

# **ESTUDIO INMUNOHISTOLÓGICO DE LOS INJERTOS HEPÁTICOS POR DONACIÓN EN ASISTOLIA FRENTE A MUERTE ENCEFALICA: PROPENSITY SCORE MATCHING ANÁLISIS**

Unidad de Trasplante del Hospital Clínico Universitario  
Virgen de la Arrixaca

# INTRODUCCION

- Trasplante hepático → Enfermedad hepática terminal
- Incremento del pool de donantes → DCD or Maastricht (III)
- Donantes de DCD isquemia caliente **ADICIONAL** asociado a tasas más altas de complicaciones biliares

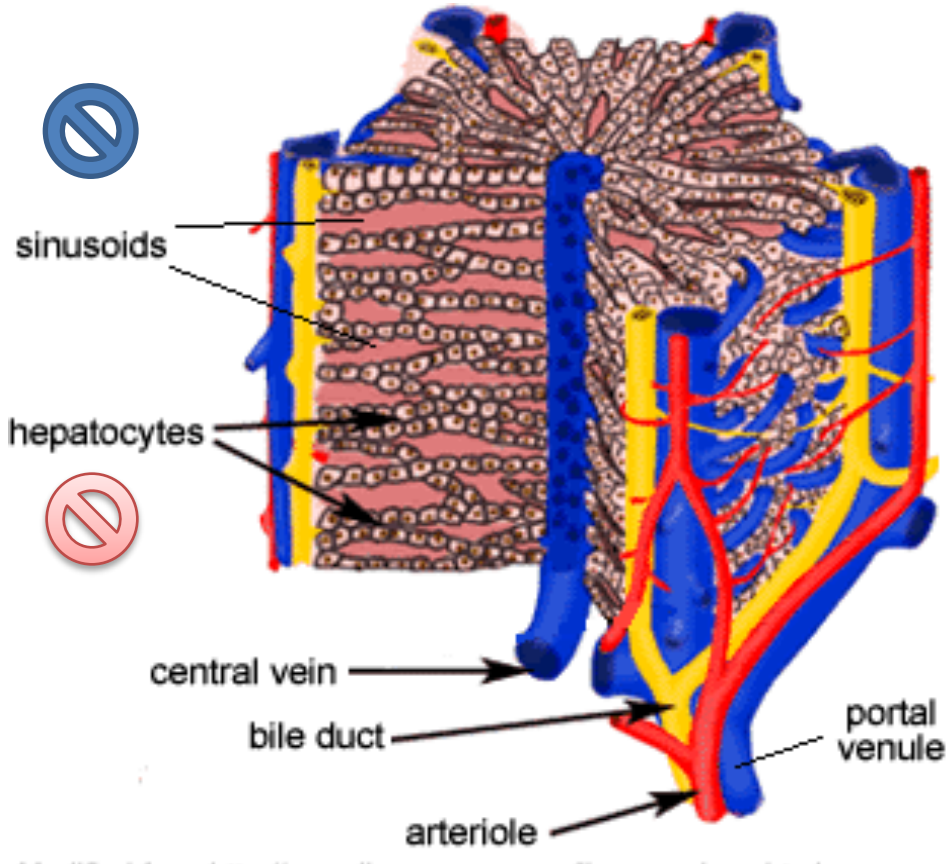
## INTRODUCCION.- Tiempo de isquemia caliente

- Consumo continuo de energía por células vivas a temperatura corporal
- Agotamiento rápido de la energía oxidativa
- El agotamiento de la energía probablemente esté relacionado con el daño celular permanente
- La lesión por isquemia-reperfusión aumenta el daño celular
- Varios otros mecanismos de lesión celular no se conocen bien

# INTRODUCCION.- Daño tisular

Isquemia fría

Isquemia caliente



# INTRODUCCION.-

- **Injertos de hígado humano DBD:**
  - Infiltrado neutrófilo sinusoidal y necrosis hepatocelular en biopsias obtenidas después de la reperfusión predijeron una peor funcionamiento postoperatorio del injerto.
  - Actualmente no se puede confiar en una marcador inmunohistoquímico en particular para predecir la función hepática después del trasplante de hígado usando la biopsia pretrasplante.
- **Modelos DCD porcinos:**
  - La inflamación de los hepatocitos, la vacuolización y la necrosis se asociaron con un tiempo de isquemia caliente más prolongado.
  - PNF podría predecirse por la gravedad de la vacuolización de hepatocitos.

# METODO

## Hipótesis

- DCD presentan biomarcadores y cambios histológicos similares en el injerto de hígado en comparación con los donantes tradicionales (DBD) en la biopsia tomada durante la extracción.

## Objetivos

- Estudio descriptivo de la serie de pacientes que comparan las características de los donantes CDC y DBD.
- Analizar marcadores histológicos y biológicos de injertos de hígado DCD y DBD.

# METODO

## Diseño del estudio

- Donantes de DCD y DBD entre noviembre de 2014 y diciembre de 2018.
- Analizamos todos los injertos en los que se tomó una biopsia intraoperatoria durante la extracción.
- Realizamos un propensity score matching (PSM) entre DCD y DBD: Donante (edad, género e isquemia fría) y receptores (edad, género, BMI y MELD)

## Criterios de exclusión

- Donante vivo.
- Procedimientos con un injerto reutilizado (utilizado previamente como injerto auxiliar).
- Retrasplante.
- Trasplante de hígado dividido.
- Trasplante combinado de hígado y riñón.

## METODO – Evaluación histológica de la biopsia de aloinjerto



- La biopsia se tomó del segmento lateral izquierdo para limitar las posibles complicaciones hemorrágicas antes de la cirugía.
- Nuestra preferencia, así como el consentimiento impulsado por expertos, es una biopsia en cuña subcapsular (1,5 cm<sup>2</sup>).
- La muestra se fijó luego en formalina tamponada neutra al 4% durante 24 horas, se procesó y se incluyó en parafina.
- Se obtuvieron tres secciones de micrómetros de las muestras para realizar un análisis histoquímico e inmunohistopatológico.



## METODO – DCD y DBD características

- Edad
- Género
- Causa de la muerte
- Drogas vasoactivas
- Esteatosis and fibrosis
- AST (U/L), ALT (U/L), QUICK (%)
- Isquemia caliente funcional, isquemia caliente total e isquemia fría
- Estancia en UCI

## METHODS – Características del receptor

- Edad
- Género
- Comorbilidades and BMI
- Indicación
- CHILD-PUGH and MELD
- 24 h y 1 semana: AST (U/L), ALT (U/L), QUICK (%)
- Hemoderivados
- Estancia en UCI y hospitalaria

## METHODS – Análisis inmunohistológico e histoquímico

### **Análisis histoquímico**

- Hematoxilina-eosina (H&E)
- Acido periódico de Schiif (PAS)
- Tinción tricrómica de Masson

### **Análisis inmunohistológico**

- Marcadores de envejecimiento (p21 y TERT)
- Daño celular (caspase-3 activa)
- Daño endotelial (VEGF)
- Células progenitoras (CD90)
- Células de Kupffer (COX-2)
- Rechazo de injerto (CD44)

# RESULTADOS – DCD y DBD características

	Before PSM				After PSM			
	Total (N = 65)	DCD (N = 39)	DBD (N = 26)	p	Total (N = 52)	DCD (N = 26)	DBD (N = 26)	p
Age, yr, median (IQR)	68 (61-74)	67 (60.5-73)	71.5 (63-75)	.18	67 (61-74)	66.5 (59.5-72.5)	71.5 (61-75.5)	.13
Elderly (>70 yr), n (%)	31(47.7)	17 (43.5)	14 (53.8)	.45	24 (46.2)	10 (38.5)	14 (53.8)	.40
Gender, male, n (%)	39 (60)	24 (61.5)	15 (57.7)	.80	32 (61.5)	17 (65.4)	15 (57.7)	.78
Cause of death, n (%)				.06				.08
Stroke	42 (64.6)	23 (58.9)	19 (73)		35 (67.3)	16 (61.5)	19 (73)	
TBI	6 (9.2)	2 (5.1)	4 (15.4)		5 (9.6)	1 (3.8)	4 (15.4)	
Others	17 (26.1)	14 (35.9)	3 (11.5)		12 (23.1)	9 (35.7)	3 (11.5)	
Stay In ICU (hours), median (IQR)	86.5 (24-157.5)	140 (64-261)	36 (23-75)	.00	71 (24-145.5)	147 (53-252)	36 (23-75)	.00
Vasoactive Drugs, n (%)	33 (50.8)	12 (30.8)	21 (80.8)	.00	30 (57.7)	9 (34.6)	21 (80.8)	.00
Blood Test Parameters, median (IQR)								
Sodium (mmol/L)	144 (140-149)	143 (140-146)	147 (140.5-153.5)	.03	144 (140-149)	143 (140-147)	147 (139.7-154.2)	.09
AST (U/L)	25.5 (18-41)	27 (17-42)	22(20-38)	.92	25 (18-45)	27.5 (16-48.5)	22(20-38)	.87
ALT (U/L)	20 (14-50)	27 (14-70)	18 (15-30)	.25	20 (15-56)	28.5 (14-86)	18 (15-30)	.18
QUICK (%)	78 (70-89)	79 (70-89)	78 (70-88)	.9	78 (70-88)	77 (70-88.5)	78 (70-88)	.91
Donor Biopsy								
Steatosis, n (%)				.2				.35
No	14 (23.7)	12 (30.8)	2 (10)		9 (17)	7 (26.9)	2 (10)	
< 5%	14 (23.7)	8 (20.5)	6 (30)		13 (25)	7 (26.9)	6 (30)	
5–30%	31 (52.5)	19 (48.7)	12 (60)		24 (46.2)	12 (46.2)	12 (60)	
Fibrosis F1, n (%)	4 (6.1)	4 (10.3)	0	.14	3 (5.8)	3 (11.6)	0	.24
Functional Warm Ischemia (min), median (IQR)	11 (9-15)	11 (9-15)	-	N/A	10 (9-13)	10 (9-13)	N/A	
Total Warm Ischemia, min, median (IQR)	18 (15-23)	18 (15-23)	-	N/A	18 (15-21)	18 (15-21)	N/A	
Cold Ischemia time hours, median (IQR)	5 (4-7)	5 (4-6)	5.5 (4-9)	.39	5 (4-7)	5 (4-6)	5.5 (4-9)	.14

# RESULTADOS – Receptores características

	Before PSM				After PSM			
	Total (N = 65)	DCD (N = 39)	DBD (N = 26)	p	Total (N = 52)	DCD (N = 26)	DBD (N = 26)	p
Age, yr, median (IQR)	57 (52-62)	57 (53-62)	59.5 (50-63.5)	.92	57.5 (52-62)	56.5 (53-60)	59.5 (50-64.5)	.68
Gender, male, n (%)	56 (86.1)	35 (89.7)	21 (80.7)	.46	47 (90.3)	26 (100)	21 (80.7)	.05
Comorbidities, n (%)								
HTA	23 (35.4)	11 (28.2)	12 (46.1)	.19	20 (38.5)	8 (30.8)	12 (46.1)	.39
DM	28 (43.1)	19 (48.7)	9 (34.6)	.31	21 (40.4)	12 (46.2)	9 (34.6)	.57
FRCV	33 (50.8)	18 (46.1)	15 (57.6)	.45	27 (51.9)	12 (46.2)	15 (57.6)	.58
EPOC	15 (23.1)	9 (23.1)	6 (23.1)	1	12 (23.1)	6 (23.1)	6 (23.1)	1
Indication for LT, n (%)				.99				.96
HCC	27 (41.5)	16 (41)	11(42.3)		23 (44.2)	12 (46.2)	11(42.3)	
HCV +	13 (20)	9 (23)	4 (15.4)		10 (19.2)	6 (0.23)	4 (15.4)	
Alcohol	19 (29.2)	9 (23)	8 (30.7)		15 (28.8)	7 (26.9)	8 (30.7)	
HCV + without HCC	5 (7.7)	11 (28.2)	2 (7.7)		4 (7.7)	2 (7.7)	2 (7.7)	
Emergencies	3 (4.61)	3 (7.7)	1 (3.8)		3 (5.8)	2 (7.7)	1 (3.8)	
Others	11 (16.9)	2 (5.1)	4 (15.4)		7 (13.5)	3 (11.5)	4 (15.4)	
CHILD-PUGH, n (%)				.99				.85
A	24 (36.9)	14 (35.9)	10 (38.5)		20 (38.5)	10 (38.5)	10 (38.5)	
B	35 (53.8)	21 (53.8)	14 (53.8)		28 (53.8)	14 (53.8)	14 (53.8)	
C	5 (7.7)	3 (7.7)	2 (7.7)		3 (5.8)	1 (3.8)	2 (7.7)	
MELD, median (IQR)	11 (8-14)	11 (8-14)	10 (9.25-14.75)	.69	10 (8-14)	10 (8-13)	10 (9.25-14.75)	.3
BMI, kg/m2, median (IQR)	26.8 (24.6-29.5)	26.8 (24.7-31)	26.6 (24.5-29.4)	.57	27.1 (24.7-31)	28.6 (24.8-31.7)	26.6 (24.5-29.4)	.16

# RESULTADOS – Receptores características

	Before PSM				After PSM			
	Total (N = 65)	DCD (N = 39)	DBD (N = 26)	p	Total (N = 52)	DCD (N = 26)	DBD (N = 26)	p
<b>Hemoderivatives, median (IQR)</b>								
Red Blood Cells	4 (2-5)	4 (2-6)	4 (2-5)	.68	4 (2-5)	4 (2-6)	4 (2-5)	.8
Fresh Frozen Plasma	1.5 (0-3.25)	2 (0-4)	0 (0-2)	.07	0 (0-3)	2 (0-3)	0 (0-2)	.1
Platelets Units	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)	.48	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)	.38
<b>Post-LT blood test, 24 h, median (IQR)</b>								
AST (U/L)	491 (293-970.5)	698 (338-1543)	412 (233-692)	.07	488 (310-955)	777 (383-1682)	412 (233-692)	.06
ALT (U/L)	495 (259-765)	565 (266-880)	371 (146-663)	.10	494 (258-834)	589.5 (280-953)	371 (146-663)	.08
Quick (%)	54 (47-67)	55 (49.5-67.5)	53 (45-67)	.8	54 (49-69)	55 (50-69)	53 (45-67)	.49
<b>Post-lt blood test, 1<sup>o</sup> week, median (IQR)</b>								
AST (U/L)	44.5 (27-73)	56 (31-89)	37 (23-56)	.06	42 (25-74.5)	55.5 (29-95)	37 (23-56)	.08
ALT (U/L)	145 (96-214)	158 (111.5-241)	130 (77-161)	.02	150 (91.5-217)	208.5 (121-252)	130 (77-161)	.01
Quick (%)	76 (68-81.5)	74 (64.5-78)	78 (73-89)	.01	76 (69.5-82)	72.5 (65-78)	78 (73-89)	.01
ICU Length of Stay, days, median (IQR)	3 (2-5)	4 (2-5)	3 (2-4)	.08	4 (2-5)	4 (3-5)	3 (2-4)	.03
Length of Hospital Stay	22 (15-30)	22 (15-28)	25 (15-32)	.86	22 (15-32)	22 (15-32)	25 (15-32)	.94

# RESULTADOS – Complicaciones en el postoperatorio inmediato y seguimiento

	Before PSM				After PSM			
	Total (N = 65)	DCD (N = 39)	DBD (N = 26)	p	Total (N = 52)	DCD (N = 26)	DBD (N = 26)	p
<b>Immediate post-lt complications, n (%)</b>								
Acute rejection	5 (7.7)	4 (10.2)	1 (3.8)	.64	5 (9.6)	4 (15.4)	1 (3.8)	.19
Early Re-LT (HAT)	3 (4.6)	2 (5.1)	1(3.8)	1	2 (3.8)	1 (3.8)	1(3.8)	1
Biliary complications	5 (7.7)	4 (10.2)	1(3.8)	.64	3 (5.8)	2 (7.7)	1(3.8)	1
Biliary leakage	4 (6.2)	4 (10.3)	0	.2	3 (5.8)	3 (11.5)	0	.25
Biliary peritonitis (retrieval of T-tube)	1 (1.6)	0	1(3.8)		1 (1.9)	0	1(3.8)	
<b>Late onset post-lt complications, n (%)</b>								
Ischemic Cholangiopathy	6 (9.2)	5 (12.8)	1(3.8)	.39	5 (9.6)	4 (15.4)	1(3.8)	.35
Biliary stricture	15 (23.1)	9 (23.1)	6 (23.1)	1	12 (23.1)	6 (23.1)	6 (23.1)	1
HCV Recurrence	2 (3.1)	1 (2.6)	1(3.8)	1	1 (1.9)	0	1(3.8)	1
Re-LT (causes)	7 (10.8)	5 (12.8)	2 (7.7)	.69	6 (11.5)	4 (15.4)	2 (7.7)	.67
Ischemic cholangiopathy	3 (4.6)	2 (5.1)	1(3.8)	.79	2 (3.8)	1 (3.8)	1(3.8)	.69
Hepatic artery stenosis	3(1.6)	2 (5.1)	1(3.8)		3 (5.8)	2 (7.7)	1(3.8)	
Chronic Rejection	1(1.6)	1 (2.6)	0		1 (1.9)	1 (3.8)	0	

## RESULTADOS – Tinción inmunohistoquímica

### Negativa

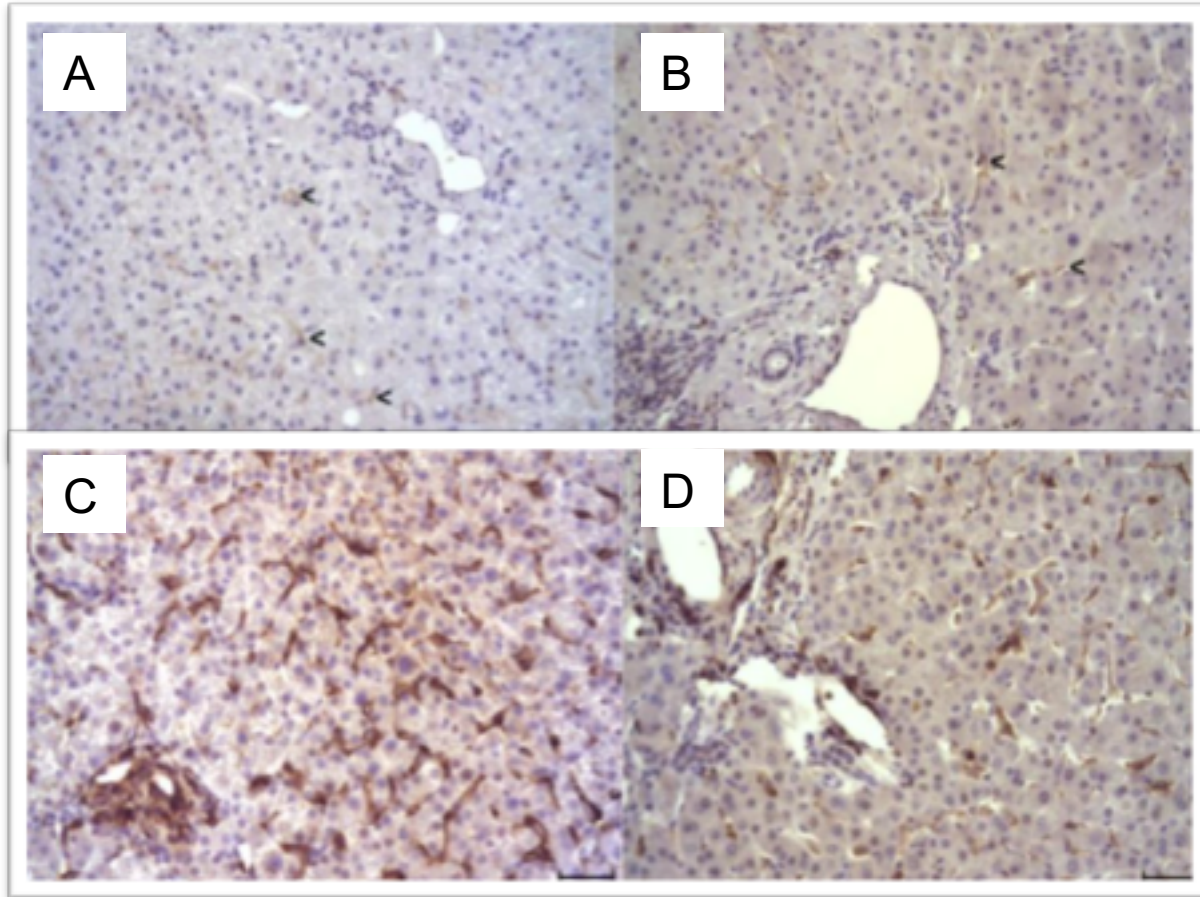
- VEGF
- p21
- Caspase-3

### Positiva

- COX2
- CD 40
- CD90
- Telomerasa

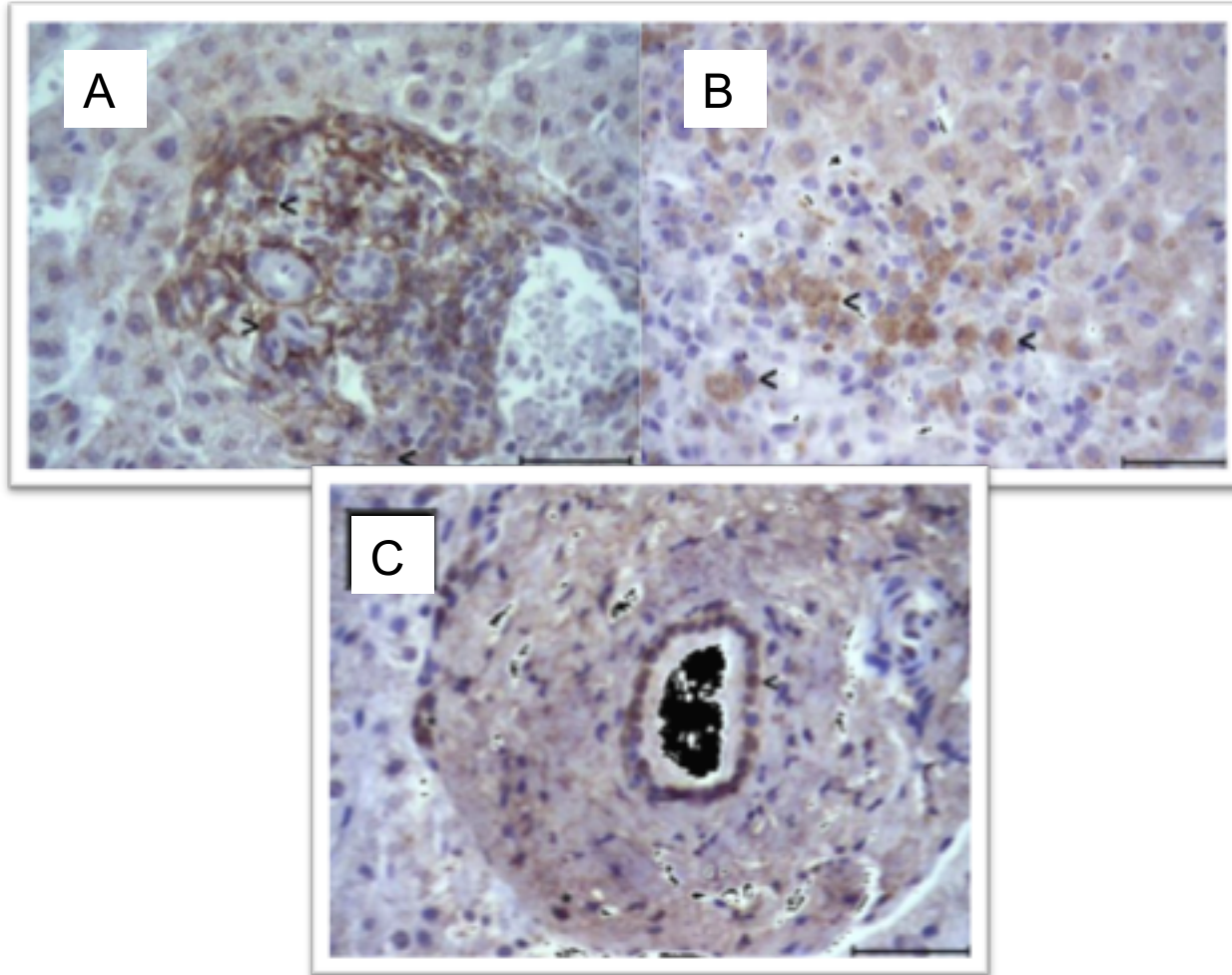


## RESULTADOS – Immunohistoquímica



Representative samples of positive stained immunohistochemistry for CD 44. A: low; B: medium; C: high; D: very high. The arrowheads indicate positive immunotincin.

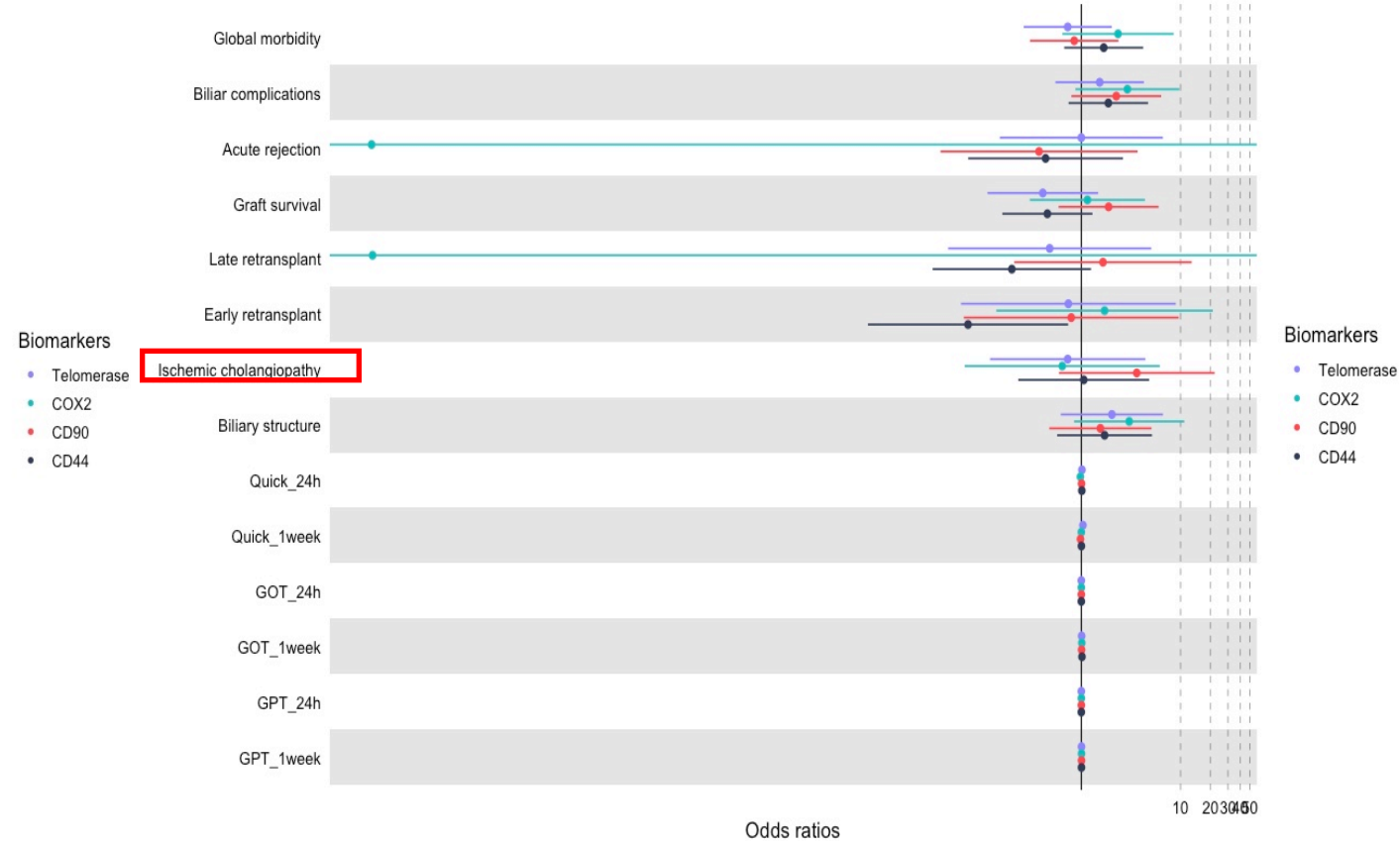
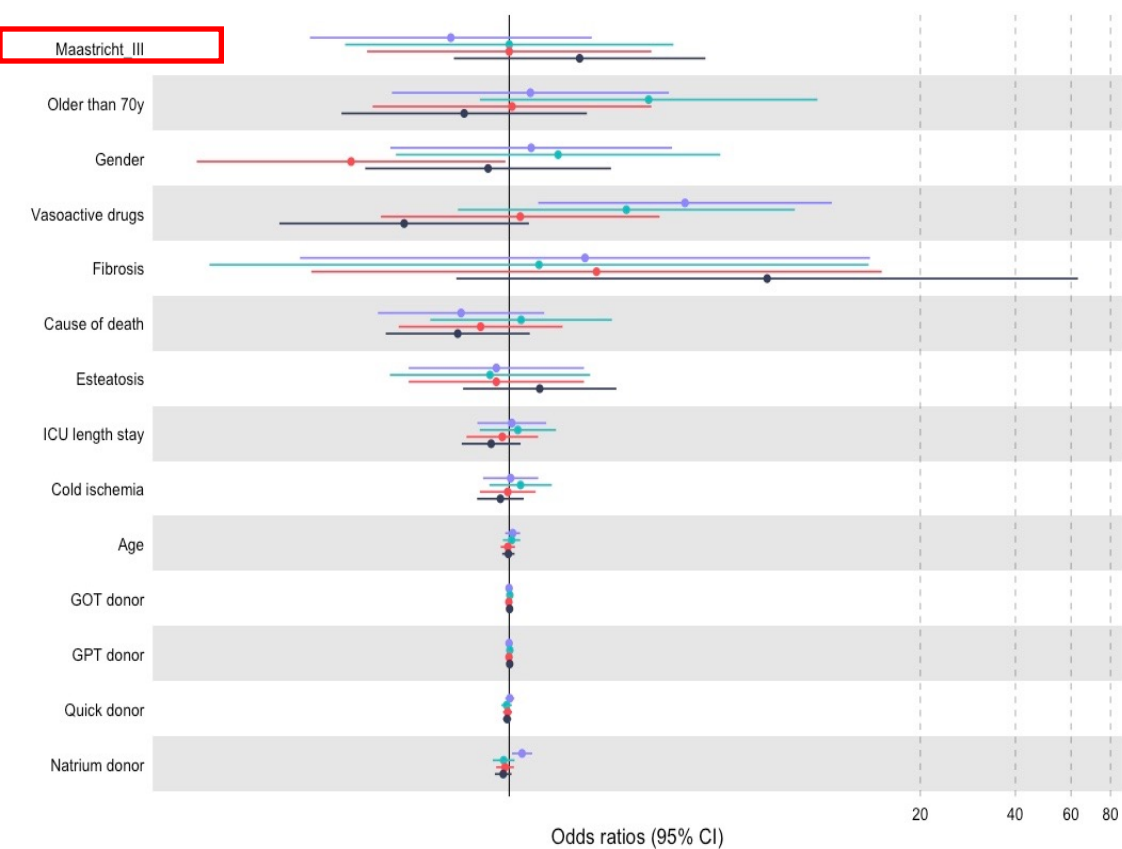
## RESULTADOS – Immunohistoquímica



Representative samples of positive stained immunohistochemistry for CD 90 (A), COX2 (B), and TERT (C). The arrowheads indicate positive immunotincin. .

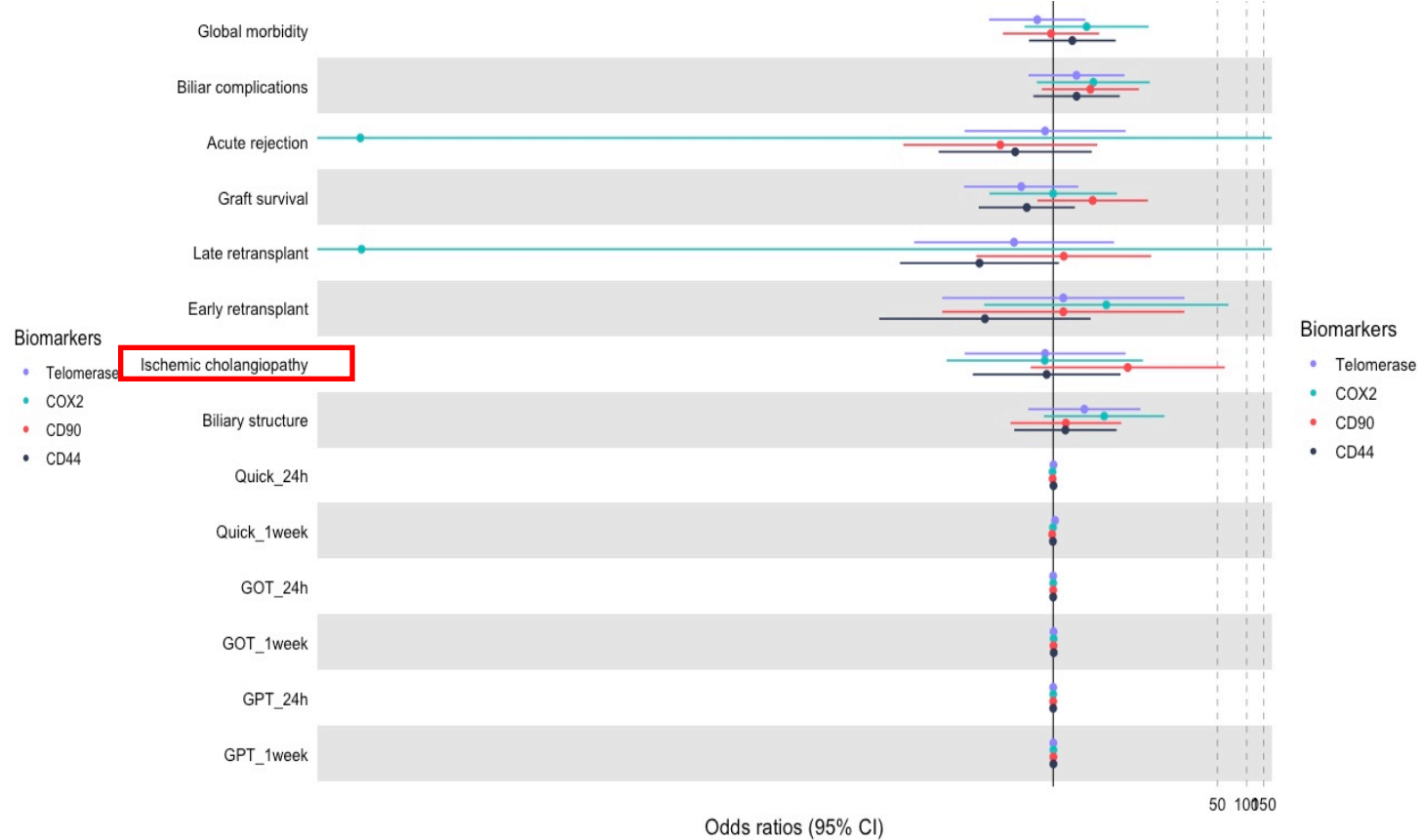
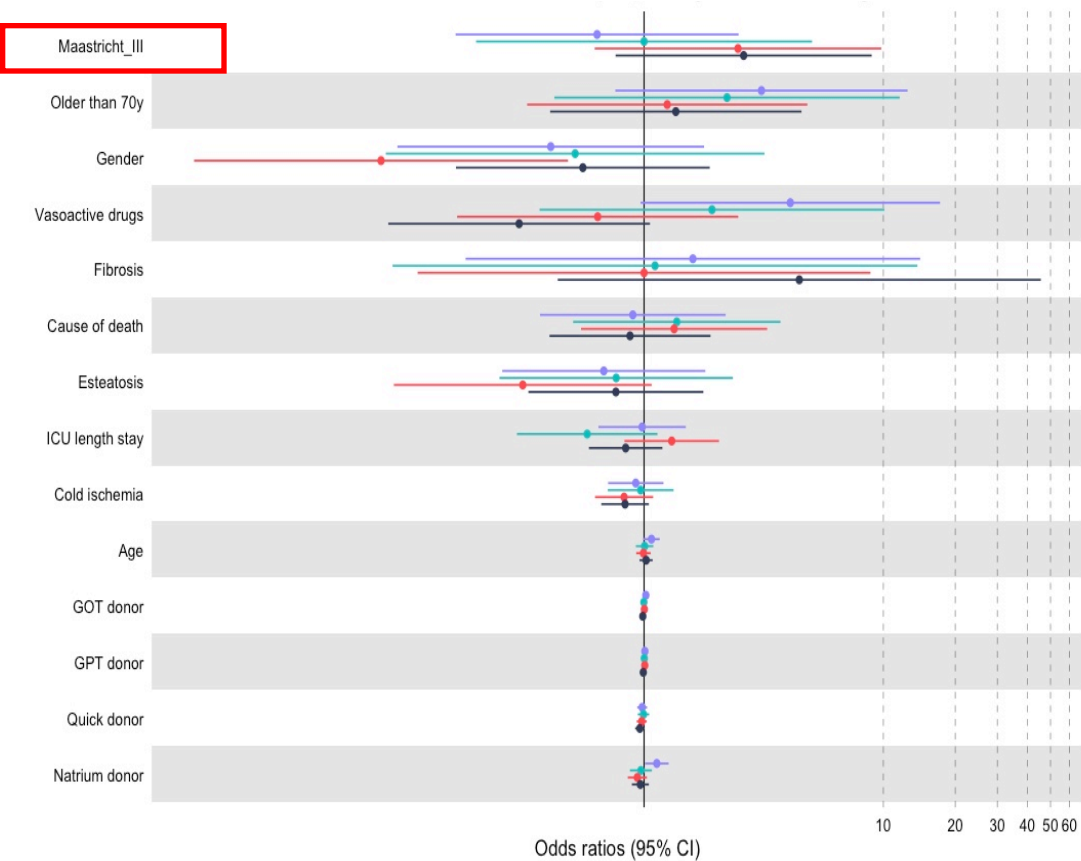
# RESULTADOS – COX2, CD 44, CD90, telomerasa

Antes del PSM, hubo una relación estadísticamente significativa entre **CD90 y los varones donantes** ( $p=0.05$ ), **TERT con el uso de drogas vasoactivas** ( $p=0.02$ ) y el **sodio del donante** ( $p=0.02$ ), y **CD44 con el trasplante precoz** ( $p=0.05$ ) y **GOT 1 semana** ( $p=0.02$ ).



# RESULTADOS – COX2, CD 44, CD90, telomerasasa

Tras el PSM, hubo una relación estadísticamente significativa entre **CD90 y los varones donantes** ( $p=0.01$ ), **TERT con el sodio del donante** ( $p=0.04$ ) y **CD44 con GOT 1 semana** ( $p=0.04$ ).



## DISCUSION –

- Células de Kupffer (COX2) +: fagocitosis, citocinas proinflamatorias, isquemia / reperfusión hepática.
- Pro-apoptótico (caspasa-3): no se produce un proceso de apoptosis temprano.
- VEGF -: indica que no hay un proceso activo de vasculogénesis.
- Senescencia (p21- y TERT +): las células han entrado en un proceso proliferativo en la fase inicial, en el que aún no se han iniciado los mecanismos reguladores para detenerlo.
- Células madre / progenitoras hematopoyéticas (CD44 +, CD90 +): regeneración hepática, mecanismos de tolerancia en el trasplante de órganos

## LIMITACIONES –

- En primer lugar, la más importante sería que no tenemos la información de todas las biopsias en los injertos por lo que el estudio puede presentar un **sesgo de selección**.
- En segundo lugar, la técnica de extracción **súper-rápida** puede favorecer un sufrimiento inicial superior del obtenido si hubiéramos realizado la extracción con perfusión regional normotérmica.
- En tercer lugar, la comparación de estos mismos marcadores al **nivel plasmático** nos habría dado una información valiosa de su relación con los hallazgos en las biopsias.

## CONCLUSIONES –

- Las biopsias de donantes de DCD tomadas durante la extracción presentan **cambios similares** en el injerto de hígado en comparación con los donantes de DBD con respecto a la lesión hepática en relación a las características **inmunohistológicas**.
- Además, no se encontró ningún **marcador predictivo específico** que justificara el daño celular teóricamente mayor relacionado con los donantes de DCD que comparaban DBD.
- La relación entre los marcadores estudiados con un aumento en el número de **complicaciones biliares** también se analizó **sin** encontrar una mayor expresión de ellos en relación con el tipo de donación.
- Por otro lado, el uso previo de **drogas vasoactivas**, el **sodio del donante** y la elevación de **GOT** en las primeras 24 horas se relacionaron principalmente con una mayor expresión de **TERT** y **CD44**.

**Gracias**