

Estudio clínico e inmunológico del xenorrechazo en el xenotrasplante ortotópico de hígado de cerdo a babuino

Pablo Ramírez^a, Rafael Chávez^b, María Majado^a, Vicente Munitiz^a, Antonio Ríos^a, Antonio Muñoz^c, Quiteria Hernández^a, Carlos García Palenciano^a, Gilda Pino-Chávez^d, María Loba^a, Alfredo Minguela^a, Manuel Rodríguez-Gago^a, Alicia Sánchez-Vizcaíno^a, Mariano Montoya^a, Francisco González^a, María Luisa Cayuela^a, Belén Segura^a, Francisca Marín^a, Olga Fernández^a, Ricardo Robles^a, Francisco Sánchez-Bueno^a, José Antonio Pons^a, José Ignacio Rodríguez-Barbosa^a, José Yélamos^a y Pascual Parrilla^a

^aUnidad de Trasplante Hepático. Departamento de Cirugía. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia. ^bUnidad de Trasplantes. Departamento de Cirugía. Hospital Universitario de Wales. Cardiff. Reino Unido. ^cFacultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

^dImutran. Cambridge. Reino Unido.

Resumen

Introducción. La experiencia de xenotrasplante hepático (Xtoh) de cerdo a primate no humano es muy limitada. Nuestros objetivos han sido: a) comprobar si el hígado de un cerdo transgénico h-DAF evita el rechazo hiperagudo; b) estudiar las funciones metabólicas del hígado porcino tras el Xtoh; y c) analizar el perfil clínico, bioquímico e inmunológico del rechazo vascular agudo retardado.

Animales y métodos. Se realizaron 6 Xtoh de cerdo a babuino, 4 de cerdos no modificados y dos de cerdos transgénicos para h-DAF. Se llevaron a cabo determinaciones hematológicas, de coagulación, de xenoanticuerpos y del complemento. En el babuino que sobrevivió 8 días, se estudiaron durante los mismos las poblaciones linfocitarias y la actividad lítica de los linfocitos.

Resultados. Los valores de xIgG e IgM descendieron drásticamente a los 3 min de la reperfusión, sobre todo del CH50, C3 y C4. En los hígados no modificados genéticamente apareció una coagulación intravascular diseminada por rechazo hiperagudo, con una supervivencia inferior a 12 h. Con los hígados h-DAF, la coagulación se normalizó, con una supervivencia de 8 y 4 días, falleciendo ambos por insuficiencia respiratoria, sin rechazo hiperagudo. El babuino que sobrevivió 8 días presentó a las 36 h un rechazo vascular agudo retardado, detectándose una estimulación de las HLA clase I sobre los linfocitos CD3+ y CD19+, que respondió al tratamiento.

Correspondencia: Dr. P. Ramírez.
Unidad de Trasplantes.
Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.
El Palmar. Murcia.
Correo electrónico: ramirezp@fcu.um.es

Aceptado para su publicación en marzo de 2002.

Conclusiones. El hígado transgénico h-DAAF previene el rechazo hiperagudo y mantiene la coagulación en rangos normales en el babuino. El rechazo vascular agudo provoca el cese en la producción de bilis y un patrón mixto de citólisis y colostasis. Los valores de expresión de HLA clase I en los linfocitos podrían ser útiles para diagnosticarlo.

Palabras clave: Xenotrasplante hepático. Cerdos transgénicos h-DAF. Rechazo vascular agudo retardado. Rechazo hiperagudo. Coagulación. HLA. Babuino.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL STUDY OF XENOREJECTION IN ORTHOTOPIC LIVER XENOTRANSPLANTATION FROM PIG TO BABOON

Introduction. Experience in liver xenotransplantation from pig-to-nonthuman primate is limited. Our aims were (i) to determine whether h-DAF transgenic pig liver prevents hyperacute rejection; (ii) to study the metabolic function of pig liver after liver xenotransplantation and (iii) to analyze the clinical, biochemical and immunological profile of acute delayed vascular rejection.

Animals and methods. Six liver xenotransplantations were performed, four from unmodified pigs and two from pigs transgenic for h-DAF. Hematological, coagulation, xenoantibodies and complement determinations were performed. In one baboon that survived 8 days, lymphocyte populations and the lytic activity of lymphocytes were studied in the same period.

Results. xIgG and IgM levels decreased drastically 3 minutes after reperfusion, especially those of CH50, C3 and C4. In genetically unmodified livers, disseminated intravascular coagulation developed due to hy-

peracute rejection, and survival was lower than 12 hours. In h-DAF livers, coagulation returned to normal and survival was 8 and 4 days; both baboons died from respiratory failure, without hyperacute rejection. The baboon who survived for 8 days, presented acute delayed vascular rejection at 36 hours and HLA class I stimulation of CD3+ and CD19+ lymphocytes was detected, which responded to treatment.

Conclusions. Transgenic hDAF liver prevents hyperacute rejection and maintains coagulation within normal limits in baboons. Acute vascular rejection provokes cessation of bile production and mixed symptoms of cytosis and cholestasis. Levels of HLA class I expression in lymphocytes may be useful for diagnosing this.

Key words: Liver xenotransplantation. h-DAF transgenic pigs. Acute delayed vascular rejection. Hyperacute rejection. Coagulation. HLA. Baboon.

Introducción

La experiencia del xenotrasplante hepático (Xtoh) de cerdo a primate no humano es muy limitada (tabla 1)¹⁻⁴, y tan sólo existe un caso clínico referido en la bibliografía⁵. En la mayor parte de Xtoh de cerdo no modificado genéticamente a primate no humano realizados hasta el momento, la supervivencia no ha superado las 12 h. Sólo en tres casos el animal sobrevivió más de tres días. Uno fue realizado por Calne¹ en 1968, sin aplicar ninguna medida para prevenir el rechazo hiperagudo. El babuino falleció por una infección pulmonar, y el hígado presentaba una histología normal. Los otros dos casos, referidos por Powelson et al³, sobrevivieron 72 y 75 h, respectivamente, pero al receptor se le eliminaron los xenoanticuerpos en sangre mediante perfusión *ex vivo* a través de otro hígado de cerdo. En estos tres Xtoh, los parámetros de coagulación durante el postoperatorio alcanzaron cifras normales, a pesar de que algunos estudios *in vitro* han descrito la incompatibilidad de los factores de la coagulación porcinos y de primates⁶.

El único caso de Xtoh clínico de cerdo a humano ha sido realizado por Makowka et al⁵ en 1994, en un paciente con hepatitis fulminante, trasplantando el hígado en posición heterotópica y sometiendo al paciente a una hemoperfusión pretrasplante para eliminar los xenoanticuerpos del plasma. El hígado no llegó a funcionar debido a un rechazo hiperagudo, y el paciente falleció a las 30 h.

Los objetivos del presente estudio han sido: a) conocer si el hígado de un cerdo transgénico h-DAF evita el rechazo hiperagudo cuando se trasplanta a un primate; b) determinar si las distintas funciones metabólicas del hígado del cerdo, como el sistema de coagulación, son capaces de mantener la homeostasis del receptor durante la primera semana después de un Xtoh, y c) estudiar el perfil clínico, bioquímico e inmunológico del rechazo vascular agudo en el Xtoh de cerdo a babuino.

Animales y métodos

Se han realizado 6 Xtoh de cerdo a babuino, 4 de cerdos no modificados genéticamente y dos de cerdos transgénicos para h-DAF (cortesía de Imutran, Cambridge, Reino Unido). Los receptores fueron 6 babuinos (*Papio anubis*) de entre 8 y 10 kg de peso. La inmunosupresión consistió en ciclofosfamida, ciclosporina y metilprednisolona. Se realizó esplenectomía en todos los casos.

Se extrajeron muestras sanguíneas durante todas las fases del Xtoh, y tras la reperfusión del injerto a los 3, 15, 60, 120 min, 4 y 8 h, y posteriormente una muestra sanguínea diaria. En todas las muestras se realizaron determinaciones hematológicas (leucocitos, hemoglobina, hematocrito y plaquetas), estudios de coagulación (protrombina, APPT, fibrinógeno, PDF, PDX, factores de la coagulación: C3, C4 y C5b9), así como determinaciones de xenoanticuerpos IgM e IgG, y actividad del complemento (CH50, C3 y C4). En el cuarto experimento (h-DAF), se determinaron además la glucemia, urea, Na, K, P, Ca, ácido úrico, GOT, GPT, fosfatasa alcalina, LDH, bilirrubina total y directa, urea, creatinina, proteínas totales y albúmina. Se realizó un estudio completo de poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo, así como un estudio de la actividad lítica de linfocitos del receptor en los babuinos que sobrevivieron 4 y 8 días. Todos los días se determinaron las concentraciones sanguíneas de ciclosporina A para ajustar la dosis.

Se obtuvo una biopsia hepática a las 2 h de la reperfusión y una segunda tras el fallecimiento del animal. En ellas se realizaron un estudio con hematoxilina-eosina y un estudio completo de inmunohistoquímica (IgG, IgM, C3, C4 y C5b-9).

Resultados

Hallazgos intraoperatorios

En los 6 experimentos, los valores de xenoanticuerpos IgG e IgM descendieron drásticamente a los 3 min de la reperfusión (fig. 1), con un descenso muy importante del CH50, C3 y C4. En los 4 experimentos con cerdos no modificados, tras la reperfusión apareció una coagulación intravascular diseminada. Sin embargo, las alteraciones de la coagulación tras la reperfusión en el trasplante con hígado h-DAF fueron discretas, al igual que ocurre en el alotrasplante hepático humano, normalizándose a los tres días del trasplante.

Resultados clínicos

Los 4 babuinos trasplantados con hígados de cerdos no modificados presentaron una supervivencia inferior a 12 h, con evidencia clínica e histopatológica de rechazo hiperagudo. En cambio, los trasplantados con órganos transgénicos sobrevivieron 8 y 4 días, y ambos animales fallecieron por insuficiencia respiratoria, sin apreciarse rechazo hiperagudo en las biopsias obtenidas. En los receptores de hígados no modificados se demostró una coagulopatía intravascular diseminada inmediatamente después de la reperfusión del injerto, mientras que los dos babuinos con hígados transgénicos no sufrieron coagulopatía y los parámetros de coagulación mejoraron al segundo día postoperatorio, permaneciendo normales hasta los días 4 y 7, respectivamente.

Hallazgos inmunopatológicos

En la biopsia tomada a las 2 h de la reperfusión, en los 4 casos de hígado no modificado genéticamente se apre-

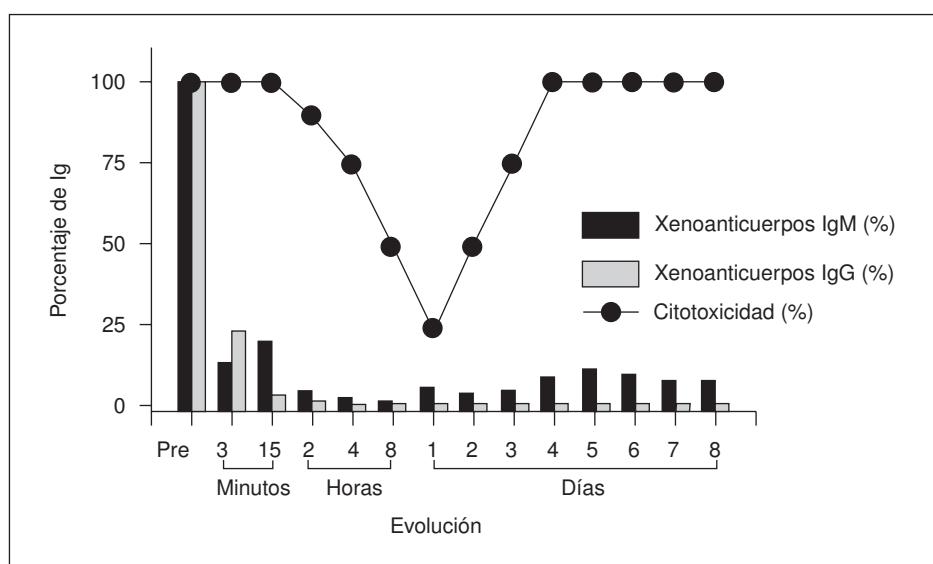


Fig. 1. Evolución de las inmunoglobulinas y de la citotoxicidad sanguíneas durante los 8 postrasplante.

cia la existencia de edema y congestión sinusoidal intensa, con destrucción del endotelio vascular y sinusoidal, y hemorragia parenquimatosa, así como depósitos de IgG y IgM, C4, C3 y C5b-9, datos característicos de rechazo hiperagudo. En la biopsia tomada tras la reperfusión en los hígados h-DAF la estructura hepática es normal y no se observan depósitos de C5b9. La biopsia hepática de control antes de la revascularización demuestra la riqueza de expresión de h-DAAF. El aspecto macroscópico del hígado transgénico tras la revascularización en el babuino es completamente normal, como se puede apreciar en la figura 2.

En ambos babuinos trasplantados con el hígado porcino transgénico el porcentaje de linfocitos CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD4+CD28+, CD8+CD28+ y CD19+, experimentaron mínimas variaciones. El número de linfocitos CD3-CD8+ disminuyó drásticamente desde los 15 min posreperfusión.

Evolución clínica del babuino que sobrevivió 8 días. Descripción del episodio de rechazo vascular agudo retardado

El babuino, tras la intervención quirúrgica, se mantuvo bajo cuidados intensivos. A las 12 h de finalizar la intervención, en una situación de estabilidad hemodinámica, sin signos de hemorragia y una coagulación del 45% de la actividad de protrombina, con un PT/TT de 45/29, buena diuresis y buen flujo biliar, se le retiró la sedación y fue extubado, quedando consciente en una silla especial de inmovilización de primates.

A las 36 h de la intervención, el flujo biliar fue disminuyendo progresivamente hasta ser cero, y se objetivaron elevaciones de GPT, bilirrubina y LDH, con una actividad del 40%, y APPT de 45/29. Tras comprobar la permeabilidad del catéter biliar (colangiografía) y flujos normales en la arteria hepática y vena porta del injerto (eco-Doppler), se sospechó el inicio de un rechazo vascular agudo (RVA) retardado y se comenzó a tratar con bolos de me-



Fig. 2. Imagen del hígado de cerdo transgénico h-DAF tras la reperfusión en el babuino. Se observa su aspecto macroscópico normal.

tilprednisolona, intensificándose además el tratamiento con ciclofosfamida. Coincidiendo con el episodio clínico de RVA se detectó una estimulación de las HLA clase I sobre los linfocitos CD3+ y CD19+ (fig. 3). La respuesta favorable fue inmediata, reestableciéndose el flujo biliar y mejorando los parámetros bioquímicos de la función hepática, así como los parámetros de coagulación.

En todo momento el animal conservaba un estado general bueno, con alimentación oral suplementada con nutrición enteral. Al tercer día postrasplante presentó pruebas de coagulación dentro del rango de la normalidad, con un valor de fibrinógeno superior a 400 mg, que se mantuvo hasta el séptimo día postrasplante.

El babuino permaneció bien hasta el día 7 postrasplante, cuando aparecieron fiebre de 38,5 °C y anorexia. Se detectó en este momento un descenso de los valores de fibrinógeno, así como alteraciones de las pruebas de la función hepática, pero con flujo biliar conservado. Al final del octavo día postoperatorio, el animal presentó un nuevo pico febril de 39 °C, se objetivaron equimosis cutáneas y hemorragia en sábana por los puntos de pun-

TABLA 1. Experiencia mundial en xenotrasplante hepático de cerdo a primate

| Autores, año | N.º de casos | Donante | Receptor | Técnica | Supervivencia | Comentario |
|--|--------------|--|-----------------------------------|-------------------|---|----------------------------|
| Calne et al ¹ , 1968 | 7 | Cerdo | Babuino | TOH | 6, 6, 9, 19, 30, 36, 84 h | 1 sin rechazo |
| Calne et al ² , 1970 | 4 | Cerdo | 3 MR 1 babuino | TOH TOH | < 12 h | |
| Powelson et al ³ , 1994 | 6 | Cerdo | 2 babuinos | TOH | 72, 75 h | Perfusión |
| LUO, 1998 (4) | 8 | Cerdo | 4 CM 2 Babuino 6 MR | THH THH | < 14 h < 6 horas | |
| Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca* | 10 | 4 controles 5 h-DAF 1 CD55+CD59+ | Babuino | TOH TOH TOH | 2, 3, 8, 8 h 18, 24, 24 h, 4, 8 días 26 h | C5b9 No C5b9 No C5b9 |
| Makowka et al ⁵ , 1994 | 1 | Cerdo | Paciente con hepatitis fulminante | THH | 30 h | Perfusión |

TOH: trasplante ortotópico de hígado; MR: mono Rhesus; CM: mono Cinomologous; THH: trasplante heterotópico de hígado. *En esta publicación sólo se incluyen datos de 4 experimentos con hígados no modificados genéticamente y de los dos trasplantes con hígados transgénicos de mayor supervivencia (4 y 8 días).

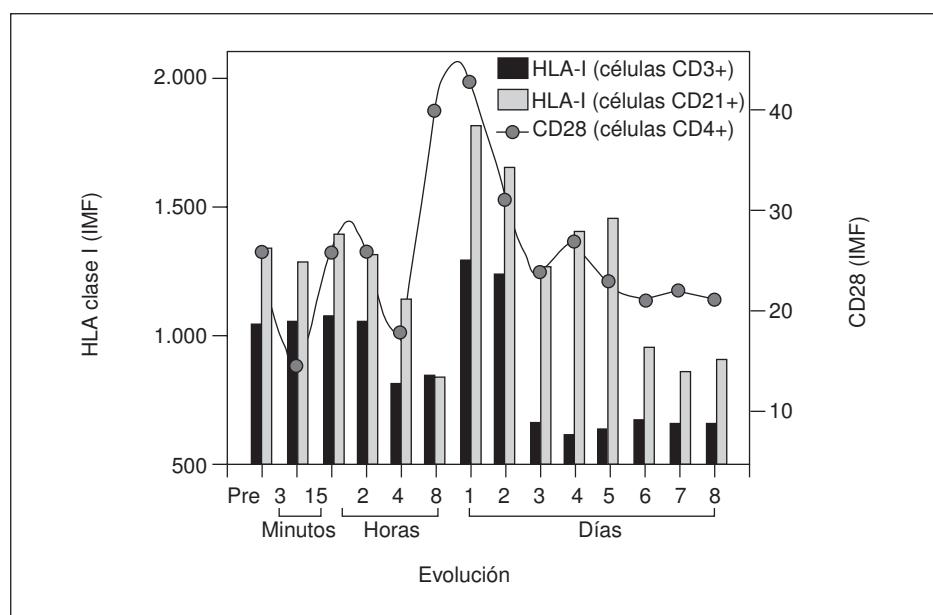


Fig. 3. Evolución del HLA tipo I y de los linfocitos CD28 sanguíneos durante los 8 días post-trasplante.

ción, disnea y oligoanuria, y el animal fue entonces sacrificado, encontrando una bronconeumonía como causa del cuadro final de sepsis y coagulación intravascular diseminada (CID).

La evolución de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica fue la siguiente (fig. 4): *a*) la expresión del CD28 no aumentó en ningún momento; *b*) la expresión de HLA-I en linfocitos T y B aumentó muy discretamente los días 3 y 4 postrasplante; *c*) la expresión de CD86 en los linfocitos B aumentó en el postrasplante inmediato; *d*) el porcentaje de CD8+CD3- descendió en el postrasplante inmediato, lo que traduce un descenso de las NK, y *e*) el porcentaje de CD8+28+ también descendió en el postrasplante inmediato.

Discusión

No cabe duda de que, al menos teóricamente, el poder disponer de órganos animales para trasplantes solucionaría el problema de la escasez de órganos. La mayoría de grupos de investigación en xenotrasplante están de

acuerdo en que la fuente ideal son los órganos de cerdos modificados genéticamente para evitar el rechazo⁷⁻⁹.

La principal barrera del xenotrasplante es la inmunológica, ya que el xenorrechazo no ha podido ser controlado. Actualmente al menos 4 empresas de biotecnología han conseguido producir cerdos transgénicos que expresan en su endotelio inhibidores fisiológicos del complemento humano, con lo que se ha conseguido prevenir el rechazo hiperagudo cuando se trasplantan en primates los órganos de estos cerdos. Los otros tres tipos de xenorrechazo (el rechazo vascular agudo retardado, el rechazo crónico y el rechazo crónico retardado) son actualmente el centro de la investigación en xenotrasplante.

Prevención del rechazo hiperagudo con hígados porcinos transgénicos para h-DAF

En nuestros 4 experimentos realizados con hígados de cerdo no modificados genéticamente se desarrolló una coagulopatía, y todos los animales fallecieron antes de las 12 h. El estudio histológico fue típico de rechazo hiper-

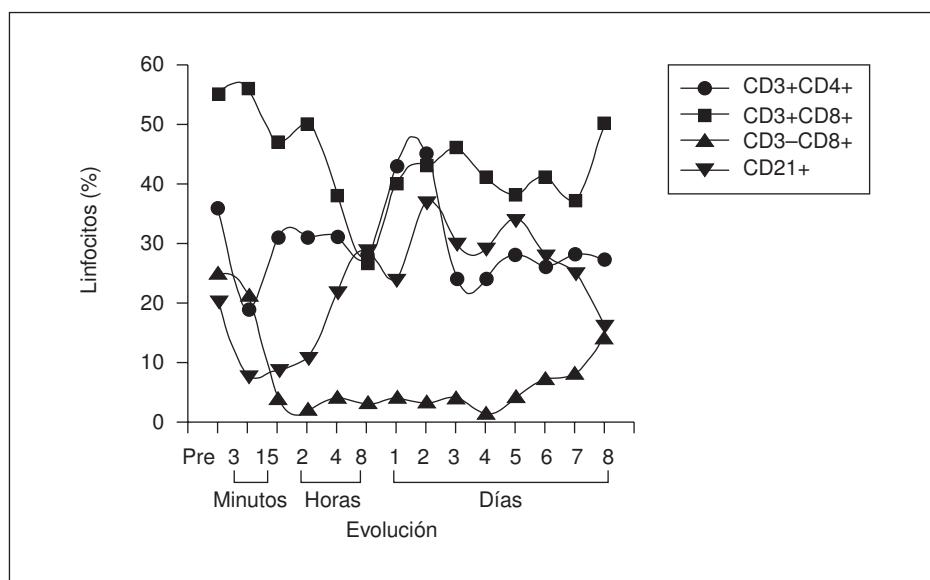


Fig. 4. Evolución de las poblaciones de linfocitos periféricos en sangre durante los 8 días post-trasplante.

agudo, con congestión importante y hemorragia a las 2 h, y posteriormente con rotura del endotelio, hemorragia, trombosis intravascular y necrosis. El estudio inmunohistoquímico demostró depósitos de xenoanticuerpos IgG e IgMg, C3, C4 y C5b-9, confirmando el rechazo hiperagudo del injerto. Sin embargo, en los Xtoh realizados con los hígados porcinos h-DAF, tras la revascularización del injerto la biopsia hepática demostró que la estructura estaba conservada, sin depósitos de C5b9, con lo que el hígado h-DAF se demostró eficaz para prevenir el rechazo hiperagudo¹⁰, como también había sido demostrado para el riñón y el corazón^{11,12}.

Episodio de rechazo vascular agudo retardado

En el babuino que sobrevivió 8 días, al segundo día cesó la excreción biliar con aumento de transaminasas y bilirrubina, lo que, tras excluir problemas vasculares, es indicativo de rechazo vascular agudo, y fue tratado con bolos de metilprednisolona y ciclofosfamida, con buena respuesta clínica y biológica. No se realizó biopsia hepática por el riesgo de complicaciones. Sin embargo, a pesar de no poder disponer de una confirmación histológica, la presentación clínica y la respuesta clinicobiológica al tratamiento empírico hacen que dicho episodio sea muy indicativo de rechazo vascular agudo retardado.

En nuestro estudio hemos demostrado que el hígado porcino sintetiza factores de coagulación funcionalmente compatibles con el primate, proporcionando una hemostasia normal al babuino al menos durante 8 días. Levy et al¹³ acaban de comunicar los resultados de un ensayo clínico en dos pacientes con hepatitis fulminante, a los que sometieron a una perfusión extracorpórea con hígado porcino transgénico para h-CD55 y CD59, consiguiendo mantenerlos con vida hasta ser trasplantados con éxito con un hígado humano. Estos resultados, junto con la demostración de la no infectividad *in vivo* de retrovirus porcinos en pacientes que han estado en contacto con

órganos y perfusiones porcinas¹⁴, a pesar de que se había demostrado *in vitro* que podían transfectar células humanas, hace posible pensar en plantear un ensayo clínico de Xtoh en casos de fallo hepático fulminante, como puente hasta el trasplante definitivo. Esta puede ser una situación clínica ideal para que la investigación en xenotrasplante abandone el laboratorio¹⁵ y se dé el primer paso clínico^{16,17}.

Finalmente, podemos concluir de este estudio que el hígado porcino transgénico h-DAAF previene el rechazo hiperagudo y mantiene los valores proteicos y de coagulación en el babuino durante al menos la primera semana después del trasplante. Además, cuando aparece un episodio de rechazo vascular agudo, cesa la producción de bilis y aparece con un patrón mixto de citólisis y colostasis, asociándose con un incremento de los valores de expresión de HLA clase I en linfocitos, que de confirmarse en otros experimentos podría llegar a ser útil para el diagnóstico del rechazo vascular agudo.

Bibliografía

1. Calne RY, White HJO, Herbertson BM, Millard PR, Davis DR, Salaman JR, et al. Pig to baboon liver xenografts. Lancet 1968;1: 1176-8.
2. Calne RY, Davis DR, Pena JR, Balner H, De Vries M, Herbertson BM, et al. Hepatic allografts and xenografts in primates. Lancet 1970;1:103-6.
3. Powelson J, Cosimi AB, Asuton W Jr, Baile M, Colvin R, Gianello P, et al. Porcine to primate orthotopic liver transplantation. Transplant Proc 1994;26:1353-4.
4. Luo Y, Kosanke S, Mieles L, Kobayashi T, Li SF, Niekras M, et al. Comparative histopathology of hepatic allografts and xenografts in the nonhuman primates. Xenotransplantation 1998;5:197-206.
5. Makowka L, Wu GD, Hoffman A, Podesta L, Sher L, Tuso PJ, et al. Immunohistopathologic lesions associated with the rejection of a pig to human liver xenograft. Transplant Proc 1998;26:1074-5.
6. Lin SS, Weidner BC, Byrne GW, Diamond LE, Lawson JH, Hoopes CW, et al. The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants. J Clin Invest 1998;101:1745-6.
7. White DJ, Yannoutsos N. Production of pigs transgenic for human DAF to overcome complement-mediated hyperacute xenograft rejection in man. Res Immunol 1996;147:88-94.

8. Ramírez P, Yélamos J, Parrilla P, Chávez R. Hepatic xenotransplantation will benefit from strategies aimed to reduce complement activation. *Liver Transpl* 2001;7:562-3.
9. Yélamos J, Ramírez P, Parrilla P. Animales modificados genéticamente como donantes de órganos en xenotrasplante. *Med Clin (Barc)* 2000;114:342-8.
10. Ramírez P, Chávez R, Majado M, Munitiz V, Muñoz A, Hernandez Q, et al. Life supporting hDAF transgenic pig liver xenograft maintains the metabolic function and coagulation in the nonhuman primate for up to eight days. *Transplantation* 2000;70:989-98.
11. Zaidi A, Schmoeckel M, Bhatti F, Waterworth P, Tolan M, Cozzi E, et al. Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors. *Transplantation* 1998;65:1584-90.
12. Schmoeckel M, Bhatti FN, Zaidi A, Cozzi E, Waterworth PD, Tolan MJ, et al. Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model. *Transplantation* 1998;65:1570-7.
13. Levy MF, Crippin J, Sutton S, Netto G, McCormack J, Curiel T, et al. Liver allograft transplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* 2000;69:272-80.
14. Paridis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, et al. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* 1999;285:1236-41.
15. Xenotransplantation: time to leave the laboratory [editorial]. *Lancet* 1999;354: 1657.
16. Parrilla P, Ramírez P. Luces y sombras en el trasplante hepático. *Med Clin (Barc)* 2000;115:542-5.
17. Ramírez P, Chávez R, Majado M, Munitiz V, Hernández Q, Loba M, et al. Study of xenograft rejection in a model of liver xenotransplantation from unmodified pig to primate. *Transplant Proc* 1999;31:2814-7.