



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Evaluación de las alteraciones de la coagulación de los donantes a corazón parado, su relación con la viabilidad de los injertos hepáticos y posibles acciones terapéuticas

Marina Vendrell Jordà



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA GENERAL Y DIGESTIVA

LINEA DE INVESTIGACIÓN: TRASPLANTE DE HÍGADO Y
VIABILIDAD DEL INJERTO

TESIS DOCTORAL:

**EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES DE LA
COAGULACIÓN DE LOS DONANTES A CORAZÓN
PARADO, SU RELACIÓN CON LA VIABILIDAD DE LOS
INJERTOS HEPÁTICOS Y POSIBLES ACCIONES
TERAPÉUTICAS**

Presentada por Marina Vendrell Jordà MD, aspirante al título de
Doctor en Medicina y Cirugía

DIRECTORES:

Constantino Fondevila Campo, MD, PhD, y

Juan Carlos García-Valdecasas Salgado, MD, PhD

Barcelona, 2018

CONSTANTINO FONDEVILA CAMPO, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía General y Digestiva de la Universidad de Barcelona,

JUAN CARLOS GARCÍA-VALDECASAS SALGADO, Catedrático del Departamento de Cirugía General y Digestiva de la Universidad de Barcelona, y

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral “EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES DE LA COAGULACIÓN DE LOS DONANTES A CORAZÓN PARADO, SU RELACIÓN CON LA VIABILIDAD DE LOS INJERTOS HEPÁTICOS Y POSIBLES ACCIONES TERAPÉUTICAS”, presentada por D^a Marina Vendrell Jordà, ha sido realizada bajo su dirección,

Y tras valorar el trabajo realizado por la aspirante al Título de Doctor,

AUTORIZAN:

Su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente.

Barcelona, mayo del 2018

Ad astra per alia porci.

John Steinbeck

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, el Dr. Fondevila y el Dr. García Valdecasas. Sin su ayuda, paciencia y ánimo este trabajo no habría sido posible. Su dedicación, desde el principio, ha sido un ejemplo a seguir.

A la Dra. Pilar Taurà, mi mentora, tanto durante mi residencia como ya de adjunta. Si no me hubiera incluido en su vorágine de inacabable energía y optimismo, tengo claro que no estaría donde estoy.

A la Dra. Amelia Hessheimer, su increíble capacidad de trabajo es casi equiparable a su olfato para detectar las fugas de sevoflurano en el estabulario.

Quisiera agradecer la dedicación de muchos colegas del Hospital Clínic: Javier Muñoz, Ángel Ruiz, Lilia Martínez, Jordi Núñez y todo el equipo de coordinación de trasplantes.

También agradecer de un modo muy especial la ayuda y consejos del Dr. Ricard Valero, sin el cual seguramente no sería anestesióloga, a la Dra. Carmen Gomar, a la Dra. Graciela Martínez Palli y a la Dra. Anabel Blasi.

A mi familia: mis padres, Francesc Vendrell y Àngels Jordà; Marta; Carla; Mireia; Nono; Júlia; Toni; Toni-monkey; Guillem y Roger. A mis abuelos.

A Marta. Si empiezo con las bromas, los motivos, y todo lo que conlleva, serían más largos los agradecimientos que la tesis. Lo dejaremos en... ready, habibi? Y en la próxima Alhambra en el Far de la Mola.

A Núria, mi clon, que por algún extraño motivo lleva aguantando mis errores y dándome los mejores consejos (que acto seguido ignoro) desde hace 10 años... y me sigue cogiendo el teléfono.

Y con ellas, al resto de mis amigos: Cris, María, Juanca, Germán (los CoAs), Guzmán (mi otro padre), Mavi y Melania (el *Trirreno*), Iván, Patri (*marmotassa*), Ana, los de la *uni*, los de Sitges. Y los de Barcelona, esos seres infectos. Si no fuera por todos ellos, habría terminado esta tesis mucho antes. Gracias por perfeccionar conmigo el noble arte del procrastinar.

ÍNDICE

1. RESUMEN	17
1.1. Introducción.....	19
1.2. Hipótesis	22
1.3. Objetivos.....	23
1.4. Material y métodos	23
1.5. Resultados.....	24
1.6. Discusión	26
1.7. Conclusiones	28
2. INTRODUCCIÓN	31
2.1. Situación Actual del Trasplante Hepático en España.....	33
2.2. La Donación en Asistolia.....	34
2.3. La Lesión por Isquemia-Reperfusión.....	35
2.4. La viabilidad del Injerto del Donante en Asistolia.....	37
2.5. El uso de Fibrinolíticos en los Injertos Provenientes de Donante en Asistolia.....	39
2.6. Patrón de Hiperfibrinólisis en la Parada Cardíaca Extrahospitalaria.....	40
3. HIPÓTESIS.....	43

4. OBJETIVOS	47
4.1. Estudio Clínico	49
1.2. Estudio Experimental	49
5. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS	51
5.1. Estudio 1: caracterización tromboelastométrica de las alteraciones de coagulación de los donantes en asistolia tipo 2	53
5.2. Estudio 2: análisis del tratamiento con fibrinolíticos o heparina para mejorar la viabilidad de los injertos hepáticos provenientes de donantes en asistolia tipo 2.....	63
6. RESULTADOS.....	77
7. DISCUSIÓN.....	81
7.1. Estudio 1	83
7.2. Estudio 2	89
8. CONCLUSIONES.....	93
9. BIBLIOGRAFÍA	97
10. ANEXOS	109
10.1. Abreviaturas.....	111
10.2. Índice de Figuras	112

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

El trasplante hepático es, en la actualidad, el único tratamiento viable para los pacientes con enfermedades hepáticas terminales. Sin embargo, el incremento de las indicaciones de trasplante no se ve equiparado por un incremento en la oferta de órganos. Según datos de la Organización Nacional de Trasplantes, en el año 2016 se trasplantaron la mitad (54.5%) de los pacientes en lista de espera. A pesar de ello, hubo un 3,6% de muertes en lista y un 6.9% de pacientes que fueron retirados de la misma por contraindicación médica o empeoramiento clínico (1).

Una de las estrategias globales más efectivas para disminuir la mortalidad en lista incluye el uso de injertos provenientes de donantes llamados ‘no convencionales’, siendo los ‘convencionales’ los injertos completos procedentes de donantes en muerte encefálica (DME). Por donantes no convencionales, nos referimos a los donantes vivos, la bipartición hepática (*split liver technique*), el trasplante secuencial (dominó) y los donantes en asistolia (DA) (2).

Se definen como DA aquellos que sufren una parada cardiorrespiratoria irreversible; y son los que potencialmente más pueden incrementar el número de trasplantes. De acuerdo con la clasificación de Maastricht (3), se pueden definir cuatro tipos de DA. Los DA tipo 1 son aquellos que sufren una parada cardio-respiratoria (PCR) extra hospitalaria, y el potencial donante es trasladado al hospital sin habersele realizado maniobras de reanimación cardiopulmonar (RCP). En los donantes tipo 2, a diferencia de en los tipo 1, se realizan maniobras de RCP, que son inefectivas. Los DA tipo 3 son aquellos en los que se induce la parada cardíaca (PC) mediante la retirada de soporte ventilatorio, en pacientes que presentan lesión cerebral pero en los que dicha

lesión es insuficiente para declarar la muerte encefálica. Finalmente, los DA tipo 4 son aquellos donantes en muerte encefálica que sufren una PCR no prevista. Los tipos 1, 2 y 4 son considerados DA no controlados, mientras que los tipo 3 son los llamados DA controlados.

En cualquiera de estos cuatro supuestos, y a diferencia de lo que ocurre en los DME, hay un periodo de parada cardiorrespiratoria previo a la extracción de los órganos. Esto implica que los DA sufren, inevitablemente, un periodo conocido como 'isquemia caliente', con una baja perfusión tisular a temperatura corporal (37º). Durante la isquemia, la falta de llegada de oxígeno y metabolitos energéticos a las células conlleva una depleción en los depósitos de adenosín-trifosfato (ATP) intracelular, con fallo de las bombas de iones y, en última instancia, acumulo de sodio y edema celular (4).

Por ello, los injertos de DA presentan una peor evolución que los de DME, observándose fundamentalmente un incremento de lesiones biliares no anastomóticas a nivel intra-hepático. El mecanismo fisiopatológico detrás de este cuadro se explica en parte por la mayor susceptibilidad del epitelio biliar a los periodos de isquemia caliente. Una activación del endotelio del plexo peribiliar y la consecuente formación de microtrombos exacerbaría la hipoxia colangiocelular (5,6). La aparición de la colangiopatía isquémica puede acompañarse de complicaciones graves (sepsis, desnutrición) en el contexto de un paciente inmunodeprimido. El tratamiento de la misma mediante radiología intervencionista suele fracasar y conllevar un incremento de los reingresos hospitalarios, siendo en la mayoría de los casos el trasplante la única opción terapéutica (7).

A lo largo de los años se han ido desarrollando diversas técnicas con el fin de mejorar la viabilidad de los órganos que provienen de los DA (8). Una de éstas es la perfusión regional abdominal normotérmica (PRAN). Mediante la oxigenación celular a 37º, no sólo cesa el insulto isquémico, sino que se potencia la recarga energética y la

reparación tisular. Es una técnica efectiva para disminuir, en los injertos que han sufrido una isquemia breve, la lesión provocada por una posterior isquemia prolongada (9,10).

El Hospital Clínic de Barcelona presenta uno de los programas más activos de obtención de órganos a partir de DA tipo 2 con PRAN, con la serie más amplia publicada de trasplante de hígado. No obstante, la aplicabilidad de este procedimiento es del 10% (11). Una de las causas de esta baja aplicabilidad es la evolución subóptima durante el proceso de extracción del injerto (fases demasiado largas, límites de transaminasas durante la PRAN, o el aspecto macroscópico del hígado en el momento de la extracción). Todas ellas constituyen contraindicaciones relativas para la donación hepática.

Durante la PC, se cree que la estasis sanguínea facilita la aparición de microtrombos que no son eliminados incluso cuando el flujo sanguíneo se ve restablecido mediante la PRAN, con lo cual la isquemia continúa a nivel microvascular. Ante dicha hipótesis, el uso de fibrinolíticos se ha postulado como una prometedora estrategia para mejorar la viabilidad de los órganos, al lisarse los trombos y permitir el paso de sangre. Existen estudios en modelos animales en DA controlados en los que la administración de trombolíticos mejoraba la viabilidad del injerto, al conseguir una mejor perfusión del mismo (12,13). En estudios similares realizados en humanos, se redujo la aparición de lesiones biliares intra-hepáticas (14,15) y, a nivel renal, se observaba una mejora de los órganos durante la perfusión, así como de los marcadores enzimáticos (16).

Para valorar la efectividad de este tipo de tratamiento en DA no controlados, primero es necesario conocer las alteraciones de la coagulación que se dan en este tipo de donantes. Estudios recientemente realizados en pacientes que han sufrido una PCR recuperada muestran un estado de hiperfibrinólisis mediante tromboelastometría (17,18). Se cree que esto es debido a que, de un modo similar a lo que ocurre en los

politraumáticos, la coagulopatía es independiente del grado de lesiones y del consumo de factores de la coagulación, siendo causada en primera instancia por la hipoperfusión tisular (19).

La tromboelastometría es una técnica de análisis viscoelástico en sangre total que proporciona información sobre la dinámica de formación, maduración y lisis del coágulo. Se trata de un método de análisis rápido, barato y sencillo que ha adquirido un mayor protagonismo en los últimos años, con la aparición de analizadores de uso más sencillo. Al realizarse en sangre total y a la temperatura del paciente, permite una evaluación más próxima a la realidad de la situación de coagulación del mismo (20). El análisis tromboelastométrico de los DA no controlados nos permite no sólo evaluar de una manera global el estado de coagulación, justificando el uso de fibrinolíticos en este tipo de donantes, sino que también puede ser un parámetro que nos ayude a tomar una decisión más objetiva acerca de la idoneidad de usar un determinado injerto sin comprometer los resultados del trasplante (11,21).

1.2. HIPÓTESIS

Las alteraciones de la coagulación que presentan los donantes a corazón parado se correlacionan con el grado de hipoperfusión tisular sufrido durante la parada cardíaca.

El uso de fibrinolíticos para tratar los microtrombos formados durante la parada cardíaca puede mejorar el flujo microvascular en injertos procedentes de donantes a corazón parado no controlados.

1.3. OBJETIVOS

Identificar y caracterizar mediante tromboelastometría las alteraciones de coagulación de los donantes a corazón parado tipo 2 de la clasificación de Maastricht.

Determinar si las alteraciones de la coagulación objetivadas en la tromboelastometría se correlacionan con los marcadores de hipoperfusión y viabilidad del injerto.

Mediante un estudio experimental en animales, determinar si la administración de fibrinolíticos mejora la viabilidad del injerto.

1.4. MATERIAL Y MÉTODOS

En el primer estudio se describen las alteraciones en la coagulación de los DA tipo 2 de la clasificación de Maastricht. Se trata de un estudio prospectivo observacional en el que, durante 18 meses, se han recogido los datos de los potenciales DA llegados al Hospital Clinic de Barcelona. Se recogen las características demográficas del donante, los datos relacionados con las maniobras de resucitación y los tiempos de isquemia. Inmediatamente tras la declaración de muerte, pero antes de la heparinización del potencial donante, se extrae una muestra de sangre con la que se realiza un análisis tromboelastométrico, así como analíticas para medir parámetros relacionados con la función hepática y renal.

El segundo estudio es un estudio experimental en un modelo porcino previamente validado de trasplante hepático (22), en el que se ha reproducido la situación clínica del DA. Brevemente, se provoca una parada cardíaca mediante administración de cloruro potásico a cerdos donantes de entre 30 y 35 kg de peso,

estratificándose en tres grupos dependiendo de la administración o no de heparina antes de la parada cardíaca, de 60 minutos de duración, y/o fibrinolítico (activador tisular del plasminógeno –tPA-) durante la perfusión regional abdominal normotérmica (PRAN) que se mantiene 60 minutos.

Después de realizar la extracción del injerto hepático, éste se almacena en la nevera a 4°C durante 4 horas y entonces se realiza el implante en el receptor, cuya situación clínica es controlada durante 5 días, momento de su eutanasia.

En distintos momentos a lo largo del estudio, se realizan extracciones de sangre para monitorizar parámetros analíticos y de tromboelastometría.

1.5. RESULTADOS

En el primer estudio, se recogen datos de 62 potenciales donantes, realizándose un análisis tromboelastométrico en 33 de ellos (en los 29 casos restantes no se pudo realizar la tromboelastometría por motivos logísticos). La mayoría proceden de hombres con un IMC (índice de masa corporal) >25. Uno de ellos presentaba trombocitopenia congénita con 66.000 plaquetas al ingreso. Ninguno recibía tratamiento antiagregante; uno recibía tratamiento con acenocumarol por fibrilación auricular. Las maniobras de RCP avanzada se mantuvieron durante una mediana de 1 hora, y la muestra para tromboelastometría, fue extraída aproximadamente a los 90 minutos post-parada (rango 48-127 minutos).

En la analítica al ingreso, se observan niveles de hemoglobina y hematocrito dentro de la normalidad, con plaquetas en el límite inferior. Los tiempos de protrombina y tiempo de cefalina se encuentran alargados, indicando coagulopatía, con niveles de fibrinógeno dentro del rango de normalidad. De los 33 potenciales donantes, se trasplantaron 22 riñones y 5 hígados.

El análisis tromboelastométrico de los potenciales donantes muestra un patrón de hipocoagulabilidad en todos ellos, con un tiempo de formación alargado y una firmeza disminuida. Así mismo, todos los potenciales donantes muestran un patrón de hiperfibrinólisis, fulminante en 26 casos e intermedia en los 7 restantes. No se encuentra correlación entre el grado de lisis a los 30 minutos y la duración de las maniobras de RCP o el tiempo desde la parada cardíaca hasta la extracción de la muestra. Sí se ve una correlación inversa entre el grado de lisis a los 30 minutos y el pico de transaminasas (aspartato aminotransferasa –ASAT- y alanina aminotransferasa –ALAT-).

En el segundo estudio, durante la PRAN se observa una mejoría en los flujos de bomba de perfusión, flujo arterial y flujo portal en aquellos animales que recibieron heparina pre-parada frente a aquellos animales que no la recibieron. No se observan diferencias en el grupo en el que se administró tPA en comparación con el grupo control.

Durante el seguimiento, la supervivencia a los 5 días es del 83% en los grupos 1 y 2 (en los que no se administró heparina), y del 100% en el grupo 3 (al que se administró heparina antes de la PCR). Los grupos 1 y 2 presentan unos niveles más elevados de transaminasas (ASAT) y más bajos de tiempo de protrombina (TP) durante las primeras 72 horas del seguimiento, en comparación con el grupo 3. Durante el seguimiento, los niveles de gammaglutamil transferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (FA) también se mantienen más bajos en el grupo 3, aunque esta diferencia no alcanza significación estadística.

El análisis histológico permite observar la progresión de la lesión tisular a lo largo de las distintas fases del estudio. La lesión por isquemia-reperfusión es menor en aquellos animales pre-tratados con heparina, con una menor alteración de la arquitectura biliar, arteriolonecrosis y lesión de las glándulas peribiliares. En ninguno de los grupos se observan depósitos de fibrina significativos.

En cuanto a la expresión de los marcadores de activación endotelial e inflamación, hay una menor expresión de E-selectina, TNF e IL1- β en los animales que recibieron heparina, en el análisis realizado después de la reperfusión y durante el seguimiento; en comparación con los grupos que no recibieron heparina.

El uso de tromboelastometría a lo largo del estudio sirvió para evaluar la correcta dosificación de tPa en el grupo 2, y de heparina en el grupo 3.

1.6. DISCUSIÓN

El hallazgo más interesante del primer estudio es la observación de un patrón de hiperfibrinólisis en todos los potenciales donantes a corazón parado. A su llegada a nuestro hospital, el 100% de los potenciales DA presentaban un patrón de hiperfibrinólisis por tromboelastometría. Esto se asemeja a los resultados de los estudios de Viersen (17) y Schöchl (18), en los que se realizaron tests viscoelásticos en pacientes que sufrieron una parada cardíaca recuperada. Dicha hiperfibrinólisis podría atribuirse al hecho de que, en las situaciones de perfusión tisular inadecuada, se incrementa la secreción de trombomodulina endotelial que, en última instancia, causa un incremento del paso de plasminogeno a plasmina (23-27). Así mismo, la propia hipoxia y la secreción de catecolaminas incrementan la secreción de tPA endotelial (28-30). Todo ello conllevaría un estado de hiperfibrinólisis que no justifica el uso terapéutico de fibrinolíticos en los DCP. Los estudios que hasta este momento se han publicado, defendiendo el uso de fibrinolíticos en los hígados de DCP (14)(15) presentan importantes limitaciones metodológicas que ponen en duda la recomendación de este tratamiento.

En el segundo estudio, destaca el hecho de que no hubo diferencias en cuanto a la calidad del injerto hepático, tanto durante la fase de PRAN como durante los 5 días de seguimiento, en los hígados provenientes de cerdos que habían recibido tPA en

comparación con los controles. Así mismo, el análisis histológico realizado sobre el tejido hepático tras 60 minutos de parada cardíaca no mostró depósitos significativos de fibrina en ninguno de los grupos. Esto se asemeja a los recientes resultados publicados por Verhoeven (31), en los que sólo se encontraron evidencias histológicas de microtrombos en 2 de 63 (3.2%) biopsias hepáticas de DCP. En otro estudio realizado por Op den Dries et al. (32) sólo se encontraron microtrombos en un 2.7% de los hígados que habían desarrollado colangiopatía isquémica. Las únicas características histológicas que se asociaron a la aparición de estenosis biliar son la lesión de las glándulas peribiliares profundas y del plexo peribiliar, y la necrosis del estroma mural. Todo ello, de nuevo, no justifica la estrategia de administrar fibrinolíticos cuando se utilicen este tipo de injertos.

En el estudio de Viersen (17), la fibrinólisis se correlaciona con el tiempo de isquemia caliente y ésta, a su vez, podría correlacionarse con la viabilidad del injerto, aunque nuestro estudio no mostró resultados concluyentes en este aspecto.

Por otro lado, la heparina administrada antes de la parada cardíaca favoreció la realización de la PRAN al mejorar el flujo de la bomba, permitiendo conseguir unos mejores flujos a nivel de la arteria hepática y la vena porta. Todo ello repercutió en una mejora en la viabilidad del injerto durante el seguimiento (menor pico de transaminasas, mayor TP), con menos signos de alteración de la arquitectura tisular (menor necrosis tisular, epitelio biliar conservado) y menor pico de marcadores de lesión endotelial (E-selectina) e inflamación tisular (TNF, IL1- β).

El efecto protector de la heparina no sólo se debería a la reducción de la trombogénesis (33), sino a su importante actividad anti-inflamatoria, efecto éste independiente a su actividad anticoagulante (34).

La ausencia de depósitos de fibrina en el tejido hepático después de la parada cardíaca, y el hecho de que el tratamiento con un agente fibrinolítico sea inefectivo

para mejorar la viabilidad del injerto hepático, ponen en entredicho la utilidad de este tratamiento. El uso de heparina antes de la parada cardíaca parece ser la mejor estrategia para mejorar la efectividad de la PRAN y, por tanto, la calidad del injerto hepático antes de su extracción y su funcionamiento post-trasplante.

1.7. CONCLUSIONES

Los injertos hepáticos procedentes de donación en asistolia tienen una menor viabilidad que los procedentes de donantes en muerte encefálica, con una mayor incidencia de estenosis biliar debidas a isquemia. El hecho de que estas complicaciones biliares sean debidas a la formación de microtrombos en el plexo peribiliar puede ponerse en entredicho, dado que no se ha demostrado la existencia de los mismos tras parada cardíaca, ni una mayor incidencia de trombos en aquellos injertos que desarrollan estenosis biliares de origen isquémico frente aquellos injertos que no las desarrollan.

Además, en los donantes en asistolia se desarrolla un estado en el que, debido a la hipoperfusión, se estimula la fibrinólisis endógena. Dicha fibrinólisis se estimula a través de la cascada de la proteína C y la secreción de tPA, y se relaciona directamente con el tiempo de isquemia caliente. Por lo tanto, la fibrinólisis medida por tromboelastometría podría correlacionarse con el grado de viabilidad del injerto, y constituir un marcador indirecto de su calidad.

Por otro lado, la administración de heparina antes de la parada cardíaca ha demostrado su utilidad para mejorar tanto la calidad del injerto durante la PRAN como su viabilidad postoperatoria.

En cualquier caso, no se justifica en el momento actual el uso de fibrinolíticos para la prevención de la aparición de estenosis biliares isquémicas en los injertos provenientes de un donante a corazón parado.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Situación Actual del Trasplante Hepático en España

El trasplante hepático es, en la actualidad, el único tratamiento viable para los pacientes con enfermedades hepáticas terminales. Según datos de la Organización Nacional de Trasplantes, en el año 2016 se trasplantaron la mitad (54.5%) de los pacientes en lista de espera, datos similares a los registrados en los años anteriores. No obstante, hubo un 3,6% de muertes en lista, y un 6.9% de los pacientes fueron retirados de la misma por contraindicación médica o empeoramiento clínico (1). Estos datos se asemejan a los datos europeos (35) y estadounidenses (36). Aunque a lo largo de los años y gracias a los avances médico-quirúrgicos se trasplantan más pacientes, también incrementa el número de pacientes con indicación de trasplante, y persiste la diferencia entre el número de pacientes pendiente de ser trasplantado y la oferta de órganos.

Una de las estrategias globales más efectivas para incrementar la oferta de órganos y disminuir la mortalidad en lista de espera incluye el uso de injertos convencionales con criterios ampliados (denominados ‘subóptimos’), y de injertos no convencionales. Mientras que los injertos convencionales son aquellos injertos completos procedentes de donantes en muerte encefálica (DME), por no convencionales nos referimos a los procedentes de donantes vivos, a los generados tras bipartición hepática (*split liver technique*), al trasplante secuencial (dominó) y a los donantes en asistolia (DA) (2).

Durante el año 2016, del total de 1159 trasplantes hepáticos realizados en España, un 14.6% (169) fueron trasplantes de donantes no convencionales, y de éstos un 80% provenía de donantes en asistolia (*Figura 1*) (1). La donación proveniente de

DA en España ha incrementado notablemente a lo largo de los últimos años, y de forma casi exponencial en los últimos tres años (37).

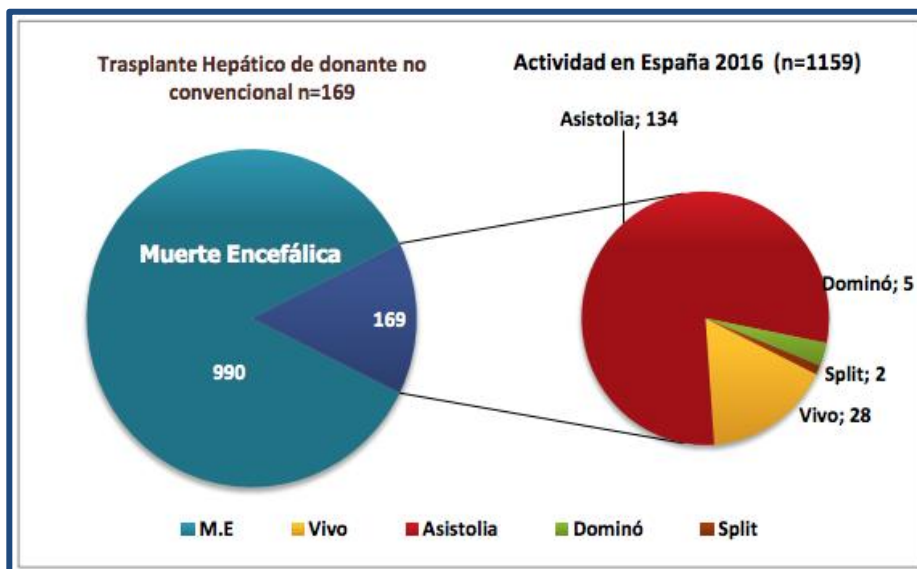


Figura 1.- Número de trasplantes hepáticos procedentes de donante convencional (donante en muerte encefálica) y donante no convencional (aistolia, dominó, *split*, vivo) realizados en España en el 2016¹.

2.2. La Donación en Asistolia

Los DA son aquellos donantes que sufren una parada cardiorrespiratoria irreversible. De acuerdo con la clasificación de Maastricht, se pueden definir cuatro tipos de DA (3,38, (39):

- Los DA tipo 1 son aquellos que sufren una parada cardíaca (PC) extra-hospitalaria, y el potencial donante es trasladado al hospital sin haberse realizado maniobras de reanimación cardiopulmonar (RCP). En estos casos, se acepta la donación de tejidos.
- En los DA tipo 2, a diferencia de en los tipo 1, se realizan maniobras de RCP, que son inefectivas. Estos donantes, considerados como DA no controlados, son los que potencialmente más pueden incrementar el número de trasplantes.

¹ Figura obtenida de la memoria anual de donación de la Organización Nacional de Trasplante de España. Electronic <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20Hep%C3%A1tico%202016.pdf>

- Los DA tipo 3, o controlados, son aquellos en los que se induce la PC mediante la retirada de soporte ventilatorio tras obtener el consentimiento de la familia, en pacientes que presentan lesión cerebral pero en los que dicha lesión es insuficiente para declarar la muerte encefálica.
- Los DA tipo 4 ocurren en aquellos casos excepcionales en los que un donante en muerte encefálica sufre una PC no prevista tras la declaración de muerte encefálica, previa a la extracción de los órganos.

Los donantes tipos 1, 2 y 4 son considerados DA no controlados, mientras que los tipo 3 son DA controlados. En los últimos años el número de DA en España se ha incrementado de forma significativa, sobre todo a expensas de los DA controlados (37).

La diferencia fundamental entre los DA y los DME estriba en que en los primeros existe un periodo de parada cardiorrespiratoria (PCR) previo a la extracción de los órganos. Durante este periodo se produce una importante hipoperfusión tisular mientras se mantiene la temperatura corporal (37°C), lo que se conoce como “tiempo de isquemia caliente”, que deteriora la calidad del injerto hepático y cuya duración determina la viabilidad o posibilidad de trasplante de estos injertos (40).

2.3. La Lesión por Isquemia-Reperfusión

La lesión por isquemia-reperfusión (IR) es aquella que se da en un órgano cuando sufre un cese en el aporte sanguíneo con una posterior reinstauración del mismo. Dicha lesión conlleva una fisiopatología compleja, en la que participan factores moleculares y celulares, y que fundamentalmente se basa en una respuesta inflamatoria excesiva (41-46).

Durante la isquemia, la falta de llegada de oxígeno y metabolitos energéticos a las células conlleva una lesión celular directa, por incremento del metabolismo anaerobio, con oxidación de los componentes celulares y peroxidación lipídica. Por depleción en los depósitos de adenosín-trifosfato intracelular, hay fallo de las bombas de iones, acúmulo de calcio y sodio, y edema mitocondrial y celular. Además, se activa la transcripción de genes inflamatorios, y la activación del sistema inmune (4,47). Posteriormente y durante la fase de reperfusión, la lesión incrementa. Los radicales libres de oxígeno (RLO) generados ya desde la fase de isquemia causan lesión directa a nivel de la célula hepática y endotelial, con destrucción de la microvasculatura. Dichos RLO también estimulan las células de Kupffer, que generan citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β , y quimiocinas como el CXC, que en última instancia promueven la activación, acúmulo y transmigración de los neutrófilos a través de un endotelio previamente lesionado (4,41,43,48), (Figura 2).

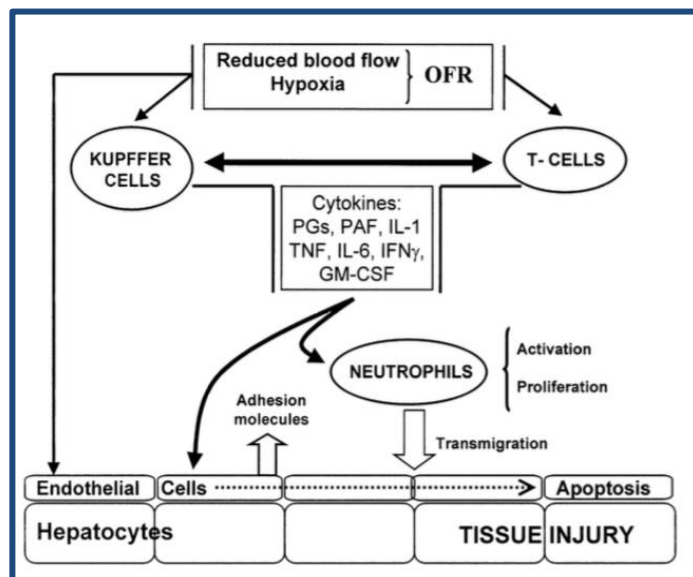


Figura 2.- Mecanismo de isquemia-reperfusión hepática².

La lesión por isquemia caliente será mayor cuanto más largo sea el tiempo de la misma. Existen diversos estudios en los que se demuestran los cambios morfológicos

² Extraído de Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look. *Experimental and Molecular Pathology*, 2003; 74(2), 86–93.

que se dan a nivel tisular, con distintos niveles de degeneración y desestructuración cuanto mayor es el tiempo de isquemia caliente (21,49,50).

2.4. La viabilidad del Injerto del Donante en Asistolia

En los injertos procedentes de DA, se observa un incremento de complicaciones a nivel de la vía biliar. Se trata fundamentalmente de lesiones de origen isquémico. La colangiopatía isquémica (CI) se define como una lesión o estenosis biliar intra o extra-hepática, no anastomótica, encontrándose la arteria hepática indemne (51). La incidencia descrita de CI oscila entre un 25-60% en los injertos de DA, en comparación con 10-30% en los injertos de DME (51).

El mecanismo fisiopatológico detrás de la CI, y su mayor incidencia en los injertos procedentes de DA, se explica en parte por la mayor susceptibilidad del epitelio biliar a los periodos de isquemia caliente (5). En esta fase se dan también alteraciones de la microvasculatura. Existen estudios que consideran que dichas alteraciones microvasculares incluyen la aparición de microtrombos, que a su vez exacerbarían la hipoxia colangiocelular en el momento de la reperfusión (5,6). En cualquier caso, durante la fase de reperfusión la mayor sensibilidad del colangiocito a ésta provocará lesiones a nivel del citoesqueleto (41). En un estudio realizado por Op den Dries et al. (32), se analizó el papel de las glándulas peribiliares en el desarrollo de la CI, dado que en dichas glándulas se hallan las células progenitoras que contribuyen a la regeneración del epitelio biliar. Las alteraciones histológicas asociadas con la aparición de CI fueron la lesión de las glándulas peribiliares, el plexo vascular peribiliar, y la necrosis del estroma mural. Cuando se comparaban los injertos de DA *versus* los de DME, se vio que había una mayor lesión del plexo vascular peribiliar en los injertos de DA.

La aparición de CI no afecta a nivel de la supervivencia de los receptores, pero sí hay una peor supervivencia de los injertos procedentes de DA en comparación con

los injertos procedentes de DME (52,53). En el estudio retrospectivo de Maheshwari et al (7), se analizaron los trasplantes realizados en el hospital John Hopkins entre marzo de 1997 y marzo del 2006; objetivándose un 15.5% de complicaciones biliares en los injertos procedentes de DME, vs un 60% en los injertos de DA; y un 40% de pérdida del injerto al año del trasplante, en el caso de los DA. Las complicaciones asociadas a CI pueden llegar a ser graves (sepsis, desnutrición) en el contexto de un paciente inmunodeprimido. El tratamiento de la misma mediante radiología intervencionista suele fracasar y conllevar un incremento de los reingresos hospitalarios, siendo en la mayoría de los casos, el retrasplante la única opción terapéutica (7,54).

A lo largo de los años se han ido desarrollando diversas técnicas con el fin de mejorar la viabilidad de los órganos que provienen de los DA (8). Una de éstas es la perfusión regional abdominal normotérmica (PRAN). Mediante la oxigenación celular a 37º, no sólo cesa el insulto isquémico, sino que se potencia la recarga energética y la reparación tisular. Es una técnica efectiva para disminuir, en los injertos que han sufrido una isquemia breve, la lesión provocada por una posterior isquemia (fría) prolongada (9,10).

El Hospital Clínic de Barcelona presenta uno de los programas más activos de obtención de órganos a partir de DA tipo 2 con PRAN, con la serie más amplia publicada de trasplante de hígado (55). No obstante, la aplicabilidad de este procedimiento es del 10% (11). Una de las causas de esta baja aplicabilidad es la evolución subóptima durante el proceso de extracción del injerto (fases demasiado largas, límites de transaminasas durante la PRAN, o el aspecto macroscópico del hígado en el momento de la extracción). Todas ellas constituyen contraindicaciones relativas para la donación hepática.

Con el fin de poder estudiar mejor las alteraciones que se dan a este nivel, y los posibles tratamientos, desde mediados de los años 90 en nuestro hospital se realizan estudios pre-clínicos de trasplante hepático en animal grande (modelo porcino) (22).

2.5. El uso de Fibrinolíticos en los Injertos Provenientes de Donantes en Asistolia

Se considera que durante el periodo de isquemia caliente la estasis sanguínea facilita la aparición de microtrombos que no son eliminados incluso cuando el flujo sanguíneo se ve restablecido, con lo cual la isquemia continua a nivel microvascular. Ante dicha hipótesis, el uso de fibrinolíticos se postuló como una prometedora estrategia para mejorar la viabilidad de los órganos, al lisarse los trombos y permitir el paso de sangre (56-58). Para corroborar dicha hipótesis, se realizaron estudios preclínicos en animal grande, en los que se reproducían modelos de DA controlados y se administraban trombolíticos (12,13). En estos estudios se observó que la administración de trombolíticos mejoraba la viabilidad del injerto, con mejor perfusión del mismo.

Un primer estudio en humanos realizado el año 2003 valoraba la mejor calidad de los injertos renales procedente de DA (controlados y no controlados), a los que se administraba estreptoquinasa post PCR. Se observó una menor tasa de desestimación del injerto en el grupo tratado con fibrinolítico (16). En el año 2010, Hashimoto et al. (14) realizaron un primer estudio en el que se administró activador tisular del plasminógeno (tPa) en injertos hepáticos procedentes de DA controlados, a nivel de la arteria hepática. Sólo 2 de los 22 casos a estudio presentaron lesiones biliares intra-hepáticas, con un 9% de incidencia de colangiopatía isquémica (en comparación con el hasta 60% descrito en las series históricas (7)).

Posteriormente, en el año 2015 el grupo de Seal et al. (15) realizó un estudio similar en injertos hepáticos provenientes de DA controlados, a los que se administraba tPa previo a la reperfusión portal. En el grupo al que se administró dicho tratamiento, se objetivó una menor incidencia de alteraciones biliares, y una mayor supervivencia al año y a los tres años.

2.6. Patrón de Hiperfibrinólisis en la Parada Cardíaca Extra-Hospitalaria

Paralelamente a la publicación de los estudios de Hashimoto (14) y Seal (15), se publicaron una serie de estudios en los cuales se analizaba el patrón tromboelastométrico de los pacientes que sufrían una PC extra-hospitalaria (PCEH) (17,18).

La tromboelastometría es una técnica de análisis viscoelástico en sangre total, que proporciona información sobre la dinámica de formación, maduración y lisis del coágulo. Se trata de un método de análisis rápido, barato y sencillo que ha adquirido un mayor protagonismo en los últimos años, con la aparición de nuevos analizadores de más fácil uso. Al realizarse en sangre total y a la temperatura del paciente, permite una evaluación más próxima a la realidad de la situación de coagulación del mismo (20).

En los estudios realizados por de Viersen (17) y SchöchI (18), se observó un patrón de hiperfibrinólisis de aparición relativamente inmediata. La hiperfibrinólisis mediante tromboelastometría se define cuando la lisis del coágulo con respecto a su máxima amplitud -ML- es superior al 15%, y en todos los pacientes recogidos se observó dicha situación, en grado más o menos fulminante (*Figura 3*).

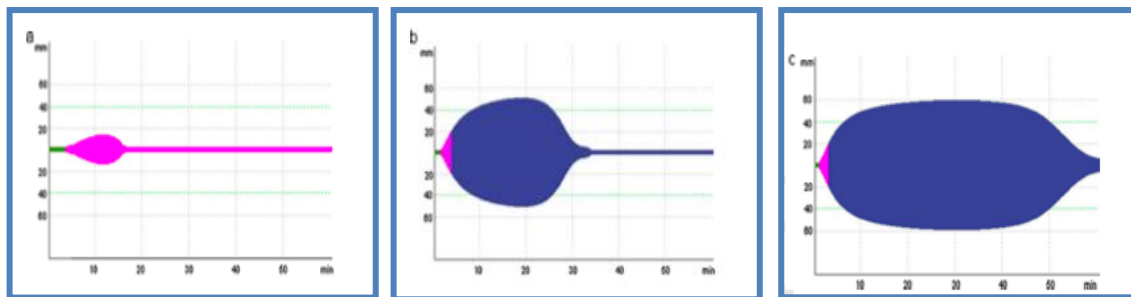


Figura 3.- análisis tromboelastométrico de pacientes con PCEH en los cuales se extrajo la muestra 'in situ'. En todos los casos se observó hiperfibrinólisis, siendo ésta fulminante (a, MCF <50mm); intermedia (b, MCF >50 mm pero con lisis precoz) o tardía³.

³ Extraído de SchöchI H, Cadamuro J, Seidl S, Franz A, Solomon C, Schlimp CJ, and Ziegler B. Hyperfibrinolysis is common in out-of-hospital cardiac arrest: results from a prospective observational thromboelastometry study. *Resuscitation*, 2013; 84(4), 454–459.

Asimismo, la severidad de la fibrinólisis parece relacionarse con el grado de hipoperfusión tisular, puesto que en el estudio de Viersen (17) se observó una correlación inversa entre la velocidad de lisis del coágulo (*lysis onset time* –LOT-) y el exceso de base, el tiempo de RCP y el nivel de lactatos.

Se cree que esto es debido a que, igual que en la coagulopatía del traumático, ésta es independiente del grado de lesiones y del consumo de factores de la coagulación, y viene causada en primera instancia por la hipoperfusión tisular (19), que favorece la lisis de cualquier trombo que se pueda haber generado.

Pensamos que la utilización del análisis tromboelastométrico puede ser útil como herramienta para conocer el estado de viabilidad del injerto en los DA no controlados y, de este modo, ayudarnos en la toma de decisiones respecto a aceptar o rechazar dicho injerto para trasplante. Además, los resultados de dicho análisis nos permitirían valorar la utilidad del uso de agentes fibrinolíticos para el tratamiento de trombos en la microcirculación hepática que pueden determinar la aparición de complicaciones biliares.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

La hipótesis de este estudio es doble:

- Las alteraciones de la coagulación que presentan los donantes a corazón parado se correlacionan con el grado de hipoperfusión sufrido durante la parada cardíaca.
- El uso de fibrinolíticos para tratar los microtrombos formados durante la parada cardíaca puede mejorar el flujo microvascular en injertos procedentes de donantes a corazón parado no controlados.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. ESTUDIO CLÍNICO

- 1) Identificar y caracterizar, mediante tromboelastometría, las alteraciones de coagulación de los donantes en asistolia tipo 2 de la clasificación de Maastricht.
- 2) Determinar si las alteraciones de la coagulación objetivadas en la tromboelastometría se correlacionan con los marcadores de hipoperfusión y viabilidad del injerto.

4.2. ESTUDIO EXPERIMENTAL

- 3) Determinar si la administración de fibrinolíticos mejora la viabilidad del injerto y los resultados post-trasplante

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

5. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

5.1. ESTUDIO 1 (CLÍNICO): CARACTERIZACIÓN TROMBOELASTOMÉTRICA DE LAS ALTERACIONES DE LA COAGULACIÓN EN LOS DONANTES EN ASISTOLIA TIPO 2

A lo largo de 18 meses se recogieron datos de todos los potenciales donantes en asistolia tipo 2 de la clasificación de Maastricht llegados a nuestro hospital. De los 62 potenciales donantes, finalmente se analizan datos de 33 DA. Se recogen datos demográficos, tiempos de resucitación cardiopulmonar, parámetros de laboratorio y análisis tromboelastométrico, así como de resultados en aquellos injertos trasplantados (de hígado y de riñón).

Una descripción detallada de dichos datos, así como de su análisis y resultados, queda recogido en el primer artículo de esta tesis,

Vendrell M, Hessheimer AJ, Ruiz A, de Sousa E, Paredes D, Rodríguez C, Saavedra S, Fuster J, Alcaraz A, Oppenheimer F, Taurá P, García-Valdecasas JC, and Fondevila C. Coagulation Profiles of Unexpected DCDD Donors Do Not Indicate a Role for Exogenous Fibrinolysis. *American Journal of Transplantation*, 2015; 15(3), 764–771.

Coagulation Profiles of Unexpected DCDD Donors Do Not Indicate a Role for Exogenous Fibrinolysis

M. Vendrell¹, A. J. Hessheimer², A. Ruiz³,
E. de Sousa⁴, D. Paredes³, C. Rodríguez³,
S. Saavedra³, J. Fuster², A. Alcaraz⁵,
F. Oppenheimer⁴, P. Taurá¹,
J. C. García-Valdecasas^{2,*} and C. Fondevila^{2,*}

¹Anesthesiology, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

²General and Digestive Surgery, Institut de Malalties Digestives i Metabòliques (IMDiM), Hospital Clínic, CIBERehd, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

³Transplant Coordination, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Nephrology, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Urology, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

*Corresponding author: Constantino Fondevila, cfonde@clinic.ub.es

It has been suggested that vascular stasis during cardio-circulatory arrest leads to the formation of microvascular thrombi and the viability of organs arising from donation after circulatory determination of death (DCDD) donors may be improved through the application of fibrinolytic therapy. Our aim was to comprehensively study the coagulation profiles of Maastricht category II DCDD donors in order to determine the presence of coagulation abnormalities that could benefit from fibrinolytic therapy. Whole blood from potential DCDD donors suffering out-of-hospital cardiac arrest was sampled after declaration of death in the emergency department, and rotational thromboelastometric analysis was performed. Between July 2012 and December 2013, samples from 33 potential DCDD donors were analyzed. All patients demonstrated hyperfibrinolysis (HF), as reflected by maximum clot lysis of 98–100% in all cases, indicating that there is no role for additional fibrinolytic therapy in this setting. As well, we observed correlations between thromboelastometric lysis parameters and maximum hepatic transaminase levels measured in potential donors and renal artery flows measured during *ex situ* hypothermic oxygenated machine perfusion, indicating that further studies on the utility of thromboelastometry to evaluate organ injury and perhaps even viability in unexpected DCDD may be warranted.

Abbreviations: aPTT, activated partial thromboplastin time; BMI, body mass index; CFT, clot formation time;

CPR, cardiopulmonary resuscitation; CT, clotting time; DBD, donation after brain death; DCDD, donation after circulatory determination of death; DGF, delayed graft function; EMS, emergency medical services; HF, hyperfibrinolysis; HMP, hypothermic pulsatile machine perfusion; IC, ischemic cholangiopathy; IGF, immediate graft function; INR, international normalized ratio; LOT, lysis onset time; LY30, lysis index at 30 min; MCF, maximum clot firmness; ML, maximum lysis; NRP, normothermic regional perfusion; OHCA, out-of-hospital cardiac arrest; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PNF, primary non-function; RAF, renal artery flow; RARI, renal artery resistive index; TPA, tissue plasminogen activator

Received 06 August 2014, revised 08 October 2014 and accepted for publication 11 October 2014

Introduction

Given the current situation of solid organ donation in which the donor pool continually fails to meet demands, alternative sources of organs are continuously sought. One such source that in theory offers considerable promise to increase the number of transplantable organs but in practice has yet to come close to meeting its supposed potential is that of donation after circulatory determination of death (DCDD). The traditional Maastricht classification describes four categories of DCDD donors; for practical purposes, however, there are really only two: those who suffer sudden an unexpected cardiac arrest, typically outside the hospital (corresponding to Maastricht category II), and those with significant neurological injury in whom an expected cardiac arrest occurs after the intentional removal of ventilatory support (Maastricht category III) (1,2). Relatively few organs are transplanted from DCDD donors—unexpected donors, in particular—relative to donation after brain death (DBD) donors out of justifiable concerns over their viability due to the prerecovery period of cardiac arrest they suffer (3–5).

During cardiac arrest, red cell stasis and systemic ischemia provoke activation of the inflammatory cascade, tissue factor release, and thrombin generation (6). Furthermore, evidence suggests that endogenous fibrinolysis may be impaired in this setting (7,8), leading to the formation of thrombi in end-organ microvasculature. It has been suggested that this microvascular thrombosis is the reason

Coagulation Profiles of Unexpected DCDD Donors

DCDD kidneys more frequently fail viability testing, thereby resulting in a higher discard rate relative to DBD donors (4,9), and why the incidences of vascular and biliary complications, namely ischemic cholangiopathy (IC), among DCDD livers are greater (10,11). Following this line of logic, several authors have suggested that the viability of organs arising from DCDD donors, especially those suffering unexpected arrest, may be improved through the application of fibrinolytic therapy (11–14).

Traditional coagulation assays (prothrombin time/INR, activated partial thromboplastin time, fibrinogen levels, platelet function studies, etc.) are not performed on whole blood and, therefore, do not take into account the critical interactions between plasma and platelets and cells in clotting. Viscoelastic coagulation assays such as thromboelastometry (ROTEM[®], Tem Innovations GmbH, Munich, Germany), on the other hand, do use whole blood and measure the entire coagulation process from initial activation of the coagulation cascade to formation of the platelet plug to fibrin crosslinking and, finally, fibrinolysis (15). They provide a complete picture of the balance between thrombosis and lysis, something that standard tests do not. Using viscoelastic methods, recent reports have shown that patients with sudden and unexpected out-of-hospital cardiac arrest (OHCA) may actually suffer from hyperfibrinolysis, not hypercoagulability, as reports based on traditional coagulation tests suggest (16,17). Hence, the objective of the present work is to use thromboelastometry to comprehensively study the coagulation profiles of potential unexpected DCDD donors in order to determine whether exogenous fibrinolytic therapy might actually be of benefit in this setting.

Patients and Methods

Clinical protocol

Out-of-hospital cardiac arrest is witnessed, and basic life support maneuvers are initiated. Emergency medical services (EMS) are mobilized to the scene of the arrest, where advanced cardiopulmonary resuscitation (CPR), including endotracheal intubation, is performed. A person may be considered a potential DCDD donor when, after performing the resuscitation maneuvers specified in the most current guidelines (18), these maneuvers are ineffective (19). If the person fulfills basic donor criteria (age ≤ 65 years, no history of criminality or violent death), transplant coordinators are notified about the pending arrival. The patient is then placed on a LUCAS[™] chest compression system (Jolife AB, Lund, Sweden) and routed to our center.

In the emergency department, ventilation and chest compressions are withheld so that death may be diagnosed based on the absence of cardiac function and spontaneous respirations during a no-touch period of at least 5 min (20). After the declaration of death, transplant coordinators have their first contact with the potential donor. The endotracheal tube is connected to a ventilator, LUCAS[™] is restarted, and the initial blood sample is taken (sample upon which thromboelastometric analysis is performed). Subsequently, heparin is administered (3 mg/kg i.v.) and the surgical team called to perform bilateral femoral cannulation for the initiation of normothermic regional perfusion (NRP), as described previously (2,5). Blood is sampled at the start of NRP and then hourly to evaluate biochemical, hematological, and gasometric parameters. Temperature during NRP is maintained 35.5–

37.5°C, pH 7.0–7.4 with the addition of bicarbonate, and hematocrit $\geq 21\%$ with the addition of packed red blood cells. Additional heparin (1.5 mg/kg) is empirically given every 90 min.

Simultaneous with restarting chest compressions after the declaration of death, the potential donor's next-of-kin is contacted for information and consent. Contraindications to donation include a history of alcohol abuse or liver disease; biological risk factors, including intravenous drug abuse; cancer; and hepatitis B virus, hepatitis C virus or HIV infection. Trauma to the abdominal or femoral vasculature preventing the use of NRP also precludes donation. Other contraindications to donate are based on the donor's evolution (5). If no contraindications are encountered, organ recovery is performed.

At our center, only kidneys and livers are recovered from unexpected DCDD donors. The final decision to transplant a DCDD kidney depends on a step-wise evaluation of various criteria, including donor age and co-existing risk factors (diabetes, hypertension, tobacco); previous serum creatinine < 2.5 mg/dL; ultrasound description, when available; macroscopic aspect at organ recovery (normal vs. congested); and the aspect of the renal microvasculature (size and number of arteries and absence of significant atheromatous plaques or other abnormalities). In donors > 60 years or with cardiovascular risk factors, a renal biopsy score based on modified Remuzzi criteria (21,22) is evaluated; kidneys with a score of 0–3 are considered for transplant, while those with a score of 4 are evaluated using *ex situ* hypothermic pulsatile machine perfusion (HMP; RM3, Waters Medical Systems[®], IGL Group, Rochester, MN) and those with a score of 5 or greater are discarded. In kidneys undergoing HMP, renal artery flow (RAF) must be > 70 mL/min and resistive index (RARI) < 0.4 after 6 h with a progressive increase in systolic pressure from 20 up to 35 mmHg. Livers are evaluated as described previously (5).

ROTEM[®] analysis

ROTEM[®] analysis is performed on the initial blood sample taken right after the declaration of death and is analyzed within an hour of sampling. According to the literature, blood samples are stable for ROTEM analysis for up to 6 h after sample draw (23). Whole blood is activated extrinsically with recombinant tissue factor (EXTEM reagent) or intrinsically with ellagic acid (INTEM reagent) and the analysis run for at least 60 min. Additional assays are performed to assess fibrinolysis through its inhibition with aprotinin (APTEM test) (24). For each analysis, a graph is created plotting time in minutes (x-axis) versus clot amplitude in millimeters (y-axis), and several different parameters of coagulation and lysis are measured. Clotting time (CT) is measured from the addition of the starting reagent to the formation of a clot with an amplitude of 2 mm. Clot formation time (CFT) is the time from the end of CT until an amplitude of 20 mm is reached, while alpha angle is the angle between the x-axis and the line tangential to the curve at the 2-mm amplitude; both are measures of the speed of clot strengthening. Maximum clot firmness (MCF) is the maximum amplitude of the clot, while maximum lysis is the maximum percentage of amplitude lost relative to MCF (normal $< 15\%$, $> 15\%$ indicating hyperfibrinolysis [HF]). The lysis index at 30 min (LY30) is the ratio of the amplitude at 30 min relative to MCF (normal 94–100%). Lysis onset time (LOT) is the time point after MCF when a 20% reduction in amplitude is produced (normally never reached) (15,17). Hyperfibrinolysis is characterized as fulminant when clot lysis occurs within 30 min in the INTEM and EXTEM tests or when there is no clot formation, with recovery of clot formation in the APTEM test; intermediate when clot breakdown occurs between 30 and 60 min; and late when clot breakdown occurs after 60 min (24).

Data and statistical analysis

Donor demographic information; electrocardiographic findings at the scene and the timing of events from cardiac arrest to death; blood-based analytical

Vendrell et al

and thromboelastomeric parameters; and donor outcomes (organs transplanted, initial graft function, etc.) are recorded. Continuous variables are presented as the median and the 25–75% interquartile range, unless otherwise specified. Differences between groups are compared using the Mann–Whitney test for continuous variables. Bivariate correlations are evaluated using Kendall’s tau b correlation test. p-Value of <0.05 is considered statistically significant. Data is analyzed using IBM® SPSS® Statistics version 20 (IBM, Somers, New York).

Institutional approval

This protocol was approved by the Hospital Clinic Institutional Ethics Committee (1998/210).

Results

Demographic and clinical data

Between July 2012 and December 2013, 62 potential DCDD donors were evaluated at our center; ROTEM® was performed on the initial blood sample in 33 cases. In the remaining 29 cases, the blood sample could not be analyzed within an hour of sampling due to logistical problems and was therefore discarded. Variables related to the potential donor and the events surrounding cardiac arrest are provided in Table 1. (Of note, these variables did not vary significantly from those of the 29 potential DCDD donors from the same time period who did not have ROTEM® analysis performed.) An overwhelming majority of potential donors were men and, on average, overweight. Slightly over half of the patients had a personal history of tobacco use, and approximately one quarter had a history of arterial hypertension. None of the potential donors in the series were taking anti-platelet medication, though one did have congenital amegakaryocytic thrombocytopenia, with a platelet count upon arrival to the emergency room of $66 \times 10^9/L$. Also, one potential donor was taking a vitamin K antagonist (acenocoumarol) for atrial fibrillation.

Table 1: Demographic and cardiac arrest parameters of 33 potential unexpected DCDD donors that underwent ROTEM® analysis after the declaration of death

Demographic parameters	
Male sex	31 (94%)
Age (y)	53 (47–57)
BMI	26.0 (24.4–27.8)
Risk factors	
Tobacco	17 (52%)
Hypertension	8 (24%)
Diabetes	5 (15%)
Alcohol	2 (6%)
Arrest parameters	
Time to EMS arrival (min)	8 (6–13)
Initial rhythm	
Asystole	23 (70%)
Ventricular fibrillation	7 (21%)
Pulseless electrical activity	3 (9%)
Bystander CPR	14 (42%)
Time of CPR (min)	59 (50–69)
Time to blood sample (min)	85 (75–102)

Time from arrest to EMS arrival was less than 15 min in all but eight cases. While waiting for EMS to arrive, CPR was initiated by a bystander in almost half of the cases, and the cardiac rhythm detected upon EMS arrival was asystole in approximately two thirds. Advanced CPR was performed for an hour (median), and the initial blood sample upon which ROTEM® analysis was performed was drawn approximately an hour and a half after cardiac arrest (range: 48–127 min).

Blood counts and standard coagulation tests

Data from blood counts and standard coagulation tests measured after the declaration of death is included in Table 2. Hemoglobin and hematocrit levels were in normal range, while platelet counts were at the low end of normal. Both INR and aPTT were prolonged, indicating coagulopathy. Fibrinogen levels, however, were normal.

Progression through the DCDD process and transplant outcomes

Figure 1 provides a flow chart that depicts the outcomes of each of the 33 potential DCDD donors that were evaluated. Among them, 12 were rejected prior to the initiation of NRP for the following reasons: family refusal (N = 4), biological risk factors (2), older age and concomitant medical pathology (2), cancer (2), judicial refusal (1), and prolonged ischemic time (1). During NRP, two potential donors were rejected due to inadequate venous return and inability to run the perfusion circuit. Also during NRP, the livers from 11 additional potential donors were rejected due to elevated hepatic transaminases.

A total of 38 kidneys and eight livers were evaluated intraoperatively. Nine kidneys and three livers were rejected

Table 2: Baseline biochemical parameters, blood counts and standard coagulation tests from 33 potential unexpected DCDD donors that underwent ROTEM® analysis after the declaration of death

	Median (25–75% IQR)	Normal range ¹
Biochemical parameters		
Sodium (meq/L)	146 (140–150)	135–145
Potassium (meq/L)	6.1 (4.7–8.3)	3.5–5.5
Creatinine (mg/dL)	1.55 (1.36–1.80)	0.30–1.30
AST (IU/L)	116 (80–260)	5–40
ALT (IU/L)	95 (49–233)	5–40
GGT (IU/L)	33 (24–79)	5–40
LDH (IU/L)	798 (636–1180)	250–450
Blood counts and standard coagulation tests		
Hemoglobin (g/dL)	13.1 (12.0–14.1)	12.0–17.0
Hematocrit (%)	40 (38–43)	36–51
Platelets ($10^9/L$)	129 (113–148)	130–400
INR	1.53 (1.36–1.66)	0.80–1.20
aPTT (s)	50 (44–75)	25–33
Fibrinogen (mg/dL)	2.7 (2.2–2.8)	1.5–4.5

¹Normal values are from our in-hospital laboratory.

Coagulation Profiles of Unexpected DCDD Donors

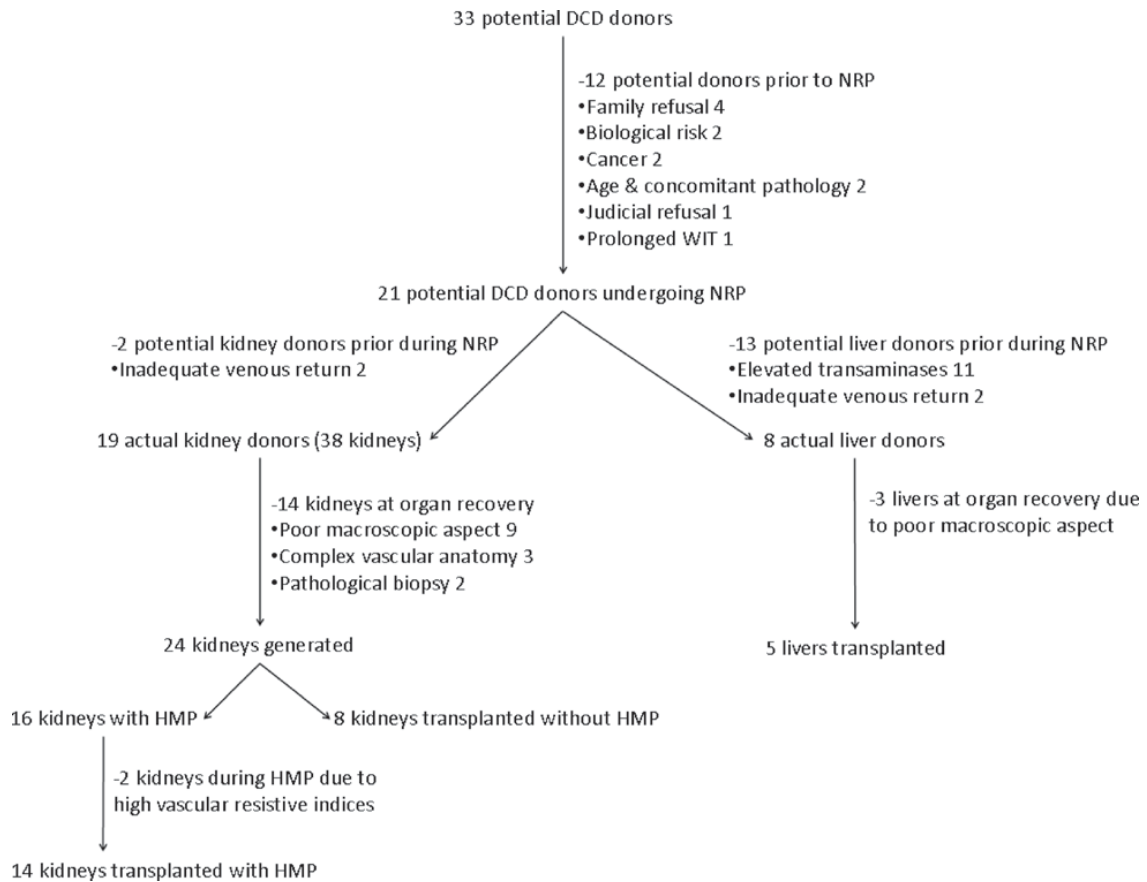


Figure 1: Outcomes of 33 potential DCDD donors that were evaluated with ROTEM®. Sixteen kidneys underwent hypothermic pulsatile machine perfusion (HMP). In all, 22 kidneys (some without previous HMP) and five livers were transplanted.

due to poor macroscopic aspect at organ recovery. (With respect to the livers, a poor macroscopic aspect refers to ischemia of the bowel and gallbladder, poor bleeding from the cut common bile duct, and a congested or moderately to severely steatotic aspect of the liver itself.) Additionally, three kidneys were turned down due complex vascular anatomy and two to pathological biopsies. Among the 24 kidneys that were generated, 16 underwent *ex situ* hypothermic pulsatile machine perfusion (HMP) and eight were transplanted without HMP. Two kidneys were discarded during HMP due to low RAF and high RARI. In all, 22 kidneys were transplanted (12 at our center and 10 at other institutions within our city). The median cold ischemic time was 840 min (range: 495–1355). Rates of immediate graft function (IGF), delayed graft function (DGF), and primary non-function (PNF) were 14%, 77% and 9%, respectively. Among those DCDD kidney recipients who experienced DGF, postoperative hemodialysis was applied for a median of 21 days (range: 2–46). With a median follow-

up of 16 months, the 3-, 6- and 12-month kidney graft survival rates are 91%. Furthermore, no kidney recipient has died in the series (patient survival rate 100%).

After a median cold ischemic time of 435 min (range: 320–525), all five of the livers that were generated were transplanted. Immediate graft function was seen in four of the five recipients, and there was one case of PNF. With a median follow-up of 13 months, the 3-, 6- and 12-month liver graft and patient survival rates are 80%.

ROTEM® data

ROTEM® analysis demonstrated a pattern of coagulopathy in all potential DCDD donors (Table 3). The initiation of clot formation was prolonged, as evidenced by increased CT values. The speed of clot strengthening was also reduced, as reflected by increased CFT and decreased alpha angle. As well, maximum clot firmness was below the normal range. Above all, the most striking finding was the fact that

Table 3: ROTEM® parameters for 33 potential unexpected DCDD donors; INTEM and EXTEM tests measure clot formation and subsequent lysis following intrinsic and extrinsic activation, respectively

	Median (25–75% IQR)	Normal range ¹
INTEM CT (s)	235 (187–1592)	100–240
INTEM CFT (s)	147 (129–179)	30–110
INTEM alpha angle (°)	63 (59–67)	70–83
INTEM MCF (mm)	38 (27–50)	50–72
EXTEM CT (s)	113 (94–158)	38–79
EXTEM CFT (s)	175 (147–218)	34–159
EXTEM alpha angle (°)	58 (51–62)	63–83
EXTEM MCF (mm)	36 (29–48)	50–72
EXTEM ML (%)	100 (100–100)	<15
EXTEM LY30 (%)	5 (0–80)	94–100
EXTEM LOT (s)	818 (477–2167)	– ²

Of note, all 33 potential donors demonstrated hyperfibrinolysis, with maximum lysis of 100% in all cases.

CFT, clot formation time; CT, clotting time; LOT, lysis onset time; LY30, lysis at 30 min; MCF, maximum clot firmness; ML, maximum lysis.

¹Normal values for ROTEM studies are provided by the manufacturer.

²No normal value exists, as there is usually no lysis.

all potential DCDD donors demonstrated HF at the time of blood sampling soon after the declaration of death, with ML of 100% in all cases. The pattern of HF was fulminant in the majority of cases—26 (79%)—and intermediate in the remaining seven (21%) (Figure 2). There was no correlation between LY30 and either the length of advanced CPR (Kendall’s tau b correlation coefficient 0.125, $p=0.374$) or the length of time from cardiac arrest to blood sample (Kendall’s tau b correlation coefficient 0.009, $p=0.952$).

Among the 16 kidneys that underwent HMP, there was a significant relationship between LY30 and RAF 6 h after the start of HMP (Kendall’s tau b correlation coefficient 0.456, $p=0.029$). There was also an inverse relationship between LY30 and RARI at 6 h, though it did not reach the level of statistical significance based on small sample size (Kendall’s tau b correlation coefficient -0.282 , $p=0.149$). With respect to DCDD livers, there was a significant inverse relationship between LY30 and maximum hepatic transaminase levels measured in potential donors (Kendall’s tau b correlation coefficient -0.338 for AST and -0.356 for ALT, $p=0.029$ and 0.019 , respectively).

Discussion

The major finding of this study is that endogenous hyperfibrinolysis is present in all unexpected DCDD donors, obviating the need for additional fibrinolytic drugs in this setting. While this is the first study to comprehensively study the coagulation profiles of DCDD donors, other groups have used thromboelastometry to study patients

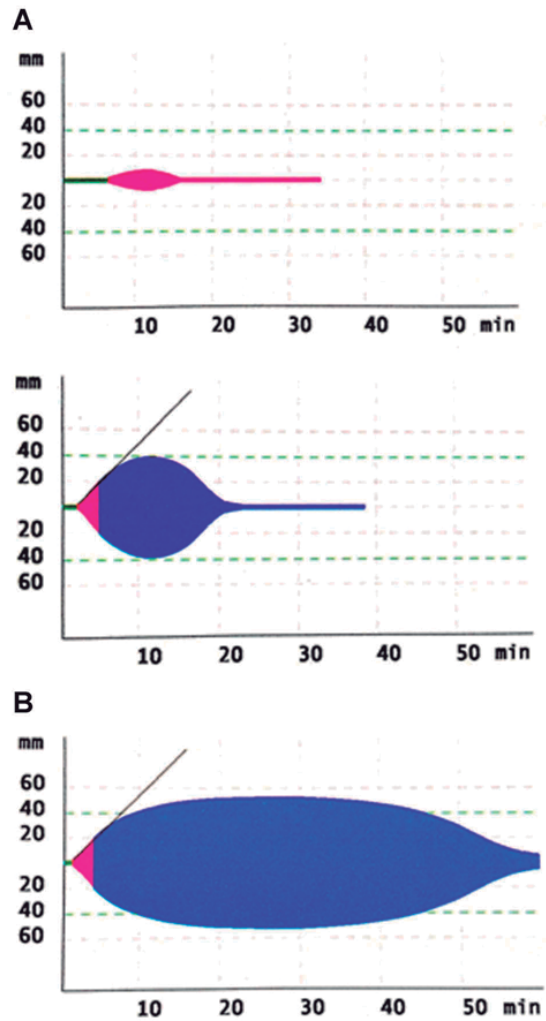


Figure 2: Representative ROTEM® figures for potential unexpected DCDD donors. (A) reflects two patterns of fulminant hyperfibrinolysis, the one on the top much more advanced than the one below, while (B) reflects intermediate hyperfibrinolysis.

suffering OHCA. Schochl et al (17) analyzed blood samples drawn at the scene at a median of 6 min (IQR: 3.5–9) after cardiac arrest and observed HF in 34%, while Viersen et al (16) drew samples for thromboelastometry upon arrival to the emergency department 42 ± 13 min after cardiac arrest and detected HF in 50% of cases. In the present study, in samples drawn at least 48 min after arrest and after about 90 min on average, HF was present in 100% of cases. Considering the results of these three studies together, it seems that the incidence of HF increases in direct relation to the length of cardiac arrest/warm ischemia a patient/potential donor suffers.

Coagulation Profiles of Unexpected DCDD Donors

In the Viersen study, the authors observed significant correlations between the temporal onset of HF on thromboelastometry (LOT) and markers of systemic hypoperfusion (base excess and lactate) as well as mortality, with a later onset of HF being associated with both improved perfusion and a lower rate of death (16). Hyperfibrinolysis has similarly been observed in trauma patients in association with signs of hypoperfusion, and it has been demonstrated that the pattern of HF can be predictive of outcome in this setting (24,25). While we did not obtain blood gas samples until later in the DCDD process (when NRP was initiated) and were not able to correlate the onset or pattern of HF with systemic markers of hypoperfusion, we did observe significant correlations between lysis parameters and some markers of organ injury (peak hepatic transaminases, renal artery flows measured during HMP). Though the present study was not designed to determine a definitive relationship between thromboelastometric parameters and markers of injury/viability (the number of patients being small and a great variability existing in cold ischemic times for the kidneys, at least, which is why we focused on parameters measured at a fixed time point during HMP instead of actual graft outcomes), this is nonetheless an intriguing preliminary finding and one that deserves further evaluation and validation in a well-designed prospective study.

Hyperfibrinolysis is commonly found in situations of microcirculatory derangement as well as in shock (26,27); the initiating factor appears to be the adequacy—or, rather, the inadequacy—of perfusion. When organs and tissues suffer progressive ischemia, thrombomodulin, an integral membrane protein expressed on the surface of endothelial cells, is induced. Thrombomodulin serves as a cofactor for thrombin and converts it from a pro- to an anticoagulant enzyme, diverting it from fibrin generation to the activation of protein C (6,28). Activated protein C consumes plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), thereby reducing the inhibition of tissue plasminogen activator (TPA) and accelerating the conversion of plasminogen to plasmin (27,29,30). Simultaneously, hypoxia and a secondary systemic rise in catecholamines cause the release of TPA from endothelial cells, leading to excessive fibrinolysis (31–34).

Studies investigating the use of systemic fibrinolysis in OHCA have shown an increase in bleeding complications without any improvements in measures of outcome (return of spontaneous circulation, neurological outcome, survival, etc.) (35,36); based on the fact that endogenous fibrinolysis is active, if not excessive, there does not appear to be any role for additional fibrinolytic therapy in unexpected DCDD donors, either. Nevertheless, there are some reports of the application of fibrinolytics in clinical DCDD. The Newcastle group performed a small trial in which 25 expected and unexpected DCDD donors were randomly assigned to streptokinase preflush or placebo prior to kidney recovery. According to their results, the use of streptokinase led to improvements in the gross aspects of the kidneys and injury biomarkers measured during *ex situ* machine perfusion, though no significant differences in terms of graft discard

rates or outcomes were detected. It should also be noted that there was significantly greater intraoperative blood loss in the streptokinase group, though the authors attributed this to technical complications of the procedure (4). In the context of expected DCDD, the group at the Cleveland Clinic recently described a series of 22 liver transplants performed with grafts from expected DCDD donors treated with recombinant TPA injected into the donor hepatic artery on the backtable, with or without heparin administered systemically prior to ventilator withdrawal. There was no control group in this study, and IC arose postoperatively in two cases (9%), including one in which heparin had been given prior to withdrawal. Of note, excessive postreperfusion bleeding was experienced in 64% of recipients (13). Also, the use of a fibrinolytic drug in previously anticoagulated patients in this study is rather surprising, given that proper anticoagulation should avoid the appearance of clot and the need for lysis.

This last study also brings up two further important points that deserve consideration. First, the administration of a fibrinolytic drug to a graft, even with subsequent washout, is an intervention that could pose substantial risk for the development of uncontrollable hemorrhage in the recipient, in particular in the context of DCDD liver transplantation, where postreperfusion coagulopathy is common. Second, the fact that a case of IC arose even when the donor had been systemically anticoagulated is striking and raises doubt regarding the microvascular thrombosis theory in IC. Perhaps IC is not so much a consequence of clot in the peribiliary arterial plexus as it is of cholangiocellular ischemia and death. More than giving fibrinolytic drugs and other pharmacological agents, it may be that the best means we have of preventing IC and DCDD organ injury in general is to limit ischemia, both warm and cold, as much as possible, probably through a combination of *in situ* NRP followed by *ex situ* normothermic machine perfusion (37).

A limitation of this study is that the results are only truly applicable in the context of unexpected DCDD, which, globally, is much less common than expected DCDD. In theory, HF could also develop in expected DCDD donors in direct relation to the degree of tissue hypoperfusion suffered during withdrawal and arrest, but specific evidence is lacking. Clinical trials using thromboelastometry to study donor coagulation profiles in the context of expected DCDD are therefore encouraged.

In summary, the present study provides conclusive evidence that unexpected DCDD donors universally present hyperfibrinolysis due to the extended period of cardiac arrest they suffer; there is no role for additional treatment with exogenous fibrinolytic agents in this setting.

Acknowledgments

Research was supported by F.I.S. Grant 11/01979 from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain. M. Vendrell was

Vendrell et al

supported by the "Premio Fin de Residencia 'Emili Letang'" from the Hospital Clínic, Barcelona. The authors would like to thank Dr. Eva Oliver of Hospital Universitari de Bellvitge, Dr. Joana Sellarés and Dr. Teresa Pont of Hospital Vall d'Hebrón, Dr. Luis Guirado and Dr. Beatriz Bardají of Fundació Puigvert, and Dr. Ana Zapatero of Hospital del Mar for providing the data regarding kidneys transplanted at other centers.

Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by *American Journal of Transplantation*.

References

1. Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP. Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1995; 27: 2893–2894.
2. Fondevila C, Hessheimer AJ, Ruiz A, et al. Liver transplant using donors after unexpected cardiac death: Novel preservation protocol and acceptance criteria. *Am J Transplant* 2007; 7: 1849–1855.
3. Metcalfe MS, Nicholson ML. Non-heart-beating donors for renal transplantation. *Lancet* 2000; 356: 1853.
4. Gok MA, Shenton BK, Buckley PE, et al. How to improve the quality of kidneys from non-heart-beating donors: A randomised controlled trial of thrombolysis in non-heart-beating donors. *Transplantation* 2003; 76: 1714–1719.
5. Fondevila C, Hessheimer AJ, Flores E, et al. Applicability and results of Maastricht type 2 donation after cardiac death liver transplantation. *Am J Transplant* 2012; 12: 162–170.
6. Adrie C, Monchi M, Laurent I, et al. Coagulopathy after successful cardiopulmonary resuscitation following cardiac arrest: Implication of the protein C anticoagulant pathway. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 21–28.
7. Bottiger BW, Motsch J, Bohrer H, et al. Activation of blood coagulation after cardiac arrest is not balanced adequately by activation of endogenous fibrinolysis. *Circulation* 1995; 92: 2572–2578.
8. Gando S, Kameue T, Nanzaki S, Nakanishi Y. Massive fibrin formation with consecutive impairment of fibrinolysis in patients with out-of-hospital cardiac arrest. *Thromb Haemost* 1997; 77: 278–282.
9. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, et al. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant* 2013; 13: 11–46.
10. Abt P, Crawford M, Desai N, Markmann J, Olthoff K, Shaked A. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors: An increased incidence of biliary complications. *Transplantation* 2003; 75: 1659–1663.
11. Deshpande R, Heaton N. Can non-heart-beating donors replace cadaveric heart-beating liver donors? *J Hepatol* 2006; 45: 499–503.
12. Fung JJ, Egtesad B, Patel-Tom K. Using livers from donation after cardiac death donors—A proposal to protect the true Achilles heel. *Liver Transpl* 2007; 13: 1633–1636.
13. Hashimoto K, Egtesad B, Gunasekaran G, et al. Use of tissue plasminogen activator in liver transplantation from donation after cardiac death donors. *Am J Transplant* 2010; 10: 2665–2672.
14. Wall SP, Kaufman BJ, Gilbert AJ, et al. Derivation of the uncontrolled donation after circulatory determination of death protocol for New York city. *Am J Transplant* 2011; 11: 1417–1426.
15. Srinivasa V, Gilbertson LI, Bhavani-Shankar K. Thromboelastography: Where is it and where is it heading? *Int Anesthesiol Clin* 2001; 39: 35–49.
16. Viersen VA, Greuters S, Korfage AR, et al. Hyperfibrinolysis in out of hospital cardiac arrest is associated with markers of hypoperfusion. *Resuscitation* 2012; 83: 1451–1455.
17. Schochl H, Cadamuro J, Seidl S, et al. Hyperfibrinolysis is common in out-of-hospital cardiac arrest: Results from a prospective observational thromboelastometry study. *Resuscitation* 2013; 84: 454–459.
18. Deakin CD, Nolan JP, Soar J, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation* 2010; 81: 1305–1352.
19. Documento de Consenso Nacional sobre Donación en Asistolia. www.ont.es 2012; Available from: URL: www.ont.es.
20. Royal Decree 1723/2012, December 28, 2012, Annex I, Section 3: Diagnosis of death based on circulatory and respiratory criteria. noticias.juridicas.com/base_datos/Admin/rd1723-2012.html#n3 2012; Available from: URL: Noticias.juridicas.com/base_datos/Admin/rd1723-2012.html#n3.
21. Gridelli B, Remuzzi G. Strategies for making more organs available for transplantation. *N Engl J Med* 2000; 343: 404–410.
22. Perico N, Ruggenenti P, Scalamogna M, Remuzzi G. Tackling the shortage of donor kidneys: How to use the best that we have. *Am J Nephrol* 2003; 23: 245–259.
23. Lang T, Bauters A, Braun SL, et al. Multi-centre investigation on reference ranges for ROTEM thromboelastometry. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; 16: 301–310.
24. Schochl H, Frietsch T, Pavelka M, Jambor C. Hyperfibrinolysis after major trauma: Differential diagnosis of lysis patterns and prognostic value of thromboelastometry. *J Trauma* 2009; 67: 125–131.
25. Theusinger OM, Wanner GA, Emmert MY, et al. Hyperfibrinolysis diagnosed by rotational thromboelastometry (ROTEM) is associated with higher mortality in patients with severe trauma. *Anesth Analg* 2011; 113: 1003–1012.
26. Rucker M, Schafer T, Scheuer C, Harder Y, Vollmar B, Menger MD. Local heat shock priming promotes recanalization of thromboembolized microvasculature by upregulation of plasminogen activators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1632–1639.
27. Brohi K, Cohen MJ, Ganter MT, Matthay MA, Mackersie RC, Pittet JF. Acute traumatic coagulopathy: Initiated by hypoperfusion: Modulated through the protein C pathway? *Ann Surg* 2007; 245: 812–818.
28. Verhagen HJ, Heijnen-Snyder GJ, Pronk A, et al. Thrombomodulin activity on mesothelial cells: Perspectives for mesothelial cells as an alternative for endothelial cells for cell seeding on vascular grafts. *Br J Haematol* 1996; 95: 542–549.
29. Rezaie AR. Vitronectin functions as a cofactor for rapid inhibition of activated protein C by plasminogen activator inhibitor-1. Implications for the mechanism of profibrinolytic action of activated protein C. *J Biol Chem* 2001; 276: 15567–15570.
30. Brohi K, Cohen MJ, Ganter MT, et al. Acute coagulopathy of trauma: Hypoperfusion induces systemic anticoagulation and hyperfibrinolysis. *J Trauma* 2008; 64: 1211–1217.
31. Schneiderman J, Adar R, Savion N. Changes in plasmatic tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor activity during acute arterial occlusion associated with severe ischemia. *Thromb Res* 1991; 62: 401–408.

American Journal of Transplantation 2015; 15: 764–771

Coagulation Profiles of Unexpected DCDD Donors

32. Kooistra T, Schrauwen Y, Arts J, Emeis JJ. Regulation of endothelial cell t-PA synthesis and release. *Int J Hematol* 1994; 59: 233–255.
33. von KR, Dimsdale JE. Effects of sympathetic activation by adrenergic infusions on hemostasis in vivo. *Eur J Haematol* 2000; 65: 357–369.
34. Gando S, Sawamura A, Hayakawa M. Trauma, shock, and disseminated intravascular coagulation: Lessons from the classical literature. *Ann Surg* 2011; 254: 10–19.
35. Bottiger BW, Arntz HR, Chamberlain DA, et al. Thrombolysis during resuscitation for out-of-hospital cardiac arrest. *N Engl J Med* 2008; 359: 2651–2662.
36. Perrott J, Henneberry RJ, Zed PJ. Thrombolytics for cardiac arrest: Case report and systematic review of controlled trials. *Ann Pharmacother* 2010; 44: 2007–2013.
37. Fondevila C, Hessheimer AJ, Maathuis MH, et al. Superior preservation of DCD livers with continuous normothermic perfusion. *Ann Surg* 2011; 254: 1000–1007.

5.2. ESTUDIO 2 (EXPERIMENTAL): ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO CON FIBRINOLÍTICOS O HEPARINA PARA MEJORAR LA VIABILIDAD DE LOS INJERTOS HEPÁTICOS PROVENIENTES DE DONANTES EN ASISTOLIA TIPO 2

En la segunda parte de esta tesis doctoral y de forma paralela a la recogida de datos clínicos, se realizó un estudio experimental de trasplante hepático en animal grande, ya validado previamente. Se estratificó a los animales según si recibían heparina pre parada cardíaca (n=6), fibrinolítico tras 60 minutos de parada cardíaca (n = 6), o no recibían ningún tratamiento (grupo control, n=6). Tras 1 hora de perfusión regional abdominal normotérmica (PRAN), se realizaba la hepatectomía. Se sometía al injerto a 4 horas de isquemia fría y posterior implante y seguimiento de los animales receptores a lo largo de 5 días o hasta su muerte.

Se recogieron datos de efectividad de la PRAN como son los flujos vasculares hepáticos, parámetros de laboratorio del funcionalismo hepático y tromboelastométricos, parámetros de supervivencia y biopsias hepáticas tras la reperfusión en el receptor y en la autopsia / necropsia.

Una descripción detallada de dichos datos, así como de su análisis y resultados, queda recogido en el segundo artículo de esta tesis,

Hessheimer AJ, **Vendrell M**, Muñoz J, Ruiz A, Díaz A, Flores-Sigüenza L, Rodriguez Lanzilotta J, Delgado Oliver E, Fuster J, Navasa M, García Valdecasas JC, Taurá P, Fondevila C. Heparin but not tissue plasminogen activator improves outcomes in DCD liver transplantation in a porcine model. Liver Transplantation, 2018; Jan19.

Heparin But Not Tissue Plasminogen Activator Improves Outcomes in Donation After Circulatory Death Liver Transplantation in a Porcine Model

Amelia J. Hessheimer,^{1*} Marina Vendrell,^{3*} Javier Muñoz,¹ Ángel Ruíz,⁵ Alba Díaz,⁴ Luís Flores Sigüenza,¹ Jorge Rodríguez Lanzilotta,¹ Eduardo Delgado Oliver,¹ Jose Fuster,¹ Miquel Navasa,² Juan Carlos García-Valdecasas,¹ Pilar Taurá,³ and Constantino Fondevila^{1,5}

¹Department of Surgery and ²Liver Unit, Institut de Malalties Digestives i Metabòliques, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Departments of ³Anesthesia, ⁴Pathology, and ⁵Hepatobiliary and Liver Transplant Surgery, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Ischemic-type biliary lesions (ITBLs) arise most frequently after donation after circulatory death (DCD) liver transplantation and result in high morbidity and graft loss. Many DCD grafts are discarded out of fear for this complication. In theory, microvascular thrombi deposited during donor warm ischemia might be implicated in ITBL pathogenesis. Herein, we aim to evaluate the effects of the administration of either heparin or the fibrinolytic drug tissue plasminogen activator (TPA) as means to improve DCD liver graft quality and potentially avoid ITBL. Donor pigs were subjected to 1 hour of cardiac arrest (CA) and divided among 3 groups: no pre-arrest heparinization nor TPA during postmortem regional perfusion; no pre-arrest heparinization but TPA given during regional perfusion; and pre-arrest heparinization but no TPA during regional perfusion. In liver tissue sampled 1 hour after CA, fibrin deposition was not detected, even when heparin was not given prior to arrest. Although it was not useful to prevent microvascular clot formation, pre-arrest heparin did offer cytoprotective effects during CA and beyond, reflected in improved flows during regional perfusion and better biochemical, functional, and histological parameters during posttransplantation follow-up. In conclusion, this study demonstrates the lack of impact of TPA use in porcine DCD liver transplantation and adds to the controversy over whether the use of TPA in human DCD liver transplantation really offers any protective effect. On the other hand, when it is administered prior to CA, heparin does offer anti-inflammatory and other cytoprotective effects that help improve DCD liver graft quality.

Liver Transplantation 00 000–000 2018 AASLD.

Received September 5, 2017; accepted January 6, 2018.

Because primary graft failure can generally be avoided by appropriate donor and graft selection, ischemic-type biliary lesions (ITBLs) are currently the most dreaded

complication of donation after circulatory death (DCD) liver transplantation. ITBLs are defined as diffuse nonanastomotic biliary strictures, with or without prestenotic dilatations, in the presence of a patent hepatic artery,⁽¹⁾ and they occur in approximately 16% of recipients of DCD livers.⁽²⁾ The development of ITBLs is associated with significantly increased patient morbidity due to the need for multiple biliary procedures and repeat hospitalizations.^(2,3) Up to 65% of patients with ITBLs require retransplantation or die.⁽³⁾ Furthermore, the fear over the development of ITBLs significantly limits the utilization of livers arising through the DCD process,^(4,5) wasting organ recovery resources and limiting access to this potentially lifesaving procedure.

Ischemia/reperfusion injury has primarily been implicated in ITBL pathogenesis.⁽⁶⁾ An additional

Abbreviations: AP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; CA, cardiac arrest; cDCD, controlled/expected donation after circulatory death; CK19, cytokeratin 19; CS, cold storage; CT, clotting time; DBD, donation after brain death; DCD, donation after circulatory death; GGT, gamma glutamyltransferase; HAF, hepatic artery flow; IL, interleukin; ITBL, ischemic-type biliary lesion; LDH, lactate dehydrogenase; LY30, lysis index at 30 minutes; LY60, lysis index at 60 minutes; MCF, maximum clot firmness; mRNA, messenger RNA; NRP, normothermic regional perfusion; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PVF, portal vein flow; QPT, quick prothrombin time; ROTEM, rotational thromboelastometry; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; TNF, tumor necrosis factor; TPA, tissue plasminogen activator; uDCD, uncontrolled/unexpected donation after circulatory death.

theory holds that microthrombi deposition in peri-biliary arterioles during the low-flow/no-flow period following ventilator withdrawal or cardiorespiratory arrest in controlled/expected donation after circulatory death (cDCD) and uncontrolled/unexpected donation after circulatory death (uDCD) donors, respectively, may also play a role. On the basis of this theory, different authors have suggested that the viability of organs arising from DCD donors may be improved through the application of fibrinolytic therapy.⁽⁷⁻¹⁰⁾

Normothermic regional perfusion (NRP) is used to limit warm ischemia during the period following declaration of death and prior to cold perfusion in uDCD and more recently cDCD donors.⁽¹¹⁾ Normothermic regional perfusion has been shown to replete cellular energy stores, reduce nucleotide degradation products, and induce endogenous antioxidants. It also allows for a comprehensive assessment of organ viability prior to recovery.⁽¹²⁾ Furthermore, NRP offers an ideal opportunity to treat and improve the quality of these marginal grafts prior to recovery.

The aim of the present study is to compare and contrast the effects on liver graft quality of fibrinolytic therapy administered during a period of postarrest NRP with that of pre-arrest heparinization followed by postarrest NRP (our current standard for cDCD donor maintenance)⁽¹³⁾ and postarrest NRP only (the standard in some countries where pre-arrest heparinization is prohibited by law) in a porcine model of DCD liver transplantation.

Materials and Methods

ANIMALS

Male weanling pigs were used as donors and recipients. Animals were cared for according to the guidelines of the University of Barcelona Committee on Ethics in Animal Experimentation and the Catalan Department of the Environment Commission on Animal Experimentation.

STUDY OVERVIEW

Animals were divided among 3 groups:

1. Control group: 60 minutes cardiac arrest (CA) + 1 hour NRP + 4 hours cold storage (CS) + transplantation (n = 6).
2. Tissue plasminogen activator (TPA) group: 60 minutes CA + 1 hour NRP with TPA + 4 hours CS + transplantation (n = 6).
3. Heparin group: pre-arrest heparinization + 60 minutes CA + 1 hour NRP + 4 hours CS + transplantation (n = 6).

DONOR PROCEDURE AND NRP

Donor anesthesia was performed as described previously.⁽¹⁴⁾ The liver and hilar structures were dissected, and cholecystectomy was performed. Hepatic artery flow (HAF) and portal vein flow (PVF) were measured using ultrasonic flow probes connected to a flowmeter (HT107, Transonic Systems, Ithaca, NY).

Control Group

The descending aorta was cross-clamped at the aortic hiatus, and the heart was stopped with an intravenous injection of potassium chloride. The abdomen was closed, and a heating pad was placed to maintain a core temperature of 37°C. Sixty minutes after the start of CA (the length of time chosen to maximize biliary injury), the abdomen was reopened, and the abdominal aorta and inferior vena cava were cannulated with a 16-Fr Jostra arterial cannula and a multiperforated 21-Fr HLS venous cannula, respectively (Maquet Cardiopulmonary, Hirrlingen, Germany). Cannulae were connected to a cardiopulmonary bypass circuit (Maquet Cardiopulmonary, Hirrlingen, Germany) primed with 500 mL of 1/6 M sodium bicarbonate, 500 mL of 20% mannitol, 500 mL of Ringer's solution, and 500 mL of Voluven (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany). Heparin (3 mg/kg) was also added to the

Address reprint requests to Constantino Fondevila, M.D., Ph.D., Hepatobiliary and Liver Transplant Surgery, Hospital Clinic, University of Barcelona, C/ Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Telephone: 34 93 227 57 18; FAX: 34 93 227 55 89; E-mail: cfonde@clinic.uib.es

**These authors contributed equally to the work.*

Research was supported by FIS Grant 11/01979 from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain. Marina Vendrell was supported by the "Premio Fin de Residencia 'Emil Letang'" from the Hospital Clínic, Barcelona.

Copyright © 2018 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/lt.25013

Potential conflict of interest: Nothing to report.

priming solution. Normothermic regional perfusion was run for 60 minutes, with a goal pump flow of 1.7–1.8 L/minute and temperature 37°C. HAF and PVF were recorded, and the perfusate was sampled via an in-line 3-way stopcock throughout NRP. At the end of NRP, the liver was perfused with 1 L of cold IGL-1 preservation solution (Institut Georges Lopez, Lissieu, France) both portally and arterially. The liver was then removed, prepared, and placed in CS at 4°C.

TPA Group

TPA was added to the regional perfusion solution (1.5 mg/kg, administered as a 10-mg priming dose and the rest as a continuous infusion over the subsequent hour of NRP). The remainder of the procedure was the same as that described for the control group.

Heparin Group

Heparin (3 mg/kg intravenously) was administered approximately 5 minutes prior to aortic cross-clamp; the remainder of the procedure was the same as that described for the control group.

RECIPIENT PROCEDURE AND POSTOPERATIVE MANAGEMENT

Approximately 4 hours after the start of CS, the liver was transplanted into the recipient pig, as described previously.^(14,15) Postoperatively, the recipient was cared for intensively for up to 5 days.⁽¹⁴⁾ Animals that survived until the fifth day were reopened and euthanized under anesthesia, whereas nonsurvivors were subjected to autopsy.

BLOOD AND SERUM ANALYSES

In blood samples collected serially during follow-up, alkaline phosphatase (AP), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyltransferase (GGT), total bilirubin, and the quick prothrombin time (QPT) were determined using the Advia 1650 automatic analyzer (Bayer, Tarrytown, NY).

ROTATIONAL THROMBOELASTOMETRY

Rotational thromboelastometry (ROTEM) analyses were performed on blood samples taken from both the donor (prior to and at the end of CA and during NRP) and the recipient after graft reperfusion. Whole

blood was activated extrinsically with recombinant tissue factor (EXTEM reagent) or intrinsically with ellagic acid (INTEM reagent), and the analysis was run for at least 60 minutes. In the HEPTTEM assay, coagulation is triggered via the intrinsic pathway in the same manner as in INTEM. However, heparinase is added to rapidly degrade heparin and allow for the assessment of hemostasis in heparinized subjects. Alpha angle measured the speed of clot strengthening. Maximum clot firmness (MCF) was the maximum amplitude of the clot, whereas maximum lysis was the maximum percentage of amplitude lost relative to MCF (normal <15%, >15% indicating hyperfibrinolysis). The lysis index at 30 minutes (LY30) and the lysis index at 60 minutes (LY60) were the ratios of the amplitudes at 30 and 60 minutes, respectively, relative to MCF (normal 94%–100%).

TISSUE ANALYSES

Liver parenchymal biopsies were taken at baseline in the donor (immediately after opening the abdominal wall), and parenchymal and distal bile duct samples were taken both 1 hour after reperfusion in the recipient and at the end of follow-up. Each biopsy was divided into 2 sections: 1 preserved in 10% formalin for paraffin inclusion and 1 diced finely and snap-frozen in liquid nitrogen for RNA extraction. Formalin-fixed samples were processed for routine histology. Sections were stained with hematoxylin-eosin and examined using standard light microscopy by 2 independent observers blinded to the identity of each sample. Parenchymal sections were evaluated for sinusoidal congestion, hepatocellular vacuolization, and necrosis according to the semiquantitative method described by Suzuki et al.,⁽¹⁶⁾ and peribiliary arteriolo-necrosis and gland injury were evaluated according to the methods described by Hansen et al. and op den Dries et al.^(17,18)

To study fibrin deposition, paraffinated sections were dewaxed with xylene and stained for fibrin using the Martius Scarlet Blue Stain Kit (Molekula, Newcastle Upon Tyne, UK), according to the manufacturer's instructions. Also in paraffin-embedded tissue samples, endogenous peroxidase activity was inhibited with peroxidase-blocking solution (S2023, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) for 10 minutes. Sections were washed with phosphate-buffered saline and incubated with anti-cytokeratin 19 (CK19) antibody (1/300, NCL-CK19 Mouse Monoclonal Antibody, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Germany) for 60

minutes. Slides were washed with phosphate-buffered saline and incubated with secondary antibody (K4011, Dako Agilent Pathology Solutions, Glostrup, Denmark) for 30 minutes. The peroxidase reaction was developed with a 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate kit (K4007, Dako Agilent Pathology Solutions). Finally, slides were washed with distilled water and counterstained with hematoxylin-eosin and examined by 2 independent observers blinded to the identity of each sample.

Real-time quantitative TaqMan reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses of E-selectin, interleukin (IL) 1 β , IL6, and tumor necrosis factor (TNF) gene expression were performed to detect endothelial cell activation and inflammation, as described previously.⁽¹⁵⁾ All samples were assayed in duplicate, recording the mean for each sample. Results in each individual animal were normalized with the value of the respective gene in that animal at baseline, which was set to 0.

DATA AND STATISTICAL ANALYSES

All quantitative values are expressed as the median and 25%-75% interquartile range. Differences between groups were compared using the Mann-Whitney U test for 2 samples and the Kruskal-Wallis 1-way analysis of variance for multiple samples. $P < 0.05$ was considered significant. Calculations were performed using SPSS statistics, version 20 (IBM, Armonk, NY).

Results

DONOR OUTCOMES

Graft Perfusion During NRP

From the start of NRP, PVF, HAF, and pump flows were significantly higher among donors in the heparin group compared with the other 2. These flows remained higher in the heparin group throughout NRP (Fig. 1).

Rotational Thromboelastometry

Rotational thromboelastometry demonstrated differences between the groups in coagulation and lysis parameters prior to and during NRP (Table 1). Donors in the heparin group were adequately anticoagulated, as reflected by significantly prolonged CT and the absence of measurable clot formation on INTEM test;

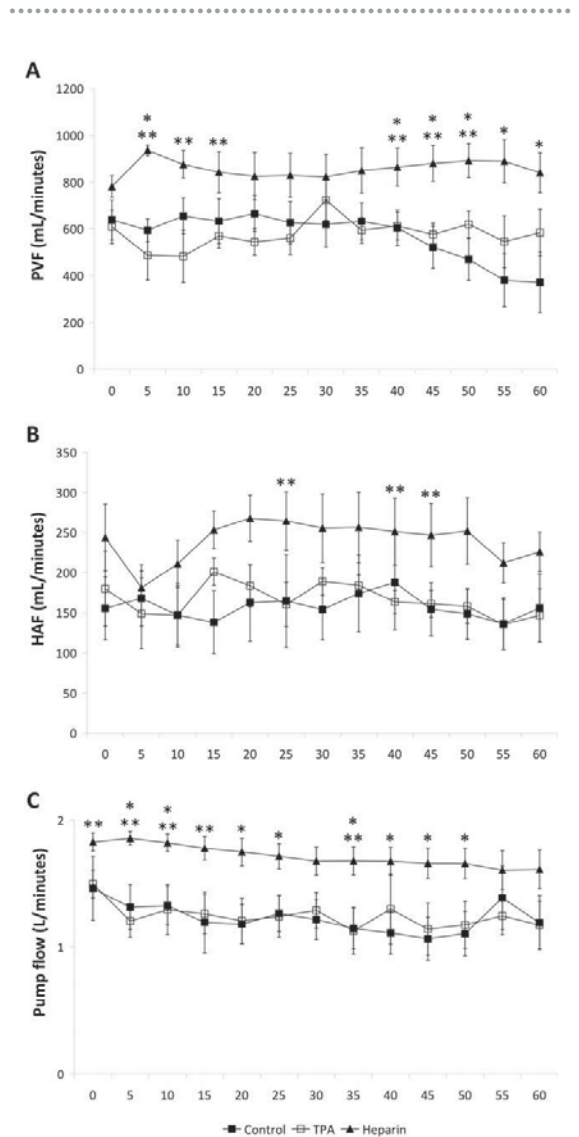


FIG. 1. (A) PVF, (B) HAF, and (C) pump flow during 1 hour of NRP (performed subsequent to 1 hour of CA). Flows were generally higher for grafts/animals treated with heparin prior to arrest. $P < 0.05$ for control (■,*) and TPA (□,**) groups versus heparin group (▲).

the effects of heparin persisted, though to a lesser extent, at the end of CA. During NRP, fibrinolytic therapy was adequate in the TPA group, as reflected by 100% lysis on HEPTTEM assay. Finally, there were no differences in postreperfusion coagulation and lysis parameters in recipient pigs.

TABLE 1. Rotational Thromboelastomeric Parameters Measured in Donor Pigs Immediately Prior to CA, After 60 Minutes of CA, and During NRP and in Recipient Pigs 20 Minutes After Graft Reperfusion

	Reference	Control	TPA	Heparin	P Values
Pre-arrest (INTEM)					
CT, seconds	63-212	151 (103-162)	171 (160-175)	3232 (1325-5136)	<0.05
Alpha, deg	80-85	81 (80-82)	80 (80-81)	—	0.34
MCF, mm	61-79	73 (71-74)	72 (70-73)	—	0.16
LY30, %	94-100	97 (95-100)	97 (94-99)	—	0.56
LY60, %	94-100	87 (86-90)	89 (86-93)	—	0.66
ML, %	<15	10 (6-14)	14 (7-19)	—	0.52
End of arrest (INTEM)					
CT, seconds	63-212	131 (115-141)	128 (119-157)	523 (474-572)	0.005
Alpha, deg	80-85	73 (67-76)	79 (78-81)	45 (41-49)	0.004
MCF, mm	61-79	55 (50-60)	76 (69-79)	47 (38-56)	0.02
LY30, %	94-100	100 (98-100)	100 (99-100)	100	0.31
LY60, %	94-100	96 (94-97)	94 (93-96)	97 (95-98)	0.39
ML, %	<15	8 (6-10)	11 (7-13)	7 (5-9)	0.17
NRP (HEPTEM)					
LY30, %	94-100	100 (98-100)	0 (0-2)	93 (91-94)	0.003
LY60, %	94-100	95 (90-97)	0	87 (84-90)	0.002
ML, %	<15	13 (8-16)	100	14 (10-18)	0.007
Postreperfusion (EXTEM)					
CT, seconds	37-80	70 (69-81)	76 (67-80)	81 (67-89)	0.72
Alpha, deg	80-86	75 (75-78)	75 (74-76)	75 (73-77)	0.58
MCF, mm	66-81	67 (65-69)	63 (63-66)	63 (61-66)	0.07
LY30, %	94-100	100	100 (99-100)	100 (99-100)	0.48
LY60, %	94-100	100 (98-100)	99 (96-100)	98 (94-100)	0.86
ML, %	<15	2 (1-4)	5 (1-8)	3 (1-9)	0.80

NOTE: Data are given as range or median (interquartile range).

TRANSPLANTATION AND POSTOPERATIVE EVOLUTION

There were no significant differences among the groups in lengths of CA (median [range]; control, 67 [65-70] minutes; TPA, 69 [66-71] minutes; and heparin, 69 [66-70] minutes), NRP (control, 61 [60-67] minutes; TPA, 65 [61-68] minutes; and heparin, 64 [63-68] minutes), cold ischemia (control, 244 [222-250] minutes; TPA, 242 [235-255] minutes; and heparin, 236 [232-243] minutes), or the anhepatic period during liver reperfusion (control, 18 [15-19] minutes; TPA, 17 [15-18] minutes; and heparin, 17 [16-18] minutes).

Upon reperfusion, serum AST and total bilirubin increased and QPT decreased in all of the recipients. During the follow-up period, the AST level was lower and the QPT level was higher (reflecting improved hepatic synthetic function) in the recipients of grafts from donors with pre-arrest heparinization compared with those from donors without (both the control and TPA groups; Fig. 2 A-C).

Both serum AP and GGT decreased immediately following reperfusion but then subsequently rose, with AP peaking approximately 24 hours in all 3 groups

and GGT continuing to rise steadily until the end of follow-up. Although there were no differences among the groups in GGT, AP tended to be lower, at some points significantly so, in the recipients of livers treated with heparin prior to CA (Fig. 2D,E).

Five-day survival was 83% in both the control and TPA groups and 100% in the recipients of grafts treated with heparin prior to CA. One recipient in each of the control and TPA groups died between the third and fourth posttransplant days due to apparent hepatic insufficiency, with progressive deterioration of serum bilirubin and QPT preceding death.

MICROSCOPY STUDIES

After an hour of cardiac standstill, no significant deposition of fibrin was detected in the samples, independent of treatment (pre-arrest heparinization or lack thereof). Notably, panlobular hepatocellular vacuolization was present in tissue samples taken after 1 hour of CA from livers from donors not previously treated with heparin, though this finding was relatively absent among heparin-treated grafts (Fig. 3).

Ischemia/reperfusion injury was evaluated in postreperfusion tissue biopsies. Congestion and

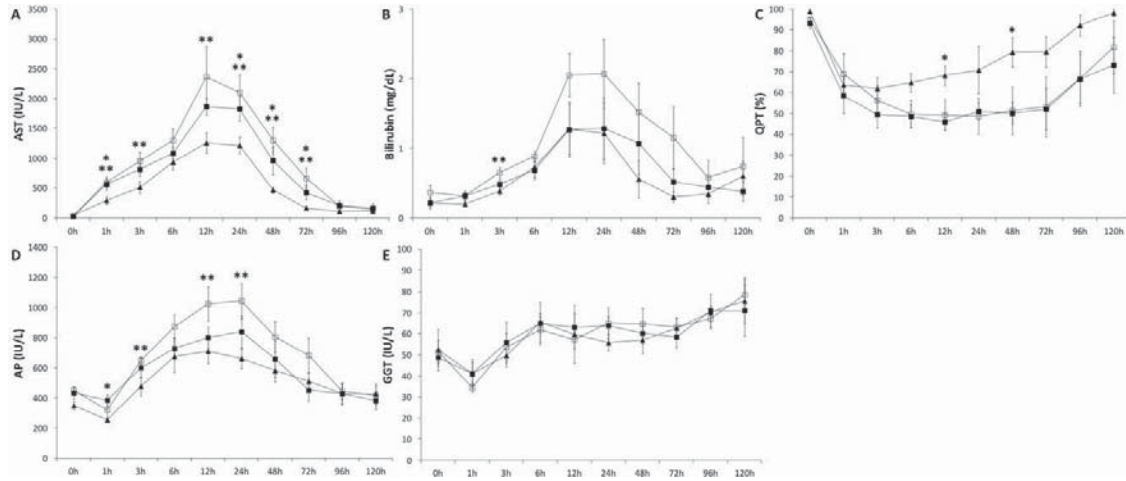


FIG. 2. Evolutions of (A) AST, (B) total bilirubin, (C) QPT, (D) AP, and (E) GGT over the course of the postoperative period, according to treatment group. At various points over the postoperative periods, these values tended to be improved among recipients of livers treated with heparin prior to CA. $P < 0.05$ for control (■,*) and TPA (□,**) groups versus heparin group (▲).

vacuolization were observed to the same degree in all 3 groups, but less necrosis was observed among grafts treated with heparin prior to CA (Table 2; Fig. 4).

Biliary epithelial histology was evaluated with anti-CK19 immunohistochemistry. At baseline, interlobular bile ducts and ductules were lined by a uniform layer of cuboidal cells with large nuclei and scant

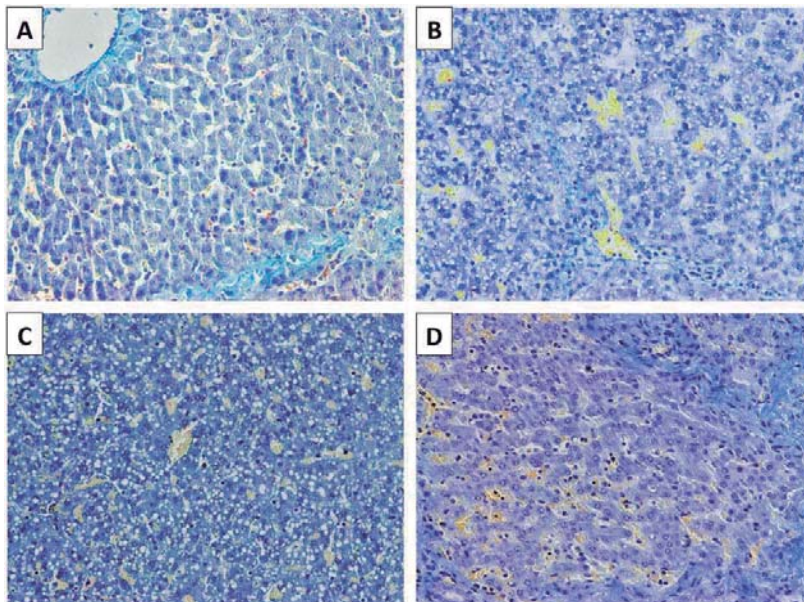


FIG. 3. Tissue samples taken at (A) baseline and (B-D) after an hour of CA were stained to detect the presence of fibrin. Even after an hour of CA, red cells were detected (staining yellow), but fibrin deposition (which stains bright pink when present) was not, independent of whether heparin had been administered (D) or not (B, control group; C, TPA group) prior to arrest. Liver tissue samples taken after 1 hour of warm ischemia were also notable for significant hepatocellular vacuolization (B,C), which was virtually absent among livers from donors treated with heparin prior to CA (D).

TABLE 2. Changes Associated With Ischemia/Reperfusion Injury Were Assessed in Postreperfusion Biopsies According to the Semiquantitative Suzuki Scoring System

	Control	TPA	Heparin	<i>P</i> Value
Congestion	3.0 (2.0-3.0)	3.0 (2.8-3.0)	2.5 (1.0-3.0)	0.49
Vacuolization	3.0 (2.8-3.3)	3.0 (1.8-3.3)	3.0 (3.0-3.3)	0.86
Necrosis	3.0 (2.0-3.5)	3.0 (2.3-3.5)	1.3 (1.0-2.0)	0.005

cytoplasm. Five days after transplantation, atypical cholangiocellular proliferation/hyperplasia and partial collapse of the ductular lumen was prominent in grafts in the control and TPA groups, whereas biliary ductules were lined by a single layer of cuboidal cells with a relatively well-defined lumen among grafts in the heparin group (Fig. 5). When the peribiliary arterioles and periluminal and deep peribiliary glands were analyzed, arteriolonecrosis and peribiliary gland injury were both minimal ($\leq 50\%$) in samples from the control and TPA groups, whereas no injury was observed in samples from the heparin group.

ENDOTHELIAL ACTIVATION AND INFLAMMATORY RESPONSE

After an hour of CA, expression of E-selectin messenger RNA (mRNA), a marker of endothelial activation, was lower in grafts in the heparin group versus those without treatment ($P = 0.03$ and 0.05 versus control and TPA groups, respectively). Both after graft reperfusion and after 5 days of follow-up in the recipients, levels of E-selectin mRNA also tended to be lower among heparin-treated grafts followed by grafts treated

with TPA during NRP and grafts in the control group.

After an hour of CA, tissue levels of TNF mRNA were lower in heparin-treated grafts ($P = 0.04$ for control versus heparin groups). Both TNF and IL1 β mRNA levels were significantly lower among heparin-treated grafts versus controls after reperfusion ($P = 0.03$), and IL1 β mRNA remained lower in heparin-treated grafts at the end of follow-up ($P = 0.02$ when compared with the control group; Fig. 6).

Discussion

The major finding of the present study is that heparin provides anti-inflammatory and other cytoprotective effects when administered prior to CA in the context of DCD, independent of its role as an anticoagulant. This finding has potential to impact clinical practice, given that heparin is not universally given prior to the withdrawal of life support in cDCD, depending on local legislation and clinical practice guidelines. As well, this study demonstrates that fibrinolytic therapy, administered in order to dissolve theoretical microthrombi formed during warm ischemia, may not be as useful as some authors have suggested.

Compared with human blood, porcine blood contains higher concentrations of fibrinogen, platelets, and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and a lower concentration of plasminogen.^(19,20) Even despite this relative hypercoagulability at baseline, there was still no fibrin clot deposition (the target of fibrinolytic therapy) in this model after an hour of cardiac standstill, regardless of whether heparin had been administered prior to

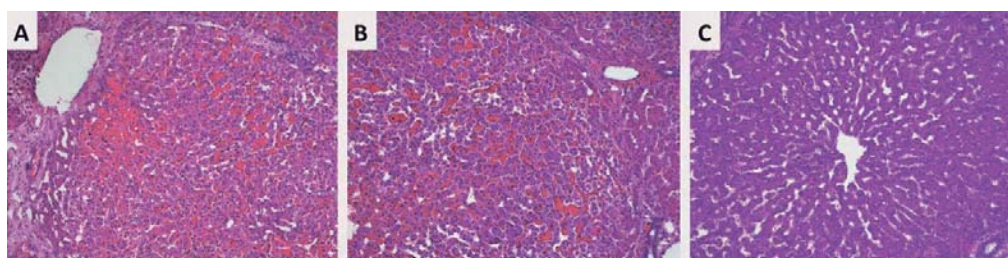


FIG. 4. Postreperfusion tissue samples were evaluated for changes associated with ischemia/reperfusion injury. Although congestion and vacuolization were all observed to the same extent in the postreperfusion samples, there was consistently less necrosis observed in grafts treated with heparin prior to CA. Representative samples from (A) control, (B) TPA, and (C) heparin groups, 200 \times magnification.

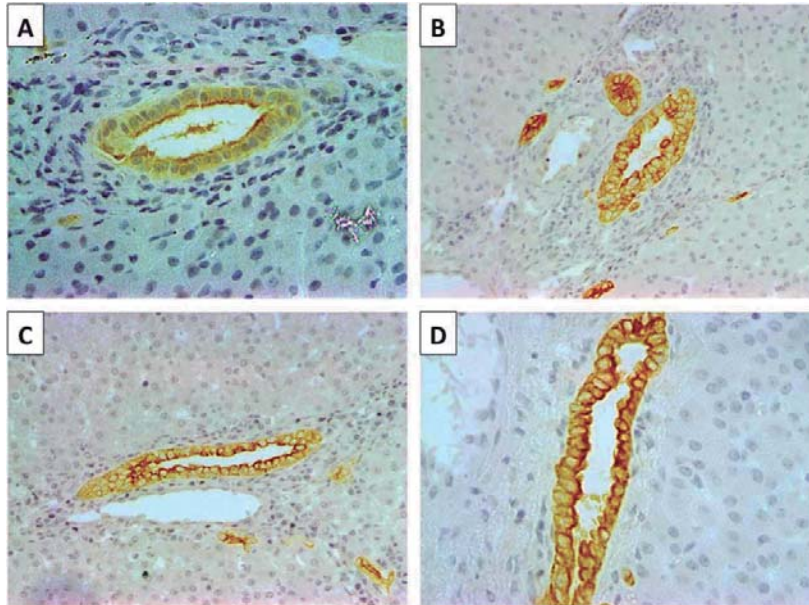


FIG. 5. Biliary epithelial histology was evaluated using anti-CK19 immunohistochemistry in liver tissue samples taken (A) at baseline and (B-D) after 5 days of follow-up. Ductular reaction, with proliferation of cholangiocytes and partial collapse of the biliary lumen, was observed among grafts in the (B) control and (C) TPA groups, while normal ductular morphology remained relatively well preserved among grafts in the (D) heparin group.

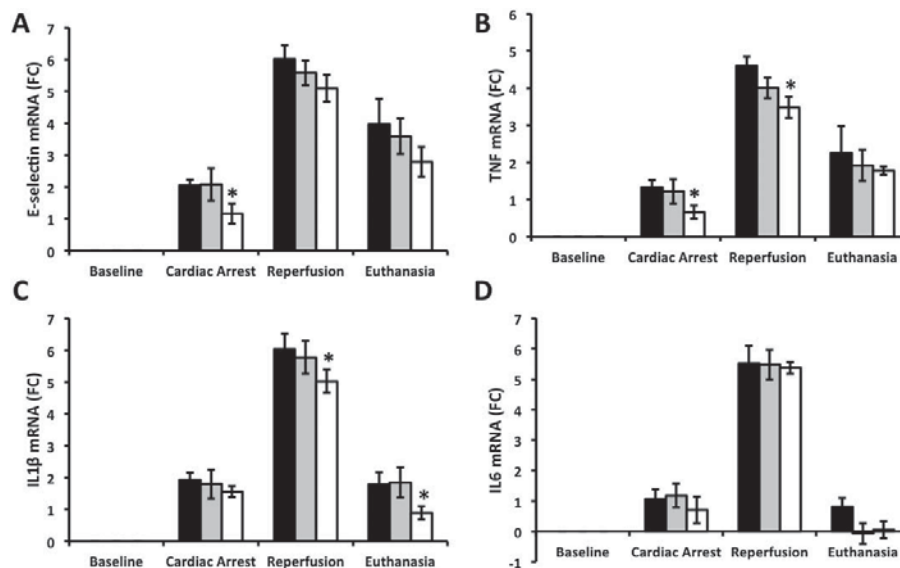


FIG. 6. Tissue samples from various time points were evaluated for E-selectin, TNF, IL1 β , and IL6 gene expression. Results in each animal were normalized with the value of the respective gene in the same animal at baseline, set to 0. After an hour of CA, E-selectin mRNA was significantly lower in grafts treated with heparin prior to arrest, indicating less endothelial activation during the period of warm ischemia. (A) The same tendency remained after both graft reperfusion in the recipient and after 5 days of follow-up. (B) Gene expression of TNF; (C) IL1 β ; (D) and IL6, all proinflammatory cytokines, was also lower among heparin-treated grafts after CA, graft reperfusion, and 5 days of follow-up. $P < 0.05$ for control (black columns, *) and TPA (gray columns) groups versus the heparin group (white columns).

arrest or not. It might be argued that a group receiving both pre-arrest heparinization and fibrinolytic therapy during NRP should have been included in this study. However, such an argument is rather counterintuitive. Adequate pre-arrest heparinization should prevent any theoretical clot from forming during the subsequent period of cardiocirculatory arrest. In this study, no microvascular clot was found, even when no therapy (neither heparin nor TPA) was given.

Given that it was performed in a porcine model, the findings of this study need to be confirmed in the clinical setting. However, there is already clinical evidence of lack of fibrin clot deposition following CA in the context of DCD. A recent clinical study from Rotterdam evaluated 282 sections from 94 biopsies from discarded human cDCD liver grafts ($n = 16$) triple-stained to detect the presence of microthrombi. Microvascular clot with fibrin was only found in 1%-3% of the sections evaluated. Furthermore, when the authors evaluated cDCD and donation after brain death (DBD) grafts from an earlier era, microthrombi were found at rates of 3% and 11%, respectively, and there was no association between the presence of microthrombi and the subsequent development of ITBL.⁽²¹⁾ Other authors have similarly studied histopathological changes associated with the appearance of ITBL after both DBD and cDCD liver transplantation in the clinical setting and have also described low rates of microvascular thrombi and no significant association between the presence of microthrombi and the development of ITBL.^(17,18)

Several years ago, Porte and Clavien highlighted the fact that platelet activation is reduced and coagulation altered early after death, with less stable clot formation and marked activation of the fibrinolytic system.⁽²²⁾ More recently, our group used ROTEM to show that potential uDCD donors universally suffer hyperfibrinolysis at the moment death is declared.⁽²³⁾ Other groups have used thromboelastometry to study patients suffering CA, and it appears that the incidence of hyperfibrinolysis increases in relation to the length of arrest and warm ischemia.⁽²⁴⁾ When organs and tissues suffer progressive ischemia, thrombomodulin, an integral membrane protein expressed on the surface of endothelial cells, is induced. Thrombomodulin serves as a cofactor for thrombin and converts it from a pro-coagulant to an anticoagulant enzyme, diverting it from fibrin generation to the activation of protein C.^(25,26) Activated protein C consumes PAI-1, thereby reducing the inhibition of TPA and accelerating the conversion of plasminogen to plasmin.⁽²⁷⁻²⁹⁾

Simultaneously, hypoxia and a secondary systemic rise in catecholamines cause the release of TPA from endothelial cells, leading to excessive fibrinolysis.^(30,31)

In the present model, CA is sudden, as is the case in human uDCD. In uDCD, given the abrupt and unexpected nature of arrest, the donor and liver undergo a very prolonged period of warm ischemia, and the risk for the development of ischemic biliary complications in the posttransplant period is very high if aggressive donor recovery and maintenance and strict organ selection criteria are not employed.^(5,32,33) Although this model lacks the "agonal phase" seen in the other clinical scenario of cDCD, it is unlikely that the addition of an agonal phase would have changed anything with regard to fibrin deposition (or, in this case, the lack thereof). It has been consistently seen that acutely critically ill patients suffering from a variety of conditions (eg, trauma, sepsis, myocardial infarction, or post-CA syndrome) present severe hemostatic alterations characterized by extreme hypocoagulability and hyperfibrinolysis. This condition, which has recently been denominated shock-induced endotheliopathy ("SHINE"), appears to be a compensatory mechanism to improve perfusion when tissue and cellular oxygenation is significantly reduced (ie, when the patient is in a state of shock, regardless of the origin).⁽³⁴⁾ The coagulation profiles of cDCD donors have not been specifically evaluated in the context of any clinical study. (We would encourage anyone with the means to do so; in our setting, however, all potential cDCD donors are systematically heparinized prior to the withdrawal of life support.) However, given that the agonal phase is also characterized by critical cellular and tissue hypoxia, it is very likely that it, too, provokes the same systemic changes of hypocoagulability and hyperfibrinolysis seen in the aforementioned clinical scenarios.

After 1 hour of warm ischemia, hepatocellular vacuolization, which was prominent among livers in the control and TPA groups (untreated up until that point), was significantly less among livers treated with heparin prior to arrest. Hepatocellular vacuolization has been observed in livers exposed to prolonged warm ischemia,⁽³⁵⁾ and the extent of vacuolization has been correlated with the degree of hepatocellular damage.⁽³⁶⁾ Theories as to the etiology of hepatocellular vacuolization include influx of plasma during cellular anoxia,⁽³⁷⁾ lysosomal degradation (ie, autophagic vacuoles),⁽³⁸⁾ or internalization of apical membranes due to adenosine triphosphate depletion.⁽³⁹⁾ Although the exact mechanism remains to be elucidated, it is possible binding

of heparin, which is known to have direct anti-inflammatory and cytoprotective effects and to reduce the expression of cellular adhesion molecules,⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ resulted in cell membrane stabilization during warm ischemia. These collateral effects of heparin could also be observed in liver tissue gene levels of E-selectin, TNF, IL1 β , and IL6, which were lowest in this study among grafts arising from donors treated with heparin prior to CA. Furthermore, it is plausible that this protective effect on the endothelium resulted in improved flows during NRP and, consequentially, improvements in postreperfusion liver biochemical, functional, and inflammatory parameters measured over the course of follow-up.

Anti-CK19 immunostaining was used to evaluate biliary histological changes in this study. Bile ductules are very reactive anatomical elements of the liver.⁽⁴³⁾ Proliferative/hyperplastic ductular changes were observed in samples taken 5 days after transplantation from grafts in the control and TPA groups, whereas these changes were relatively absent in grafts in the heparin group. In accordance with the previous commentary, these findings are reflective of, if anything, the adequacy of perfusion during NRP. Mounting clinical evidence suggests that NRP has a significant positive impact on biliary preservation in the setting of DCD liver transplantation because it limits the length of warm ischemia, restores cellular energy stores, and reconditions the graft prior to cold perfusion and storage.^(11,12) There are now several single-center series that describe excellent posttransplantation survival rates and virtually no ITBL using DCD livers recovered with postmortem NRP.⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾ At our own center, postmortem NRP has been used to recover livers from cDCD donors.⁽¹³⁾ Fifteen livers recovered in this fashion have been transplanted since 2014, with 92% 1-year graft survival and not a single case of ITBL.

Apart from the fact that it is not beneficial, the administration of a fibrinolytic drug to a graft, which may have ongoing effects even after washout due to binding to the vascular endothelium,⁽⁴⁸⁾ is an intervention that could pose substantial risk for the development of uncontrollable hemorrhage in the recipient. This issue is particularly relevant in the setting of DCD liver transplantation, where postreperfusion coagulopathy is not uncommon.^(49,50) Nonetheless, there are clinical reports that allege benefit for the use of fibrinolytic therapy in this setting. The Cleveland Clinic Group described a series of 22 transplants performed with cDCD grafts treated with TPA injected into the donor hepatic artery on the back table, with or

without heparin administered systemically prior to ventilator withdrawal. There was no control group in this study, and ITBL arose postoperatively in 1 (9%) patient, including 1 in which heparin had been given prior to withdrawal. Notably, 64% of recipients had excessive postreperfusion bleeding.⁽⁷⁾ Seal et al. subsequently published a retrospective review of cDCD liver transplants performed at 2 North American centers wherein a small dose of TPA was administered directly into the hepatic artery prior to completing the portal anastomosis in 85 of 113 cDCD recipients transplanted during a 7-year period. The authors described a lower rate of biliary strictures in the TPA-treated recipients (17% versus 33%; $P = 0.07$).⁽⁸⁾ It is important to note, however, that patients were not randomized. The authors compared recipients of livers treated with TPA with controls from an earlier era. As well, donors were fully heparinized prior to withdrawal. One of the same 2 centers recently published a retrospective analysis of 138 cDCD liver transplants performed in which the last 100 recipients received low-dose TPA and verapamil injected directly into the hepatic artery immediately following graft reperfusion in the recipient. Donors in both eras were heparinized prior to withdrawal, and the rates of ITBL in both eras were low (3%-5%) and not significantly different.⁽¹⁰⁾ Also, the Indiana University Group compared cDCD livers treated with TPA added to the aortic flush and subsequently directly injected into the hepatic artery ($n = 30$) with a historic group of controls from an earlier era ($n = 61$). They claimed the use of TPA significantly reduced the rates of both anastomotic and nonanastomotic biliary strictures, though donor age was greater and the warm and cold ischemia times significantly longer in non-TPA grafts.⁽⁹⁾ In contrast, a study from Leiden compared recipients of livers treated with urokinase during back-table surgery ($n = 63$: 46 DBD and 17 cDCD) with a group of controls from an earlier era ($n = 122$: 94 DBD and 28 cDCD). The control group had lower body mass index but longer cold ischemia times, but rates of ITBL were exactly the same in both groups (11% and 39% among DBD and cDCD recipients, respectively, in the control group versus 10% and 41% among DBD and cDCD recipients, respectively, in the study group).⁽⁵¹⁾

In summary, this experimental study suggests that fibrinolytic therapy does not play a role in improving liver grafts arising through the DCD process due to lack of fibrin clot deposition during CA. Although it may not be needed for its anticoagulant properties, heparin does offer anti-inflammatory and other

cytoprotective effects that may be useful to help improve liver graft quality when administered prior to withdrawal of life support/CA in the context of cDCD.

Acknowledgments: The authors would like to thank Dr. Marc Net and Institut Georges Lopez for providing the Institut Georges Lopez 1 solution used in these studies.

REFERENCES

- 1) Buis CI, Hoekstra H, Verdonk RC, Porte RJ. Causes and consequences of ischemic-type biliary lesions after liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2006;13:517-524.
- 2) Jay CL, Lyuksemburg V, Ladner DP, Wang E, Caicedo JC, Holl JL, et al. Ischemic cholangiopathy after controlled donation after cardiac death liver transplantation: a meta-analysis. *Ann Surg* 2011;253:259-264.
- 3) Foley DP, Fernandez LA, Leveson G, Anderson M, Mezrich J, Sollinger HW, D'Alessandro A. Biliary complications after liver transplantation from donation after cardiac death donors: an analysis of risk factors and long-term outcomes from a single center. *Ann Surg* 2011;253:817-825.
- 4) Davila D, Ciria R, Jassem W, Briceño J, Littlejohn W, Vilca-Meléndez H, et al. Prediction models of donor arrest and graft utilization in liver transplantation from maastricht-3 donors after circulatory death. *Am J Transplant* 2012;12:3414-3424.
- 5) Fondevila C, Hessheimer AJ, Flores E, Ruiz A, Mestres N, Calatayud D, et al. Applicability and results of Maastricht type 2 donation after cardiac death liver transplantation. *Am J Transplant* 2012;12:162-170.
- 6) Hessheimer AJ, Cárdenas A, García-Valdecasas JC, Fondevila C. Can we prevent ischemic-type biliary lesions in donation after circulatory determination of death liver transplantation? *Liver Transpl* 2016;22:1025-1033.
- 7) Hashimoto K, Eghtesad B, Gunasekaran G, Fujiki M, Uso TD, Quintini C, et al. Use of tissue plasminogen activator in liver transplantation from donation after cardiac death donors. *Am J Transplant* 2010;10:2665-2672.
- 8) Seal JB, Bohorquez H, Reichman T, Kressel A, Ghanekar A, Cohen A, et al. Thrombolytic protocol minimizes ischemic-type biliary complications in liver transplantation from donation after circulatory death donors. *Liver Transpl* 2015;21:321-328.
- 9) Kubal C, Mangus R, Fridell J, Saxena R, Rush N, Wingle M, et al. Optimization of perioperative conditions to prevent ischemic cholangiopathy in donation after circulatory death donor liver transplantation. *Transplantation* 2016;100:1699-1704.
- 10) Bohorquez H, Seal JB, Cohen AJ, Kressel A, Bugeaud E, Bruce DS, et al. Safety and outcomes in 100 consecutive donation after circulatory death liver transplants using a protocol that includes thrombolytic therapy. *Am J Transplant* 2017;17:2155-2164.
- 11) Hessheimer AJ, García-Valdecasas JC, Fondevila C. Abdominal regional in-situ perfusion in donation after circulatory determination of death donors. *Curr Opin Organ Transplant* 2016;21:322-328.
- 12) Hessheimer AJ, Billault C, Barrou B, Fondevila C. Hypothermic or normothermic abdominal regional perfusion in high-risk donors with extended warm ischemia times: impact on outcomes? *Transpl Int* 2015;28:700-707.
- 13) Hessheimer AJ, Domínguez-Gil B, Fondevila C, Matesanz R. Controlled donation after circulatory determination of death in Spain. *Am J Transplant* 2016;16:2239-2240.
- 14) Fondevila C, Hessheimer AJ, Flores E, Vendrell M, Muñoz J, Escobar B, et al. Step-by-step guide for a simplified model of porcine orthotopic liver transplant. *J Surg Res* 2011;167:e39-e45.
- 15) Fondevila C, Hessheimer AJ, Maathuis MH, Muñoz J, Taurá P, Calatayud D, et al. Superior preservation of DCD livers with continuous normothermic perfusion. *Ann Surg* 2011;254:1000-1007.
- 16) Suzuki S, Nakamura S, Koizumi T, Sakaguchi S, Baba S, Muro H, Fujise Y. The beneficial effect of a prostaglandin I2 analog on ischemic rat liver. *Transplantation* 1991;52:979-983.
- 17) Hansen T, Hollemann D, Pitton MB, Heise M, Hoppe-Lotichius M, Schuchmann M, et al. Histological examination and evaluation of donor bile ducts received during orthotopic liver transplantation—a morphological clue to ischemic-type biliary lesion? *Virchows Arch* 2012;461:41-48.
- 18) op den Dries S, Westerkamp AC, Karimian N, Gouw AS, Bruinsma BG, Markmann JF, et al. Injury to peribiliary glands and vascular plexus before liver transplantation predicts formation of non-anastomotic biliary strictures. *J Hepatol* 2014;60:1172-1179.
- 19) Velik-Salchner C, Schnürer C, Fries D, Müssigang PR, Moser PL, Streif W, et al. Normal values for thrombelastography (ROTEM) and selected coagulation parameters in porcine blood. *Thromb Res* 2006;117:597-602.
- 20) Holland CK, Vaidya SS, Datta S, Coussios CC, Shaw GJ. Ultrasound-enhanced tissue plasminogen activator thrombolysis in an in vitro porcine clot model. *Thromb Res* 2008;121:663-673.
- 21) Verhoeven CJ, Simon TC, de Jonge J, Doukas M, Biermann K, Metselaar HJ, et al. Liver grafts procured from donors after circulatory death have no increased risk of microthrombi formation. *Liver Transpl* 2016;22:1676-1687.
- 22) Porte RJ, Clavien PA. Peflush with plasminogen activator in non-heart-beating donors: is it worth it? *Transplantation* 2000;69:1769-1771.
- 23) Vendrell M, Hessheimer AJ, Ruiz A, de Sousa E, Paredes D, Rodríguez C, et al. Coagulation profiles of unexpected DCDD donors do not indicate a role for exogenous fibrinolysis. *Am J Transplant* 2015;15:764-771.
- 24) Viersen VA, Greuters S, Korfage AR, Van der Rijst C, Van Bochove V, Nanayakkara PW, et al. Hyperfibrinolysis in out of hospital cardiac arrest is associated with markers of hypoperfusion. *Resuscitation* 2012;83:1451-1455.
- 25) Verhagen HJ, Heijnen-Snyder GJ, Pronk A, Vroom TM, van Vroonhoven TJ, Eikelboom BC, et al. Thrombomodulin activity on mesothelial cells: perspectives for mesothelial cells as an alternative for endothelial cells for cell seeding on vascular grafts. *Br J Haematol* 1996;95:542-549.
- 26) Adrie C, Monchi M, Laurent I, Um S, Yan SB, Thuong M, et al. Coagulopathy after successful cardiopulmonary resuscitation following cardiac arrest: implication of the protein C anticoagulant pathway. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:21-28.
- 27) Rezaie AR. Vitronectin functions as a cofactor for rapid inhibition of activated protein C by plasminogen activator inhibitor-1. implications for the mechanism of profibrinolytic action of activated protein C. *J Biol Chem* 2001;276:15,567-15,570.
- 28) Brohi K, Cohen MJ, Ganter MT, Matthay MA, Mackersie RC, Pittet JF. Acute traumatic coagulopathy: initiated by hypoperfusion: modulated through the protein C pathway? *Ann Surg* 2007;245:812-818.

- 29) Brohi K, Cohen MJ, Ganter MT, Schultz MJ, Levi M, Mackersie RC, Pittet JF. Acute coagulopathy of trauma: hypoperfusion induces systemic anticoagulation and hyperfibrinolysis. *J Trauma* 2008;64:1211-1217.
- 30) von Känel R, Dimsdale JE. Effects of sympathetic activation by adrenergic infusions on hemostasis in vivo. *Eur J Haematol* 2000;65:357-369.
- 31) Gando S, Sawamura A, Hayakawa M. Trauma, shock, and disseminated intravascular coagulation: lessons from the classical literature. *Ann Surg* 2011;254:10-19.
- 32) Otero A, Gómez-Gutiérrez M, Suárez F, Arnal F, Fernández-García A, Aguirrezabalaga J, et al. Liver transplantation from Maastricht category 2 non-heart-beating donors. *Transplantation* 2003;76:1068-1073.
- 33) Savier E, Dondero F, Vibert E, Eyraud D, Brisson H, Riou B, et al.; for Donation After Cardiac Death Study Group. First experience of liver transplantation with type 2 donation after cardiac death in France. *Liver Transpl* 2015;21:631-643.
- 34) Johansson PI, Stensballe J, Ostrowski SR. Shock induced endotheliopathy (SHINE) in acute critical illness - a unifying pathophysiological mechanism. *Crit Care* 2017;21:25.
- 35) Monbaliu D, Crabbé T, Roskams T, Fevery J, Verwaest C, Pirenne J. Livers from non-heart-beating donors tolerate short periods of warm ischemia. *Transplantation* 2005;79:1226-1230.
- 36) Monbaliu D, Libbrecht L, De Vos R, Vekemans K, Walter H, Liu Q, et al. The extent of vacuolation in non-heart-beating porcine donor liver grafts prior to transplantation predicts their viability. *Liver Transpl* 2008;14:1256-1265.
- 37) Li X, Elwell MR, Ryan AM, Ochoa R. Morphogenesis of post-mortem hepatocyte vacuolation and liver weight increases in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 2003;31:682-688.
- 38) Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000;290:1717-1721.
- 39) Doctor RB, Dahl RH, Salter KD, Fouassier L, Chen J, Fitz JG. ATP depletion in rat cholangiocytes leads to marked internalization of membrane proteins. *Hepatology* 2000;31:1045-1054.
- 40) Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 1993;82:3253-3258.
- 41) Senden NH, Jeunhomme TM, Heemskerk JW, Wagenvoord R, van't Veer C, Hemker HC, Buurman WA. Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* 1998;161:4318-4324.
- 42) Deepa PR, Varalakshmi P. Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity. *Chem Biol Interact* 2003;146:201-210.
- 43) Nakanuma Y. Tutorial review for understanding of cholangiopathy. *Int J Hepatol* 2012;2012:547840.
- 44) Oniscu GC, Randle LV, Muiesan P, Butler AJ, Currie IS, Perera MT, et al. In situ normothermic regional perfusion for controlled donation after circulatory death--the United Kingdom experience. *Am J Transplant* 2014;14:2846-2854.
- 45) Rojas-Peña A, Sall LE, Gravel MT, Cooley EG, Pelletier SJ, Bartlett RH, Punch JD. Donation after circulatory determination of death: the University of Michigan experience with extracorporeal support. *Transplantation* 2014;98:328-334.
- 46) De Carlis R, Di Sandro S, Lauterio A, Ferla F, Dell'Acqua A, Zanierato M, De Carlis L. Successful donation after cardiac death liver transplants with prolonged warm ischemia time using normothermic regional perfusion. *Liver Transpl* 2017;23:166-173.
- 47) Miñambres E, Suberviola B, Dominguez-Gil B, Rodrigo E, Ruiz-San Millan JC, Rodríguez-San Juan JC, Ballesteros MA. Improving the outcomes of organs obtained from controlled donation after circulatory death donors using abdominal normothermic regional perfusion. *Am J Transplant* 2017;17:2165-2172.
- 48) Urano T, Suzuki Y. Accelerated fibrinolysis and its propagation on vascular endothelial cells by secreted and retained tPA. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:208108.
- 49) Broomhead RH, Patel S, Fernando B, O'Beirne J, Mallett S. Resource implications of expanding the use of donation after circulatory determination of death in liver transplantation. *Liver Transpl* 2012;18:771-778.
- 50) Blasi A, Hessheimer AJ, Beltrán J, Pereira A, Fernández J, Balust J, et al. Liver transplant from unexpected donation after circulatory determination of death donors: a challenge in perioperative management. *Am J Transplant* 2016;16:1901-1908.
- 51) Pietersen LC, den Dulk AC, Braat AE, Putter H, Korkmaz KS, Baranski AG, et al. Flushing the liver with urokinase before transplantation does not prevent nonanastomotic biliary strictures. *Liver Transpl* 2016;22:420-426.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

En el primer estudio, se recogen datos de 62 potenciales donantes, realizándose un análisis tromboelastométrico en 33 de ellos (en los 29 casos restantes no se pudo realizar la tromboelastometría por motivos logísticos). La mayoría proceden de hombres con un IMC (índice de masa corporal) >25. Uno de ellos presentaba trombocitopenia congénita con 66.000 plaquetas al ingreso. Ninguno recibía tratamiento antiagregante; uno recibía tratamiento con acenocumarol por fibrilación auricular. Las maniobras de RCP avanzada se mantuvieron durante una mediana de 1 hora, y la muestra para tromboelastometría, fue extraída aproximadamente a los 90 minutos post-parada (rango 48-127 minutos).

En la analítica al ingreso, se observan niveles de hemoglobina y hematocrito dentro de la normalidad, con plaquetas en el límite inferior. Los tiempos de protrombina y tiempo de cefalina se encuentran alargados, indicando coagulopatía, con niveles de fibrinógeno dentro del rango de normalidad. De los 33 potenciales donantes, se trasplantaron 22 riñones y 5 hígados.

El análisis tromboelastométrico de los potenciales donantes muestra un patrón de hipocoagulabilidad en todos ellos, con un tiempo de formación alargado y una firmeza disminuida. Así mismo, todos los potenciales donantes muestran un patrón de hiperfibrinólisis, fulminante en 26 casos e intermedia en los 7 restantes. No se encuentra correlación entre el grado de lisis a los 30 minutos y la duración de las maniobras de RCP o el tiempo desde la parada cardíaca hasta la extracción de la muestra. Sí se ve una correlación inversa entre el grado de lisis a los 30 minutos y el pico de transaminasas (aspartato aminotransferasa –ASAT- y alanina aminotransferasa –ALAT-).

En el segundo estudio, durante la PRAN se observa una mejoría en los flujos de bomba de perfusión, flujo arterial y flujo portal en aquellos animales que recibieron heparina pre-parada frente a aquellos animales que no la recibieron. No se observan diferencias en el grupo en el que se administró tPA en comparación con el grupo control.

Durante el seguimiento, la supervivencia a los 5 días es del 83% en los grupos 1 y 2 (en los que no se administró heparina), y del 100% en el grupo 3 (al que se administró heparina antes de la PCR). Los grupos 1 y 2 presentan unos niveles más elevados de transaminasas (ASAT) y más bajos de tiempo de protrombina (TP) durante las primeras 72 horas del seguimiento, en comparación con el grupo 3. Durante el seguimiento, los niveles de gammaglutamil transferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (FA) también se mantienen más bajos en el grupo 3, aunque esta diferencia no alcanza significación estadística.

El análisis histológico permite observar la progresión de la lesión tisular a lo largo de las distintas fases del estudio. La lesión por isquemia-reperfusión es menor en aquellos animales pre-tratados con heparina, con una menor alteración de la arquitectura biliar, arteriolonecrosis y lesión de las glándulas peribiliares. En ninguno de los grupos se observan depósitos de fibrina significativos.

En cuanto a la expresión de los marcadores de activación endotelial e inflamación, hay una menor expresión de E-selectina, TNF e IL1- β en los animales que recibieron heparina, en el análisis realizado después de la reperfusión y durante el seguimiento, en comparación con los grupos que no recibieron heparina.

El uso de tromboelastometría a lo largo del estudio sirvió para evaluar la correcta dosificación de tPa en el grupo 2, y de heparina en el grupo 3.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1. ESTUDIO 1

En este primer estudio, la constatación de la existencia de un patrón de hiperfibrinólisis en todos los potenciales donantes en asistolia es un hallazgo muy interesante, puesto que deja de justificar la necesidad del uso de fibrinolíticos en los DA como método de prevención de complicaciones biliares.

Nuestros resultados, observados en una situación de PC no recuperada, se asemejan a los resultados observados en los estudios realizados por Scöchl y Viersen (18,17). En ellos, se recogían muestras de pacientes que sufrían una PC, ya fuera en el escenario de la parada o a su llegada al hospital. En el primer estudio, con muestras recogidas a los 6 minutos (RIC 3.5-9) se vio un patrón de hiperfibrinólisis en un 35.8% de los casos; y en el segundo estudio (muestras recogidas a su llegada al hospital, 42 ± 13 minutos), se vio en el 53% de los pacientes. Nosotros encontramos un patrón de hiperfibrinólisis en el 100% de los casos (fulminante en el 79% de ellos e intermedia en el 21%)⁴. El tiempo de recogida de las muestras en nuestro caso fue de 85 minutos (RIC 75-102). El hecho de que a tiempos de extracción más prolongados se dieran más casos de hiperfibrinólisis puede significar que a tiempos de isquemia caliente más prolongada, con mayor duración de la hipoperfusión tisular, mayor es el grado de fibrinólisis.

Para comprender mejor la fisiopatología que subyace a esta observación, nos basamos en los estudios que se han realizado en la coagulopatía del paciente traumático. La hiperfibrinólisis en éste se da en aproximadamente el 25% de los casos

⁴ La hiperfibrinólisis objetivada por tromboelastomería se definió como tal cuando se daba una lisis máxima del coágulo (ML) superior al 20% dentro de los primeros 60 minutos tras el inicio de la formación del mismo. Nos referíamos a hiperfibrinólisis intermedia cuando el coágulo se rompía pasados los primeros 30 minutos (pero antes de los 60), y fulminante cuando se rompía antes de los primeros 30 minutos.

a su llegada al hospital (26,59,60). Clásicamente, se consideraba que ésta era de consumo, habiéndose desencadenado tras una situación de hipercoagulabilidad previa (26,61,62).

Teniendo en cuenta el modelo celular de la coagulación (63), tras una primera fase de iniciación, se da la amplificación y propagación del coágulo. Es en esta fase en la que se da el mayor paso de protrombina a trombina, y de fibrinógeno a fibrina. Para contrarrestar la excesiva trombogénesis, la fase final es la que se conoce como fase de resolución o fibrinólisis (64). Esta evita la excesiva sobreproducción del coágulo. El principal mediador de la fibrinólisis es la plasmina, que facilita el paso de fibrina a productos de degradación de la fibrina (PDF). El paso de plasminógeno a plasmina se ve estimulado, a su vez, por el activador tisular del plasminógeno (tPA) (Figura 4).

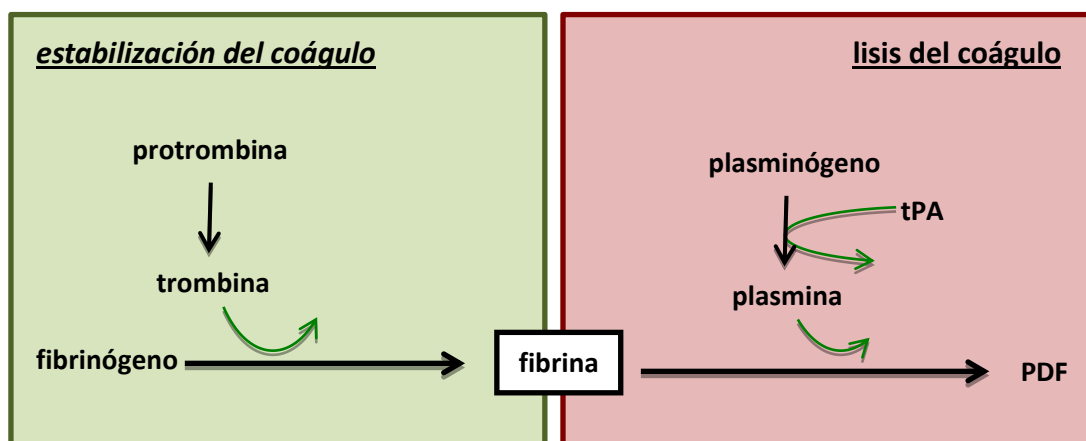


Figura 4: Tras la formación de trombina, que estimula a su vez el coágulo maduro con depósitos de fibrina; la fibrinólisis viene dada por la activación de plasminógeno a plasmina por parte del activador tisular del plasminógeno.

tPA: activador tisular del plasminógeno. PDF: productos de degradación de la fibrina.

Tradicionalmente se consideraba que esta activación del tPA venía dada en respuesta a la formación excesiva de trombina y la oclusión venosa (65), y que la coagulopatía del traumático venía dada por el nivel de lesión tisular asociada, así como por la acidosis, hipotermia y un factor dilucional (59).

No obstante, existen estudios que hablan una situación de hipocoagulabilidad independiente del traumatismo, debida fundamentalmente al grado de hipoperfusión tisular (23,66,67). En el estudio de Brohi, se realizó una analítica a aquellos pacientes politraumáticos que llegaban al hospital. En éstos se vio que los tiempos de protrombina (TP) y de cefalina (ttpa) eran independientes del nivel de consumo de factores de la coagulación, ya que la cantidad de trombina generada (inferida según sus fragmentos de protrombina, PF1 y PF2, encontrados) no alteraba dichos tiempos. La disminución de TP y el alargamiento del tiempo de cefalina sólo se vieron alterados cuando se daba hipoperfusión tisular, medida por el exceso de base. Varios estudios con resultados similares (26,68,69) han servido para definir la situación clínica conocida como coagulopatía aguda del traumático (ACoT en su acrónimo en inglés, *Acute Coagulopathy of Trauma*), en la que la hipocoagulabilidad e hiperfibrinólisis viene dada no tanto por una situación de consumo de factores, si no por una situación de perfusión inadecuada que estimula la salida de trombomodulina del endotelio. Ésta se une a la trombina y, de forma conjunta, el complejo trombina-trombomodulina activa la proteína C, inhibidora del Inhibidor del Activador del Plasminógeno (PAI). El PAI es a su vez inhibidor del tPA. Así pues, esta doble inhibición conlleva en última instancia una activación del tPA, cuya actividad se ve incrementada por partida doble, ya que la hipoperfusión también estimula la salida directa de tPA de la célula endotelial (70,71) (*Figura 5*).

Otra hipótesis de porqué se produce esta situación, independientemente del grado de consumo, es la que se refiere a la lesión del glicocálix. Se basa en que, secundariamente al denudamiento del glicocálix, se secretan sustancias heparinoides (heparan sulfato, condroitín sulfato) que incrementan la eficacia del tándem trombina-trombomodulina (70)(72)(73).

se comparaba la administración de tPA en 85 DA con una cohorte histórica de 33 trasplantes en los que no se había administrado dicho tratamiento. De modo similar al estudio anterior, se observó una menor incidencia de lesiones biliares no anastomóticas en el grupo tratado (16.5%) *versus* el no tratado (33.3%) ($p=0.07$). No obstante, nuevamente se trata de un estudio en el que, por una parte, se administraba heparina pre-parada cardíaca en los donantes y, por otra, se comparaban los resultados del grupo tratado con una cohorte histórica, con lo cual, las mejoras técnicas podrían haber determinado la mejor viabilidad de los injertos en el grupo de estudio. Los resultados son similares al tercer estudio, de Kubal y cols. La crítica más importante de estos dos estudios es la de que el uso de heparina pre-parada cardíaca contravendría la necesidad de administrar fibrinolítico *a posteriori*, dado que la heparina previene la formación de trombos, con lo cual no debería haber depósitos de fibrina que lisar.

En estudios experimentales realizados en un modelo murino (13) y canino (12) en los cuales se administró fibrinolítico (estreptoquinasa en el primer caso, uroquinasa en el segundo), se determinó que se producía una mejora en la integridad estructural y del funcionalismo del injerto, pero no aparecían depósitos de fibrina post-parada cardíaca. El mismo resultado se reprodujo en un estudio realizado en humanos (16) en el que se administró estreptoquinasa para evaluar la mejora del funcionalismo renal. Además, en los tres estudios se administró heparina pre parada cardíaca que, nuevamente, iría en contra de la necesidad de administrar fibrinolítico post parada.

En un estudio más reciente (31), se analizó la incidencia real de depósitos de fibrina en la microvasculatura hepática. Se recogieron un total de 94 biopsias procedentes de 16 DA, y se analizaron 282 secciones en distintos tiempos. Sólo en 4 de las 282 secciones se observó, mediante tinción específica de Lendrum, la presencia de depósitos de fibrina. Dentro del mismo estudio, se compararon las biopsias procedentes de los receptores que desarrollaron estenosis biliares no anastomóticas durante el seguimiento, ya fueran de injertos procedentes de DA o de DME. Se

observó que no había una mayor incidencia de microtrombos en aquellos injertos procedentes de DA con respecto a los de DME , ni en aquellos injertos que desarrollaban estenosis biliares no anastomóticas frente a los que no. En otro estudio (32), en el que se incluyeron 128 pacientes trasplantados en los que se realizaron biopsias hepáticas del injerto en el momento del implante, sólo se encontraron microtrombos en un 2.7% de los hígados que posteriormente desarrollaron colangiopatía isquémica.

Después de considerar toda la información previa, junto a la constatación del estado de hiperfibrinólisis observada en nuestros pacientes a su llegada al hospital, bien sea mediada directamente por una situación de hipoperfusión o siendo secundaria a una coagulopatía de consumo (62)(73)(76), podría inferirse que el uso de fibrinolíticos para lisar los posibles trombos generados durante el periodo de isquemia caliente no está justificado.

Uno de los objetivos secundarios de nuestro estudio clínico era determinar si las alteraciones de la coagulación objetivadas en la tromboelastometría se correlacionaban con los marcadores de hipoperfusión y viabilidad del injerto. A nivel hepático, nuestros resultados mostraron una correlación inversa entre el tiempo de inicio de la lisis y el pico de transaminasas (AST) a la llegada al hospital (en la primera analítica), es decir, a menor estabilidad del coágulo según el análisis por ROTEM, mayor pico de transaminasas. En relación a la utilización de los riñones, de los 33 potenciales donantes renales fueron efectivos 19, y de ellos se trasplantaron 22 órganos. En este caso, lo que observamos es que a una mayor estabilidad del coágulo (menos porcentaje de lisis a los 30 minutos) había un mayor flujo de la arteria renal y unas resistencias menores durante el periodo de PRAN. Aunque nuestro estudio no estaba específicamente diseñado con este objetivo, podría considerarse el uso de tromboelastometría para evaluar la potencial viabilidad de los injertos provenientes de DA.

7.2. ESTUDIO 2

Lo más interesante de nuestro segundo estudio son los resultados referentes al efecto citoprotector de la heparina, al margen de su efecto anticoagulante. Además, los resultados de este estudio corroboran lo que ya observamos en el primero, es decir, la no-justificación, con la evidencia actual, del tratamiento con fibrinolíticos en donantes en asistolia después de la parada cardíaca.

Realizamos este estudio experimental en un modelo de animal grande, ya previamente validado por nuestro grupo (22). Se reprodujo la situación clínica de los DA tipo 2 para valorar la verdadera necesidad del uso de fibrinolítico tras la parada cardíaca, y su efecto en el funcionalismo hepático. La situación de los DA tipo 2 es una situación no controlada, que suele implicar un tiempo de isquemia caliente más o menos largo, desde la inesperada parada cardio-respiratoria hasta el momento de la extracción del órgano y el inicio de su preservación fría. La realización de una perfusión abdominal normotérmica previa a este periodo de isquemia fría ha demostrado, tanto a nivel experimental (10,55,77), como en la clínica humana (78), que es un método efectivo para la mejora de la función del injerto, tanto hepático como renal. La técnica de PRAN determina un proceso de recuperación energética a nivel celular, por el cual la célula obtiene las condiciones fisiológicas y el substrato necesario para su mejora antes del almacenamiento en frío y el implante en el receptor (79,80,81). En nuestro centro y desde el año 1994, se ha instaurado un protocolo de obtención de órganos procedentes de DA tipo 2 con PRAN (11).

Cuando se compara con la sangre humana, la sangre porcina contiene una mayor cantidad de fibrinógeno, plaquetas, y factor inhibidor del plasminógeno; y una menor concentración de plasminógeno. No obstante, el modelo porcino se ha validado como modelo para estudiar la coagulación y la fibrinólisis (82), incluso mediante la tromboelastometría (83). En nuestro caso, el uso del análisis tromboelastométrico en

todas las fases del proceso nos sirvió para garantizar la adecuada dosis de fármaco, ya fuera fibrinolítico post PCR, o heparina pre-PCR.

La administración de heparina pre-PCR nos sirvió para analizar su efecto en los DA tipo 3 (controlados) en nuestro medio ⁵ (84). Aunque los DA controlados no presentan una situación de isquemia caliente tan evidente como la que se da en los DA tipo 2; en la fase agónica sí se da una progresiva hipotensión hasta la PCR. Es en esta fase de hipotensión extrema, con hipoperfusión tisular, cuando se desencadena la coagulopatía secundaria a la misma (23,66,67). Se cree que esto podría ser debido a un mecanismo de protección del organismo que, ante una situación de escaso aporte de oxígeno, pretende garantizar su llegada a nivel tisular mediante la lisis de cualquier trombo que se pudiera formar (70). Se ha descrito esta situación como 'endotelopatía inducida por shock' (SHINE, del inglés 'shock induced endotelopathy'), en la que el objetivo es mejorar la perfusión cuando la oxigenación está severamente afectada (85).

Esta teoría concuerda con nuestros resultados, y con lo visto previamente en el estudio en clínica humana: tras someter a los animales a 60 minutos de parada cardíaca, se realizó una primera biopsia hepática para analizar la posible aparición de depósitos de fibrina (86). En ninguna de las dos posibles situaciones que se daban en este momento (animales tratados con heparina pre-PCR o no) se vio la aparición de depósitos de fibrina. Recordemos que ya en los estudios realizados en animales (12,13) o en humanos (16,31,77) no se describía la aparición de depósitos de fibrina.

Por su parte, en aquellos animales a los que se les había administrado heparina previo a la parada cardíaca, se vio un mantenimiento de la estructura hepática mejor que aquella de los animales en los que no se había administrado heparina pre-parada. La lesión del epitelio biliar es común durante el periodo de isquemia, siendo el

⁵ Según la legislación vigente en cada país, se permite la administración de heparina pre-parada cardíaca antes de la limitación del esfuerzo terapéutico para la donación de órganos en DA tipo III.

colangiocito especialmente sensible a la hipoxia celular (8,32,87-89). Las series son variables, pero la lesión biliar post-trasplante ocurre en hasta el 60% de los casos (51). Distintos estudios (32,90-92) han analizado con mayor detenimiento la fisiopatología a nivel celular, y el momento de aparición de la lesión. A partir de análisis tisular, en distintos momentos, se observa que dicha lesión ya se encuentra presente tras el tiempo de isquemia fría, sin necesidad de que se dé la reperfusión para ver una alteración de la arquitectura biliar del tejido conectivo. El análisis histológico de la lesión hepática por isquemia-reperfusión se basó en el índice de Suzuki (93,94), evaluándose el grado de congestión hepática, vacuolización hepatocelular y necrosis. Dicho índice de severidad de la lesión oscila entre el 0 y el 4, siendo el 0 la ausencia total de lesión, y el 4 un grado de lesión severa, con más del 60% de necrosis. En nuestro estudio, la congestión y la vacuolización eran similares en todos los grupos post parada, pero había una menor necrosis en el grupo que había sido previamente tratado con heparina. Para evaluar específicamente la lesión a nivel del colangiocito se realizó el análisis inmunohistoquímico con CK-19, con resultados similares: en aquellos animales previamente tratados con heparina, las biopsias a los 5 días post trasplante mostraron una menor alteración de la estructura del colangiocito, con mantenimiento de la estructura biliar: una monocapa uniforme de células cuboideas (88).

Los marcadores inflamatorios (IL1-beta, IL6, TNF y e-selectina) analizados a lo largo de los tiempos de estudio también mostraron una mayor elevación en aquellos animales que no habían sido tratados con heparina en comparación con aquellos que sí fueron tratados.

Finalmente, si analizamos el funcionamiento del injerto a lo largo de los 5 días de seguimiento postoperatorio, vemos que hubo una más rápida recuperación en aquellos injertos que habían recibido heparina, puesto que el pico de transaminasas era menor, y el incremento de los valores del TP también se daban con mayor velocidad.

La heparina no sólo tiene un efecto de mejora de la función hepática por una disminución de formación del coágulo (33,95). Diversos estudios han demostrado que la administración de heparina (96-100) tiene efectos citoprotectores independientes a su efecto anticoagulante (34). En un estudio murino experimental realizado por Taha en el 2009 (97) se vio que el uso de heparina antes de la reperfusión disminuía las lesiones centrolobulillares en el hígado de los animales pre-tratados. Existen otros estudios realizados con objetivos similares en distintos órganos, en los que se ve una menor lesión inflamatoria en aquellos órganos tratados con heparina versus aquellos en los que no se administró. Aunque se podría argüir que el efecto citoprotector de la heparina en estos casos viene dado por su efecto preventivo de la formación del trombo, que a su vez disminuiría la lesión por isquemia/reperfusión; se cree que la heparina tiene un efecto más directo al disminuir la expresión de moléculas de adhesión celular (98), disminuyendo la infiltración por neutrófilos y la lesión inflamatoria directa. Recordemos que la lesión por isquemia/reperfusión incluye una respuesta inflamatoria excesiva (41-50); por lo que este efecto de la heparina justificaría su uso en esta situación. Otros estudios sugieren que la heparina y sus derivados actúan eliminando a los radicales libres e inhibiendo la apoptosis (101-105).

Para finalizar, recordemos que en ninguno de los casos en los que se administró fibrinolítico post parada cardíaca se vieron las mejoras que sí se vieron en los animales pre-tratados con heparina. Este hecho, junto con la ausencia de depósitos de fibrina post-parada cardíaca, asociado al potencial riesgo que representa la administración de fibrinolítico, al incrementar la posibilidad de hemorragia en el postoperatorio, determina que la recomendación de la administración de dichos agentes no pueda justificarse.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

Los injertos hepáticos procedentes de donación en asistolia tienen una menor viabilidad que los procedentes de donantes en muerte encefálica, con una mayor incidencia de estenosis biliar de origen isquémico. El hecho de que estas complicaciones biliares sean debidas a la formación de microtrombos en el plexo peribiliar puede ponerse en entredicho, dado que no se ha demostrado la existencia de los mismos en injertos hepáticos tras la parada cardíaca, ni una mayor incidencia de trombos en aquellos injertos que desarrollan estenosis biliares de origen isquémico frente a aquellos injertos que no las desarrollaron.

En los donantes en asistolia se desarrolla un estado en el que, debido a la hipoperfusión, se estimula la fibrinólisis endógena. Dicha fibrinólisis se genera a través de la cascada de la proteína C y la secreción de tPA, y se relaciona directamente con el tiempo de isquemia caliente. Por lo tanto, la fibrinólisis medida por tromboelastometría podría correlacionarse con el grado de viabilidad del injerto, y servir como marcador indirecto de la calidad del mismo.

La administración de heparina antes de la parada cardíaca ha demostrado su utilidad para mejorar tanto la efectividad de la aplicación de la PRAN como la viabilidad y evolución del injerto post-trasplante.

El uso de los agentes fibrinolíticos para la prevención de la aparición de las estenosis biliares de origen isquémico no está justificada en el momento actual.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. ONT. Memoria Trasplante Hepático 2016. 2017 Jun 9;:1–22.
2. Fondevila C, Jiménez-Galanes S, García-Valdecasas JC. ¿Cómo incrementar el número de trasplantes hepáticos? *Gastroenterología y Hepatología*. 2009 Aug;32(7):519–30.
3. Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP. Categories of non-heart-beating donors. *TPS*. 1995 Oct;27(5):2893–4.
4. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp Mol Pathol*. 2003 Apr;74(2):86–93.
5. Flores E, Fondevila C, Fuster J, Garcia-Valdecasas JC. Retrasplante en donante a corazón parado. Lesiones isquémicas de la vía biliar. Programa controlado. *Medicina Clínica*. Barcelona; 2011 Apr 29;12(3):53–6.
6. Haring TR, Nguyen NTT, Cotton RT, Guiteau JJ, Salas de Armas IA, Liu H, et al. Liver transplantation with donation after cardiac death donors: a comprehensive update. *J Surg Res*. 2012 Nov;178(1):502–11.
7. Maheshwari A, Maley W, Li Z, Thuluvath PJ. Biliary complications and outcomes of liver transplantation from donors after cardiac death. *Liver Transpl*. 2007 Nov 30;13(12):1645–53.
8. Monbaliu D, Pirenne J, Talbot D. Liver transplantation using Donation after Cardiac Death donors. 2012 Feb;56(2):474–85.
9. Valero R, García-Valdecasas JC, Tabet J, Taurá P, Rull R, Beltran J, et al. Hepatic blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling as viability predictors in non-heart-beating donor pigs. *Transplantation*. 1998 Jul 27;66(2):170–6.
10. Net M, Valero R, Almenara R, Barros P, Capdevila L, Lopez-Boado MA, et al. The effect of normothermic recirculation is mediated by ischemic preconditioning in NHBD liver transplantation. *Am J Transplant*. Munksgaard International Publishers; 2005 Oct;5(10):2385–92.
11. Fondevila C, Hessheimer AJ, Flores E, Ruiz A, Mestres N, Calatayud D, et al. Applicability and results of Maastricht type 2 donation after cardiac death liver transplantation. *Am J Transplant*. Wiley Online Library; 2012;12(1):162–70.

12. Sugimoto R, Date H, Sugimoto S, Okazaki M, Aokage K, Inokawa H, et al. Post-mortem Administration of Urokinase in Canine Lung Transplantation From Non-heart-beating Donors. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Dec 31;25(9):1148–53.
13. Minor T, Hachenberg A, Tolba R, Pauleit D, Akbar S. Fibrinolytic preflush upon liver retrieval from non-heart beating donors to enhance postpreservation viability and energetic recovery upon reperfusion. *Transplantation*. 2001 Jun 27;71(12):1792–6.
14. Hashimoto K, Eghtesad B, Gunasekaran G, Fujiki M, Uso TD, Quintini C, et al. Use of tissue plasminogen activator in liver transplantation from donation after cardiac death donors. *Am J Transplant*. 2010 Nov 30;10(12):2665–72.
15. Seal JB, Bohorquez H, Reichman T, Kressel A, Ghanekar A, Cohen A, et al. Thrombolytic Protocol Minimizes Ischemic-Type Biliary Complications in Liver Transplantation from Donation-After-Circulatory Death Donors. *Liver Transpl*. 2014 Dec 26;21(3):321–8.
16. Gok MA, Shenton BK, Buckley PE, Peaston R, Cornell C, Soomro N, et al. How to improve the quality of kidneys from non-heart-beating donors: a randomised controlled trial of thrombolysis in non-heart-beating donors. *Transplantation*. 2003 Dec 26;76(12):1714–9.
17. Viersen VA, Greuters S, Korfage AR, Van der Rijst C, Van Bochove V, Nanayakkara PW, et al. Hyperfibrinolysis in out of hospital cardiac arrest is associated with markers of hypoperfusion. *Resuscitation*. 2012 Nov 30;83(12):1451–5.
18. Schöchl H, Cadamuro J, Seidl S, Franz A, Solomon C, Schlimp CJ, et al. Hyperfibrinolysis is common in out-of-hospital cardiac arrest: results from a prospective observational thromboelastometry study. *Resuscitation*. 2013 Mar 31;84(4):454–9.
19. Adrie C, Monchi M, Laurent I, Um S, Yan SB, Thuong M, et al. Coagulopathy After Successful Cardiopulmonary Resuscitation Following Cardiac Arrest Implication of the Protein C Anticoagulant Pathway. *Journal of the American College of Cardiology*. *Am Coll Cardio Found*; 2005;46(1):21–8.
20. Ganter MT, Hofer CK. Coagulation monitoring: current techniques and clinical use of viscoelastic point-of-care coagulation devices. *Anesthesia & Analgesia*. 2008 Apr 30;106(5):1366–75.
21. Foley DP. Impact of donor warm ischemia time on outcomes after donation after cardiac death liver transplantation. *Liver Transpl*. 2014 May;20(5):509–11.

22. Fondevila C, Hessheimer AJ, Flores E, Vendrell M, Muñoz J, Escobar B, et al. Step-by-Step Guide for a Simplified Model of Porcine Orthotopic Liver Transplant. *Journal of Surgical Research*. 2011 Apr 30;167(1):0–0.
23. Brohi K, Cohen MJ, Ganter MT, Matthay MA, Mackersie RC, Pittet JF. Acute traumatic coagulopathy: initiated by hypoperfusion: modulated through the protein C pathway? *Annals of Surgery*. 2007 May;245(5):812–8.
24. Verhagen HJ, Heijnen-Snyder GJ, Pronk A, Vroom TM, van Vroonhoven TJ, Eikelboom BC, et al. Thrombomodulin activity on mesothelial cells: perspectives for mesothelial cells as an alternative for endothelial cells for cell seeding on vascular grafts. *Br J Haematol*. 1996 Dec;95(3):542–9.
25. Rezaie AR. Vitronectin functions as a cofactor for rapid inhibition of activated protein C by plasminogen activator inhibitor-1. Implications for the mechanism of profibrinolytic action of activated protein C. *J Biol Chem*. 2001 May 11;276(19):15567–70.
26. Brohi K, Cohen MJ, Ganter MT, Schultz MJ, Levi M, Mackersie RC, et al. Acute coagulopathy of trauma: hypoperfusion induces systemic anticoagulation and hyperfibrinolysis. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 2008 Apr 30;64(5):1211–7.
27. Schneiderman J, Adar R, Savion N. Changes in plasmatic tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor activity during acute arterial occlusion associated with severe ischemia. *Thrombosis Research*. 1991 Jun 1;62(5):401–8.
28. Kooistra T, Schrauwen Y, Arts J, Emeis JJ. Regulation of endothelial cell t-PA synthesis and release. *Int J Hematol*. 1994 Jun;59(4):233–55.
29. Känel von R, Dimsdale JE. Effects of sympathetic activation by adrenergic infusions on hemostasis in vivo. *Eur J Haematol*. 2000 Nov 30;65(6):357–69.
30. Gando S, Sawamura A, Hayakawa M. Trauma, shock, and disseminated intravascular coagulation: lessons from the classical literature. *Annals of Surgery*. 2011 Jun 30;254(1):10–9.
31. Verhoeven CJ, Simon TC, de Jonge J, Doukas M, Biermann K, Metselaar HJ, et al. Liver grafts procured from donors after circulatory death have no increased risk of microthrombi formation. *Liver Transpl*. 2016 Aug;:1–32.
32. op den Dries S, Westerkamp AC, Karimian N, Gouw ASH, Bruinsma BG, Markmann JF, et al. Injury to peribiliary glands and vascular plexus before liver transplantation predicts formation of non-anastomotic biliary strictures. *Journal of Hepatology*. 2014 Jun;60(6):1172–9.

33. Gedik HS, Korkmaz K, Erdem H. Protective effect of heparin in the end organ ischemia/reperfusion injury of the lungs and heart. *Journal of ...* 2012;7(1):3191.
34. Page C. Heparin and Related Drugs: Beyond Anticoagulant Activity. *ISRN Pharmacology*. 2013;2013(6):1–13.
35. Adam R, Hoti E. Liver Transplantation: The Current Situation. *Semin Liver Dis*. 2009 Feb 23;29(01):003–18.
36. Kim WR, Lake JR, Smith JM, Schladt DP, Skeans MA, Harper AM, et al. OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Liver. *Am J Transplant*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2018 Jan;18 Suppl 1:172–253.
37. Hessheimer AJ, Domínguez-Gil B, Fondevila C, Matesanz R. Controlled Donation After Circulatory Determination of Death in Spain. *Am J Transplant*. 2016 Jul;16(7):2239–40.
38. Fondevila C, Hessheimer AJ, Ruiz A, Calatayud D, Ferrer J, Charco R, et al. Liver transplant using donors after unexpected cardiac death: novel preservation protocol and acceptance criteria. *Am J Transplant*. 2007 Jun 30;7(7):1849–55.
39. Morrissey PE, Monaco AP. Donation after circulatory death: current practices, ongoing challenges, and potential improvements. *Transplantation*. 2014 Feb 15;97(3):258–64.
40. Deshpande R, Heaton N. Can non-heart-beating donors replace cadaveric heart-beating liver donors? 2006 Oct;45(4):499–503.
41. Guan L-Y. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. *WJGS*. 2014;6(7):122–8.
42. Cutrin JC, Cantino D, Biasi F, Chiarpotto E, Salizzoni M, Andorno E, et al. Reperfusion damage to the bile canaliculi in transplanted human liver. *Hepatology*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1996 Nov;24(5):1053–7.
43. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Jan;284(1):G15–26.
44. Teoh NC, FARRELL GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2003;18(8):891–902.
45. Cannistrà M, Ruggiero M, Zullo A, Gallelli G, Serafini S, Maria M, et al. Hepatic ischemia reperfusion injury: a systematic review of literature and the role of

- current drugs and biomarkers. *International Journal of Surgery*. 2016 May;:1–14.
46. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischemia-Reperfusion Injury of the Liver. Second Edition. *Transplantation of the Liver*. Elsevier Inc; 2005. 12 p.
 47. Vardanian AJ, Busuttil RW. Molecular mediators of liver ischemia and reperfusion injury: a brief review. *Molecular Medicine*. 2008;14(5-6):1.
 48. Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*. 1998;5(4):402–8.
 49. Ma Y, Wang G-D, Wu L-W, Hu R-D. Dynamical changing patterns of histological structure and ultrastructure of liver graft undergoing warm ischemia injury from non-heart-beating donor in rats. *World J Gastroenterol*. 2006 Aug 14;12(30):4902–5.
 50. Abt PL, Praestgaard J, West S, Hasz R. Donor hemodynamic profile presages graft survival in donation after cardiac death liver transplantation. *Liver Transpl*. 2014 Feb;20(2):165–72.
 51. Foley DP, Fernandez LA, Levenson G, Anderson M, Mezrich J, Sollinger HW, et al. Biliary complications after liver transplantation from donation after cardiac death donors: an analysis of risk factors and long-term outcomes from a single center. *Annals of Surgery*. 2011 Mar 31;253(4):817–25.
 52. Abt P, Crawford M, Desai N, Markmann J, Olthoff K, Shaked A. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors: an increased incidence of biliary complications. *Transplantation*. 2003 May 27;75(10):1659–63.
 53. Fung JJ, Egthesad B, Patel-Tom K. Using livers from donation after cardiac death donors--a proposal to protect the true Achilles heel. *Liver Transpl*. 2007 Nov 30;13(12):1633–6.
 54. de Vera ME, Lopez-Solis R, Dvorchik I, Campos S, Morris W, Demetris AJ, et al. Liver transplantation using donation after cardiac death donors: long-term follow-up from a single center. *Am J Transplant*. 2009 Apr;9(4):773–81.
 55. Fondevila C, Hessheimer AJ, Maathuis M-HJ, Muñoz J, Taura P, Calatayud D, et al. Superior Preservation of DCD Livers With Continuous Normothermic Perfusion. *Annals of Surgery*. 2011 Dec;254(6):1000–7.
 56. Böttiger BW, Motsch J, Böhrer H, Böker T, Aulmann M, Nawroth PP, et al. Activation of blood coagulation after cardiac arrest is not balanced adequately by activation of endogenous fibrinolysis. *Circulation*. 1995 Oct 31;92(9):2572–

- 8.
57. Böttiger BW, Martin E. Thrombolytic therapy during cardiopulmonary resuscitation and the role of coagulation activation after cardiac arrest. *Current Opinion in Critical Care*. 2001 May 31;7(3):176–83.
 58. Gando S, Kameue T, Nanzaki S, Nakanishi Y. Massive fibrin formation with consecutive impairment of fibrinolysis in patients with out-of-hospital cardiac arrest. *Thromb Haemost*. 1997 Feb;77(2):278–82.
 59. Brohi K, Singh J, Heron M, Coats T. Acute traumatic coagulopathy. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 2003 Jun;54(6):1127–30.
 60. MacLeod JBA, Lynn M, McKenney MG, Cohn SM, Murtha M. Early coagulopathy predicts mortality in trauma. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 2003 Jul;55(1):39–44.
 61. Sawamura A, Hayakawa M, Gando S, Kubota N, Sugano M, Wada T, et al. Disseminated intravascular coagulation with a fibrinolytic phenotype at an early phase of trauma predicts mortality. *Thrombosis Research*. 2009 Nov;124(5):608–13.
 62. Gando S, Otomo Y. Local hemostasis, immunothrombosis, and systemic disseminated intravascular coagulation in trauma and traumatic shock. *Crit Care*. 2015;19(1):72.
 63. Pérez-Gómez F, Bover R. [The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage]. *Rev Esp Cardiol*. 2007 Dec;60(12):1217–9.
 64. Adams R, Bird RJ. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology . Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology*. 2009;14:462–70.
 65. Szymanski LM, Pate RR, Durstine JL. Effects of maximal exercise and venous occlusion on fibrinolytic activity in physically active and inactive men. *J Appl Physiol*. 1994 Nov;77(5):2305–10.
 66. Hess JR, Brohi K, Dutton RP, Hauser CJ, Holcomb JB, Kluger Y, et al. The coagulopathy of trauma: a review of mechanisms. *J Trauma*. 2008 Oct;65(4):748–54.
 67. Jansen JO, Scarpelini S, Pinto R, Tien HC, Callum J, Rizoli SB. Hypoperfusion in severely injured trauma patients is associated with reduced coagulation factor activity. *J Trauma*. 2011 Nov;71(5 Suppl 1):S435–40.
 68. Niles SE, McLaughlin DF, Perkins JG, Wade CE, Li Y, Spinella PC, et al. Increased

- mortality associated with the early coagulopathy of trauma in combat casualties. *J Trauma*. 2008 Jun;64(6):1459–63–discussion1463–5.
69. Simmons RL, Collins JA, Heisterkamp CA, Mills DE, Andren R, Phillips LL. Coagulation disorders in combat casualties. I. Acute changes after wounding. II. Effects of massive transfusion. 3. Post-resuscitative changes. *Annals of Surgery*. Lippincott, Williams, and Wilkins; 1969 Apr;169(4):455–82.
 70. Walsh M, Shreve J, Thomas S, Moore E, Moore H, Hake D, et al. Fibrinolysis in Trauma: “Myth,” “Reality,” or “Something in Between.” *Semin Thromb Hemost*. Thieme Medical Publishers; 2017 Mar 2;43(02):200–12.
 71. Hayakawa M. Pathophysiology of trauma-induced coagulopathy: disseminated intravascular coagulation with the fibrinolytic phenotype. *J Intensive Care*. *BioMed Central*; 2017;5(1):14.
 72. Dobson GP, Letson HL, Sharma R, Sheppard FR, Cap AP. Mechanisms of early trauma-induced coagulopathy: The clot thickens or not? *J Trauma Acute Care Surg*. 2015 Aug;79(2):301–9.
 73. Johansson PI, Ostrowski SR. Acute coagulopathy of trauma: Balancing progressive catecholamine induced endothelial activation and damage by fluid phase anticoagulation. *Medical Hypotheses*. Elsevier Ltd; 2010 Dec 1;75(6):564–7.
 74. Kubal C, Mangus R, Fridell J, Saxena R, Rush N, Wingler M, et al. Optimization of Perioperative Conditions to Prevent Ischemic Cholangiopathy in Donation After Circulatory Death Donor Liver Transplantation. *Transplantation*. 2016 Aug;100(8):1699–704.
 75. Fujita S, Mizuno S, Fujikawa T, Reed AI, Kim RD, Howard RJ, et al. Liver transplantation from donation after cardiac death: a single center experience. *Transplantation*. 2007 Jul 14;84(1):46–9.
 76. Madurska MJ. Fibrinolysis in trauma: a review. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. 1st ed. Springer Berlin Heidelberg; 2017 Sep 16;0(0):0–0.
 77. op den Dries S, Karimian N, Westerkamp AC, Sutton ME, Kuipers M, Wiersema-Buist J, et al. Normothermic machine perfusion reduces bile duct injury and improves biliary epithelial function in rat donor livers. *Liver Transpl*. 2016 Jun 24;22(7):994–1005.
 78. op den Dries S, Karimian N, Sutton ME, Westerkamp AC, Nijsten MWN, Gouw ASH, et al. Ex vivo Normothermic Machine Perfusion and Viability Testing of Discarded Human Donor Livers. *Am J Transplant*. 2013 Mar 6;13(5):1327–35.

79. González FX, García-Valdecasas JC, López-Boado MA, Tabet J, Net M, Grande L, et al. Adenine nucleotide liver tissue concentrations from non-heart-beating donor pigs and organ viability after liver transplantation. *TPS*. 1997 Dec;29(8):3480–1.
80. García-Valdecasas JC, Tabet J, Valero R, Taurá P, Rull R, García F, et al. Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental animal model. *Transpl Int*. 1998;11(6):424–32.
81. Imber CJ, St Peter SD, Lopez de Cenarruzabeitia I, Pigott D, James T, Taylor R, et al. Advantages of normothermic perfusion over cold storage in liver preservation. *Transplantation*. 2002 Mar 15;73(5):701–9.
82. Münster A-MB, Olsen AK, Bladbjerg E-M. Usefulness of human coagulation and fibrinolysis assays in domestic pigs. *Comp Med*. 2002 Feb;52(1):39–43.
83. Velik-Salchner C, Schnürer C, Fries D, Müssigang PR, Moser PL, Streif W, et al. Normal values for thrombelastography (ROTEM) and selected coagulation parameters in porcine blood. *Thrombosis Research*. 2006;117(5):597–602.
84. ONT. Documento de Consenso: Donación en Asistolia en España: Situación Actual y Recomendaciones. 2012 Mar 30;:1–205.
85. Johansson PI, Stensballe J, Ostrowski SR. Shock induced endotheliopathy (SHINE) in acute critical illness - a unifying pathophysiologic mechanism. *Crit Care*. 1st ed. BioMed Central; 2017 Feb 9;21(1):25.
86. Goeijenbier M, van Gorp EC, Van den Brand JM, Stittelaar K, Bakhtiari K, Roelofs JJ, et al. Activation of coagulation and tissue fibrin deposition in experimental influenza in ferrets. *BMC Microbiol*. 2014 May 30;14(1):1–12.
87. Foley DP, Fernandez LA, Levenson G, Chin LT, Krieger N, Cooper JT, et al. Donation After Cardiac Death. *Annals of Surgery*. 2005 Nov;242(5):724–31.
88. Nakanuma Y. Tutorial review for understanding of cholangiopathy. *Int J Hepatol*. Hindawi; 2012;2012:547840.
89. Doctor RB, Dahl RH, Salter KD, Fouassier L, Chen J, Fitz JG. ATP depletion in rat cholangiocytes leads to marked internalization of membrane proteins. *Hepatology*. Wiley-Blackwell; 2000 May;31(5):1045–54.
90. Brunner SM, Junger H, Ruemmele P, Schnitzbauer AA, Doenecke A, Kirchner GI, et al. Bile duct damage after cold storage of deceased donor livers predicts biliary complications after liver transplantation. *Journal of Hepatology*. 2013 Jun;58(6):1133–9.
91. Karimian N, Weeder PD, Bomfati F, Gouw ASH, Porte RJ. Preservation injury of

the distal extrahepatic bile duct of donor livers is representative for injury of the intrahepatic bile ducts. *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver; 2015 Jul 1;63(1):284–7.

92. Hansen T, Hollemann D, Pitton MB, Heise M, Hoppe-Lotichius M, Schuchmann M, et al. Histological examination and evaluation of donor bile ducts received during orthotopic liver transplantation—a morphological clue to ischemic-type biliary lesion? *Virchows Arch*. Springer-Verlag; 2012 May 17;461(1):41–8.
93. Suzuki S, Nakamura S, Koizumi T, Sakaguchi S, Baba S, Muro H, et al. The beneficial effect of a prostaglandin I₂ analog on ischemic rat liver. *Transplantation*. 1991 Dec;52(6):979–83.
94. Datta G. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: Insights from transgenic knockout models. *WJG*. 2013;19(11):1683–16.
95. Xu X, Dai Y. Heparin: an intervenor in cell communication. *J Cell Mol Med*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2010 Jan;14(1-2):175–80.
96. Yener AM, ek MCNI, Gen SB, zkan T, Dogan E, Bilgin BLA, et al. Protective role of heparin in the injury of the liver and kidney on the experimental model of ischemia/reperfusion. *Journal of Cardiothoracic Surgery*. *Journal of Cardiothoracic Surgery*; 2014 Feb 17;9(1):1–7.
97. Taha MO, Gonçalves PFZRA, Vidigal ROG, Sacchi GPS, Pinheiro FG, Brandão LSG, et al. Protective effects of heparin on hepatic ischemia and reperfusion lesions in rabbits. *TPS*. 2009 Apr;41(3):812–5.
98. Kouretas PC, Kim YD, Cahill PA, Myers AK, To LN, Wang YN, et al. Nonanticoagulant heparin prevents coronary endothelial dysfunction after brief ischemia-reperfusion injury in the dog. *Circulation*. 1999 Mar 2;99(8):1062–8.
99. Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood*. 1993 Dec 1;82(11):3253–8.
100. Deepa PR, Varalakshmi P. Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity. *Chem Biol Interact*. 2003 Oct 25;146(2):201–10.
101. Fuh KC, Meneshian A, Patel CB, Takiar V, Bulkley GB. Signal transduction by reactive oxygen species: alternative paradigms for signaling specificity. *Surgery*. 2002 Jun;131(6):601–12.
102. Samama MM, Desnoyers PC, Conard J, Bousser MG. Acute ischemic stroke and

- heparin treatments. *Thromb Haemost.* 1997 Jul;78(1):173–9.
103. Kay R, Wong KS, Yu YL, Chan YW, Tsoi TH, Ahuja AT, et al. Low-molecular-weight heparin for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* Massachusetts Medical Society; 1995 Dec 14;333(24):1588–93.
 104. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007 May;87(1):179–97.
 105. Margail I, Plotkine M, Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med.* 2005 Aug 15;39(4):429–43.

ANEXOS

10. ANEXOS

10.1. ABREVIATURAS

ACOT *acute coagulopathy of trauma* o coagulopatía aguda del traumático

ALAT alanina aminotransferasa

ASAT aspartato aminotransferasa

ATP adenosín-trifosfato

CXC quimiocina C

CI colangiopatía isquémica

DME donantes en muerte encefálica

DA donantes en asistolia

GGT gamma glutamil transferasa

IL1- β interleuquina-1-beta

IMC índice de masa corporal

LOT *lysis onset time*

ML *maximal lysis*

PAI *plasminogen activator inhibitor* o inhibidor del activador del plasminógeno

PC parada cardíaca

PCEH parada cardíaca extra hospitalaria

PCR parada cardio-respiratoria

PDF productos de la degradación del fibrinógeno

PF 1 *prothrombin fragment 1*

PF 2 *prothrombin fragment 2*

PRAN perfusión regional abdominal normotérmica

RCP reanimación cardiopulmonar

RIC rango intercuartílico

RLO radicales libres de oxígeno

ROTEM *rotational thromboelastometry* o tromboelastometría rotacional

SHINE *shock-induced endotheliopathy* o endotelopatía inducida por shock

TNF *tumor necrosis factor* o factor de necrosis tumoral

TP tiempo de protrombina

tPa *tissue plasminogen activator* o activador tisular del plasminógeno

ttpa tiempo de tromboplastina parcial activado o tiempo de cefalina

10.1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	34
Figura 2	36
Figura 3	40
Figura 4	84
Figura 5	86