


Figura 47. Número de pacientes en lista de espera al final de cada año en España (1993-2008).

Imagen cedida desde Digestive and Liver Disease Supplements 3 2009 75-81.

La persistente escasez de donantes ha obligado a los centros de trasplante a buscar alternativas con la finalidad de aumentar el número de donantes disponibles. Actualmente, se consideran también las fuentes de injertos hepáticos diferentes al donante con muerte encefálica: el donante vivo, el *split*, el trasplante dominó y los donantes en asistolia (254,255).

Desde el año 2011 en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe se han realizado 8 *splits*, 2 trasplantes de donante vivo y 2 trasplantes dominó.

Por otra parte, también se ha intentado aumentar el número de donantes en muerte encefálica considerándose donantes potenciales a aquellos que anteriormente se descartaban por su peor calidad, asumiendo consecuentemente un mayor

riesgo para el desarrollo de DPI (63,66,70). El uso de donantes con criterios expandidos, también conocidos antiguamente como donantes marginales, es una opción que se utiliza en todo el mundo para aumentar la oferta de órganos para trasplante. La definición de injertos marginales implica el uso de donantes añosos, con edad superior a 60 años o que presentan otras características perjudiciales, (etnia afro-americana, IMC, causa de la muerte que no es traumatismo o anoxia, donante a corazón parado, Split o hígado reducido, entre otros), que pueden condicionar mayor frecuencia de DPI y de FPI (256). Sin embargo, el riesgo de la utilización de este tipo de injertos sigue siendo impreciso y controvertido (70,257-259).

En nuestra serie el grupo de edad que presentó mayor DPI fue el subgrupo de donantes con edad superior a 70 años. En el grupo de Olthoff et al. (71) se observó como se incrementaba significativamente la incidencia de DPI con la edad, de manera que los donantes mayores de 45 años duplicaban el riesgo de DPI (RR . 1.94, 95% CI: 1.21, 3.92, $p = 0.004$).

Las directrices para el uso de injertos con criterios expandidos varían de un centro a otro. El estado pretrasplante de los pacientes parece ser de utilidad para la asignación de este tipo de órganos, sin embargo, existe desacuerdo a la hora de la asignación de este tipo de órganos en función del receptor (121,260). Por una parte, algunos autores han seleccionado injertos marginales para su utilización en receptores sanos,

mientras que otros han preferido abogar su uso sin restricciones para satisfacer las necesidades de las listas de espera de trasplante (257–259).

A pesar de los múltiples esfuerzos por expandir los criterios de aceptación de los donantes, en el año 2014 en España se desecharon 374 hígados para trasplante, un 26.7 % de los hígados generados para trasplante, siendo descartados en el 90% de los casos por presentar un aspecto macroscópico patológico (261).

De los potenciales donantes que se consideraron durante el estudio se desecharon 62 hígados, un 28% de los generados (Tabla 10), dato superponible a los demás grupos de trasplante en España.

De las múltiples escalas propuestas para considerar donantes de riesgo, en el estudio se consideró el DRI (249) por ser la escala de riesgo más utilizada en la literatura publicada. En la presente investigación se identificaron 32 donantes con DRI superior a 1.8, los cuales se encontraron asignados de manera similar entre ambos grupos de estudio, 20 pacientes en el grupo de tratamiento y 12 en el grupo control. Además, se consideró también la clasificación de donantes con criterios expandidos propuesta por J. Briceño et al. (250), por su practicidad, identificando 52 (24.3%) pacientes en los que se utilizaron donantes de riesgo en la serie, distribuidos de manera similar en ambos grupos de tratamiento, 25 (11.7%)

pacientes en el grupo control y 27 (12.6%) en el grupo de tratamiento.

2 Mejorando el *pool* de donantes: administración de NAC

Cuando restauramos el flujo sanguíneo del injerto hepático en el trasplante se producen una serie de eventos que exacerban el daño producido tras la isquemia. Las interacciones que se producen en el endotelio de los sinusoides hepáticos, las células *Kupffer* y los metabolitos celulares procedentes del *inflow* sanguíneo producen daño local y respuesta inflamatoria sistémica (262,263).

A nivel hepatocelular se producen ROS en las mitocondrias, que acaban produciendo OS. En los mecanismos de defensa intracelular que participan en la regulación del OS es bien conocida la participación de la superóxido dismutasa y la glutathion peroxidasa (34,176,196). GSH constituye el principal buffer endógeno de grupo *thiol* que interviene en la eliminación de radicales libres de oxígeno (190). Para la síntesis tisular de GSH la disponibilidad de cisteína es generalmente el factor limitante.

Las estrategias para reducir la incidencia de DPI son de actual relevancia (146,264). Dado que las causas de la disfunción del injerto son múltiples y la IR juega un papel fundamental alterando la microcirculación del órgano y generando OS, se han testado múltiples antioxidantes (265). La NAC, precursor de cisteína, fluye rápidamente al interior de la célula, se hidroliza en L-cisteína y rellena el almacén de GSH (266,267).

Un enfoque farmacológico sencillo, seguro y económico, es la administración sistémica de NAC (164).

En la literatura publicada, la NAC se ha administrado de manera muy variada: antes de la isquemia, después de la isquemia y antes de la reperfusión, en el donante o en el receptor.

En el experimento realizado por Nakano et al. (194), el efecto que se produce tras la administración de NAC antes de la isquemia disminuye el daño de IR, sin embargo, este efecto se pierde cuando se administra NAC en el momento de la reperfusión. En nuestro estudio se decidió administrar la NAC en el donante y antes de la isquemia fría, por el hecho de que reponer los niveles de GSH antes de producirse el primer daño hepatocelular posibilita el hecho de detener la cascada de ROS desde el primer momento. La depleción de glutatión puede potenciar la toxicidad derivada de las ROS, si podemos anticiparnos a la depleción de glutatión y mantenerlo en niveles normales, protegeremos a las células precozmente frente a dicha toxicidad (268).

En los 11 estudios clínicos publicados de la utilización de NAC en el TH únicamente se administra en el donante en 2 estudios (207,208):

- El estudio de Regueira et al. (208) se trata de un estudio no aleatorizado y en el que se administra NAC en bolo intravenoso

de 6 gramos, sin ajustarse el peso del paciente, sin embargo en sus resultados se observa una mejoría en los niveles de transaminasas con la relevancia clínica de disminuir la DPI en el grupo de tratamiento.

- En el estudio de D'Amico et al (207), se administran 30 mg/kg en vía venosa periférica previa a la cirugía junto con 150 mg/kg (dosis máxima de 300 mg) en la vena porta, justo antes del clampaje aórtico.

En el presente estudio se decidió administrar la NAC en el donante tras realizar el análisis de las publicaciones sobre la administración de NAC en el trasplante y observarse que tanto el estudio de F. D'Amico (207) como en el de F. Regueira (208) se conseguía mejorar la DPI en el grupo de tratamiento, sin poner en riesgo directo al receptor al no administrarle ningún fármaco adicional. En nuestro experimento se administró la NAC en vía venosa periférica y en vena porta, tal como describía el estudio de D'Amico (207). Sin embargo, decidimos administrar la NAC en vena porta más precozmente, debido a que administrarla justo antes del clampaje aórtico permite poco tiempo de acción. Finalmente decidimos añadir 300 mg de NAC en el primer litro de solución de preservación por vía portal. Únicamente se administró en el primer litro, ya que una vez se produce el enfriamiento celular, la utilidad de la administración del precursor carece de utilidad.

No existe ningún estudio publicado en la literatura con la dosis de NAC administrada en este ensayo. Ninguno de los estudios clínicos previamente publicados inicia la administración de NAC tan precozmente como el presente estudio (intrevenosa y portal a los 30 min de iniciar la extracción hepática en el donante), permitiendo de este modo reponer los depósitos de GSH con mayor antelación, mejorando de este modo la metodología frente a los experimentos clínicos anteriores. El presente estudio es el que consta con mayor muestral de los estudios clínicos realizados con la utilización de NAC en el TH. Esta investigación clínica es la primera que compara la determinación de metabolitos del OS reconocidos, mediante técnicas de metabonómica aplicadas a biopsias hepáticas seriadas del injerto.

3 Resultados de la n-acetilcisteína en el daño hepático

En varios modelos experimentales, la NAC ha demostrado proteger el hígado del daño severo inducido por IR (171,172,174–180,187,188,190). De los estudios publicados sobre el papel que ejerce la NAC en el daño de IR en la resección hepática y en el TH se observa:

- i) Existen múltiples estudios experimentales sobre el daño IR hepático, que han sido realizados con un tamaño muestral pequeño, sin definir el cálculo de la potencia del estudio y con *end-points* definidos de manera ambigua. Sin

embargo, se observan efectos beneficiosos en 17 (171-173,175,176,178,180-186,188,190,191,269) de los 21 estudios analizados. El resultado más frecuentemente reportado es la disminución de las transaminasas y la reducción del daño oxidativo. La vía de administración más estudiada es la vía intravenosa y la mayoría recomiendan que la NAC debe ser administrada antes de la isquemia hepática (194). No obstante, existen 4 estudios publicados (174,177,179,187) en los que no se observa beneficio de la adición de NAC y también se administraron en el período previo a la isquemia. Profundizando en estos estudios, cabe recalcar que en el estudio de Chavez-Cartaya et al. (174) en el que no se observan beneficios derivados de la administración de NAC, la vía de administración fue intramuscular y ésta no ha sido utilizada en ningún otro estudio publicado hasta el momento.

ii) En los resultados de los estudios experimentales de perfusión de hígado aislado, en 2 de ellos se observa descenso de transaminasas y disminución del daño IR (200,201) y en otros 2 (199,202) no se observa ningún beneficio. En los estudios en los que se observan beneficios, existen dos aspectos técnicos a tener en cuenta: a) En el estudio de Koeppel et al. (200) se administra una dosis superior (400 mg/kg) al resto de estudios; b) En el estudio de Regueira et al. (201) la administración de NAC se realiza 1 hora antes de la isquemia. Ambos aspectos han sido

considerados claves para conseguir efectividad de la adición de NAC por algunos autores (164). En el presente estudio se administró la NAC 1 hora antes de la isquemia fría y se infundieron cantidades de NAC superiores a los utilizados en los previos ensayos clínicos (207).

iii) La mayoría de los estudios clínicos publicados sobre NAC son series de casos de pequeño tamaño muestral (170,203-206,208-211), debido a que se trata de estudios publicados hace más de una década cuando el papel de la NAC podía ser legítimamente evaluado únicamente en estudios piloto. Sin embargo, estudios clínicos más recientes como el Hilmi et al. (212) y de D'Amico et al. (207) son ensayos clínicos aleatorizados y con tamaños muestrales significativamente superiores a los estudios clínicos previos. Con todo, los resultados obtenidos en ambos son contrarios y aunque ambos traten de la administración de la NAC en el TH, no son comparables, ya que la metodología utilizada en la dosis, vía de administración y población del estudio, son distintas. Mientras que en el estudio de I. Hilmi (212), se utiliza la vía de administración iv, a una dosis de 70 mg por kg cada 4 H con un total de 12 administraciones y el tratamiento lo recibe el receptor, sin observarse ningún beneficio en el grupo de tratamiento; en el estudio de F. D'Amico (207), el tratamiento con NAC se administra vía iv-portal, a una dosis de 30 mg por kg iv y 300 mg en la vena porta antes de la

perfusión, en el donante, observándose una disminución de las complicaciones postoperatorias y una mayor supervivencia del injerto al año del trasplante en el grupo tratado.

iv) En el contexto del TH de los 11 estudios publicados sólo en 4 (206-208,212) se examina la supervivencia del injerto y en 2 (170,211) de ellos no se utilizan los marcadores bioquímicos habituales para la evaluación del proceso del daño IR.

En resumen se puede deducir que existen varios estudios experimentales que apoyan el uso de NAC, principalmente si el tratamiento se administra antes de la isquemia, ya que reduce los marcadores bioquímicos de daño hepático, aunque sin observarse una repercusión clínica coincidente en todos ellos.

En nuestro estudio, hemos evidenciado que los niveles de GPT disminuyen significativamente a partir de las 6h de isquemia fría en el grupo de tratamiento. Se observa una reducción del pico de las transaminasas después del trasplante, resultados que se corroboran con los hallazgos referidos en la mayoría de artículos publicados (Tabla 27).

Tabla 27. Tabla de estudio clínicos tras la administración de NAC en el trasplante epático con repercusión bioquímica en el receptor.

Autor Año	Tipo	Intervención NAC	Nº NAC -/ Nº NAC+	End-point
Regueira et al. 1997 (208)	Cohortes sin/con NAC	6 g NAC al donante 1 hora antes del trasplante	25/37	GOT : 825 control GOT: 353 NAC DPI n = 5 control DPI n = 0 NAC .
Steib et al. 1998 (205)	RCT	150 mg/kg NAC durante 30 min + 50 mg/kg durante 4 h en el receptor	30/30	GOT NAC 773 ± 133 vs control 1102 ± 225 U/L
Bucuvalas et al. 2001 (206)	Estudio comparativo no aleatorio	70 mg/kg en la reperusión y cada 12 h durante 6 días (junto con PGE)	12/13	Pico GPT 499 UI/L NAC vs 867 UI/L en control. OS a los 3 meses 100% en ambos grupos.
Santiago et al. 2010 (211)	RCT	100 mg/kg tras 15 min de iniciar la fase anhepática seguidos de 50 mg/kg infusión	25/25	Disminución del ph en el grupo NAC tras la reperusión.

			durante 24 h.		
Amico et al. 2013 (207)	RCT	30 mg/kg	71/69	GOT 15 DPO	
		NAC en el donante 1 h antes de la cirugía + 300 mg en vena porta antes del clampaje en el donante			

La utilización de NAC intravenosa, se ha reportado como segura en todos los estudios publicados, con escasos efectos secundarios, principalmente reacciones anafilácticas moderadas, que rara vez requieren tratamiento o cese de la administración del antioxidante (270). En nuestro estudio no se identificó ningún acontecimiento adverso con la administración de NAC.

4 De la isquemia reperusión al fallo primario del injerto

Durante el proceso del trasplante participan múltiples factores que van a condicionar la posterior función del órgano, el daño que produce la IR es el principal ejecutor. La esteatosis del injerto, la edad del donante y los tiempos de isquemia fría largos, van a favorecer el desarrollo de la IR, que en función de su severidad culminarán en la posterior DPI (103,121,123,250). El efecto se debe a una cascada de eventos celulares que acaban perturbando el flujo microcirculatorio del injerto, el cual, bien puede estar ausente, produciendo fallo de la perfusión capilar, o bien puede generar reflujo paradójico, haciendo interaccionar los leucocitos con el endotelio, la liberación de los mediadores tóxicos y el deterioro de la barrera endotelial (69,271).

Existen también otros factores que contribuyen tanto a la DPI como a generar efectos perjudiciales sobre el resultado global después del TH. Estos delegados son: las condiciones del receptor, el tipo de donante, la conservación del órgano, la inmunosupresión y el tipo de régimen antibiótico en el período perioperatorio (114,249,272).

A parte de las complicaciones técnicas (vasculares y biliares) y el rechazo agudo o crónico, la DPI cuenta con la mayoría de indicaciones para el retrasplante (273). En nuestra serie de los 7 (3,2%) pacientes que precisaron retrasplante (del día 0 al día

7 postoperatorio) en 3 (42%) casos la indicación fue por DPI ($p=0,1$), todos ellos en el grupo NAC NO. Resultados de tasa de retrasplante similares a los obtenidos por el grupo de Olthoff et al. (71), de los 9 (3%) pacientes retrasplantados en su serie, en 5 (55%) casos la indicación fue por DPI. En el estudio de D'Amico et al. (207), se identificaron 38 FPI que condicionaron 6 retrasplantes (4,2%). Se identificó FPI en 34% ($n=13$) en el grupo de tratamiento y 66% ($n=25$) en el grupo control ($p=0,03$). Durante los primeros 3 meses postrasplante la principal causa de FPI también fue la DPI en un 42% de los casos, resultados superponibles a los obtenidos en la presente tesis doctoral.

Explicar el aumento de la incidencia del retrasplante en el grupo control requiere profundizar en los mecanismos moleculares que envuelven el OS que acontece el proceso de la IR. Aunque el papel de la respuesta inflamatoria en el proceso de la IR se ha documentado desde los años 90, siguen existiendo detalles a nivel molecular y mecanismos que siguen siendo objeto de estudio. Estudios recientes (274) sugieren que el impacto del proceso de IR depende de la respuesta inflamatoria local en el receptor, el cual produce daño en el parénquima hepático tras producción de ROS entre otras moléculas dañinas llamadas “alarminas” que junto con la activación de monocitos circulantes y polimorfonucleares va progresivamente amplificando la respuesta inmune local con la consiguiente destrucción del parénquima hepático. Esta

interacción puede ser la clave para comprender el enlace entre la NAC y el FPI.

5 Incidencia de disfunción primaria del injerto del estudio

La incidencia de DPI después del TH reportada en la literatura es de aproximadamente un 25% dentro de un rango entre 9 a 43% (64–66,69–71,271) en función de las diferentes definiciones que caracterizan la DPI. El FPI se desarrolla hasta en alrededor de un 10% de los casos y requiere retrasplante urgente (124).

Se han descrito una amplia variedad de propuestas para definir la disfunción del injerto después del TH. Actualmente sigue sin existir una terminología estandarizada. Muchas de las clasificaciones utilizan criterios subjetivos como la escasa producción biliar que incluye la clasificación de Greig et al. (64) o la presencia de encefalopatía que considera M. Deschênes (68). Otras consideran parámetros que no se determinan habitualmente en la práctica clínica como es la cuantificación de los niveles de amonio de la escala de R. Ploeg (65). Sin embargo, todas las escalas en unanimidad, consideran bien de manera categórica (60,63,65,66,68–71) o continua (72) la determinación de los niveles de transaminasas en el postoperatorio inmediato. La definición validada recientemente por K. Olthoff et al. (71) es la que optamos por utilizar en el presente estudio, porque usa criterios postrasplante objetivos que se asocian altamente con la pérdida del injerto y la mortalidad de los pacientes.

La incidencia global de disfunción en nuestro estudio fue superior a la descrita en la literatura por el grupo de K. Olthoff (71). Mientras que el grupo que describe el *score* obtiene una incidencia de DPI del 23%, nuestra incidencia global de DPI fue de un 34%, sin diferencias significativas entre ambos grupos. Ahondando en este resultado, es importante recalcar que la edad media de los donantes de nuestra serie fue de 63 años, mientras que la edad media de los donantes que definen el *score* fue de 48 años. Además, en el estudio de Olthoff et al. al realizar el análisis multivariante, observaron la edad del donante como parámetro de riesgo independiente, con un Odds Ratio de 3.12 (95% IC: 1.44, 6.69). Esta disparidad de edades de los donantes entre ambas series, podría justificar el aumento de la incidencia de DPI en nuestra serie siguiendo los parámetros de K. Olthoff.

En el estudio de D'Amico optaron por la clasificación de Pokorny et al. (70) para definir la DPI (se define DPI como la necesidad de transfusión de plasma superior a 2 días o GOT > 2500 UI/L durante los 5 primeros días postrasplante), identificándose una incidencia global de DPI del 26% (34% en el grupo de tratamiento vs 66% en el grupo control, $p=0,03$), sin embargo el criterio utilizado por el grupo de H. Pokorny en cuanto a la necesidad de transfusión de plasma respecta, se trata de un criterio impreciso, que no viene definido por los resultados de coagulación concretos a partir de los cuales se consideró indicada la transfusión de plasma y que por tanto es

dependiente de los anesthesiólogos de la unidad de cuidados intensivos correspondiente, convirtiéndose en un dato subjetivo, con lo cual no consideramos esta clasificación en nuestro estudio.

Cuando se aplicó la definición de DPI descrita por Mor (63) en el presente estudio, se observó una mayor tendencia ($p=0,07$) a encontrar una diferencia en la DPI entre el grupo de tratamiento y el grupo control. En dicha clasificación, se considera únicamente el pico de transaminasas en el primer DPO. Es importante recalcar esta tendencia, ya que en nuestro estudio se administra el tratamiento en dosis única en el momento pretrasplante, con lo cual es lícito considerar adicionalmente una clasificación en la que intervenga únicamente la citolisis en el momento postrasplante inmediato sin considerar parámetros que pueden estar condicionados por el estado del receptor como son la bilirrubina y el INR.

Sin embargo, a pesar de la relación entre la DPI y la supervivencia, conviene separar aquellos pacientes con DPI que se recuperan rápidamente de aquellos que no lo hacen. En este ensayo clínico de los 24 pacientes que presentaban niveles de GOT superiores a 1500 UI/L el primer día p.o. se observó una disminución de la citolisis a valores inferiores a 1000 UI/L en 21 de ellos al tercer p.o. Por ello, únicamente un 27% de los pacientes que presentaron DPI en nuestra serie perdieron el

injerto durante el seguimiento, obteniendo una supervivencia del injerto a los tres años del trasplante superior al 85%.

6 Impacto de la n-acetilcisteína sobre morbilidad global

A parte del daño hepático que se genera directamente por la IR hepática en el TH, la cascada de procesos oxidativos y la respuesta inflamatoria que sigue a la reperfusión genera también consecuencias a nivel global que influyen en la función de muchos otros órganos.

El fracaso renal agudo ocurre frecuentemente en pacientes con DPI. El evento inicial es la hipertensión portal que junto con las maniobras de oclusión vascular que suceden en el trasplante acaban produciendo vasodilatación esplácnica con la consecuente vasoconstricción renal. La activación del sistema renina-angiotensina junto con la respuesta inflamatoria sistémica generada por el proceso de la IR hepática acaban induciendo daño renal (275,276).

Un estudio realizado por el *US Acute Liver Failure Study Group* observó que la elevación de troponinas es común (hasta en un 74% de los casos) en los pacientes que presentan daño hepático (277). Tanaka et al. (278) realizaron un estudio preclínico en el que demostraron que el proceso de IR hepática se acompaña de necrosis de las células miocárdicas con elevación de los niveles de troponinas y en el que el OS es el principal ejecutor.

El impacto de las complicaciones pulmonares en la morbi-mortalidad tras el proceso de la IR hepática se conoce desde hace más de 20 años (279). Las células Kupffer permiten el paso de endotoxinas en el capilar pulmonar estimulando el TNFalfa e IL-6 entre otras moléculas con la consecuente infiltración pulmonar neutrofílica que junto con el OS producido durante la IR hepática acaba produciendo daño pulmonar (280).

La oclusión portal, el OS y la apoptosis de las células intestinales, participan entre otros sucesos durante el proceso de IR hepática generando daño de la barrera intestinal con la consiguiente translocación bacteriana (281).

En nuestra serie, obtuvimos una diferencia significativa de complicaciones postoperatorias de acuerdo con la clasificación Dindo-Clavien (241). La morbilidad de grado mayor (Grados 3-4 de Dindo-Clavien) fue de 24,7% en el grupo control frente a un 10,6% en el grupo de tratamiento ($p=0,003$). Observándose también una mayor morbilidad postoperatoria global en el grupo control de un 57,4% frente a un 34,5% en el grupo de tratamiento ($p = 0,001$).

Aunque en los resultados del grupo de D'Amico (207), se utilizó la clasificación de *Common Terminology criteria for Adverse Events v4.0*, en la cual se consideran aquellas que presentaban un grado superior a 3 de Dindo-Clavien, también se observó una disminución de la incidencia de complicaciones en el grupo

de tratamiento de manera significativa (23% en el grupo de tratamiento vs. de un 51% en el grupo control ($p < 0.01$)).

Sin embargo, el ensayo clínico recientemente publicado ($n=115$) por Aliakbarian et al. (282) no se observaron beneficios en la morbilidad p.o. entre ambos grupos de estudio, obteniéndose tasas de mortalidad p.o. y trasplante similares. Aunque, cabe destacar que la dosis de NAC es de 2 gramos (sin ajustarse por peso) y la solución de preservación utilizada es UW. Así mismo, al analizar detalladamente los datos demográficos de este estudio encontramos que la edad del donante es significativamente distinta entre ambos grupos ($p=0,009$), dato a tener en cuenta en la interpretación de los resultados de dicho estudio.

En el estudio de I. Hilmi (212), no se observaron diferencias entre ambos grupos en estancia en UCI ni estancia media hospitalaria. Sin embargo, en el subgrupo de pacientes del grupo de tratamiento que se consiguió aumentar los niveles de GSH por encima de $5 \mu\text{M}$, se redujo el fracaso renal agudo de manera significativa ($p=0.033$). En nuestro estudio, se observaron 10 casos (9,9%) de fracaso renal agudo en el grupo NAC NO y 8 casos (7,0%) en el grupo NAC SÍ ($p=0,47$) sin observarse una reducción de fracaso renal agudo en los pacientes que se consiguieron niveles de GSH superiores a $5 \mu\text{M}$.

Respecto al efecto de la adición de NAC en la resección hepática, dos ensayos clínicos (283,284) y dos revisiones sistemáticas (263,285) concluyen que no existe beneficio de la adición del antioxidante en el grupo de tratamiento en cuanto a la morbilidad p.o. Aunque, en la resección hepática mayor, se precise de maniobras de oclusión del hilio hepático que pueden condicionar daño de IR sobre el hígado similares a los producidos en la IR tras la isquemia que se produce en el proceso del trasplante, la envergadura del efecto del OS en el trasplante es mucho mayor, con niveles de citolisis y FPI muy superiores a los que se producen en las resecciones hepáticas, con lo cual el efecto de la NAC es más difícil de demostrar en este tipo de población.

7 N-acetilcisteína en la supervivencia del injerto

En el año 2006 un estudio de la *United Network for Organ Sharing* evaluó los resultados de la supervivencia del injerto en dos períodos. Un primer período del año 1992-1996 y un segundo período del año 1997-2002, entre los que se incluían 35186 receptores hepáticos. Observaron que la supervivencia del injerto a los 5 años era de un 67.4% para el primer período y de un 67.5% para el segundo período, únicamente había mejorado discretamente la supervivencia al año del 81 al 83.5%. Es decir, a pesar de los múltiples avances tecnológicos y en inmunosupresión entre otros, la supervivencia del injerto no es sujeto fácil de mejorar.

Estos resultados han estado estancados durante mucho tiempo debido a que han sido negativamente influenciados por la población trasplantada con el VHC, en la cual no se ha podido mejorar su supervivencia por su alta tasa de recaída tras el trasplante (286). Este escenario está cambiando radicalmente en este momento, ya que gracias a las nuevas terapias antivirales se dispone de un tratamiento eficaz y seguro para los receptores con infección viral tipo C (287). En nuestro estudio únicamente se pudieron beneficiar de esta nueva terapia un 3,7 % (n = 7), de los 108 pacientes que presentaban VHC.

En el presente estudio se observó una supervivencia del injerto entorno al 85% al año del trasplante, sin diferencias entre ambos grupos. Presentaron recurrencia precoz confirmada por biopsia (< 90 días) de VHC 6 (5,3%) pacientes del grupo NAC SÍ y 5 (4,9%) pacientes del grupo NAC NO. Entre los 3 meses y el año del trasplante, presentaron recidiva del CHC en 4 (3,9%) pacientes del grupo NAC NO y en 3 (2,6%) pacientes del grupo NAC, un total de un 8% (n=9) de recidiva del VHC en el grupo NAC SÍ y de un 9% (n=9) en el grupo NAC NO.

En el estudio del grupo de D'Amico (207), se observó una mayor supervivencia del injerto de manera significativa en el grupo de tratamiento a los 3, 12 y 24 meses después del TH (93%, 90% y 86% en el grupo de tratamiento frente a 82%, 70% y 67% en el grupo control; p=0,02). Entre los 3 meses y el año del trasplante, aparecieron 3 (4,2%) casos de recidiva del VHC en el grupo control y 1 (1,4%) en el grupo de tratamiento, sin presentarse recidivas precoces, resultados de recidiva de VHC inferiores a los de nuestra serie.

En el presente estudio no se observó una mejoría de la supervivencia del injerto entre ambos grupos de tratamiento a los 12 y 36 meses tras el trasplante. De los 7 (3,2%) retrasplantes de la serie, en 4 casos la causa del trasplante fue por trombosis arterial, en 3 casos por DPI en relación con severos signos de IR. Los 3 casos de retrasplante por DPI se

encontraban en el grupo NAC NO ($p=0,1$). La supervivencia del injerto al año es de un 85% en el grupo control y de un 89% en el grupo de tratamiento, mientras que en el grupo de D'Amico et al. fueron del 70 y 90% respectivamente, condicionando una diferencia significativa ($p=0,02$). La principal causa de pérdida del injerto en el estudio de F. D'Amico fue la DPI (8 casos (42%) y 5 casos (26%) sepsis tras DPI). En su serie, se realizaron 6 (4,2%) retrasplantes, las indicaciones de retrasplante no han sido definidas en el estudio. Obtuvieron también una mejoría de la estancia media hospitalaria, descenso de la incidencia de complicaciones p.o. y una mejoría de la supervivencia del injerto en el grupo de tratamiento, por lo que especularon que la NAC efectúa en efecto protector en el hígado.

Tanto en el ensayo clínico del grupo de D'Amico como en el estudio que aquí se presenta, se utilizó el mismo tipo de solución de preservación (*Celsior*®) a una dosis de NAC similar (en nuestra serie administramos una ampolla adicional de NAC en la solución de preservación), sin embargo, no se ha conseguido reproducir los resultados del grupo italiano.

No obstante, es de importancia fundamental tener en cuenta que el TIF medio del presente estudio fue de 4 H mientras que fue de 8 H en el ensayo clínico de D'Amico et al. (207).

En el presente estudio al realizarse el análisis por subgrupos de los donantes que presentaban criterios expandidos, no se

observó ningún efecto de adición de la NAC en los donantes esteatósicos, ni en los donantes años, ni en los donantes de DRI >1.8, aunque sí se observaba un efecto en la reducción del pico de transaminasas p.o. en los pacientes que habían recibido injertos con TIF superiores a 6 h, sin embargo sólo se trasplantaron 37 pacientes con injertos de TIF superiores a 6 h. Teniendo en cuenta este dato se podría indagar que en el presente experimento no se han conseguido reproducir los mismos resultados que en el grupo de D'Amico en cuanto a la supervivencia del injerto respecta, ya que la población utilizada presenta tiempos de isquemia significativamente más cortos a la población del grupo de D'Amico. Parece lícito entonces reconocer que la utilización de la NAC se aconseja en aquellos en que se prevé un TIF prolongado. Así mismo, se precisaría aplicar el presente método en centros de trasplante donde los TIF sean prolongados con la finalidad de corroborar esta hipótesis. En conclusión, la utilización sistemática de la NAC no aporta diferencias en la supervivencia del injerto ni del paciente en el presente ensayo clínico.

Científicos reconocidos como T. Mone y C. Niemann (288) han publicado recientemente su escepticismo al respecto de los resultados del estudio del grupo italiano de F. D'Amico (207).

8 Cambios histológicos de la adición de NAC

Es llamativa la poca trascendencia que produce el daño isquémico a nivel morfológico y estructural. Las imágenes que en los Tratados de Histología se presentan como normales corresponden a tejidos que han estado sometidos a isquemia durante períodos de tiempo muy prolongados (289).

Esto sucede porque la anoxia no solamente deteriora la “maquinaria” sino que además detiene las “máquinas”. Aunque a nivel inicial es posible que no se observen alteraciones morfológicas a nivel tisular, las lesiones producidas por la isquemia pueden acabar condicionando alteraciones metabólicas más precozmente detectables, que a pesar de que pueden ser transitorias pueden generar a largo plazo un fallo funcional y consecuentemente morfológico que aparece más tardíamente.

Silva et al. (269) realizaron un estudio preclínico de dos brazos NAC frente a placebo en animales sometidos a hepatectomías, observando que en la biopsia post-isquemia del grupo que había sido tratado con NAC se identificaba menos congestión vascular y menor “*light areas*” citoplásmicas en los hepatocitos, pero lo más interesante consistía en que certificaron un mayor incremento de hepatocitos binucleados en los ratones tratados (17% frente a 6%) alegando un mejor funcionamiento hepático en los animales que recibían NAC. En el presente estudio no se han observado tales hallazgos tras la adición de NAC. Al

analizar la incidencia de cambios postisquemia en ambos grupos hemos observado incidencias similares de balonización, dilatación sinusoidal y binucleación entre ambos grupos. La frecuencia de esteatosis hepática en donantes cadáver y donante vivo, ha sido publicada entre un 9-26% (102,108,290). En el presente estudio, de los 109 injertos con biopsias analizadas, un 20% (n=22) presentaban macroesteatosis leve (< 30%), 1 (0,9%) injerto presentaba macroesteatosis moderada (>30%) y ninguno presentaba macroesteatosis severa (< 60%). En las biopsias hepáticas de hígados aceptados para la donación se han identificado hallazgos histológicos distintos a la esteatosis, dilatación sinusoidal, necrosis focal, depósitos de lipofucsina y apoptosis entre otros, en alrededor de un 60% de los casos (291). En el presente experimento se identificó la presencia de dilatación sinusoidal en un 67% (n=74) de los casos y balonización en un 17% (n=19), sin observarse diferencias entre ambos grupos, ni tampoco entre las biopsias seriadas pre y post-reperfusión.

9 NAC en las soluciones de preservación

En el año 2015 se han publicado los resultados del Registro Europeo de TH (272), en el que se analizan los resultados de 42 869 trasplantes hepáticos realizados entre el año 2003 y 2012 (UW®, n = 24 562; HTK®, n = 8696; *Celsior*® n = 7756; IGL-1® n = 1855). Tras el análisis multivariante se identificó HTK® como un factor independiente de pérdida del injerto, cuando se utiliza en receptores VIH, en donantes de edad superior 65 años, en receptores VHC, en insuficiencia hepática aguda, se utiliza en injertos parciales, cuando la edad del receptor es superior a 60 años, cuando ABO donante-receptor no son idénticos, en donantes con antígeno de superficie de VHB positivo, en TIT superiores a 12 h, cuando el receptor masculino y cuando la indicación del trasplante es distinta de la cirrosis. Con estos resultados se demostró que la utilización de la solución de preservación HTK® es un factor de riesgo independiente de pérdida del injerto. Tanto UW® como IGL-1®, y *Celsior*® aunque en menor medida, proporcionaron resultados similares para los injertos de tamaño completo. Sin embargo, IGL-1® tiende a ofrecer mejores resultados de función del injerto cuando se utiliza donantes cadáver de hígado parcial.

Recientemente se han desarrollado nuevas soluciones de preservación, basadas en otras previamente comercializadas, entre ellas la solución Custodiol-N®. Esta solución fue

modificada en 4 puntos importantes para mejorar la previa solución HTK®:

- i) La adición de quelantes de hierro (desferoxamina y LK-614) para reducir el daño producido por el hierro.
- ii) Reducción de la concentración de cloruro para reducir lesión inducida por cloruros.
- iii) La adición de ácidos amino cardioprotectores (L-arginina: precursor de NO para mejorar el flujo de sangre coronaria; glicina y alanina para estabilizar la membrana plasmática).
- iv) La sustitución de histidina por N- α -acetil-histidina para inhibir la citotoxicidad inducida por histidina.

Estudios experimentales han demostrado que cuando se utilizan las máquinas hipotérmicas de perfusión de órganos, la nueva composición de Custodiol-N® mejora la función cardíaca, pulmonar, renal y hepática, comparativamente con HTK® (292-294).

A día de hoy, se sigue buscando la mejor fórmula para encontrar la solución de preservación óptima, ya que el problema no está resuelto.

En resumen, de acuerdo con la reciente literatura publicada se puede concluir que no existen diferencias para la preservación hepática de hígado entero entre la utilización de solución de

preservación UW®, IGL-1® y Celsior®. Todas ellas contienen moléculas antioxidantes en cantidades abundantes, pero aún así no consiguen amortiguar de manera completa el daño producido por la isquemia. Sin embargo, cuando analizamos la composición de las soluciones de preservación, ninguna contiene NAC, contienen generalmente GSH, la adición de GSH como agente terapéutico se ve limitada debida a su desfavorable bioquímica (carece de grupo thiol) y sus propiedades farmacocinéticas. El GSH tiene una vida en plasma inferior a 3 min y penetra con dificultad en las membranas celulares (33,295). Sin embargo, populares soluciones de preservación como UW® y *Celsior*® siguen conteniendo GSH en su composición y se encuentran ausentes de NAC.

En el presente estudio se añadió NAC a la solución de preservación *Celsior*® que es el que se utiliza de manera habitual en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Aunque la adición de la NAC en las soluciones de preservación como el UW ha sido previamente descrita (282), este es el primer estudio publicado en el que se añade NAC a la solución de preservación *Celsior*®.

10 Aplicación de la metabonómica en el daño por isquemia-reperfusión hepático

Para poder evaluar la potencial utilidad del nuevo enfoque analítico desarrollado en el estudio, se desarrolló previamente un análisis comparativo del tejido hepático normal y de tejido hepático procedente de pacientes NASH. El hecho de utilizar este tipo de muestras para la validez del método viene acontecido porque el OS ha demostrado ser un elemento clave para la progresión de la esteatosis hepática a NASH (296). Como era de esperar se encontraron diferencias significativas relativas al OS entre ambos grupos. En particular en el ratio GSH/GSSG fue significativamente inferior en el grupo de pacientes con NASH en comparación con los controles. Es importante señalar que el cambio del GSH / GSSG hacia el estado *redox* de oxidación activa varias vías de señalización vías, incluyendo la proteína quinasa B, proteínas fosfatasa 1 y 2A, la calcineurina, factor B nuclear, quinasa c-Jun N-terminal, quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis y la protein quinasa mitógeno activadora, reduciendo de ese modo la proliferación celular y el aumentando la apoptosis (297). Junto con el descenso de la relación GSH / GSSH, también se objetivaron niveles más altos Opht A en los pacientes con NASH. Estos resultados no sólo evidenciaban el daño oxidativo general en el hígado NASH sino también confirman la potencial utilidad del Opht A como un biomarcador de OS. Por otra parte, estos resultados revelan

que el presente método es útil, versátil y constituye una herramienta analítica para los biomarcadores del OS en las muestras de tejido hepático (Figura 48).

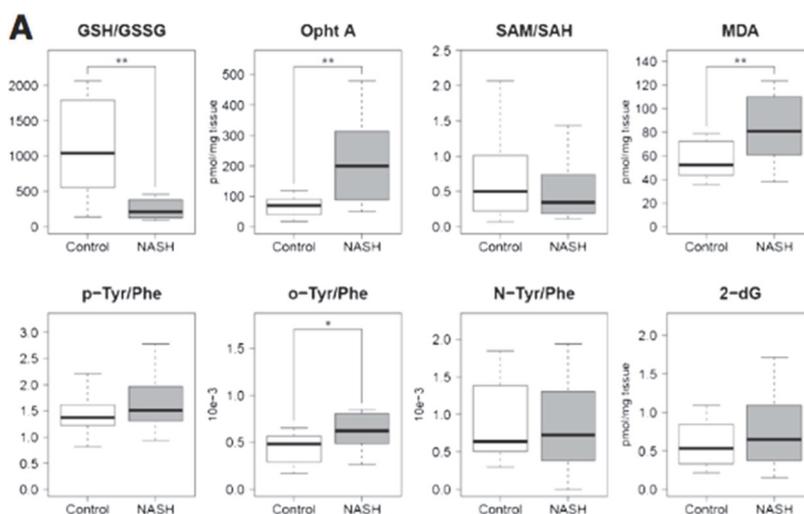


Figura 48. Diagrama de cajas de los marcadores del estrés oxidativo de tejido hepático de pacientes NASH y pacientes control.

Sin embargo en el presente estudio, aunque en el grupo NAC SÍ, n=15 (36.6%) de las muestras analizadas, se conseguían aumentar los niveles de GSH, este efecto no se conseguía en todos los pacientes. Los niveles medios de GSH fueron mayores en los tres tiempos analizados del grupo NAC SÍ, aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. Este hecho tiene un significado biológico relevante, y es que la administración de NAC parece aumentar los niveles de GSH, aunque quizás la propia homeostasis celular provoca que este

aumento alcance un máximo difícil de superar, el cual depende del estado inicial del órgano.

En el único estudio que se han evaluado los efectos clínicos de la adición de NAC en el trasplante y los niveles de GSH, fue en el estudio de Hilmi et al. (212). En este estudio la administración de NAC se realizaba en el receptor por vía venosa periférica. En él no se consiguieron diferencias clínicas en el daño hepatorenal por IR, entre ambos grupos. Sin embargo, en el grupo de tratamiento se conseguían niveles de GSH más altos que el grupo control en el 50% de los casos. Además observaron también que en los pacientes que conseguían niveles de GSH superiores a 5 μM , si se conseguía disminuir el fracaso renal agudo.

En nuestro estudio no se analizaron todas las muestras de los pacientes incluidos por encontrarse incompletas o por no haber conseguido mantenerlas en las condiciones adecuadas de almacenamiento. Es de importancia crucial, tener en cuenta este hecho ya que sólo se consiguieron analizar un total de 76 muestras, debido a las exigencias logísticas que implica el método para conseguir una conservación de las muestras de manera óptima y dada la inestabilidad de los metabolitos determinados.

A pesar de la dificultad de conseguir resultados estadísticamente significativos en los estudios metabolómicos debido a la complejidad del procesado de las muestras, en

nuestro caso consideramos que la ausencia de significación puede encontrarse en el contexto del escaso número de muestras analizadas.

CONCLUSIONES

1 Conclusiones

1. La administración de n-acetilcisteína en el injerto hepático no influye de manera significativa en la incidencia de disfunción primaria del injerto, de acuerdo con la clasificación de Olthoff.
2. De todos los parámetros bioquímicos, hematológicos y de hemostasia estudiados, la administración de n-acetilcisteína en el injerto hepático sólo influyó de manera significativa reduciendo los niveles de GPT en los injertos que tuvieron tiempos de isquemia fría superiores a 6 H.
3. No se han observado diferencias significativas en los niveles de metabolitos del estrés oxidativo estudiados, entre ambos grupos de tratamiento.
4. La morbilidad postoperatoria global clasificada con el sistema de Dindo-Clavien, fue significativamente superior en el grupo sin administración de n-acetilcisteína.
5. No se han encontrado diferencias pre y postreperfusión de daño histológico de preservación entre ambos grupos de estudio.
6. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la supervivencia del injerto y del

paciente al año y a los 3 años del trasplante entre ambos grupos de estudio.

ANEXOS



VALENCIA
2014
del 8 al 10 de Junio

CERTIFICADO DE COMUNICACIÓN

Por la presente certificamos que:

**Concepción Gómez i Gavara, Eva M. Montalvá Orón,
Agustín LaHoz Rodríguez, David Hervás Marín, Judith
Pérez Rojas, Ángel Moya Herraiz, Eugenia Pareja Ibars,
Carmen Vinaixa, María García Eliz, Rafael López-
Andújar**

han presentado la Comunicación Oral (O33) titulada:

**"Ensayo clínico fase III. Resultados bioquímicos preliminares
tras la administración del antioxidante n-acetilcisteína en el
donante hepático cadáver"**

en el III CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
TRASPLANTE, celebrado en Valencia del 8 al 10 de Junio de
2014.

Valencia, 10 de Junio de 2014

Dr. Manuel Arias
Presidente de la SET

Dr. José Mir Pallardó
Presidente del Comité Organizador Local



Sociedad Española de Trasplante
Calvo Sotelo, nº19 - 3º - of.3 / 39002 Santander
Tel. 902116513 / E-mail: info@setrasplante.org
<http://www.setrasplante.org/SET2014>

BIBLIOGRAFÍA

1. Murray KF, Carithers RL. AASLD practice guidelines: Evaluation of the patient for liver transplantation. *Hepatology* 2005;41(6):1407-32.
2. Sade RM. Transplantation at 100 years: Alexis Carrel, pioneer surgeon. *Ann Thorac Surg* 2005;80(6):2415-8.
3. Murray J. Interview with Dr Joseph Murray (by Francis L Delmonico). *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2002. p. 803-6.
4. Carrel A. The transplantation of organs. A preliminary communication. *J Am Med Assoc* 1905;74:239-41.
5. Lesky E. The first renal transplantation. Emerich Ullmann (1861-1937). *MMW Munch Med Wochenschr* 1974;116(21):1081-4.
6. Watts SH. VIII. The Suture of Blood Vessels. Implantation and Transplantation of Vessels and Organs. An Historical and Experimental Study. *Ann Surg*. 1907;46(3):373-404.7.
7. Carrel A, Guthrie CC. Functions of a transplanted kidney. *Science* 1905;22(563):473.
8. Carrel A. Anastomosis of blood vessels by the patching method and transplantation of the kidney. *J Am Med Assoc*. 1906;XLVII(20):1648-51.
9. Dutkowski P, De Rougemont O, Clavien PA. Alexis Carrel: Genius, innovator and ideologist. *American Journal of Transplantation* 2008; 1998-2003.
10. Starzl T. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg. Gynecol Pnstet* 1963; 659-76.

11. Kukral JC, Littlejohn MH, Butz GW, Starzl TE. Biochemical studies of the homotransplanted canine liver. *Surg Forum* 1961;12:112-4.
12. Starzl T, Kaupp H. Studies on the rejection of the transplanted homologous dog liver. *Surg Gynecol Obstet.* 1961;112:135-44.
13. Calne RY, Williams R. Liver transplantation in man. I. Observations on technique and organization in five cases. *Br Med J* 1968;4(5630):535-40.
14. Hurst J. A modern Cosmas and Damian: Sir Roy Calne and Thomas Starzl receive the 2012 Lasker~DeBakey Clinical Medical Research Award. *J Clin Invest* 2012;122(10):3378-82.
15. Calne RY, Williams R, Dawson JL, Ansell ID, Evans DB, Flute PT, et al. Liver transplantation in man. II. A report of two orthotopic liver transplants in adult recipients. *Br Med J* 1968;4(5630):541-6.
16. Starzl TE, Marchioro TL, Porter KA, Brettschneider L. Homotransplantation of the liver. *Transplantation* 1967;5(4):Suppl:790-803.
17. Margarit C, Jaurrieta E, Casais L, Maestre P, Osorio A, Fernández de Sevilla A, et al. Orthotopic hepatic transplant: first year of experience. *Med Clin (Barc)* 1986;87(10):397-402.
18. Mir Pallardó J. El trasplante hepático. Ed General Valencia Cons Sanit. 2001.
19. ONT. Dossier de la Organización Nacional de Trasplantes. 2013.
20. Kochhar G, Parungao JM, Hanouneh IA, Parsi MA. Biliary complications following liver transplantation.

World J Gastroenterol 2013;19(19):2841–6.

21. Stange BJ, Glanemann M, Nuessler NC, Settmacher U, Steinmüller T, Neuhaus P. Hepatic artery thrombosis after adult liver transplantation. *Liver Transpl* 2003;9(6):612–20.

22. Maluf DG, Stravitz RT, Cotterell AH, Posner MP, Nakatsuka M, Sterling RK, et al. Adult living donor versus deceased donor liver transplantation: a 6-year single center experience. *Am J Transplant* 2005;5(1):149–56.

23. Meneu-Díaz JC, Moreno-Elola-Olaso A. Liver transplantation from living donor as a sign of social intelligence. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*. 2011;103(3):111–4.

24. Pezzati D. Strategies to optimize the use of marginal donors in liver transplantation. *World J Hepatol* 2015;7(26):2636.

25. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003. p. 917–36.

26. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008;147(1):153–9.

27. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284(1):G15–26.

28. Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annu Rev Med*. 1995;46:235–47.

29. Belous A, Knox C, Nicoud IB, Pierce J, Anderson C, Pinson CW, et al. Reversed activity of mitochondrial adenine nucleotide translocator in ischemia-

- reperfusion. *Transplantation* 2003;75(10):1717–23.
30. Evans PJ, Tredger JM, Dunne JB, Halliwell B. Catalytic metal ions and the loss of reduced glutathione from University of Wisconsin preservation solution. *Transplantation* 1996;62(8):1046–9.
31. Sumimoto R, Jamieson N V, Wake K, Kamada N. 24-hour rat liver preservation using UW solution and some simplified variants. *Transplantation* 1989;48(1):1–5.
32. Upadhyaya GA, Strasberg SM. Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology* 2000;31(5):1115–22.
33. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 1999;13(10):1169–83.
34. Boudjema K, Van Gulik TM, Lindell SL, Vreugdenhil PS, Southard JH, Belzer FO. Effect of oxidized and reduced glutathione in liver preservation. *Transplantation* 1990;50(6):948–51.
35. Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 2005; 1653–6.
36. Zhai Y, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *Am J Transplant* 2011;11(8):1563–9.
37. Ordonez R, Carbajo-Pescador S, Mauriz JL, Gonzalez-Gallego J. Understanding nutritional interventions and physical exercise in non-alcoholic

Fatty liver disease. *Curr Mol Med* 2015;15(1):3–26.

38. Koçbiyik A, Demirhan B, Sevmis S, Budakoglu I, Karakayali H, Haberal M. Role of Postreperfusion Subcapsular Wedge Biopsies in Predicting Initially Poor Graft Function After Liver Transplantation. *Transplant Proc* 2009;41:2747–8.

39. Hinder RA, Stein HJ. Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg* 1991;126(1):104–5.

40. Il'yasova D, Scarbrough P, Spasojevic I. Urinary biomarkers of oxidative status. *Clin Chim Acta* 2012;413(19–20):1446–53.

41. Ogino K, Wang D-H. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Med Okayama* 2007;61(4):181–9.

42. Syslová K, Kačer P, Kuzma M, Pankráčová A, Fenclová Z, Vlčková S, et al. LC-ESI-MS/MS method for oxidative stress multimarker screening in the exhaled breath condensate of asbestosis/silicosis patients. *J Breath Res* 2010;4(1):17104.

43. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992;53(5):957–78.

44. Jaeschke H, Farhood A. Kupffer cell activation after no-flow ischemia versus hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* 2002;33(2):210–9.

45. Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K. Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 1992;16(2):454–61.

46. Peralta C, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol* 2013;59(5):1094–106.

47. Noack K, Bronk SF, Kato A, Gores GJ. The greater vulnerability of bile duct cells to reoxygenation injury than to anoxia. Implications for the pathogenesis of biliary strictures after liver transplantation. *Transplantation* 1993;56(3):495-500.
48. Busquets J, Figueras J, Serrano T, Torras J, Ramos E, Rafecas A, et al. Postreperfusion biopsy changes predict biliary complications after liver transplantation. *Transplant Proc* 2002;34(1):256-8.
49. Op den Dries S, Sutton ME, Lisman T, Porte RJ. Protection of bile ducts in liver transplantation: looking beyond ischemia. *Transplantation* 2011;92(4):373-9.
50. Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Ward EM, Maus TP, Wahlstrom HE, Moore SB, et al. Ischemic-type biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1992;16(1):49-53.
51. Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998;5(4):402-8.
52. Ballatori N, Truong AT. Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am J Physiol* 1992;263(5 Pt 1):617-24.
53. Koepfel TA, Trauner M, Mennone A, Arrese M, Rios-Velez L, Boyer JL. Role of glutathione in hepatic bile formation during reperfusion after cold ischemia of the rat liver. *J Hepatol* 1998;28(5):812-9.
54. Accatino L, Pizarro M, Solís N, Arrese M, Koenig CS. Bile secretory function after warm hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Liver Transpl* 2003;9(11):1199-210.
55. Carrasco L, Sanchez-Bueno F, Sola J, Ruiz JM, Ramirez P, Robles R, et al. Effects of cold ischemia time

on the graft after orthotopic liver transplantation. A bile cytological study. *Transplantation* 1996;61(3):393–6.

56. 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(1):103–7.

57. Rull R, Garcia Valdecasas JC, Grande L, Fuster J, Lacy AM, González FX, et al. Intrahepatic biliary lesions after orthotopic liver transplantation. *Transpl Int* 2001;14(3):129–34. Boyer JL. Bile duct epithelium: frontiers in transport physiology. *Am J Physiol* 1996;270(1 Pt 1):G1-5.

58. Vajdová K, Smreková R, Kukan M, Lutterová M, Wsólóvá L. Bile analysis as a tool for assessing integrity of biliary epithelial cells after cold ischemia--reperfusion of rat livers. *Cryobiology* 2000;41(2):145–52.

59. Vierling JM, Fennell RH. Histopathology of early and late human hepatic allograft rejection: evidence of progressive destruction of interlobular bile ducts. *Hepatology* 1985(6):1076–82.

60. Makowka L, Gordon RD, Todo S, Ohkohchi N, Marsh JW, Tzakis AG, et al. Analysis of donor criteria for the prediction of outcome in clinical liver transplantation. *Transplant Proc* 1987;19(1 Pt 3):2378–82.

61. Busuttill RW, Tanaka K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl* 2003;9(7):651–63.

62. RAE. Real Academia de la Lengua Española. 2014;24 edición(Madrid, España: Autor).

63. Mor E, Klintmalm GB, Gonwa TA, Solomon H, Holman MJ, Gibbs JF, et al. The use of marginal donors for liver transplantation. A retrospective study of 365 liver donors. *Transplantation* 1992;53(2):383-6.
64. Greig PD, Forster J, Superina RA, Strasberg SM, Mohamed M, Blendis LM, et al. Donor-specific factors predict graft function following liver transplantation. *Transplant Proc.* 1990;22(4):2072-3.
65. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis. *Transplantation* 1993;55(4):807-13.
66. Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Hertl M. Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1994;20(4 Pt 1):829-38.
67. González FX, Rimola A, Grande L, Antolin M, Garcia-Valdecasas JC, Fuster J, et al. Predictive factors of early postoperative graft function in human liver transplantation. *Hepatology* 1994;20(3):565-73.
68. Deschênes M, Belle SH, Krom RA, Zetterman RK, Lake JR. Early allograft dysfunction after liver transplantation: a definition and predictors of outcome. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Transplantation* 1998;66(3):302-10.
69. Nanashima A, Pillay P, Verran DJ, Painter D, Nakasuji M, Crawford M, et al. Analysis of initial poor graft function after orthotopic liver transplantation: experience of an australian single liver transplantation center. *Transplant Proc.* 2002;34(4):1231-5.
70. Pokorny H, Langer F, Herkner H, Schernberger R,

Plöchl W, Soliman T, et al. Influence of cumulative number of marginal donor criteria on primary organ dysfunction in liver recipients. *Clin Transplant* 2005;19(4):532-6.

71. Olthoff KM, Kulik L, Samstein B, Kaminski M, Abecassis M, Emond J, et al. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver Transpl.* 2010;16(8):943-9.

72. Pareja E, Cortes M, Hervás D, Mir J, Valdivieso A, Castell JV, et al. A score model for the continuous grading of early allograft dysfunction severity. *Liver Transpl.* 2015;21(1):38-46.

73. Uemura T, Randall HB, Sanchez EQ, Ikegami T, Narasimhan G, McKenna GJ, et al. Liver retransplantation for primary nonfunction: analysis of a 20-year single-center experience. *Liver Transpl.* 2007;13(2):227-33.

74. Muto P, Freeman RB, Haug CE, Lu A, Rohrer RJ. Liver transplant candidate stratification systems. Implications for third-party payors and organ allocation. *Transplantation* 1994;57(2):306-8.

75. Cameron A, Busuttil RW. AASLD/ILTS transplant course: is there an extended donor suitable for everyone? *Liver Transpl.* 2005;(11 Suppl 2):S2-5.

76. Oh CK, Sanfey HA, Pelletier SJ, Sawyer RG, McCullough CS, Pruett TL. Implication of advanced donor age on the outcome of liver transplantation. *Clin Transplant* 2000;14:386-90.

77. Cuervas-Mons V, de la Rosa G, Pardo F, San Juan F, Valdivieso A. [Activity and results of liver transplantation in Spain during 1984-2012. Analysis of the Spanish Liver Transplant Registry.]. *Med Clin (Barc)*. 2014.

78. Schmucker DL. Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease? *Exp Gerontol.* 2014;40(8-9):650-9.
79. Wynne HA, Cope LH, Mutch E, Rawlins MD, Woodhouse KW, James OF. The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man. *Hepatology* 1989;9(2):297-301.
80. Tajiri K, Shimizu Y. Liver physiology and liver diseases in the elderly. *World J Gastroenterol* 2013;19(46):8459-67.
81. Jung T, Bader N, Grune T. Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Ann N Y Acad Sci* 2007 Nov;1119:97-111.
82. Jolly RD, Douglas B V, Davey PM, Roiri JE. Lipofuscin in bovine muscle and brain: a model for studying age pigment. *Gerontology* 1995 Jan;41 Suppl 2:283-95.
83. Kang T-W, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 2011;479(7374):547-51.
84. Tietz NW, Shuey DF, Wekstein DR. Laboratory values in fit aging individuals--sexagenarians through centenarians. *Clin Chem* 1992;38(6):1167-85.
85. Dong MH, Bettencourt R, Barrett-Connor E, Loomba R. Alanine aminotransferase decreases with age: the Rancho Bernardo Study. *PLoS One* 2010;5(12):e14254.
86. Yersiz H, Shaked A, Olthoff K, Imagawa D, Shackleton C, Martin P, et al. Correlation between donor age and the pattern of liver graft recovery after

transplantation. *Transplantation* 1995;60(8):790–4.

87. Berenguer M, Prieto M, San Juan F, Rayón JM, Martínez F, Carrasco D, et al. Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* 2002;36(1):202–10.

88. Ghinolfi D, Marti J, De Simone P, Lai Q, Pezzati D, Coletti L, et al. Use of octogenarian donors for liver transplantation: a survival analysis. *Am J Transplant* 2014;14(9):2062–71.

89. Charlton M, Gane E, Manns MP, Brown RS, Curry MP, Kwo PY, et al. Sofosbuvir and Ribavirin for Treatment of Compensated Recurrent Hepatitis C Virus Infection After Liver Transplantation. *Gastroenterology* 2015;148(1):108–17.

90. Berrevoet F, Hesse UJ, de Laere S, Jacobs B, Pattyn P, de Hemptinne B. Impact of donor and recipient gender on liver transplantation. *Transplant Proc* 1997;29(8):3431–2.

91. Nair S, Thuluvath PJ. Does race-matched liver transplantation offer any graft survival benefit? *Transplant Proc* 2014;33(1–2):1523–4.

92. Eckhoff DE, McGuire BM, Young CC, Frenette L, Hudson SL, Contreras J, et al. Race is not a critical factor in orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1997;29(8):3729–30.

93. Gonwa TA, Morris CA, Mai ML, Husberg BS, Goldstein RM, Klintmalm GB. Race and liver transplantation. *Arch Surg* 1991;126(9):1141–3.

94. Ge F, Huang T, Yuan S, Zhou Y, Gong W. Gender issues in solid organ donation and transplantation. *Ann Transplant* 2013;18:508–14.

95. 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(6):514–8.
96. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010;52(5):1836–46.
97. Noujaim HM, de Ville de Goyet J, Montero EFS, Ribeiro CMF, Capellozzi VL, Crescentini F, et al. Expanding postmortem donor pool using steatotic liver grafts: a new look. *Transplantation* 2009;87(6):919–25.
98. Burke A, Lucey MR. Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant* 2004;4(5):686–93.
99. Mosbah I Ben, Roselló-Catafau J, Franco-Gou R, Abdennebi H Ben, Saidane D, Ramella-Virieux S, et al. Preservation of steatotic livers in IGL-1 solution. *Liver Transplant*. 2006;12(8):1215–23.
100. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM* [Internet]. 2010 Feb [cited 2015 Jan 24];103(2):71–83.
101. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. Nonalcoholic fatty liver disease: multimodal treatment options for a pathogenetically multiple-hit disease. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(4):272–84.
102. D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW, Hoffmann RM, Reed A, Knechtle SJ, et al. The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1991;51(1):157–63.

103. Adam R, Reynes M, Johann M, Morino M, Astarcioglu I, Kafetzis I, et al. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc.* 1991;23(1 Pt 2):1538-40.
104. Todo S, Demetris AJ, Makowka L, Teperman L, Podesta L, Shaver T, et al. Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration. *Transplantation* 1989;47(5):903-5.
105. Markin RS, Wisecarver JL, Radio SJ, Stratta RJ, Langnas AN, Hirst K, et al. Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. *Transplantation* 1993;56(6):1403-9.
106. Fishbein TM, Fiel MI, Emre S, Cubukcu O, Guy SR, Schwartz ME, et al. Use of livers with microvesicular fat safely expands the donor pool. *Transplantation* 1997;64(2):248-51.
107. Hornbøll P, Olsen TS. Fatty changes in the liver: the relation to age, overweight and diabetes mellitus. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A.* 1982;90(3):199-205.
108. Rinella ME, Alonso E, Rao S, Whittington P, Fryer J, Abecassis M, et al. Body mass index as a predictor of hepatic steatosis in living liver donors. *Liver Transpl* 2001;7(5):409-14.
109. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30(6):1356-62.
110. Escudero D. Brain death diagnosis. *Med Intensiva* 2009;33(4):185-95.
111. Briceño J, Marchal T, Padillo J, Solórzano G, Pera C. Influence of marginal donors on liver preservation

injury. *Transplantation* 2002;74:522-6.

112. Markmann JF, Markmann JW, Markmann DA, Bacquerizo A, Singer J, Holt CD, et al. Preoperative factors associated with outcome and their impact on resource use in 1148 consecutive primary liver transplants. *Transplantation*. 2001;72:1113-22.

113. Ghobrial RM, Steadman R, Gornbein J, Lassman C, Holt CD, Chen P, et al. A 10-year experience of liver transplantation for hepatitis C: analysis of factors determining outcome in over 500 patients. *Ann Surg*. 2001;234:384-393-394.

114. Cuende N, Miranda B, Cañón JF, Garrido G, Matesanz R. Donor characteristics associated with liver graft survival. *Transplantation* 2005;79:1445-52.

115. Totsuka E, Dodson F, Urakami A, Moras N, Ishii T, Lee MC, et al. Influence of high donor serum sodium levels on early postoperative graft function in human liver transplantation: effect of correction of donor hypernatremia. *Liver Transpl Surg*. 1999 Sep;5(5):421-8.

116. Totsuka E, Fung U, Hakamada K, Tanaka M, Takahashi K, Nakai M, et al. Analysis of clinical variables of donors and recipients with respect to short-term graft outcome in human liver transplantation. *Transplant Proc*. 2004;36(8):2215-8.

117. Powner DJ. Factors during donor care that may affect liver transplantation outcome. *Prog Transplant*. 2004 Sep;14(3):241-7-9.

118. Cywinski JB, Mascha E, Miller C, Eghtesad B, Nakagawa S, Vincent JP, et al. Association between donor-recipient serum sodium differences and orthotopic liver transplant graft function. *Liver Transpl*. 2008;14(1):59-65.

119. Figueras J, Busquets J, Grande L, Jaurrieta E, Perez-Ferreiroa J, Mir J, et al. The deleterious effect of donor high plasma sodium and extended preservation in liver transplantation. A multivariate analysis. *Transplantation*. 1996;61:410-3.
120. Chen XB, Xu MQ. Primary graft dysfunction after liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2014; 13(2):125-37.
121. Cameron AM, Ghobrial RM, Yersiz H, Farmer DG, Lipshutz GS, Gordon SA, et al. Optimal utilization of donor grafts with extended criteria: a single-center experience in over 1000 liver transplants. *Ann Surg*. 2006;243:748-753-755.
122. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 2001. p. 464-70.
123. 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;90:530-9.
124. Johnson SR, Alexopoulos S, Curry M, Hanto DW. Primary nonfunction (PNF) in the MELD era: An SRTR database analysis. *Am J Transplant*. 2007;7:1003-9.
125. Ijtsma AJC, Van Der Hilst CS, De Boer MT, De Jong KP, Peeters PMJG, Porte RJ, et al. The clinical relevance of the anhepatic phase during liver transplantation. *Liver Transplant*. 2009;15:1050-5.
126. Doyle HR, Marino IR, Morelli F, Doria C, Aldrighetti L, McMichael J, et al. Assessing risk in liver transplantation. Special reference to the significance of a positive cytotoxic crossmatch. *Ann Surg*. 1996;224(2):168-77.

127. Marino IR, Doyle HR, Aldrighetti L, Doria C, McMichael J, Gayowski T, et al. Effect of donor age and sex on the outcome of liver transplantation. *Hepatology*. 1995;22(6):1754–62.
128. Hoofnagle JH, Lombardero M, Zetterman RK, Lake J, Porayko M, Everhart J, et al. Donor age and outcome of liver transplantation. *Hepatology*. 1996;24(1):89–96.
129. Ghobrial RM, Gornbein J, Steadman R, Danino N, Markmann JF, Holt C, et al. Pretransplant model to predict posttransplant survival in liver transplant patients. *Ann Surg*. 2002;236(3):315-322-323.
130. Sirivatanauksorn Y, Taweerutchana V, Limsrichamrern S, Kositamongkol P, Mahawithitwong P, Asavakarn S, et al. Recipient and perioperative risk factors associated with liver transplant graft outcomes. *Transplant Proc*. 2012;44:505–8.
131. Defamie V, Cursio R, Le Brigand K, Moreilhon C, Saint-Paul MC, Laurens M, et al. Gene expression profiling of human liver transplants identifies an early transcriptional signature associated with initial poor graft function. *Am J Transplant*. 2008;8:1221–36.
132. Silva MA, Mirza DF, Murphy N, Richards DA, Reynolds GM, Wigmore SJ, et al. Intrahepatic complement activation, sinusoidal endothelial injury, and lactic acidosis are associated with initial poor function of the liver after transplantation. *Transplantation*. 2008;85:718–25.
133. Totsuka E, Fung JJ, Hakamada K, Ohashi M, Takahashi K, Nakai M, et al. Synergistic effect of cold and warm ischemia time on postoperative graft function and outcome in human liver transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2004. p. 1955–8.

134. Niemann CU, Malinoski D. Therapeutic Hypothermia in Deceased Organ Donors and Kidney-Graft Function. *N Engl J Med.* 2015 Dec 31;373(27):2687.
135. Pavel M-C, Fondevila Campo C, Calatayud Mizrahi D, Ferrer Fabrega J, Sanchez Cabus S, Molina Santos V, et al. Normothermic perfusion machine in liver transplant with cardiac death donor grafts. *Cirugía española* 2015 Oct;93(8):485–91.
136. Kalayoglu M, Sollinger HW, Stratta RJ, D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Pirsch JD, et al. Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet.* 1988;1:617–9.
137. Howard BJ, Pohorecki R, Becker GL, Landers DF. Energy status in anoxic rat hepatocytes: effects of isoflurane, solution composition, and hypothermia. *Liver Transpl Surg.* 1995;1(4):220–4.
138. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology.* 1991;13:83–95.
139. Weight SC, Bell PRF, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery.* 1996. p. 162–70.
140. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990;280:1–8.
141. Southard JH, Marsh DC, McAnulty JF, Belzer FO. Oxygen-derived free radical damage in organ preservation: activity of superoxide dismutase and xanthine oxidase. *Surgery.* 1987;101:566–70.
142. Garcia CE, Garcia RF, Gunson B, Christensen E,

Neuberger J, McMaster P, et al. Analysis of marginal donor parameters in liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Exp Clin Transpl.* 2004;2:183–8.

143. Scuderi V, Ceriello A, Maida P, Aragiusto G, Arenga G, Carfora T, et al. The Marginal Donor: A Single-Center Experience in Orthotopic Liver Transplantation. *Transplant Proc.* 2006;38:1069–73.

144. Todo S, Tzakis A, Starzl TE. Preservation of livers with UW or Euro-Collins' solution. *Transplantation* 1988 Dec;46(6):925–6.

145. Jamieson N V, Sundberg R, Lindell S, Claesson K, Moen J, Vreugdenhil PK, et al. The 24- to 48-hour preservation of canine liver by simple cold storage using UW lactobionate solution. *Transplant Proc.* 1989;21:1292–3.

146. Zaouali MA, Ben Abdennebi H, Padriassa-Altés S, Mahfoudh-Boussaid A, Roselló-Catafau J. Pharmacological strategies against cold ischemia reperfusion injury. *Expert Opin Pharmacother.* 2010;11:537–55.

147. Morariu AM, Vd Plaats A, V Oeveren W, 'T Hart NA, Leuvenink HGD, Graaff R, et al. Hyperaggregating effect of hydroxyethyl starch components and University of Wisconsin solution on human red blood cells: a risk of impaired graft perfusion in organ procurement? *Transplantation.* 2003;76:37–43.

148. Todo S, Nery J, Yanaga K, Podesta L, Gordon RD, Starzl TE. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *JAMA.* 1989;261:711–4.

149. Stewart ZA, Cameron AM, Singer AL, Montgomery RA, Segev DL. Histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) is associated with reduced graft survival in deceased donor livers, especially those

donated after cardiac death. *Am J Transplant.* 2009;9:286–93.

150. Eghtesad B, Aucejo F, Fung JJ. Preservation solutions in liver transplantation: What are the options? *Liver Transplantation.* 2006;12(2):196–8.

151. Mangus RS, Tector AJ, Agarwal A, Vianna R, Murdock P, Fridell JA. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) and University of Wisconsin solution (UW) in adult liver transplantation. *Liver Transplant.* 2006;12(2):226–30.

152. Menasché P, Termignon JL, Pradier F, Grousset C, Mouas C, Alberici G, et al. Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1994;8(4):207–13.

153. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology.* 1989;10(3):292–9.

154. Yu WM, Coddington D, Bitter-Suermann H. Rat liver preservation. I. The components of UW solution that are essential to its success. *Transplantation.* 1990;49(6):1060–6.

155. Urushihara T, Sumimoto R, Sumimoto K, Jamieson N V, Ito H, Ikeda M, et al. A comparison of some simplified lactobionate preservation solutions with standard UW solution and Eurocollins solution for pancreas preservation. *Transplantation* 1992;53(4):750–4.

156. Biguzas M, Jablonski P, Howden BO, Thomas AC, Walls K, Scott DF, et al. Evaluation of UW solution in rat kidney preservation. II. The effect of pharmacological additives. *Transplantation* 1990;49(6):1051–5.

157. Lopez-Andujar R, Deusa S, Montalvá E, San Juan F, Moya A, Pareja E, et al. Comparative prospective study of two liver graft preservation solutions: University of Wisconsin and Celsior. *Liver Transplant*. 2009;15:1709–17.
158. Badet L, Abdennebi H Ben, Petruzzo P, McGregor B, Espa M, Hadj-Aissa A, et al. Evaluation of IGL-1, a new organ preservation solution: preclinical results in renal transplantation. *Prog Urol*. 2005;15(3):481–488; discussion 487.
159. Pedotti P, Cardillo M, Rigotti P, Gerunda G, Merenda R, Cillo U, et al. A comparative prospective study of two available solutions for kidney and liver preservation. *Transplantation*. 2004.
160. O’Callaghan JM, Morgan RD, Knight SR, Morris PJ. The effect of preservation solutions for storage of liver allografts on transplant outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg*. 2014;260:46–55.
161. Azoulay D, Del Gaudio M, Andreani P, Ichai P, Sebag M, Adam R, et al. Effects of 10 minutes of ischemic preconditioning of the cadaveric liver on the graft’s preservation and function: the ying and the yang. *Ann Surg*. 2005;242:133–9.
162. Oreopoulos GD, Wu H, Szaszi K, Fan J, Marshall JC, Khadaroo RG, et al. Hypertonic preconditioning prevents hepatocellular injury following ischemia/reperfusion in mice: A role for interleukin 10. *Hepatology*. 2004;40:211–20.
163. Moussavian MR, Scheuer C, Schmidt M, Kollmar O, Wagner M, Von Heesen M, et al. Multidrug donor preconditioning prevents cold liver preservation and reperfusion injury. *Langenbeck’s Arch Surg*. 2011;396:231–41.

164. Aitio ML. N-acetylcysteine - Passe-partout or much ado about nothing? *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2006. p. 5–15.
165. Eren N, Cakir O, Oruc A, Kaya Z, Erdinc L. Effects of N-acetylcysteine on pulmonary function in patients undergoing coronary artery bypass surgery with cardiopulmonary bypass.
166. Galli F, Ghibelli L, Buoncristiani U, Bordoni V, D'Intini V, Benedetti S, et al. Mononuclear leukocyte apoptosis in haemodialysis patients: The role of cell thiols and vitamin E. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:1592–600.
167. Shyu KG, Cheng JJ, Kuan P. Acetylcysteine protects against acute renal damage in patients with abnormal renal function undergoing a coronary procedure. *J Am Coll Cardiol*. 2002;16;40(8):1383–8.
168. Tepel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med*. 2000;20;343(3):180–4.
169. Rank N, Michel C, Haertel C, Lenhart A, Welte M, Meier-Hellmann A, et al. N-acetylcysteine increases liver blood flow and improves liver function in septic shock patients: results of a prospective, randomized, double-blind study. *Critical care medicine*. 2000;28(12):3799–807.
170. Taut FJH, Schmidt H, Zapletal CM, Thies JC, Grube C, Motsch J, et al. N-acetylcysteine induces shedding of selectins from liver and intestine during orthotopic liver transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2001;124:337–41.
171. Fukuzawa K, Emre S, Senyuz O, Acarli K, Schwartz ME, Miller CM. N-acetylcysteine ameliorates

reperfusion injury after warm hepatic ischemia. *Transplantation*. 1995;59(1):6-9.

172. Koeppel TA, Thies JC, Lehmann T, Gebhard MM, Herfarth C, Otto G, et al. Improvement of hepatic microhemodynamics by N-acetylcysteine after warm ischemia. *Eur Surg Res*. 28(4):270-7.

173. Demir S, Inal-Erden M. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clin Chim Acta*. 1998;275(2):127-35.

174. Chavez-Cartaya R, Jamieson N V., Ramirez P, Marin J, Pino-Chavez G. Free radical scavengers to prevent reperfusion injury following experimental warm liver ischaemia. Is there a real physiological benefit? *Transpl Int*. 1999;12(3):213-21.

175. Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, et al. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;261(3):917-22.

176. Sener G, Tosun O, Şehirli AÖ, Kaçmaz A, Arbak S, Ersoy Y, et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci*. 2003;72(24):2707-18.

177. Rüdiger HA, Graf R, Clavien PA. Sub-lethal oxidative stress triggers the protective effects of ischemic preconditioning in the mouse liver. *J Hepatol*. 2003;39(6):972-7.

178. Glantzounis GK, Yang W, Koti RS, Mikhailidis DP, Seifalian AM, Davidson BR. Continuous infusion of N-acetylcysteine reduces liver warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 2004;91(10):1330-9.

179. Montero EFS, Quireze C, D'Oliveira DMR. Bile duct exclusion from selective vascular inflow occlusion

in rat liver: Role of ischemic preconditioning and N-acetylcysteine on hepatic reperfusion injury. *Transplantation Proceedings*. 2005. p. 425–7.

180. Okay E, Karadenizli A, Müezzinoğlu B, Zeybek U, Ergen HA, Isbir T. N-acetylcysteine attenuates bacterial translocation after partial hepatectomy in rats. *J Surg Res*. 2005;127(2):164–70.

181. Smyrniotis V, Arkadopoulos N, Kostopanagiotou G, Theodoropoulos T, Theodoraki K, Farantos C, et al. Attenuation of ischemic injury by N-acetylcysteine preconditioning of the liver. *J Surg Res*. 2005;129(1):31–7.

182. Fusai G, Glantzounis GK, Hafez T, Yang W, Quaglia A, Sheth H, et al. N-Acetylcysteine ameliorates the late phase of liver ischaemia/reperfusion injury in the rabbit with hepatic steatosis. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109(5):465–73.

183. Chen CF, Leu FJ, Chen HI, Wang D. Oxygen radicals and matrix metalloproteinases mediate reperfusion liver injury. *Transplant Proc*. 2005;37(10):4547–9.

184. Glantzounis GK, Rocks SA, Sheth H, Knight I, Salacinski HJ, Davidson BR, et al. Formation and role of plasma S-nitrosothiols in liver ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(6):882–92.

185. Jin X, Wang L, Wu H-S, Zhang L, Wang C-Y, Tian Y, et al. N-acetylcysteine inhibits activation of toll-like receptor 2 and 4 gene expression in the liver and lung after partial hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2007;6(3):284–9.

186. Galhardo MA, Quireze C, Navarro PGR, Morello RJ, Simões MDJ, Montero EFDS. Liver and lung late alterations following hepatic reperfusion associated to ischemic preconditioning or N-acetylcysteine.

Microsurgery 2007;27(4):295-9.

187. Baumann J, Ghosh S, Szakmany T, Jancso G, Ferencz A, Roth E, et al. Short-term effects of N-acetylcysteine and ischemic preconditioning in a canine model of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Eur Surg Res.* 2008;41(2):226–30.

188. Keles MS, Demirci N, Yildirim A, Atamanalp SS, Altinkaynak K. Protective effects of N-acetylcysteine and Ginkgo biloba extract on ischaemia-reperfusion-induced hepatic DNA damage in rats. *Clin Exp Med.* 2008;8(4):193–8.

189. Lee EJS, Silva SM da, Simões M de J, Montero EF de S. Effect of N-acetylcysteine in liver ischemia-reperfusion injury after 30% hepatectomy in mice. *Acta Cirurgica Brasileira.* 2012 ;27(4):346-9.

190. Sun Y. N-acetylcysteine attenuates reactive-oxygen-species-mediated endoplasmic reticulum stress during liver ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol.* 2014;20(41):15289.

191. Cai Z, Lou Q, Wang F, Li E, Sun J, Fang H, et al. N-acetylcysteine protects against liver injury induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(7):8655–62.

192. Vivot C, Stump DD, Schwartz ME, Theise ND, Miller CM. N-acetylcysteine attenuates cold ischemia/reperfusion injury in the isolated perfused rat liver. *Transplant Proc.* 1993;25:1983–4.

193. Dunne JB, Davenport M, Williams R, Tredger JM. Evidence that S-adenosylmethionine and N-acetylcysteine reduce injury from sequential cold and warm ischemia in the isolated perfused rat liver. *Transplantation.* 1994;57:1161–8.

194. Nakano H, Boudjema K, Alexandre E, Imbs P, Chenard MP, Wolf P, et al. Protective effects of N-acetylcysteine on hypothermic ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Hepatology*. 1995;22:539–45.
195. Nakano H, Boudjema K, Jaeck D, Alexandre E, Imbs P, Chenard MP, et al. Amelioration of hepatocellular integrity and inhibition of sinusoidal oxidative stress by N-acetylcysteine pretreatment in cold ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Eur Surg Res*. 28:245–55.
197. Nakano H, Nagasaki H, Barama A, Boudjema K, Jaeck D, Kumada K, et al. The effects of N-acetylcysteine and anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody against ischemia-reperfusion injury of the rat steatotic liver produced by a choline-methionine-deficient diet. *Hepatology*. 1997;26:670–8.
198. Nakano H, Nagasaki H, Yoshida K, Kigawa G, Fujiwara Y, Kitamura N, et al. N-acetylcysteine and anti-ICAM-1 monoclonal antibody reduce ischemia-reperfusion injury of the steatotic rat liver. *Transplant Proc*. 1998;30(7):3763.
199. Walcher F, Marzi I, Flecks U, Larsen R. N-Acetylcysteine failed to improve early microcirculatory alterations of the rat liver after transplantation. *Transpl Int*. 1995;8:317–23.
200. Koeppel TA, Lehmann TG, Thies JC, Gehrcke R, Gebhard MM, Herfarth C, et al. Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 1996;61(9):1397–402.
201. Regueira FM, Hernández JL, Sola I, Cienfuegos JA, Pardo F, Díez-Caballero A, et al. Ischemic damage prevention by N-acetylcysteine treatment of the donor before orthotopic liver transplantation. *Transplantation Proceedings*. 1997. p. 3347–9.

202. Manika A, Trinh T, Lagacé G, Dugas MA, Proulx F, Lepage G, et al. N-acetylcysteine in pig liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation*. 1999;68(3):327-30.
203. Bromley PN, Cottam SJ, Hilmi I, Tan KC, Heaton N, Ginsburg R, et al. Effects of intraoperative N-acetylcysteine in orthotopic liver transplantation. *Br J Anaesth*. 1995; 75(3):352-4.
204. Thies JC, Koeppel TA, Lehmann T, Schemmer P, Otto G, Post S. Efficacy of N-acetylcysteine as a hepatoprotective agent in liver transplantation: An experimental study. *Transplantation Proceedings* 1997; 29(1-2):1326-7.
205. Steib A, Freys G, Collin F, Launoy A, Mark G, Boudjema K. Does N-acetylcysteine improve hemodynamics and graft function in liver transplantation? *Liver Transpl Surg*. 1998 ;4(2):152-7.
206. Bucuvalas JC, Ryckman FC, Krug S, Alonso MH, Balistreri WF, Kotagal U. Effect of treatment with prostaglandin E1 and N-acetylcysteine on pediatric liver transplant recipients: a single-center study. *Pediatr Transplant*. 2001;5(4):274-8.
207. D'Amico F, Vitale A, Piovan D, Bertacco A, Ramirez Morales R, Chiara Frigo A, et al. Use of N-acetylcysteine during liver procurement: A prospective randomized controlled study. *Liver Transplant*. 2013;19:135-44.
208. Regueira FM, Cienfuegos J-A, Pardo F, Hernández JL, Díez-Caballero A, Sierra A, et al. Improvement in early function of the hepatic graft after treatment of the donor with N-Acetylcysteine: Clinical study. *Transplant Proc*. 1997;29(8):3350-2.

209. Weigand MA, Plachky J, Thies JC, Spies-Martin D, Otto G, Martin E, et al. N-acetylcysteine attenuates the increase in alpha-glutathione S-transferase and circulating ICAM-1 and VCAM-1 after reperfusion in humans undergoing liver transplantation. *Transplantation* 2001; 27;72(4):694-8.
210. Khan AW, Fuller BJ, Shah SR, Davidson BR, Rolles K. A prospective randomized trial of N-acetyl cysteine administration during cold preservation of the donor liver for transplantation. *Ann Hepatol Off J Mex Assoc Hepatol.* 2005;4(2):121-6.
211. Santiago FM, Olmedo C, Muffak-Granero K, Comino A, Villar JM, Garrote D, et al. Intraoperative pH values after N-acetylcysteine administration during liver transplantation. *Transplant Proc.* 2010;42:3164-6.
212. Hilmi IA, Peng Z, Planinsic RM, Damian D, Dai F, Tyurina YY, et al. N-acetylcysteine does not prevent hepatorenal ischaemiareperfusion injury in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:2328-33.
213. Kanter MZ. Comparison of oral and i.v. acetylcysteine in the treatment of acetaminophen poisoning. *Am J Health Sys Pharm.* 2006 1;63(19):1821-7.
214. Carbonell N, Sanjuán R, Blasco M, Jordá A, Miguel A. N-acetylcysteine: short-term clinical benefits after coronary angiography in high-risk renal patients. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63:12-9.
215. Schmidt CW. Metabolomics: What's happening downstream of DNA. *Environ Health Perspect.* 2004;112(7):A410-5.
216. 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):1-31.

217. Nicholson JK, Higham DP, Timbrell JA, Sadler PJ. Quantitative high resolution ¹H NMR urinalysis studies on the biochemical effects of cadmium in the rat. *Mol Pharmacol*. 1989;36(3):398-404.

218. Montanez JE, Peters JM, Correll JB, Gonzalez FJ, Patterson AD. Metabolomics: an essential tool to understand the function of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Toxicol Pathol*. 2013;41(2):410-8.

219. Lindon JC, Nicholson JK. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2008;1:45-69.

220. Li H, Wang L, Yan X, Liu Q, Yu C, Wei H, et al. A proton nuclear magnetic resonance metabonomics approach for biomarker discovery in nonalcoholic fatty liver disease. *J Proteome Res*. 2011;10(6):2797-806.

221. Silva MA, Richards DA, Bramhall SR, Adams DH, Mirza DF, Murphy N. A study of the metabolites of ischemia-reperfusion injury and selected amino acids in the liver using microdialysis during transplantation. *Transplantation* 2005;15;79(7):828-35.

222. Singh HK, Yachha SK, Saxena R, Gupta A, Nagana Gowda GA, Bhandari M, et al. A new dimension of ¹H-NMR spectroscopy in assessment of liver graft dysfunction. *NMR Biomed*. 2003;16(4):185-8.

223. Pan L, Qiu Y, Chen T, Lin J, Chi Y, Su M, et al. An optimized procedure for metabonomic analysis of rat liver tissue using gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*.

2010;52(4):589–96.

224. Feng B, Wu S, Liu F, Gao Y, Dong F, Wei L. Metabonomic analysis of liver tissue from BALB/c mice with D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute hepatic failure. *BMC Gastroenterol.* 2013;13:73.

225. Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, et al. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem.* 2006;281(24):16768–76.

226. Dello SA, Neis EPJG, de Jong MC, van Eijk HMH, Kicken CH, Olde Damink SWM, et al. Systematic review of Ophthalmate as a novel biomarker of hepatic Glutathione depletion. *Clin Nutr.* 2013; ;32(3):325-30.

227. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46(5–6):241–81.

228. García-Cañaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A. A comprehensive untargeted metabonomic analysis of human steatotic liver tissue by RP and HILIC chromatography coupled to mass spectrometry reveals important metabolic alterations. *J Proteome Res.* 2011;10(10):4825–34.

229. Carretero A, León Z, García-Cañaveras JC, Zaragoza A, Gómez-Lechón MJ, Donato MT, et al. In vitro/in vivo screening of oxidative homeostasis and damage to DNA, protein, and lipids using UPLC/MS-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2014 Sep;406(22):5465–76.

230. Rossi R, Dalle-Donne I, Milzani A, Giustarini D. Oxidized forms of glutathione in peripheral blood as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chem.* 2006;52(7):1406–14.

231. James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, et al. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6):1611-7.
232. Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, et al. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2011;103(3):220-5.
233. Delatour T, Richoz J, Vouros P, Turesky RJ. Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine and tyrosine in plasma proteins of rats and assessment of artifactual tyrosine nitration. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci [Internet].* 2002;779(2):189-99.
234. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009;27(2):120-39.
235. Bastani NE, Gundersen TE, Blomhoff R. Determination of 8-epi PGF(2alpha) concentrations as a biomarker of oxidative stress using triple-stage liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009;23(18):2885-90.
236. Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta.* 2007;380(1-2):50-8.
237. Begg C, Cho M, Eastwood S, Horton R, Moher D, Olkin I, et al. Improving the quality of reporting of randomized controlled trials. The CONSORT statement. *JAMA J Am Med Assoc.* 1996;276(8):637-9.

238. Starzl TE, Miller C, Broznick B, Makowka L. An improved technique for multiple organ harvesting. *Surg Gynecol Obstet.* 1987 Oct;165(4):343–8.
239. López-Andújar R, Orón EM, Carregnato AF, Suárez FV, Herraiz AM, Rodríguez FSJ, et al. T-tube or no T-tube in cadaveric orthotopic liver transplantation: the eternal dilemma: results of a prospective and randomized clinical trial. *Ann Surg.* 2013;258(1):21–9.
240. Moya-Herraiz A, Torres-Quevedo R, San Juan F, López-Andújar R, Montalvá E, Pareja E, et al. Indications and results of liver retransplantations. *Cirugía española* 2008 Nov;84(5):246–50.
241. Dindo D, Demartines N, Clavien P-A. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg.* 2004;240(2):205–13.
242. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313–21.
243. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(9):2467–74.
244. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1996;24(2):289–93.
245. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol.* 1991;13(3):372–4.

246. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidant. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;827(1):76–82.
247. FDA. Guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Bethesda, MD. 2001.
248. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 2003;75(13):3019–30.
249. Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, Dykstra DM, Punch JD, DeRoy MA, et al. Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. *Am J Transplant.* 2006;6(4):783–90.

250. Briceno J, Solorzano G, Pera C, Briceño J, Solórzano G. A proposal for scoring marginal liver grafts. *Transpl Int.* 2000;13 Suppl 1:S249-52.
251. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: liver transplantation--June 20-23, 1983. *Hepatology.* 4(1 Suppl):107S-110S.
252. Jain A, Reyes J, Kashyap R, Dodson SF, Demetris AJ, Ruppert K, et al. Long-term survival after liver transplantation in 4,000 consecutive patients at a single center. *Ann Surg.* 2000;232(4):490-500.
253. Matesanz R, De la Rosa G. Liver transplantation: The Spanish experience. *Dig Liver Dis Suppl.* 2009;3:75-81.
254. Foster R, Zimmerman M, Trotter JF. Expanding donor options: marginal, living, and split donors. *Clin Liver Dis.* 2007;11(2):417-29.
255. Abradelo M, Fondevila C, Grupo de Trabajo de la Sociedad Española de Trasplante Hepático. [IV Consensus meeting of the Spanish Society of Liver Transplantation (SETH) 2012. Liver transplant with non-conventional grafts: Split liver transplantation and non-heart beating donors]. *Cirugía Española* 2014;92(3):157-67.
256. Durand F, Renz JF, Alkofer B, Burra P, Clavien P-A, Porte RJ, et al. Report of the Paris consensus meeting on expanded criteria donors in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2008;14(12):1694-707.
257. Mirza DF, Gunson BK, Da Silva RF, Mayer a. D, Buckels J a C, McMaster P. Policies in Europe on "marginal quality" donor livers. *Lancet.* 1994;344(8935):1480-3.

258. Melendez H V, Heaton ND. Understanding “marginal” liver grafts. *Transplantation* 1999;68(4):469–71.
259. Busquets J, Xiol X, Figueras J, Jaurrieta E, Torras J, Ramos E, 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(12):1765–71.
260. Gastaca M. Extended criteria donors in liver transplantation: adapting donor quality and recipient. *Transplant Proc*. 2009;41(3):975–9.
261. ONT. Dossier de la organización Nacional de Trasplantes. 2014.
262. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg*. 2001;181(2):160–6.
263. Jegatheeswaran S, Siriwardena AK. Experimental and clinical evidence for modification of hepatic ischaemia-reperfusion injury by N-acetylcysteine during major liver surgery. *HPB*. 2011;13(2):71–8.
264. Von Heesen M, Seibert K, Hülser M, Scheuer C, Wagner M, Menger MD, et al. Multidrug donor preconditioning protects steatotic liver grafts against ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg*. 2012;203(2):168–76.
265. Kurokawa T, Nonami T, Harada A, Nakao A, Sugiyama S, Ozawa T, et al. Effects of prostaglandin E1 on the recovery of ischemia-induced liver mitochondrial dysfunction in rats with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol*. 1991;26:269–74.

266. Prescott LF, Illingworth RN, Critchley JA, Proudfoot AT. Intravenous N-acetylcysteine: still the treatment of choice for paracetamol poisoning. *Br Med J*. 1980; 5;280(6206):46-7.
267. Prescott LF, Park J, Ballantyne A, Adriaenssens P, Proudfoot AT. Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *Lancet* 1977;27;2(8035):432-4.
268. Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr [Internet]*. 2004 Mar;134(3):489-92.
269. Silva SM, Carbonel AAF, Taha MO, Simões MJ, Montero EFS. Proliferative Activity in Ischemia/Reperfusion Injury in Hepatectomized Mice: Effect of N-Acetylcysteine. *Transplantation Proceedings*. 2012. p. 2321-5.
270. Bailey B, McGuigan MA. Management of anaphylactoid reactions to intravenous N-acetylcysteine. *Ann Emerg Med*. 1998;31(6):710-5.
271. Chen H, Peng C-H, Shen B-Y, Deng X-X, Shen C, Xie J-J, et al. Multi-factor analysis of initial poor graft function after orthotopic liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2007;6(2):141-6.
272. Adam R, Delvart V, Karam V, Ducerf C, Navarro F, Letoublon C, et al. Compared efficacy of preservation solutions in liver transplantation: a long-term graft outcome study from the European Liver Transplant Registry. *Am J Transplant*. 2015;15(2):395-406.
273. Biggins SW, Beldecos A, Rabkin JM, Rosen HR. Replantation for hepatic allograft failure: Prognostic modeling and ethical considerations. *Liver Transpl*. 2002;8(4):313-22.

274. Zhai Y, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: New insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *Am J Transplant.* 2011;11(8):1563-9.
275. Davis CL, Gonwa TA, Wilkinson AH. Pathophysiology of renal disease associated with liver disorders: implications for liver transplantation. Part I. *Liver Transpl.* 2002;8(2):91-109.
276. Betrosian A-P, Agarwal B, Douzinas EE. Acute renal dysfunction in liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2007;14;13(42):5552-9.
277. Parekh NK, Hynan LS, De Lemos J, Lee WM, Acute Liver Failure Study Group. Elevated troponin I levels in acute liver failure: is myocardial injury an integral part of acute liver failure? *Hepatology.* 2007;45(6):1489-95.
278. Tanaka Y, Maher JM, Chen C, Klaassen CD. Hepatic ischemia-reperfusion induces renal heme oxygenase-1 via NF-E2-related factor 2 in rats and mice. *Mol Pharmacol.* 2007 Mar;71(3):817-25.
279. Miyata T, Yokoyama I, Todo S, Tzakis A, Selby R, Starzl TE. Endotoxaemia, pulmonary complications, and thrombocytopenia in liver transplantation. *Lancet* 1989;22;2(8656):189-91.
280. Matuschak GM, Henry KA, Johanss CA, Lechner AJ. Liver-lung interactions following *Escherichia coli* bacteremic sepsis and secondary hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(4):1002-9.
281. Abdala E, Baía CES, Mies S, Massarollo PCB, de Paula Cavalheiro N, Baía VRM, et al. Bacterial translocation during liver transplantation: a randomized trial comparing conventional with venovenous bypass

vs. piggyback methods. *Liver Transpl.* 2007;13(4):488–96.

282. Aliakbarian M, Nikeghbalian S, Ghaffaripour S, Bahreini A, Shafiee M, Rashidi M, et al. Effects of N-Acetylcysteine Addition to University of Wisconsin Solution on the Rate of Ischemia-Reperfusion Injury in Adult Orthotopic Liver Transplant. *Exp Clin Transplant.* 2015. PMID: 26114393.

283. Robinson SM, Saif R, Sen G, French JJ, Jaques BC, Charnley RM, et al. N-acetylcysteine administration does not improve patient outcome after liver resection. *HPB.* 2013;15(6):457–62.

284. Grendar J, Ouellet JF, McKay A, Sutherland FR, Bathe OF, Ball CG, et al. Effect of N-acetylcysteine on liver recovery after resection: A randomized clinical trial. *J Surg Oncol.* 2016;114(4):446–50.

285. McKay A, Cassidy D, Sutherland F, Dixon E. Clinical results of N-acetylcysteine after major hepatic surgery: a review. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2008;15(5):473-8.
286. Vinaixa C, Rubín A, Aguilera V, Berenguer M. Recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol.* 2013;26(4):304-13.
287. Belli LS, Berenguer M, Cortesi PA, Strazzabosco M, Rockenschaub S-R, Martini S, et al. Delisting of liver transplant candidates with chronic hepatitis C after viral eradication: A European study. *J Hepatol.* 2016;65(3):524-31.
288. Mone T, Heldens J, Niemann CU. Deceased organ donor research: the last research frontier? *Liver Transpl.* 2013 Feb;19(2):118-21.
289. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.* 1987;107(4):526-45.
290. Loinaz C, González EM. Marginal donors in liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2000; 47(31):256-63.
291. Savas N, Coskun M, Bilezikci B, Uruc I, Karakayali H, Yilmaz U, et al. Value of an individual liver biopsy in the preoperative evaluation of apparently healthy potential liver donors. *Liver Transplant.* 2008;14(4):541-6.
292. Stegemann J, Hirner A, Rauen U, Minor T. Use of a New Modified HTK Solution for Machine Preservation of Marginal Liver Grafts. *J Surg Res.* 2010;160(1):155-62.
293. Gallinat A, Lüer B, Swoboda S, Rauen U, Paul A,

Minor T. Use of the new preservation solution Custodiol-N supplemented with dextran for hypothermic machine perfusion of the kidney. *Cryobiology*. 2013;66(2):131–5.

294. Pizanis N, Petrov A, Heckmann J, Wiswedel I, Wohlschlger J, De Groot H, et al. A new preservation solution for lung transplantation: Evaluation in a porcine transplantation model. *J Hear Lung Transplant*. 2012;31(3):310–7.

295. Wendel A, Cikryt P. The level and half-life of glutathione in human plasma. *FEBS Lett*. 1980;3;120(2):209–11.

296. Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):20704–28.

297. Wu G, Fang Y, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Recent Advances in Nutritional Sciences Glutathione Metabolism and Its Implications for Health 1. *Environ Heal*. 2004;132;:489–92.



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA