

Estado actual del xenotrasplante de órganos

Pablo Ramírez^a, Antonio Ríos^b, José Yelamos^c, Antonio Muñoz^d y Pascual Parrilla^e

^aProfesor Titular de Cirugía, Coordinador Regional de Trasplantes. ^bMédico Adjunto de Cirugía. ^cInmunólogo contratado por el FIS adscrito a la Unidad de Trasplantes. ^dCatedrático de Genética. ^eCatedrático de Cirugía, Jefe del Departamento de Cirugía. Departamento de Cirugía. Unidad de Trasplantes. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia.

Resumen

No cabe duda de que poder disponer de órganos animales para trasplante solucionaría el problema de su escasez. Para que los xenotrasplantes puedan llegar a ser una realidad clínica, se debe superar de forma consistente tres barreras: la inmunológica, la fisiológica y el riesgo de xenozoonosis. Desde el punto de vista inmunológico, la condición necesaria sería que el xenorrechazo pudiera modularse y transformarse a un *allorejection-type*. Los avances en la tecnología transgénica han resuelto por completo el rechazo hiperagudo, y así en los ensayos preclínicos de órganos porcinos transgénicos para proteínas reguladoras de complemento realizados hasta el momento se han obtenido sobrevidas máximas de meses para el riñón y el corazón, y de 8 días para el hígado. Estas sobrevidas han permitido estudiar la compatibilidad fisiológica de estos órganos porcinos trasplantados en los monos durante estos períodos.

En cuanto a las barreras infecciosas, con el desarrollo biotecnológico actual en el área de la producción porcina, se asegura el nacimiento de lechones completamente libres de patógenos específicos. En 1997 se demostró *in vitro* que retrovirus endógenos porcinos podían transfectar linfocitos humanos. Sin embargo, diversos trabajos clínicos, con tejidos u órganos perfundidos confirman la ausencia de infectividad *in vivo* de estos pacientes por retrovirus porcinos.

Hasta la fecha no se ha comunicado ningún xenotrasplante clínico con órganos porcinos transgénicos. La razón de ello es que existe unanimidad en que todavía las barreras inmunológicas no se han superado. En la actualidad todos los esfuerzos están orientados a estudiar los mecanismos del rechazo vascular agudo retardado para así poder diseñar estrategias que lo prevengan con efectividad.

Palabras clave: Xenotrasplante. Xenorrechazo. Órganos transgénicos. Xenozoonosis. Supervivencia. h-DAF.

CURRENT STATE OF ORGAN XENOTRANSPLANTATION

The availability of animal organs for transplantation would undoubtedly solve the problem of organ scarcity. For xenotransplantations to become a clinical reality, three barriers must consistently be overcome: immunological and physiological obstacles and the risk of xenozoonosis. From the immunological point of view, the necessary condition would be that xenorejection could be adapted and transformed to the "allorejection-type". Advances in transgenic technology have completely resolved the problem of hyperacute rejection; thus, in the preclinical trials of transgenic pig organs for complement regulatory proteins performed to date, maximum survivals of months for kidney and heart and of eight days for liver have been obtained. These survivals have enabled the physiological compatibility of these pig-to-monkey transplanted organs to be studied in these time periods.

Concerning infectious obstacles, current biotechnological development in the area of pig production guarantees the birth of piglets completely free of specific pathogens. In 1997 porcine endogenous retroviruses were demonstrated to be able to transfect human lymphocytes *in vitro*. However, several clinical studies, with perfused tissues or organs confirmed that these patients could not be infected *in vivo* by porcine retroviruses.

To date, there have been no reports of clinical xenotransplantation with transgenic pig organs because there is unanimous agreement that the immunological barriers remain to be overcome. Currently, all efforts are directed towards studying the mechanisms of acute delayed vascular rejection in order to design effective strategies for its prevention.

Key words: Xenotransplantation. Xenorejection. Transgenic organs. Xenozoonosis. Survival. hDAF.

Correspondencia: Dr. P. Ramírez Romero.
Departamento de Cirugía. Unidad de Trasplantes, 3.ª planta.
Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.
El Palmar. 30120 Murcia.
Correo electrónico: ramirezp@fcu.um.es

Aceptado para su publicación en junio de 2002.

Introducción

El xenotrasplante de órganos implica el trasplante de órganos entre especies distintas filogenéticamente, y el desarrollo actual en su investigación se basa en su potencial aplicabilidad clínica, es decir, la posibilidad de trasplantar órganos animales en el ser humano¹. Esta

idea no es nueva, ya que ha sido un sueño muy antiguo durante muchos años, y en la historia de la medicina existen numerosas evidencias en este sentido. Si realizamos un repaso histórico, la historia del xenotrasplante se podría dividir en cuatro períodos:

1. *La prehistoria.* Abarcaría desde las primeras civilizaciones arcaicas hasta finales del siglo xix. Es una época de absoluta oscuridad desde el punto de vista científico.

2. *Primera mitad del siglo xx,* ampliada hasta la década de los sesenta. Los primeros trasplantes clínicos que se hacen a principios de siglo² son xenotrasplantes; inmediatamente se superan las barreras técnicas³. Los trasplantes se hacen sin complicaciones vasculares, pero los órganos no funcionan (barrera biológica). Se hacen decenas de xenotrasplantes, sobre todo de riñón, aunque también de corazón e hígado, usando diferentes animales como donantes. Los órganos procedentes de primates funcionan, en algunos casos, incluso varios meses (riñón de chimpancé, 9 meses)⁴. Durante este período se estudia intensamente la barrera biológica responsable de que los órganos transplantados no funcionen y se describe el fenómeno del segundo injerto y del rechazo⁵. Se demuestra que el rechazo es tanto más intenso cuanto más distante filogenéticamente es la especie animal usada como donante⁶, debido al rechazo hiperagudo, donde los órganos se necrosan inmediatamente por acción del complemento activado por xenoanticuerpos naturales⁷.

3. *1970-1990.* En la historia de los xenotrasplantes clínicos y preclínicos (usando el mono como receptor) existe un período de casi silencio absoluto coincidente con la consolidación y éxito de los programas clínicos de alotrasplantes.

4. *Última década del siglo xx.* Los médicos y los investigadores en el área de trasplantes comienzan a pensar nuevamente en el xenotrasplante como una posibilidad, debido fundamentalmente a dos razones: a) el aumento extraordinario de la demanda de órganos, con un importante aumento de pacientes para trasplante y de fallecidos en lista de espera a la espera del trasplante, tanto en los EE.UU.⁸, donde fallecen 15 pacientes todos los días en lista de espera¹, como en Europa, incluida España, a pesar de que en este país hemos alcanzado y mantenido desde 1994 la tasa más elevada del mundo de donación de órganos y trasplantes por millón de habitantes^{9,10}, por encima de los EE.UU. y de todos los países de la Unión Europea, y b) los nuevos avances de las ciencias biomédicas, sobre todo en los campos de la inmunología y la genética, con el desarrollo de la tecnología transgénica, han posibilitado vencer la barrera del rechazo hiperagudo¹¹. En este sentido no cabe duda de que, al menos teóricamente, poder disponer de órganos animales para trasplante solucionaría el problema de la escasez de órganos^{12,13}.

En este artículo, y bajo nuestra perspectiva personal, se revisa la situación actual de los xenotrasplantes y se analizan las condiciones actuales para poder comenzar ensayos clínicos de xenotrasplante de órganos.

Fuentes de órganos para el xenotrasplante

En los primeros intentos de xenotrasplante los primates no humanos parecían ser el donante ideal para los

xenotrasplantes aplicados a la clínica, pues son los más relacionados filogenéticamente con los seres humanos; sin embargo, su utilización como donantes presentaba varios inconvenientes: a) los problemas éticos concernientes al uso de estos animales en peligro de extinción; b) existe un elevado riesgo de infecciones transmitidas por los primates, dadas las similitudes fisiológicas con la especie humana; c) los problemas derivados de su largo período de gestación y su largo tiempo de crecimiento, y d) por razones técnicas y éticas los primates son pobres candidatos para la manipulación genética¹.

En la actualidad la mayoría de los grupos de investigación en xenotrasplante están de acuerdo en que la fuente ideal son los órganos de cerdos modificados genéticamente para evitar el rechazo^{11,14}, ya que son animales de fácil acceso y con un período de crecimiento corto; además es ampliamente aceptada su utilización para la alimentación y la experimentación, su obtención libre de patógenos es fácil, y el tamaño de sus órganos y su fisiología son bastante similares a los humanos^{1,15,16}. En la actualidad, al menos cuatro empresas de biotecnología han conseguido cerdos transgénicos que en su endotelio expresan inhibidores fisiológicos del complemento humano, con lo que se ha conseguido prevenir el rechazo hiperagudo de manera reproducible cuando los órganos de estos cerdos se trasplantan en primates.

Barreras para el xenotrasplante clínico

La técnica quirúrgica para la realización de los xenotrasplantes está ampliamente desarrollada¹⁷. Sin embargo, para que éstos puedan llegar a ser una realidad clínica, deben superarse las otras tres barreras que existen en la actualidad de forma consistente: a) la barrera inmunológica: ¿está ya superado el xenorrechazo?; b) la barrera fisiológica: ¿pueden los órganos porcinos asumir correctamente las funciones de los órganos humanos?, y c) las xenozoonosis: ¿cuál es el riesgo real de transmisión de infecciones interespecie, del cerdo al hombre, actuando el órgano porcino transplantado como vector de transmisión?

Barreras inmunológicas

Para poder aceptar el xenotrasplante como una realidad clínica desde el punto de vista inmunológico, la condición necesaria sería que el xenorrechazo pudiera modularse y transformarse a un *allorejection-type*, que los clínicos saben controlar de forma rutinaria. Se han identificado al menos cuatro tipos de xenorrechazo: a) hiperagudo; b) vascular agudo retardado; c) celular, y d) crónico.

1. *Rechazo hiperagudo.* La interacción de los xenoanticuerpos naturales del receptor con los xenoantígenos (con predominio de α -gal) del endotelio vascular del donante induce la activación del complemento, responsable del daño endotelial y finalmente de los fenómenos de trombosis y hemorragia que necrosan en minutos el órgano xenotrasplantado^{7,18}.

Los avances en la tecnología transgénica¹⁹⁻²⁰ han resuelto por completo el rechazo hiperagudo. Se ha de-

mostrado que trasplantando órganos de cerdos transgénicos para proteínas reguladoras del complemento (MCP, CD55, CD59, etc.)^{11,21,22} a primates no humanos se previene el rechazo hiperagudo, en el caso de xenotrasplante de riñón²³, de corazón²⁴ o de hígado²⁵. Esto, junto con el desarrollo de nuevas medicaciones^{22,26-29}, sobre todo las inhibidoras del complemento^{22,26,27}, está mejorando los resultados en cuanto al control del rechazo.

2. *Rechazo vascular agudo retardado*. El control del rechazo hiperagudo ha permitido conocer un tipo de xenorechazo, conocido como rechazo vascular agudo retardado, de mecanismo aún no bien esclarecido, con un componente humorar y otro componente celular (macrófagos, células *natural killer* [NK], etc.)^{12,30,31}. En los ensayos preclínicos (de cerdos transgénicos a primates) el control de este tipo de rechazo exige administrar una inmunosupresión muy potente (ciclofosfamida, altas dosis de ciclosporina o FK506, altas dosis de esteroides, altas dosis de azatioprina o mofetil micofenolato, etc.), que finalmente condiciona el fallecimiento del animal como consecuencia directa (toxicidad) o indirecta (infecciones) de la misma.

3. *Rechazo celular y crónico*. Como consecuencia de que algunos monos trasplantados con riñones transgénicos han sobrevivido varios meses (supervivencia máxima de 100 días), ha sido posible observar fenómenos de rechazo celular e incluso, de forma reciente, de rechazo crónico en estos injertos. Ésta ha sido una importante ventana de investigación que se abre por primera vez cara a plantear la realidad clínica de los xenotrasplantes³².

Barreras fisiológicas

Los ensayos preclínicos de órganos porcinos transgénicos para proteínas reguladoras de complemento han obtenido sobrevidas máximas superiores a 2 meses en el riñón³², 30 días en el corazón²⁴ y 8 días en el hígado²⁵. Estas sobrevidas han permitido estudiar la compatibilidad fisiológica de estos órganos porcinos trasplantados en los monos durante estos períodos¹⁸.

Los datos disponibles de fisiología renal a largo plazo son esperanzadores, y en la amplia serie de riñones transgénicos trasplantados en monos, en Cambridge, los riñones funcionan de forma adecuada, manteniendo valores normales de creatinina y, asimismo, del equilibrio ácido-básico e hidroelectrolítico³². Sin embargo, los receptores necesitan aporte de eritropoyetina humana para mantener cifras normales de hemoglobina, y existe asimismo una tendencia a una hipofosfatemia e hipoalbuminemia, sin albuminuria.

Los trasplantes ortotópicos de corazón de cerdo transgénico a mono funcionan de forma adecuada: la función de eyeción y la hemodinámica de estos animales se mantienen correctamente mientras que los corazones no son rechazados²⁴.

En cuanto al xenotrasplante hepático con cerdos transgénicos, se ha realizado recientemente una experiencia pionera a escala mundial en la Unidad de Investigación del Hospital Virgen de la Arrixaca²⁵, y en ella se ha demostrado en el modelo de cerdo transgénico h-DAF a babuino que el hígado porcino sintetiza factores de coagulación funcionalmente compatibles con el primate, pro-

porcionando una hemostasia normal al babuino al menos durante 8 días. Además, los monos trasplantados con estos hígados transgénicos se mantienen despiertos, conscientes y con alimentación oral durante este período. En este centro, además, se ha acumulado la serie más importante a escala mundial de xenotrasplante ortotópico de hígado en el modelo preclínico de cerdo a babuino.

Finalmente, si el xenotrasplante llega a ser una realidad clínica habrá que ver la evolución de los órganos porcinos en el hombre conforme se vayan alcanzando supervivencias de años, pues la vida normal de un cerdo ronda los 15 años, frente a la edad media de 70-80 años del ser humano.

Barreras infecciosas: xenozoonosis

Los riesgos potenciales más importantes del xenotrasplante son las infecciones, la transmisión de zoonosis a la especie humana. Existen dos tipos de infecciones que potencialmente se podrían transmitir³³: a) las vehiculizadas por los gérmenes específicos porcinos, y b) las que utilizarían el órgano porcino como vector (retrovirus porcinos).

1. *Gérmenes específicos porcinos*. Hoy día, el desarrollo biotecnológico en el área de la producción porcina asegura el nacimiento de lechones completamente libres de patógenos específicos (condiciones SPF [*specific pathogen free*])^{33,34}, lo que ha solucionado el problema de la transmisión de zoonosis. Para ello es necesario disponer de instalaciones de bioseguridad (grado P3) y tener experiencia en técnicas de obtención de lechones por histerectomía y nutrición artificial, como ha descrito recientemente el Grupo de Genética y Producción Porcinas de la Universidad de Murcia³⁴. Estas condiciones de bioseguridad están recogidas en las *Recomendaciones del documento de Consenso elaborado por la Subcomisión Nacional de Xenotrasplantes* en 1999, bajo la presidencia del Dr. Rafael Matesanz²⁵, y que se pueden consultar en la página web de la ONT.

2. *Retrovirus porcinos*. En 1997 se demostró *in vitro* que retrovirus endógenos porcinos, incorporados durante millones de años en el genoma porcino, podían transfectar linfocitos humanos mantenidos en cultivos celulares³⁶. Todos los cerdos, como los humanos, poseen retrovirus en su genoma, llamados en el cerdo retrovirus porcinos endógenos o PoERV. Éstos son el resultado de la infección por retrovirus de células germinales del cerdo, de forma que entran a formar parte del código genético y, de esta manera, serán transmitidos de una generación a otra. Este hecho potenció la investigación en virología porcina, y hasta el momento se han descrito cuatro tipos de retrovirus porcinos, favoreciendo además que los protocolos de investigación en xenotrasplantes se enriquecieran con las medidas de bioseguridad para prevenir los riesgos de xenozoonosis en los ensayos preclínicos. Muy pronto, en 1999, Paridis et al³⁷ publicaron en *Science* los resultados del seguimiento a largo plazo de más de 160 pacientes que habían mantenido contacto con tejidos vivos porcinos, incluyendo pacientes sometidos a perfusión extracorpórea con hígados y hepatocitos. En ningún caso se pudo demostrar la infección en humanos por estos re-

trovirus, y sólo en 23 pacientes se confirmó microquimerismo (presencia de células porcinas en los receptores), sin ninguna significación clínica o patológica. La mayoría de los provirus es defectuosa y no se expresan como virus infeccioso. Sin embargo, algunos podrían ser reactivados y producir viriones infecciosos³⁶, aunque su infectividad es baja.

El mayor temor referido a los retrovirus endógenos porcinos es el que después de un xenotrasplante los PoERV puedan infectar al receptor, hacerse patogénicos para él y diseminarse a otros congéneres, o que éstos puedan adaptarse en el receptor o recombinarse con otros virus y producir retrovirus más virulentos.

En este campo, las aportaciones están siendo en la actualidad muy numerosas: cabe destacar la demostración en un modelo de ratón completamente inmunocompetente (*SCID mouse*)³⁸, la transfección e incluso infección de tejido linfoide en algunos experimentos por retrovirus inoculados por vía intravenosa a dosis altas. Aunque los expertos consideran que se trata más de un modelo *in vitro* que *in vivo*, es una demostración que apoya la necesidad de establecer las máximas precauciones de bioseguridad en la investigación de xenotrasplantes. Por otro lado, nuevos trabajos clínicos de xenotrasplante con tejidos o con órganos perfundidos confirman la no infectividad *in vivo* de los pacientes por retrovirus porcinos³⁹. En la página web de la Food and Drug Administration (fda.gov/ceber/gdlns/zooxeno.pdf) se pueden consultar las

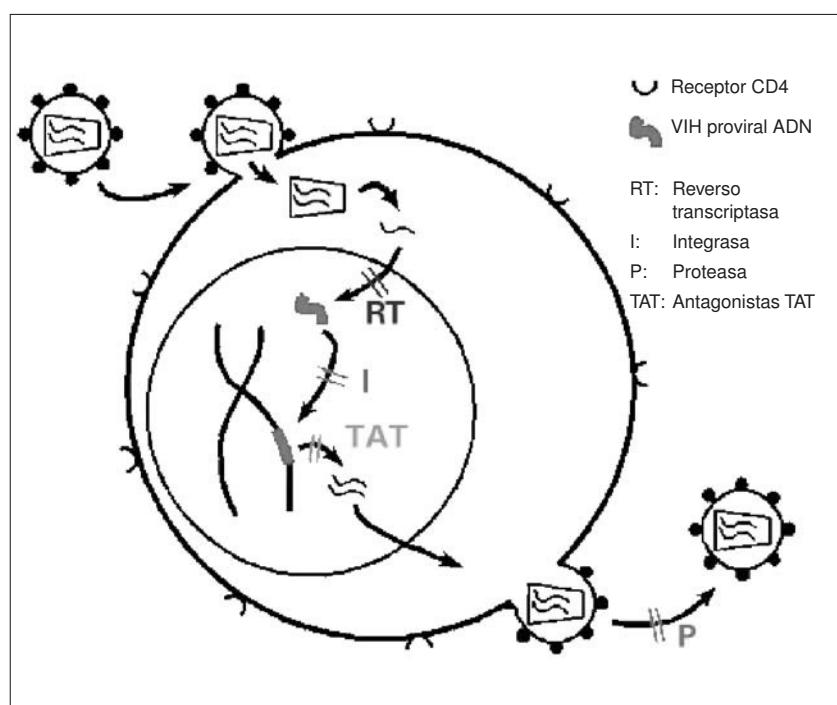


Fig. 1. Ámbitos de actuación genética para impedir la replicación de los retrovirus endógenos: reverso transcriptasa, integrasa, antagonistas TAT y proteasa.

Guías para monitorizar el riesgo de infecciones en ensayos clínicos de xenotrasplante en fase I.

Las estrategias de actuación en transgénesis ponen de manifiesto la posibilidad de utilizar una terapia génica que implique la transfección de líneas celulares porcinas con "genes suicidas" que bloquen la reverso transcriptasa e impidan la replicación del ARN y en consecuencia la posibilidad de replicación del retrovirus (figs. 1 y 2).

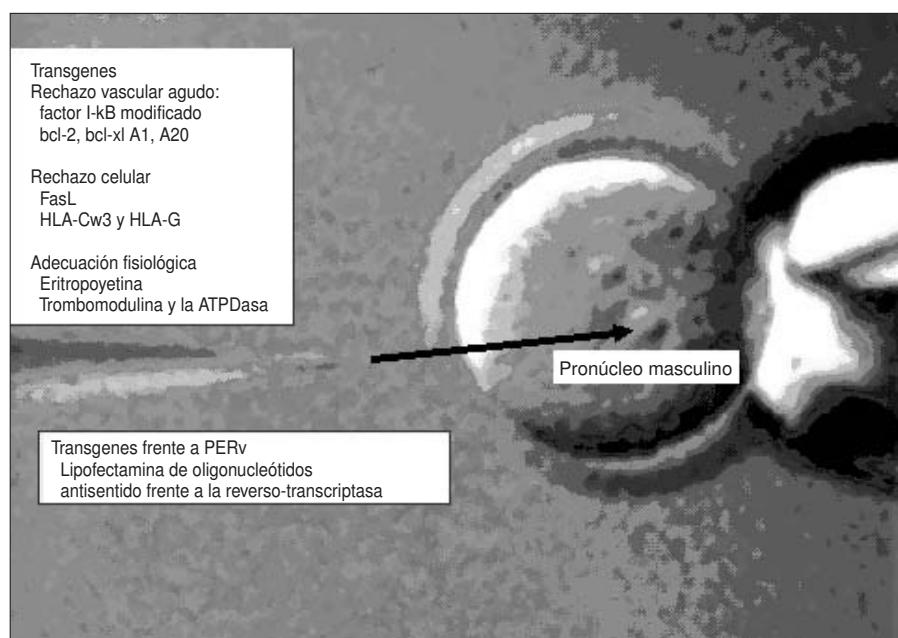


Fig. 2. Esquema de politransgénesis para la humanización de los órganos a trasplantar y para garantizar la inocuidad infecciosa del injerto.

Resultados del xenotrasplante preclínico

Xenotrasplante de riñón de cerdo a mono

Los primeros trasplantes clínicos que se hacen a principios de siglo² son xenotrasplantes, y los primeros fracasos del xenotrasplante renal en animales se relacionan con errores en la técnica quirúrgica, sobre todo en las anastomosis vasculares (trombosis, hemorragias, etc.). Superadas estas barreras técnicas³ se realizan varios xenotrasplantes, sobre todo de riñón⁴⁰, usando diferentes animales como donantes; sin embargo, los resultados son desalentadores, pues los órganos dejan de funcionar sin que se aprecien fallos técnicos o trombosis vasculares⁴⁰. A principios de los años sesenta Reemtsma⁴¹ trasplantó riñones de chimpancé en receptores humanos antes de que la diálisis estuviera disponible de forma habitual. Observó que inicialmente estos injertos tenían una adecuada función pero todos los receptores fallecían eventualmente por un rechazo incontrolable o una infección.

Los avances en la tecnología transgénica^{19,20} han resuelto el rechazo hiperagudo con órganos de cerdos transgénicos para proteínas reguladoras del complemento (MCP, CD55, CD59, etc.)^{11,21,23}. En varios estudios se ha observado que la esplenectomía mejora la supervivencia en el xenotrasplante renal en el mono^{21,32,42,43}. Como consecuencia de que algunos monos trasplantados con riñones transgénicos han sobrevivido varios meses, se ha podido estudiar su fisiología^{23,32,44-48}. Soin et al⁴⁴ en 22 xenotrasplantes renales transgénicos observaron que el injerto renal en el mono era capaz de mantener la homeostasis electrolítica plasmática, aunque desarrollaban una anemia importante que requería del aporte exógeno de eritropoyetina. Coccia et al³², en otra amplia serie de riñones transgénicos trasplantados en monos, demostraron que los riñones funcionaban de forma adecuada, manteniendo valores normales de creatinina y, asimismo, de los equilibrios ácido-base e hidroelectrolítico. Sin embargo, los receptores necesitan aporte de eritropoyetina humana para mantener normales las cifras de hemoglobina; existe asimismo una tendencia a una hipofosfatemia e hipoalbuminemia, sin albuminuria. Soin et al⁴⁴ sí observaron proteinuria pero lo achacaron al daño del injerto por el rechazo, pues se asociaba con una reducida supervivencia del injerto, aunque hay que tener en cuenta que los lechones neonatales pueden padecer de forma fisiológica proteinuria, debido a lo inmaduro del sistema tubular proximal renal. Todo esto sugiere que la fisiología interespecies es compatible para el control del sistema hormonal en la mayoría de las funciones.

Con respecto al xenotrasplante clínico con órganos sólidos, después de la experiencia de Reemtsma⁴¹ en los años sesenta no se ha realizado ninguno otro, pues el desarrollo de la diálisis hace que los pacientes en lista de espera para un trasplante renal puedan esperarlo con buena calidad de vida y no deban exponerse a una técnica hoy día experimental como el xenotrasplante hasta que se confirme su utilidad. Cabe remarcar que ninguno de los injertos utilizados en clínica es transgénico.

Xenotrasplante de corazón de cerdo a mono

Inicialmente, al igual que en el xenotransplante renal, el cardíaco presentaba malos resultados por el rechazo hiperagudo^{49,50}, aunque en algunos casos como los descritos por Kaplon et al^{51,52} se consiguieron largas supervivencias con cerdos no modificados genéticamente. Sin embargo, a pesar de varios intentos y modelos^{53,54}, no fue hasta la superación del rechazo hiperagudo con los cerdos transgénicos para h-DAF cuando se empiezan a conseguir resultados esperanzadores^{24,55-62}. Así, Vial et al⁶³ presentaron un mono trasplantado con una supervivencia de 39 días, en que la necropsia puso de manifiesto una arquitectura miocárdica bien preservada con pequeños focos de rechazo humorar moderado. Es decir, existen largas supervivencias con un trasplante cardíaco discordante con órganos h-DAF transgénicos y un régimen de inmunosupresión aceptable, conservando una función cardiopulmonar aceptable. Posteriormente Bhatti et al⁶⁴ refieren supervivencias de 3 meses con estos co-razones h-DAF.

Estas sobrevidas han permitido estudiar la compatibilidad fisiológica de estos órganos porcinos trasplantados en los monos durante estos períodos^{63,65-68}. Los trasplantes ortotópicos de corazón de cerdo transgénico a mono funcionan de forma adecuada con una buena fracción de eyeción y hemodinámica²⁴. Sin embargo, se ha observado que las válvulas del corazón porcino pueden sufrir daño con el tiempo por los diferentes gradientes de presión que existen entre un receptor que anda erecto frente a un corazón de un donante que anda a cuatro patas¹.

Con respecto al xenotrasplante clínico destaca el realizado por Bailey⁶⁹ en 1985, que trasplantó un corazón de babuino a un recién nacido y sobrevivió 3 semanas hasta que el injerto sufrió un rechazo mediado por anticuerpos. No existe ningún caso publicado con cerdos transgénicos.

Xenotrasplante de hígado de cerdo a mono

El hígado es un órgano más complejo que el riñón y el corazón, tanto por su funcionalidad como por su sensibilidad a la isquemia, de ahí que la experiencia de los xenotrasplante hepático (Xtoh) de cerdo a primate no humano sea muy limitada (tabla 1)^{25,70-74}. En la mayoría de los xenotrasplantes hepáticos de cerdo no modificado genéticamente a primate no humano realizados hasta el momento, la sobrevida no ha superado las 12 h. Sólo en tres casos el animal sobrevivió más de 3 días. Uno fue realizado por Calne⁷⁰ en 1968, sin aplicar ninguna medida para prevenir el rechazo hiperagudo. El babuino falleció por una infección pulmonar, y el hígado evidenciaba una histología normal. Los otros dos casos, referidos por Powelson et al⁷², 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 xenotrasplantes hepáticos, los parámetros de coagulación durante el postoperatorio alcanzaron cifras normales, a pesar de que en algunos estudios *in vitro* se ha descrito la incompatibilidad de los factores de la coagulación porcinos y de primates⁵⁸. Con los hígados de cerdo transgénicos para el h-DAF se ha

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

| Autores, año y referencia bibliográfica | N.º de casos | Donante | Receptor | Técnica | Sobrevida | Comentario |
|--------------------------------------------------------------|--------------|---------------------|-----------------------------------|------------|--------------------------------------------|----------------------|
| Calne et al, 1968 ⁷⁰ | 7 | Cerdo | Babuino | TOH | 6, 6, 9, 19, 30, 36, 84 h | 1 sin rechazo |
| Calne et al, 1970 ⁷¹ | 4 | Cerdo | 3 MR | TOH TOH | < 12 h | |
| Powelson et al, 1994 ⁷² | 6 | Cerdo | 1 babuino 2 babuinos 4 MC | TOH THH | 72, 75 h < 14 h | Perfusión |
| Luo et al, 1998 ⁷³ | 8 | Cerdo | 2 babuinos 6 MR | THH TOH | < 6 h | |
| Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca ^{25,*} | 10 | 4 control 5 hDAF | Babuino | TOH TOH | 2, 3, 8, 8 h 18, 24, 24 h, 4, 8 días | C5b9 No C5b9 |
| Makowka et al, 1994 ⁷⁴ | 1 | 1CD55+CD59 Cerdo | Paciente con hepatitis fulminante | TOH THH | 26 h 30 h | No C5b9 Perfusión |

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

prevenido el rechazo hiperagudo. En nuestro centro se han realizado xenotrasplantes hepáticos con hígados transgénicos²⁵ y se observa que se previene el rechazo hiperagudo. Además, el hígado porcino sintetiza factores de coagulación funcionalmente compatibles con el primate, proporcionando una hemostasia normal al babuino al menos durante 8 días⁷⁶⁻⁷⁹. Levy et al⁸⁰ han comunicado recientemente 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 en contacto con órganos y perfusiones porcinas⁸¹, a pesar de que se había demostrado *in vitro* que podían transfectar células humanas, hace posible pensar en plantear un ensayo clínico de xenotrasplante hepático en casos de fallo hepático fulminante, como puente hasta el trasplante definitivo. Ésta puede ser una situación clínica ideal para que la investigación en xenotrasplante abandone el laboratorio⁸², y se dé el primer paso clínico^{83,84}. Sin embargo, habrá que valorar la fisiología hepática a más largo plazo, pues existen más de 2.000 proteínas específicas de especie que sintetiza este órgano.

Con respecto al xenotrasplante clínico con órganos sólidos, sólo existe una referencia de xenotrasplante hepático porcino, con un hígado no transgénico, que Makowka⁷⁴ realizó en 1993 a un paciente con hepatitis fulminante. El hígado se colocó en posición heterotópica, y se sometió 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.

Otros xenotrasplantes

Hay xenotrasplantes de otros órganos que se están investigando, como el de pulmón⁸⁵⁻⁸⁷, aunque aún son pocos y sus resultados todavía no son valorables.

Xenotrasplante clínico

El xenotrasplante de células neuroendocrinas porcinas para la enfermedad de Parkinson y para la diabetes es ya una realidad clínica. En la actualidad se están realizando diversos ensayos clínicos en fase II con islotes pancreáticos porcinos en diabéticos tipo I⁸⁸, y se ha comunicado su eficacia para el control del metabolismo de la glucosa, aunque no existen todavía datos sobre los resultados a largo plazo.

También se han realizado varios ensayos clínicos con perfusión extracorpórea de hígados porcinos, transgénicos⁸⁰ y no modificados genéticamente⁸⁹, en pacientes con fallo hepático fulminante o con hepatopatía terminal, pero con pobres resultados en cuanto al functionalismo hepático.

Con respecto al xenotrasplante clínico con órganos sólidos, después de la experiencia publicada por Reemtsma⁴¹ en los años sesenta, sólo se han realizado tres experimentos exitosos usando el babuino como donante. En 1985, Bailey⁶⁹ trasplantó un corazón de babuino a un recién nacido y sobrevivió 3 semanas. En 1993, Starzl⁹⁰ trasplantó dos hígados, también de babuinos, a sendos pacientes, que sobrevivieron 70 y 26 días, aunque ambos fallecieron por sepsis secundaria a la intensa inmunosupresión. Sólo existe una referencia de xenotrasplante hepático porcino, con un hígado no transgénico, que Makowka⁷⁴ realizó en 1993 a un paciente con hepatitis fulminante, que falleció por rechazo hiperagudo, ya que no se actuó para inhibir el complemento.

Hasta la fecha no se ha comunicado ningún xenotrasplante clínico con órganos porcinos transgénicos. Existe unanimidad entre los grupos que investigan en xenotrasplante de órganos en que la razón de ello es que las barreras inmunológicas, tal y como han sido expuestas, no se han superado todavía⁹¹. Todos los esfuerzos están orientados actualmente a estudiar los mecanismos del rechazo vascular agudo retardado para así poder diseñar estrategias que lo prevengan con efectividad.

Por tanto, esta unanimidad fundamenta el pensamiento de que los xenotrasplantes de órganos podrían estar "a

la vuelta de la esquina", aunque como dice Sir Roy Calne, puede ser una esquina muy larga ("clinical xenotransplantation is just around the corner, but it may be a very long corner"). Sin embargo, algunos autores se cuestionan si podrían utilizarse en situaciones de urgencia, como órgano puente hasta que aparezca un órgano humano^{18,92}. Estas situaciones de extrema urgencia no se dan en la insuficiencia renal, ya que existe la hemodiálisis como tratamiento sustitutivo. Sí se dan, por el contrario, en pacientes con fracaso ventricular, pero actualmente existen novedosos mecanismos de soporte ventricular mecánico, incluidos los balones de contrapulsación o los corazones artificiales, que permiten la llegada a tiempo del corazón para ser trasplantado. Finalmente también se dan en situaciones de fallo hepático fulminante, ya sea por hepatitis fulminante o por necesidad de un retrasplante urgente. En estas situaciones se han ensayado diversos procedimientos, como el soporte extracorpóreo de hepatocitos o la perfusión extracorpórea de hígados porcinos, pero con pobres resultados. Es aquí donde puede tener lugar el xenotrasplante hepático, ortotópico o heterotópico con un hígado porcino transgénico, que puede dar margen a que el paciente espere en buena situación clínica el hígado humano definitivo. Incluso si se hiciera en posición heterotópica, a los vasos ilíacos (trasplante auxiliar), como recientemente han publicado Margarit et al⁹³ con un alotrasplante en un caso de hepatitis fulminante tóxica, podría dar tiempo a que el hígado nativo se recuperase, y de esa manera, tras retirar el injerto en un segundo tiempo, evitar los efectos adversos de la inmunosupresión de por vida.

Hace unos días vivimos una situación trágica en nuestro hospital. Desde un hospital comarcal nos refirieron a un paciente de 37 años, que tras cirugía laparoscópica por colelitiasis no complicada presentó una gangrena hepática por ligadura de la arteria hepática y entró en código urgente de trasplante hepático. La situación tóxica obligó a dejarlo anhepático al día siguiente, y en esta situación estuvo esperando el hígado 18 h. Cuando el hígado donante llegó, el paciente hacía 2 h que había fallecido. Entendemos que, en una situación similar, Makowka intentaría el xenotrasplante con un hígado porcino aunque no fuera transgénico⁷⁴. Sin duda, un trasplante con un hígado porcino transgénico hubiera podido salvar la vida de nuestro paciente. Afortunadamente, estas situaciones son poco frecuentes, pero son las que nos van a obligar a dar el salto a la clínica, tal y como enfatiza un reciente editorial de *The Lancet*: "Xenotransplantation: time to leave the laboratory"⁸².

Líneas actuales y futuras del xenotrasplante

Se trabaja intensamente en conocer los mecanismos íntimos de las vías humorales y celulares del rechazo vascular agudo retardado. De forma reciente se ha conseguido disminuir el componente humoral mediante la administración de agentes antitrombóticos⁹⁴, con el uso de cerdos deficitarios del antígeno gal obtenidos mediante la tecnología de microinyección o de transferencia nuclear²¹, y utilizando nuevos agentes farmacológicos o anticuerpos monoclonales frente a células B (p. ej., anti-CD

20) o células T (bloqueando la interacción B7 entre los antígenos leucocitarios porcinos y el complejo mayor de histocompatibilidad)⁹⁵⁻⁹⁷. De forma reciente, nuestro grupo de trabajo ha descrito que los clones gamma-delta pueden desempeñar un papel importante en el xenorrechazo³⁰, por lo que actuaciones con manipulaciones genéticas para inducir apoptosis en el sistema FAS-FASLigando o el uso de inhibidores farmacológicos del sistema PARP⁹⁸ podrían ser útiles en controlar esta vía de activación.

Uno de los campos de máximo interés en la investigación del xenorrechazo es el de la tolerancia inmunológica⁹⁹. El uso de diferentes estrategias, incluida la administración de anticuerpos monoclonales para deplecionar poblaciones linfocitarias o dirigidos frente a diferentes moléculas coestimuladoras, en un futuro inmediato podría reducir la necesidad de administrar altas dosis de inmunosupresión para el control del xenorrechazo.

Recientemente, la Unidad de Nefrología y Trasplante Renal de la Mayo Clinic ha comenzado un protocolo clínico de trasplante renal de donante vivo en pacientes hiperinmunizados (más de 20 casos, datos no publicados), donde han conseguido controlar el rechazo humorar, utilizando un protocolo de inmunosupresión que incluye plasmaférésis repetidas y administración de anticuerpos monoclonales anti-CD20, que deplecionan linfocitos B. La tasa de rechazo es del 25% pero en ningún caso se ha perdido el injerto, aunque aún no se conocen los resultados del seguimiento a largo plazo. Este ensayo clínico realmente proporciona una información muy importante cara al tratamiento de la inmunosupresión que sería necesaria en un ensayo clínico de xenotrasplante renal.

Por último, la solución de las incompatibilidades fisiológicas del xenotrasplante renal³² o hepático²⁵ vendrán necesariamente de la mano de la tecnología transgénica. La introducción de un transgén que codifique para la eritropoyetina humana evitaría la administración exógena de eritropoyetina para mantener los valores de hemoglobina (fig. 2). En cuanto al xenotrasplante hepático, habría que detectar las incompatibilidades metabólicas, posiblemente fundamentalmente en dos sentidos: *a*) en lo que se refiere a interacciones de hormonas humanas y receptores porcinos (p. ej., insulina humana y receptor porcino de la insulina humana); *b*) en lo relativo a la compatibilidad de las proteínas porcinas para ejercer su función adecuadamente en ambiente humano. Es necesario, por tanto, detectar y priorizar estas incompatibilidades para solucionarlas con manipulación transgénica.

Parece obvio, por tanto, que la vía que puede convertir en realidad clínica el xenotrasplante de órganos ha de pasar posiblemente por la generación de animales politransgénicos, que expresen de forma simultánea el número de proteínas necesarias para "humanizar" el hígado donante y permitir, así, tanto su aceptación inmunológica como su correcto funcionamiento desde el punto de vista fisiológico. Con la metodología existente en este momento es posible la microinyección de una mezcla equimolar de diferentes construcciones genéticas que codifican para diferentes proteínas²⁰. De esta forma se puede generar una línea politransgénica para dichas proteínas que podría cruzarse con otras líneas politransgénicas

para incrementar en poco tiempo el número de transgenes presentes en el animal. Igualmente, otros avances recientemente incorporados del área de la reproducción porcina, que simplifican de forma extraordinaria el implante de embriones transgénicos, o en el área de la clonación (ya se han conseguido clonar cerdos transgénicos), influirán decisivamente en reducir de forma significativa la velocidad de la reacción para la obtención de cerdos politransgénicos cada vez más "humanizados".

El xenotrasplante presenta diversos dilemas éticos en los que se entrecruzan diferentes perspectivas^{35,100}. En primer lugar, la de salvar vidas humanas, junto con los principios que deben presidir toda experimentación clínica, previniendo el cobayismo. En segundo lugar, los relativos a la salvaguarda de la salud pública y el medio ambiente y a la protección de los animales utilizados con fines experimentales o de tratamiento del ser humano.

Los diferentes aspectos éticos del xenotrasplante requieren especial atención, debido a sus características diferenciales en comparación con otro tipo de trasplantes, su estadio experimental, los riesgos para la persona que recibe un trasplante, para la salud pública en general y el hecho de que el material que debe ser trasplantado procede de una especie animal diferente del ser humano. La situación del animal en la escala filogenética ostenta también una gran importancia ética.

El xenotrasplante constituye actualmente una línea de investigación muy sugestiva y prometedora, a pesar de las barreras científicas existentes, que debe continuar en todo caso, y ser estimulada y apoyada cuanto sea necesario. Al mismo tiempo, exige una extraordinaria prudencia, sobre todo cuando se pretenda dar el salto al ser humano, puesto que si bien parece que las barreras inmunológicas y fisiológicas, aun siendo importantes, podrían quedar resueltas con mayor o menor dificultad y permitir en el futuro al menos el xenotrasplante como procedimiento transitorio o puente hasta que se obtenga el órgano humano idóneo para el receptor, esto no sería aconsejable mientras no se logren soluciones claras y fiables a los potenciales o teóricos riesgos de transmisión de enfermedades interespecie, pensando tanto en el paciente como en la colectividad (su entorno, posible descendencia, la sociedad en general). Éticamente no parece lógica cualquier iniciativa clínica mientras este decisivo aspecto no quede claramente resuelto.

Bibliografía

- Grant D, Mendicino M, Levy G. Xenotransplantation: Just around the corner? *Surgery* 2001;129:243-7.
- Jaboulay M. Kidney grafts in the antecubital fossa by arterial and venous anastomosis. *Lyon Med* 1906;107:575-92.
- Carrel A. The operative technique for vascular anastomoses and transplantation of viscera. *Lyon Med* 1902;98:859-73.
- Reemtsma K, McCracken BH, Schiegel JV, Pearl M. Heterotransplantation of the kidney: two clinical experiences. *Science* 1964; 143:700-2.
- Medawar PB. The behavior and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. *J Anat* 1944;78:176-99.
- Calne RY. Organ transplantation between widely disparate species. *Trans Proc* 1970;2:550-4.
- 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.
- UNOS. Disponible en: www.unos.org.
- Matesanz R, Miranda B. Need for liver transplantation. *Lancet* 1995;28:1168-9.
- ONT. Disponible en: www.Msc.es/ont/esp/home.htm.
- 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.
- Platt JL. New directions for organ transplantation. *Nature* 1998; 392(Suppl):11-7.
- Dorling A, Riesbeck K, Warrens A, Lechler R. Clinical xenotransplantation of solid organs. *Lancet* 1997;349:867-71.
- Caplan A. The case for using pigs. *Bull World Health Organ* 1999; 77:67-8.
- Majado MJ, Hernández Q, Ramírez P, Loba M, Munitiz V, Chávez R, et al. Selection criteria of donors and recipients in pig to baboon orthotopic liver xenotransplantation. *Transplant Proc* 1999;31:2810-1.
- Muñoz A, Ramis G, Pallares FJ, Martínez JS, Chávez R, Munitiz V, et al. Selection criteria for mothers of future donor candidates for xenotransplantation (pigs to baboon). *Transplant Proc* 1999;31: 2807-9.
- Zhang Z, Bedard E, Luo Y, Wang H, Deng S, Kelvin D, et al. Animal models in xenotransplantation. *Expert Opin Investig Drugs* 2000;9:2051-68.
- Halperin EC. Non human to human organ transplantation: its biological basis and a potential role for radiation therapy. *Int J Cancer* 2001;96:76-89.
- Yelamos J, Ramírez P, Parrilla P. Animales modificados genéticamente como donantes de órganos en xenotrasplante. *Med Clin* 2000;114:342-8.
- Yelamos J, Klix N, Goyenechea B, Lozano F, Chui YL, González-Fernández A, et al. Targeting of non. Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. *Nature* 1995;376:225-9.
- Cowan PJ, Aminian A, Barlow H, Brown AA, Chen CG, Fisicaro N, et al. Renal xenografts from triple transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non immunosuppressed baboons. *Transplantation* 2000;69:2504-15.
- Vangerow B, Hecker JM, Lorenz R, Loss M, Przemeck M, Appiah R, et al. C1-inhibitor for treatment of acute vascular xenograft rejection in cynomolgus recipients of h-DAF transgenic porcine kidneys. *Xenotransplantation* 2001;8:266-72.
- 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.
- 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.
- Ramírez P, Chávez R, Majado M, Munitiz V, Muñoz A, Hernández Q, et al. Life-supporting human complement regulator decay accelerating factor transgenic pig liver xenograft maintains the metabolic function and coagulation in the nonhuman primate for up to 8 days. *Transplantation* 2000;70:989-98.
- Hecker JM, Lorenz R, Appiah R, Vangerow B, Loss M, Kunz R, et al. C1 inhibitor for prophylaxis of xenograft rejection after pig to cynomolgus monkey kidney transplantation. *Transplantation* 2002; 73:688-94.
- Salerno CT, Kulick DM, Yeh CG, Guzman Paz M, Higgins PJ, Benson BA, et al. A soluble chimeric inhibitor of C3 and C5 convertases, complement activation blocker-2, prolongs graft survival in pig to rhesus monkey heart transplantation. *Xenotransplantation* 2002;9:125-34.
- Chen G, Wang XM, Sun QY, Shen SQ, Guo H, Wang H, et al. Prevention of hyperacute rejection of pig to monkey cardiac xenografts by chinese cobra venom factor. *Transplant Proc* 2001;33: 3857-8.
- Kozlowski T, Shimizu A, Lambright D, Yamada K, Fuchimoto Y, Glaser R, et al. Porcine kidney and heart transplantation in baboons undergoing a tolerance induction regimen and antibody adsorption. *Transplantation* 1999;67:18-30.
- Rodríguez-Gago M, De Heredia A, Ramírez P, Parrilla P, Aparicio P, Yelamos J. Human anti-porcine gammadelta T cells xenoreactivity is inhibited by human Fas L expression on porcine endothelial cells. *Transplantation* 2001;72:503-9.
- Loss M, Schmidtko J, Przemeck M, Kunz R, Arends H, Jalali A, et al. A primate model for discordant pig to primate kidney xenotransplantation without hyperacute graft rejection. *Invest Surg* 2001;14:21-9.

32. Cozzi E, Bhatti F, Schmoeckel M, Chávez G, Smith KG, Zaidi A, et al. Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation* 2000;70:15-21.
33. Fishman JA. Infection in xenotransplantation. *BMJ* 2000;321:717-8.
34. Muñoz A, Pallares FJ, Ramis G, Martínez JS, Munitiz V, Ramírez P, et al. Surgical procedure for specific pathogen free piglet production by modified terminal hysterectomy. *Transplant Proc* 1999;31:2627-8.
35. Matesanz R, Miranda B. Recomendaciones del Comité Nacional de Xenotrasplante. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 1999.
36. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Zoonosis in xenotransplantation. *Curr Opin Immunol* 1998;10:539-42.
37. 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. *Science* 1999;285:1236.
38. Van der Laan LJ, Lockey C, Griffith BC, Frasier FS, Wilson CA, et al. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 2000;27:29-30.
39. Switzer WM, Michler RE, Shanmugam V, Matthews A, Hussain AI, Wright A, et al. Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus infection to nonhuman primate recipients of porcine cells, tissues, or organs. *Transplantation* 2001;71:959-65.
40. Hancock WW. The past, present, and future of renal xenotransplantation. *Kidney Int* 1997;51:932-44.
41. Reemtsma K. Renal heterotransplantation from non human primates to man. *Ann NY Acad Sci* 1969;162:412-8.
42. Schmoeckel M, Bhatti FNK, Zaidi A, Cozzi E, Chávez G, Wallwork J, et al. Splenectomy improves survival of h-DAF transgenic pig kidneys in primates. *Transplant Proc* 1999;31:961.
43. Bhatti FN, Zaidi A, Schmoeckel M, Cozzi E, Chávez G, Wallwork J, et al. Survival of life supporting h-DAF transgenic kidneys in primates is enhanced by splenectomy. *Transplant Proc* 1998;30: 2467.
44. Soin B, Smith KG, Zaidi A, Cozzi E, Bradley JR, Ostlie DJ, et al. Physiological aspects of pig to primate renal xenotransplantation. *Kidney Int* 2001;60:1592-7.
45. Cohen AJ, Larson TS, Dean P, Logan J, Diamond L, McGregor CG, et al. Renal physiology in pig to baboon xenografts. *Transplant Proc* 2001;33:727-8.
46. Loss M, Vangerow B, Schmidtko J, Kunz R, Jalali A, Arends H, et al. Acute vascular rejection is associated with systemic complement activation in a pig to primate kidney xenograft model. *Xenotransplantation* 2000;7:186-96.
47. Loss M, Przemeck M, Schmidtko J, Arends H, Kunz R, Jager K, et al. Long term survival of cynomolgus monkeys following pig to primate kidney xenotransplantation using h-DAF transgenic donor organs. *Transplant Proc* 2000;32:1095-6.
48. Zaidi A, Bhatti F, Schmoeckel M, Cozzi E, Chávez G, Wallwork J, et al. Kidneys from h-DAF transgenic pigs are physiologically compatible with primates. *Transplant Proc* 1998;30:2465-6.
49. Artrip JH, Kwiatkowski P, Michler RE, Itescu S. Immunologic barriers in pig to primate cardiac xenotransplantation. *Ann Transplant* 1997;2:5-11.
50. Minanov OP, Artrip JH, Szabolcs M, Kwiatkowski PA, Galili U, Itescu S, et al. Triple immunosuppression reduces mononuclear cell infiltration and prolongs graft life in pig to newborn baboon cardiac xenotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:998-1006.
51. Kaplon RJ, Michler RE, Xu H, Kwiatkowski PA, Edwards NM, Platt JL. Absence of hyperacute rejection in newborn pig to baboon cardiac xenografts. *Transplantation* 1995;59:1-6.
52. Kaplon RJ, Platt JL, Xu H, Kwiatkowski PA, Edwards NM, Michler RE. Prolonged survival of pig cardiac xenografts in unmodified newborn baboons. *Transplant Proc* 1994;26:1072.
53. Fukushima N, Shirakura R, Chang J, Yamaguchi T, Kobayashi Y, Yoshitatsu M, et al. Prolonged survival of pig cardiac xenografts in baboons by sequential cardiac transplantation. *Transplant Proc* 1998;30:3815-7.
54. Bailey LL, Gundry SR. Survival following orthotopic cardiac xenotransplantation between juvenile baboon recipients and concordant and discordant donor species: foundation for clinical trials. *World J Surg* 1997;21:943-50.
55. Waterworth PD, Dunning J, Tolan M, Cozzi E, Langford G, Chávez G, et al. Life supporting pig to baboon heart xenotransplantation. *J Heart Lung Transplant* 1998;17:1201-7.
56. Adams DH, Chen RH, Kadner A, Naficy S. Technique for heterotopic pig heart xenotransplantation in primates. *Ann Thorac Surg* 1999;68:265-8.
57. Chen RH, Naficy S, Logan JS, Diamond LE, Adams DH. Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates. *Xenotransplantation* 1999;6:194-200.
58. Lin SS, Weidner BC, Byrne GW, Diamond LE, Lawson JH, Hooypes CW, et al. The role of antibodies in acute vascular rejection of pig to baboon cardiac transplants. *J Clin Invest* 1998;101:1745-56.
59. McCurry KR, Kooyman DL, Alvarado CG, Cotterell AH, Martin MJ, Logan JS, et al. Human complement regulatory proteins protect swine to primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med* 1995;1:423-7.
60. Schuurman HJ, Pino Chávez G, Phillips MJ, Thomas L, White DJ, Cozzi E. Incidence of hyperacute rejection in pig to primate transplantation using organs from h-DAF transgenic donors. *Transplantation* 2002;73:1146-51.
61. Goddard J, Dunning J, Horsley J, Atkinson C, Pino Chávez G, Wallwork J. Histopathology of cardiac xenograft rejection in the pig to baboon model. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:474-84.
62. Miyazaki K, Watanabe S, Miyatake T, Watanabe T, Kubota S, Murashita T, et al. Structural analysis of hyperacute rejection in cardiac xenotransplantation: comparison of two different donor recipient species combinations. *Transplant Proc* 2000;32:946.
63. Vial CM, Ostlie DJ, Bhatti FN, Cozzi E, Goddard M, Chávez GP, et al. Life supporting function for over one month of a transgenic porcine heart in a baboon. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:224-9.
64. Bhatti FN, Schmoeckel M, Zaidi A, Cozzi E, Chávez G, Goddard M, et al. Three month survival of h-DAFF transgenic pig hearts transplanted into primates. *Transplant Proc* 1999;31:958.
65. Przemeck M, Vangerow B, Loss M, Schmidtko J, Klempnauer J, Ruckoldt H, et al. Hemodynamic consequences of porcine kidney xenograft reperfusion in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 2001;71:1512-4.
66. Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, Eder V, et al. Prevention of hyperacute xenograft rejection in orthotopic xenotransplantation of pig hearts into baboons using immunoabsorption of antibodies and complement factors. *Transpl Int* 2000;13(Suppl 1):S508-17.
67. Brenner P, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Felbinger T, Hinz M, Eder V, et al. Technique of immunoapheresis in heterotopic and orthotopic xenotransplantation of pig hearts into cynomolgus and rhesus monkeys. *Transplant Proc* 2000;32:1087-8.
68. Chen RH, Kadner A, Adams DH. Monitoring pig to primate cardiac xenografts with live Internet images of recipients and xenograft telemetric signals: histologic and immunohistochemical correlations. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:591-7.
69. Bailey LL, Nehls-Cannarella SL, Concepcion W, Jolle WB. Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA* 1985, 254:3321-9.
70. Calne RY, White HJO, Herbertson BM, Millard PR, Davis DR, Salaman JR, et al. Pig to baboon liver xenografts. *Lancet* 1968;1:1176-8.
71. 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.
72. Powelson J, Cosimi AB, Asuton W Jr, Baillie M, Colvin R, Gianello P, et al. Porcine to primate orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1994;26:1353-4.
73. 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.
74. 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.
75. Wolf P. Xenotransplantation of the liver. *Ann Transplant* 2000;5:53-4.
76. Ramírez P, Chávez R, Majado M, Munitiz V, Muñoz A, Hernández Q, et al. The porcine liver supports metabolic homeostasis in the nonhuman primate: experimental study in a model of orthotopic liver transplantation from h-DAF transgenic pig to baboon. *Transplant Proc* 2000;32:1112-3.
77. Munitiz V, Ramírez P, Hernández Q, Loba M, Chávez R, Muñoz A, et al. Hematologic and hepatic function profile comparison between pig and baboon in an orthotopic liver xenotransplantation model. *Transplant Proc* 1999;31:2641-2.
78. Minguela A, Ramírez P, Carrascosa C, Majado MJ, Munitiz V, Hernández Q, et al. Identification of porcine proteins in baboon sera after pig liver xenotransplantation. *Transplant Proc* 1999;31:2635-7.

79. Majado MJ, Ramírez P, Minguela A, Hernández Q, González C, Loba M, et al. Evolution of blood coagulation factors and hemotherapeutic support in three pig to baboon orthotopic liver xenotransplants. *Transplant Proc* 1999;31:2622-4.
80. Levy MF, Crippin J, Sutton S, Netto G, McCormack J, Curiel T, et al. Liver allotransplantation 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.
81. 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.
82. Xenotransplantation: time to leave the laboratory [editorial]. *Lancet* 1999;354:1657.
83. Parrilla P, Ramírez P. Luces y sombras en el trasplante hepático. *Med Clin (Barc)* 2000;115:542-5.
84. 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.
85. Lau CL, Daggett WC, Yeatman MF, Chai P, Lin SS, Lodge AJ, et al. The role of antibodies in dysfunction of pig to baboon pulmonary transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:29-38.
86. Kaplon RJ, Platt JL, Kwiatkowski PA, Edwards NM, Xu H, Shah AS, et al. Absence of hyperacute rejection in pig to primate orthotopic pulmonary xenografts. *Transplantation* 1995;59:410-6.
87. Macchiarini P, Oriol R, Azimzadeh A, De Montpreville V, Wolf P, Darteville P. Characterization of a pig to goat orthotopic lung xenotransplantation model to study beyond hyperacute rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:805-14.
88. Reinholt FP, Hultenby K, Tibell A, Korsgren O, Groth CG. Survival of fetal porcine pancreatic islet tissue transplanted to a diabetic patient: findings by ultrastructural immunocytochemistry. *Xenotransplantation* 1998;5:222-5.
89. Stockmann HB, Hiemstra CA, Marquet RL, Ijzermans JN. Extracorporeal perfusion for the treatment of acute liver failure. *Ann Surg* 2000;231:460-70.
90. Starlz TE, Fung J, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Marino JR, et al. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* 1993;341:65-71.
91. Samstein B, Platt JL. Physiologic immunologic hurdles to xenotransplantation. *Am Soc Nephrol* 2001;12:182-93.
92. Simon A, Hammer C. Xenotransplantation so close but yet so far. *Transplantation* 2002;73:1-2.
93. Margarit C, Bilbao I, Charco R, Lázaro JL, Hidalgo E, Allende E, et al. Auxiliary heterotopic liver transplantation with portal arterialization for fulminant hepatic failure. *Liver Transplantation* 2000;6:805-9.
94. Fiorante P, Banz Y, Mohacsi PJ, Kappeler A, Wuillemin WA, Macchiarini P, et al. Low molecular weight dextran sulfate prevents complement activation and delays hyperacute rejection in pig-to-human xenotransplantation models. *Xenotransplantation* 2001;8:24-35.
95. Appel JZ 3rd, Alwayn IP, Buhler L, DeAngelis HA, Robson SC, Cooper DK. Modulation of platelet aggregation in baboons: implications for mixed chimerism in xenotransplantation. I. The roles of individual components of a transplantation conditioning regimen and of pig peripheral blood progenitor cells. *Transplantation* 2001;72:1299-305.
96. Jonker M, Rijkelijkhuizen JK, Haanstra KG, Kuhn EM, Ringers J, Bouwman E. T cell directed immunosuppression allows prolonged survival of xenogeneic pig islets in monkeys. *Transplant Proc* 2001;33:726.
97. Basker M, Buhler L, Alwayn IP, Appel JZ 3rd, Cooper DK. Pharmacotherapeutic agents in xenotransplantation. *Expert Opin Pharmacother* 2000;1:757-69.
98. Cayuela ML, Carrillo A, Ramírez P, Parrilla P, Yélamos J. Genomics instability in a PARP-1 cell line expressing PARP-1 DNA binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:289-94.
99. Rodríguez-Barbosa JL, Zhao Y, Barth R, Zhao G, Arn JS, Sachs DH, et al. Enhanced CD4 reconstitution by grafting neonatal porcine tissue in alternative locations is associated with donor-specific tolerance and suppression of pre-existing xenoreactive antibodies. *Transplantation* 2001;72:1223-31.
100. Consejo de Europa, Asamblea Parlamentaria. Recomendación sobre xenotrasplante [Documento 8166]. Aprobado el 29 de enero de 1999.