

Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen **49**
Volume

Número **3**
Number

Julio-Septiembre **2002**
July-September

Artículo:

Mecanismos de reconocimiento humoral en el xenotrasplante de órganos sólidos: I. Revisión del rechazo hiperagudo

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)

Mecanismos de reconocimiento humoral en el xenotrasplante de órganos sólidos:

I. Revisión del rechazo hiperagudo

Palabras clave: Complemento, anticuerpos anti-Gal, rechazo hiperagudo, xenotrasplante.

Key words: Complement, anti-Gal antibodies, hyperacute rejection, xenotransplantation.

Abreviaturas:

CVF, factor de veneno de cobra; Fab', sitio de combinación antigénica; MAC, complejo de ataque a la membrana; Nab's, anticuerpos naturales; XNa-Ig, xenorreactividad por inmunoglobulinas.

Recibido: 26/04/02

Acceptado: 13/05/02

Gabriel Arteaga Troncoso,* Fernando M Guerra-Infante**

* Investigador asociado adscrito al Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal. Instituto Nacional de Perinatología, SSA. (Alumno de doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México).

** Investigador en Inmunología. Instituto Nacional de Perinatología, SSA. (Tutor del Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México).

Correspondencia:

M en C. Gabriel Arteaga Troncoso

Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal.

Instituto Nacional de Perinatología, SSA. Montes Urales 800

Colonia Lomas Virreyes, C.P. 11000, México, D.F.

Teléfono (55) 5520-9900 ext. 334, fax: (55) 5520-0034; domicilio (55) 5582-1985.

Correo electrónico: garteaga@latinmail.com

130

Resumen

El trasplante de tejidos vascularizados entre especies filogenéticamente distantes ocasiona que tales tejidos sean rápidamente y violentamente destruidos mediante el proceso denominado rechazo hiperagudo. En algunas combinaciones de cerdo y primate el rechazo del injerto es iniciado por el reconocimiento de anticuerpos del receptor a los antígenos presentes en los vasos sanguíneos del donador. Los anticuerpos unidos a los blancos antigénicos activan al complemento, el cual potencializa el evento patogénico. La xenorreactividad observada en el rechazo hiperagudo varía sustancialmente de experimento a experimento y de especie a especie, existe relativa investigación en la variación de la expresión de los blancos antigénicos en la población de los potenciales donadores porcinos. Tales cuantificaciones podrán tener muchas implicaciones para el xenotrasplante debido a que la variabilidad de la expresión de los antígenos permitiría la evaluación experimental de los donadores que identificaran los pares con menor reactividad. Esta revisión permite examinar los mecanismos de rechazo hiperagudo observados en la experimentación xenogénica entre animales y humanos.

Summary

Vascularized tissue grafting between phylogenetically disparate species is violently destroyed within minutes to a few hours by the so called hyperacute xenograft rejection. Graft rejection in some combinations between pigs and apes begins with antibody recognition by the antigenic targets found in the donor's blood vessels. Antibodies bound to the antigenic target activate the complement molecules, which in turn lead to the pathogenic process. The xenoreactivity in hyperacute rejection varies a lot from one experiment to another and among different species. There is a little knowledge about the variation in the expression of antigenic targets in potentially donor pigs population. Such quantifications could have many implications for xenotransplantation, because such variability of the antigenic expression would let the identification of species combination with lower reactivity towards each other. This overview possesses examination of hyperacute rejection mechanisms observed in the xenogenic experimentation among humans and animals.

Introducción

El trasplante de órganos y tejidos no habría sido posible sin los avances biotecnológicos en la investigación básica; éstos han servido para elucidar el mecanismo de reactividad inmunológica en alotrasplantes,^a lo que ha permitido la implementación de estrategias encaminadas al control de la respuesta de rechazo. Los xenotrasplantes permitirán, potencialmente una mejor calidad de vida a millones de personas con condiciones patológicas diversas tales como diabetes o enfermedad cerebral degenerativa. Actualmente la demanda de órganos excede con mucho a los posibles donadores; por ejemplo, en los Estados Unidos alrededor de 60,000 personas esperaron un órgano humano para donación, pero sólo 20,000 estuvieron disponibles; murieron, en promedio, 10 pacientes de la "lista de espera" por día por falta de donadores.¹ El incremento en la carencia de órganos donados para el trasplante clínico ha conducido al aumento de interés en la posibilidad de los xenotrasplantes.^b

El concepto del trasplante de órganos no humanos en receptores humanos no es nuevo; Reemtsma y cols. (1964)² trasplantaron riñones de chimpancé en pacientes humanos con falla renal, de los cuales 6 de 7 funcionaron adecuadamente, esto fue demostrado por la excreción de orina, por el decremento de creatinina sérica y por la disminución del nitrógeno úrico en la sangre. Las similitudes funcionales entre humanos y primates hacen de estos últimos la más lógica fuente de órganos donadores; sin embargo, el uso de primates conlleva una serie de dificultades de manejo zootécnico: los índices reproductivos de ellos, en cautiverio, son bajos e ineficientes; algunas especies también están en peligro de extinción en el

hábitat salvaje; además, pueden ser fuente potencial de agentes infecciosos (xenozoonosis)^{3,4}. También están las cuestiones éticas y religiosas en cuanto al uso de primates como donadores de órganos para humanos.⁵

La óptima elección de un donador xenogénico puede ser de aquellas especies relativamente cercanas a la nuestra en la matriz filogénica, que en la actualidad son desarrolladas para alimento de consumo humano.⁶⁻⁸ El interés científico se ha centrado en la especie porcina como una potencial fuente de órganos, ya que cumple con muchos de los requisitos teóricos para ser considerada, es decir, es una especie de producción doméstica, con camadas grandes, fácil de alimentar, con desarrollo y crecimiento relativamente rápido y además participa de un número considerable de similitudes anatómicas y fisiológicas con la especie humana. Se han empleado modelos cerdo-humano para evidenciar los aspectos fisiológicos y de activación celular previos al uso clínico en pacientes con daño hepático agudo; recientemente se ha utilizado un hígado bioartificial con células porcinas en un sistema de perfusión extracorpórea para asistir a un paciente con disfunción hepática, donde los hepatocitos efectuaron adecuadamente la detoxificación y las funciones de síntesis del hígado del paciente;⁹ así mismo, el trasplante de un hígado de cerdo en una persona de 26 años de edad, quien sufría de falla hepática fulminante, soportó por un lapso de 34 horas las funciones del paciente; sin embargo, las lesiones observadas progresaron con rapidez y fueron acompañadas por evidencia de trombosis, deposición de inmunoglobulinas del isotipo M y del complemento, además de necrosis isquémica del xenoinjerto.¹⁰ En el modelo cerdo-primate el rechazo del injerto es iniciado por el reconocimiento de los anticuerpos del receptor de los antígenos presentes en los vasos sanguíneos del donador. Las inmunoglobulinas unidas a los blancos antigénicos activan las moléculas del complemento y las células citotóxicas dependientes de anticuerpos. El daño producido por los anticuerpos puede ser "na-

^a Trasplante de órganos en receptores con características fenotípicas y genotípicas similares al del donador.

^b El término es entendido como el trasplante en humanos de órganos de otras especies filogénicamente concordantes o discordantes.

tural", como los inducidos por el sistema de los grupos sanguíneos, o pueden ser los anti-HLA como resultado de injertos previos, transfusión sanguínea o multiparidad.¹¹ En el desarrollo del xenotrasplante una barrera clínica mayor es la presencia de los anticuerpos naturales preformados dirigidos a los antígenos proteicos y sacarídicos de los tejidos animales. Actualmente, el trabajo científico está enfocado en poder reducir los niveles de complemento, la remoción de esos anticuerpos naturales y la manipulación genética de los animales para que sus tejidos reduzcan la expresión de los blancos antigénicos, así como una mayor resistencia al daño ocasionado por el complemento o por las moléculas pro-inflamatorias. Esta revisión permite examinar los mecanismos de rechazo mediados por los anticuerpos y el complemento que se presenta en la experimentación xenogénica entre animales y humanos.

Experiencias clínicas usando modelos mandril-humano

132

El uso clínico de los xenoinjertos ha sido limitado a algunos casos utilizando riñones,^{12,13} corazones^{14,15} e hígados¹⁶ de donadores filogénicamente concordantes con la especie humana; se ha observado una supervivencia del órgano trasplantado hasta cerca de nueve meses utilizando un agresivo esquema de inmunosupresión con azatioprina, terapia esteroideal, actinomicina C e irradiación local. De estas experiencias se obtuvieron dos puntos importantes: el primero fue que en la mayoría de los casos el órgano funcionó en el receptor, lo que implica que no existen aspectos fisiológicos únicos en el riñón humano en comparación con los órganos de otros primates no humanos; el segundo, que las respuestas al rechazo del xenoinjerto fueron mediadas por la actividad de los anticuerpos y el complemento a pesar del uso de los inmunosupresores, este mecanismo de xenorreactividad es fundamentalmente diferente al observado en el trasplante de órganos alogénicos.

Algunos años después de los primeros intentos de xenotrasplante clínico el uso de órganos sólidos fue emprendido nuevamente bajo la premisa del hallazgo de otros agentes inmunosupresores de linfocitos T, tales como la ciclosporina A y el FK506, los cuales controlan vigorosamente la respuesta de rechazo; estas drogas evitan la inducción del gene que codifica la IL-2 en las células durante la estimulación linfocítica proliferativa.¹⁷ El primer caso clínico a quien le fue trasplantado un corazón de mandril sobrevivió 20 días; se observó por medio de examen histopatológico del órgano la respuesta del rechazo mediada por anticuerpos con un proceso de necrosis temprana con depósitos de IgM, IgG, IgA y C₃.¹⁴ Otras experiencias clínicas en el xenotrasplante fueron realizadas en dos pacientes con falla hepática secundaria a infección por hepatitis B (virus que no afecta a los órganos de primates no humanos); ambos pacientes murieron por complicaciones sépticas. En uno de ellos la función hepática fue adecuada durante 55 días pero hubo deterioro progresivo de la actividad funcional después de ese tiempo, murió al día 70. En la necropsia se observó que el sistema biliar fue ocupado por un sedimento consistente en desechos celulares con infartos biliares a lo largo del tejido injertado. En el otro paciente el xenoinjerto nunca funcionó y falleció por sepsis a los 26 días. En ninguno de los pacientes se observó evidencia de arteritis o rechazo vascular, aunque estuvieron presentes depósitos de inmunoglobulinas IgM en los injertos.¹⁶

Concepto de concordancia de especies con relación al rechazo de xenoinjertos

Cuando los órganos de algunas especies son trasplantados en receptores de diferente especie el injerto es inmediatamente rechazado; sin embargo, se ha observado un mayor retardo en el tiempo de rechazo si la combinación de especies es concordante con relación a la posición que guar-

dan en la matriz filogénica; si el trasplante involucra a dos especies distintas ocurre el rechazo hiperagudo del injerto, esto es caracterizado patológicamente por la presencia de edema intersticial, hemorragia, necrosis celular, infiltración y trombosis difusa de los tejidos.¹⁸

Calne R (1970)¹⁹ propuso un sistema de nomenclatura para categorizar el rechazo de xenoinjertos basado en el tiempo y en la severidad observada. Los modelos experimentales en los cuales se observó la respuesta inmediata del rechazo fueron referidos como combinación de especies discordantes, en virtud de que estos procesos no fueron análogos a los observados en aloinjertos primeramente determinados como de especies concordantes. La combinación en el modelo cerdo-cabra es concordante, mientras que la combinación leporino-cerdo es discordante. Entre especies de roedores la combinación cobayo-rata es discordante, en cuanto a los modelos hámster-rata y ratón-rata son concordantes; sin embargo, este sistema de nomenclatura no es absoluto, depende del tipo de tejido examinado, es decir, aunque la combinación rata-ratón es concordante se ha demostrado la presencia de los anticuerpos IgM e IgG3 en el ratón que reaccionaron en contra de las células de la médula ósea de la especie donadora.²⁰

La xenorreactividad natural de los anticuerpos

En modelos cerdo-primate la observación de la xenorreactividad natural mediada por los anticuerpos está dada primeramente por los isotipos IgM, aunque en estudios recientes también se ha enfatizado que la actividad de las IgG puede desempeñar un papel importante. Se han evaluado algunos aspectos de la avidéz de las IgM en la interacción con las células porcinas en cuanto al significado de la xenorreactividad de diferentes individuos; se ha demostrado que tan sólo 1×10^5 moléculas xenorreactivas son capaces de activar las rutas del complemento en ensayos *in vitro* con

células endoteliales aórticas porcinas.²¹ Platt y cols. (1990)²² desarrollaron un modelo de especies discordantes para estudiar los mecanismos del rechazo hiperagudo con un corazón de cerdo trasplantado a un mono rhesus, en el cual se observó la destrucción del tejido injertado durante los 20 minutos posteriores a la revascularización, las IgM fueron depositadas rápidamente a lo largo del endotelio conduciendo la codeposición de C3 y C4; en estos experimentos, la presencia de C4 (pero no de properdina; factor P) en el tejido rechazado afirma el papel de la activación clásica del complemento.

Gambiez y cols. (1992)²³ demostraron que el rechazo hiperagudo es mediado por la interacción de las IgM con las células endoteliales en modelos *in vitro* cobayo-rata, donde los fragmentos Fab'-IgM (sitios de combinación antigénica de la inmunoglobulina M) estuvieron presentes en el cultivo endotelial. Estos hallazgos sugieren que la IgM se une a esos sitios en contraste con la IgG que se liga a sitios no específicos. El uso de anticuerpos anti-Fab' previo al trasplante de corazón de los cobayos los cuales fueron perfusionados con las fracciones de la rata, mostró que el injerto sobrevivió por mayor tiempo cuando el sitio de unión del receptor fue bloqueado.

La absorción de estos anticuerpos naturales (Nab's) en el receptor previa al proceso de trasplante ha sido estudiada en varios protocolos experimentales para prevenir la aparición del rechazo hiperagudo y de aumentar así la supervivencia del injerto. Con base en estos datos Fischel y cols. (1992)²⁴ perfusionaron suero de monos rhesus a través de riñones de cerdo previo al trasplante de corazón en un modelo cerdo-primate; los injertos del grupo tratado sobrevivieron 80 horas a diferencia de los del grupo control que sólo fueron dos horas.

En otros estudios usando modelos cerdo-mandrill el suero del receptor fue utilizado para perfusionar el bazo de los cerdos, esto con el fin de remover los Nab's anti-cerdo; subsecuen-

temente fue trasplantado el corazón porcino, se observó disminución significativa de los anticuerpos y los xenoinjertos sobrevivieron de 8 a 15 días versus 24 horas de los injertos del grupo no tratado. Cabe señalar que a pesar de la agresiva inmunosupresión practicada en el receptor, que consistió en la aplicación de corticosteroides, ciclosporina e irradiación del tejido linfoide, se observaron lesiones patológicas sugestivas de rechazo hiperagudo y de rechazo celular, lo que reafirma que el control de la respuesta humoral en el rechazo de los xenoinjertos no es suficiente para prevenir la xenorreactividad.²⁵

Alvarado y cols. (1995)²⁶ probaron la hipótesis de que los niveles de expresión xenoantigénica varían en la población de cerdos. Los estudios estuvieron basados en la medición del IgM adherido a los riñones porcinos al ser perfusionados con sangre de mandriles; se observó que niveles altos de anticuerpos (≈ 704 unidades de anticuerpos) predisponen a una mayor xenorreactividad (3.6 ± 1.3 unidades de xenorreactividad/g) a diferencia de lo observado con niveles bajos (≈ 446 unidades de anticuerpos / -0.8 ± 1.0 unidades de xenorreactividad/g). El estudio inmunopatológico de los órganos perfusionados demostró mayor deposición de IgM y C4 en aquellos órganos con niveles altos de xenoantígenos, lo que demuestra que la variación de xenoantígenos puede ser desarrollada selectivamente en las razas de los posibles donadores porcinos que son menos susceptibles de ser atacados por la xenorreactividad natural de anticuerpos.

Estudios realizados por Geller y cols. (1994)²⁷ demostraron que 10% de la población de los cerdos analizados mostraron una relativa manifestación de sitios antigénicos que fueron reconocidos por los Nab's siendo esta variación reproducible en los múltiples ensayos con el mismo suero humano. Además, las xenorreactividades de dos diferentes sujetos no relacionados fueron comparadas entre sí y mostraron una correlación de reactividad a los antígenos de los extractos de plaquetas porcinas. Las glicoproteínas de mem-

brana 115, 125 y 135 mostraron diferencias cuantitativas en las diferentes razas de cerdos. La presencia de estas glicoproteínas en la superficie de las células endoteliales es el primer objetivo de los anticuerpos naturales del receptor. Se ha demostrado que extractos de células endoteliales porcinas al ser sometidos a digestión enzimática específica identifican la fracción que reactiva fuertemente con las inmunoglobulinas humanas, las cuales son un complejo de dos glicoproteínas denominadas como gp 115/135 con base en sus pesos moleculares y que además muestran residuos de galactosa.^{28,29} Estos antígenos se manifiestan en plaquetas y en células endoteliales. El mayor determinante antigénico en esas moléculas reside en un complejo de oligosacáridos. Al examinar la presencia de estas glicoproteínas en glóbulos rojos, plaquetas y linfocitos porcinos solamente las plaquetas mostraron un complejo de reactividad que co-migraba con las gp 115/135 sugiriendo que el reconocimiento del determinante antigénico por los anticuerpos está asociado con diferente blanco proteico.

La caracterización funcional y molecular de las gp 115/135 ha mostrado que la gp 115 contiene un alto grado de secuencias homólogas con los elementos integrantes de las inmunoglobulinas humanas cadenas $\beta 3$, mientras que la gp 135 tiene afinidad por las $\alpha 2$. Hay un tercer epitopo porcino reconocido por las IgM humanas la gp 250 que contiene secuencias altamente análogas con el factor von Willebrand (FvW).^{30,31} Platt JL y Holzknicht ZE (1994)²⁸ observaron que al incubar extractos de plaquetas porcinas con anticuerpos bloqueadores anti- $\alpha 2$ y anti- $\beta 3$ disminuye significativamente la reactividad de los Nab's, indicando que estos elementos compitieron por los sitios de reconocimiento con los Nab's presentes en el suero humano; funcionalmente, las uniones de IgM a las gp 115/135 dan como resultado la activación de la ruta clásica del complemento y sostienen tal interacción en el comienzo del rechazo hiperagudo.

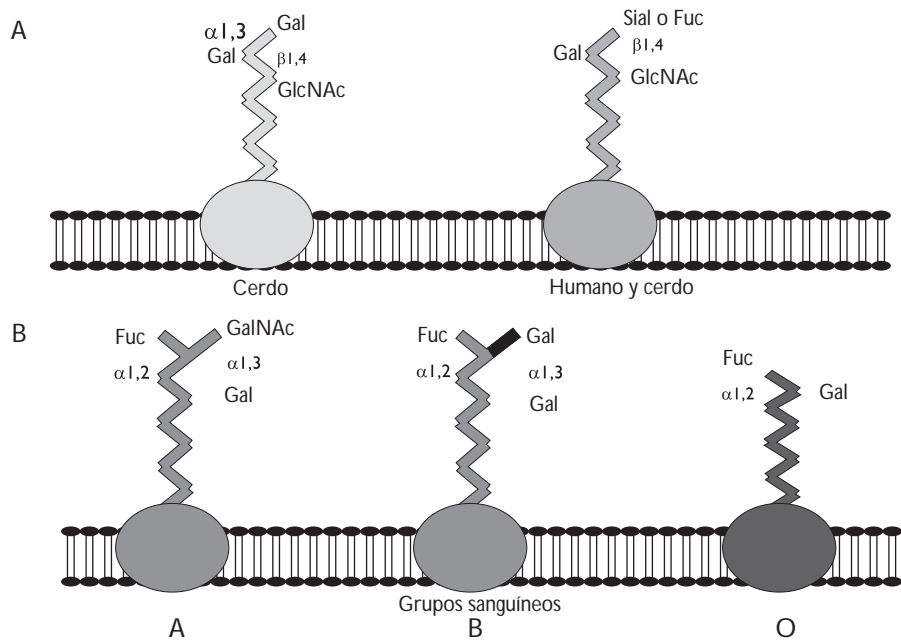


Figura 1. Glicosilación terminal en cerdos y humanos. Gal, galactosil; GlcNAc, N-acetil-glucosamina; Sial, sialil; Fuc, fucosil; GalNAc, N-acetil-galactosamina. A. Glicosilación especie específica en cerdos y humanos. B. Sistema polimórfico de glicosilación de los grupos sanguíneos ABO.

Se han identificado anticuerpos IgG preformados en contra de los epitopos antigénicos α -galactosil en modelos cerdo-humano. Estos anticuerpos que reaccionan con Gal $\alpha 1,3$ galactosa constituyen una significativa proporción de las inmunoglobulinas totales.³² Las observaciones de McMorro y cols. (1996)³³ han confirmado que los Nab's α -Gal constituyen de 4 a 8% de las IgM totales y de 1 a 2.5% de las IgG. El epitopo reconocido por esos Nab's específicamente son el Gal $\alpha 1,3$ Gal $\beta 1,4$ GlcNAc³⁴ donde dos residuos galactosil están unidos con otra molécula N-acetil-glucosamina (figura 1). Estas estructuras no se han encontrado en la superficie celular de humanos, simios y monos, pero sí en otros mamíferos. Los humanos producen Nab's que reaccionan con α -Gal igual que hacia los antígenos de los grupos sanguíneos A y B, presumiblemente debido a la reacción cruzada con los antígenos de la pared bacteriana de infecciones previas.^{32,33} Good y cols. (1992)³¹ han identificado algunas fracciones IgM anti-Gal, aunque la mayoría de los Nab's son polirreactivos observan especificidad definida. Los anticuerpos de los grupos sanguíneos son un ejemplo de este reconocimiento, el antígeno A consis-

te en GalNAc $\alpha 1,3$ (Fuc 1,2) galactosa mientras que el B es Gal $\alpha 1,3$ (Fuc 1,2) galactosa. Diferencias serológicas entre los antígenos A y B están basadas en la identidad de la estructura terminal de la galactosa, además los anticuerpos anti-B que son producidos en individuos que expresan el grupo sanguíneo A y los anticuerpos anti-A que están ausentes en los sujetos con antígeno A. De manera similar al sistema anti-ABO de los grupos sanguíneos se ha sugerido que el desarrollo de Nab's preformados en neonatos en respuesta a la presencia de ciertos agentes infecciosos expresan epitopos α -Gal que juegan un papel preponderante en los mecanismos de infección y de rechazo. Por ejemplo, cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Serratia*, *Klebsiella* y *Salmonella*, así como del virus de la leucemia murina expresan esos epitopos;^{32,35-37} también se han identificado altos niveles de anticuerpos anti- α Gal en pacientes con leishmaniasis cutánea (*Leishmania mexicana*), en la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*),^{38,39} en fibrosis idiopática pulmonar, esclerosis sistémica^{40,41} y en mielofibrosis idiopática⁴² lo que sugiere que el incremento de los niveles de anticuerpos prefor-

mados pueden estar asociados con la medición de los procesos de fibrosis y lisis de células porcinas. Además, la actividad y el efecto citotóxico de los anticuerpos anti- α Gal inducen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

La importancia del complemento en el rechazo hiperagudo

Se han caracterizado las rutas de la activación del complemento involucradas en el rechazo hiperagudo.⁴³ La ruta clásica da comienzo cuando los anticuerpos naturales se unen a las células endoteliales o parenquimales, aunque las IgM son más eficientes para iniciar la ruta clásica de activación; también se ha observado que las IgG1, IgG2 e IgG3 son capaces de activar la ruta. La presencia de las fracciones Fc de dos de esos anticuerpos sirven como "pilares de recepción" para C1, el primer componente en el evento de activación. C1 es un complejo enzimático pentamolar dependiente de Ca^{2+} consistente de una molécula de C1q, dos de C1r y otras dos de C1s. La unión de dos o más de los seis dominios globulares de C1q a los anticuerpos da inicio a la ruta clásica de activación; esta unión, que es de alta avidéz, forma agregados inmunológicos. Los cambios conformacionales de C1q-IgM o de C1q-IgG promueven la activación de C1r por autocatálisis permitiendo que la otra molécula produzca dos enzimas activas que se unen a las C1s restantes. Estas actividades enzimáticas dan como resultado las primeras serina-proteasas capaces de romper los enlaces tioéster de los siguientes fragmentos del complemento y así potencializar la actividad en forma exponencial. La separación de la molécula produce un fragmento que rompe a C4 en dos componentes, C4a el cual observa una alta actividad anafiláctica y C4b el cual es hidrolizado formando un compuesto inactivo (iC4b), también forma enlaces covalentes con los grupos hidroxil y amino en la superficie celular para actuar como sitios de unión de C2. Un largo segmento de C2a permanece unido a C4b en forma

de C4b2a (C3 convertasa), enseguida C3 se une a C4 y juntos continúan la ruta de C5 hasta C9.

La ruta alternativa de la activación del complemento no requiere de la presencia de anticuerpos, C3 es hidrolizado espontáneamente y genera la forma activa C3i lo que favorece la unión de los factores B, D y P, respectivamente. La convertasa resultante puede ser inactivada por agua, sin embargo si la molécula de C3 se une de forma covalente a la membrana de los blancos antigénicos se inicia la amplificación de la ruta efectora, incluso se ha observado que en ambas vías de activación la actividad es dirigida a la unión del complejo de ataque a la membrana (MAC) a partir de C5 a C9 formando poros en la membrana celular que dan como resultado lisis osmótica de la misma.⁴⁴

La deposición de los anticuerpos naturales en la superficie endotelial de los xenoinjertos son generalmente observados al inicio de la respuesta antigénica, cuya presencia en la superficie celular activa los eventos de la ruta clásica del complemento, causa la activación endotelial, libera los mediadores vasoactivos y por último permite la lisis celular, permeabilidad vascular con hemorragia intersticial y trombosis de los conductos.⁴⁵

Cabe recordar que el rechazo hiperagudo es caracterizado por una rápida obstrucción trombótica de la vasculatura del xenoinjerto que comienza minutos después de que los conductos del receptor se anastomosan a los del injerto. Las células endoteliales secretan formas de alto peso molecular del factor de von Willebrand que promueven la adhesión y agregación de plaquetas, las cuales sufren un proceso de vesiculación de la membrana lo que provoca el desprendimiento de partículas lipídicas que promueven posteriormente la coagulación. Las células endoteliales a su vez pierden protoglicanos y heparán sulfato de la superficie celular que normalmente interactúan con la anti-trombina III para inhibir la coagulación.⁴⁶

El complemento puede dañar directamente a las células endoteliales a través de la inserción de

C5b-9 e indirectamente por el reclutamiento de los elementos celulares de la respuesta inflamatoria. El carboximetil bencilamida sulfonato de dextran (CMDBS25) es un polímero de dextran que inhibe la activación del complemento, interfiere con el ensamblaje de la C3 convertasa y reduce la generación de los fragmentos de activación. Thomas y cols. (1996)⁴⁷ demostraron que tal compuesto inhibe la activación del complemento así como el daño producido en células endoteliales aórticas porcinas; la adición de 5 a 25 mg de CMDBS25/mL bajo las condiciones experimentales inhibieron la activación del complemento y la generación de C3a; con dosis de 25 mg/mL se suprimió totalmente la deposición del complejo citolítico C3b, C5 y C5b al C9 en las células y también se redujo la lisis de 42% de los blancos en las células endoteliales del donador. Por otra parte, se ha identificado la actividad de otros componentes proteicos para disminuir la activación del complemento, cuando es administrado el factor de veneno de cobra (CVF) en receptores de xenoinjertos discordantes se ha observado prolongación del tiempo de supervivencia, debido a que CVF es un potente agente reductor de C3; sin embargo, estas aproximaciones no han sido suficientes para prolongar la duración del injerto lo que sugiere la posibilidad de que existan otros componentes involucrados en la xenorreactividad, tales como los observados en la vía de las ficolinas y lectinas.⁴⁸⁻⁵⁰

Aunque es aceptado que los anticuerpos naturales son los primeros efectores del rechazo hiperagudo, han sido reportadas algunas excepciones en las cuales el evento ocurrió en ausencia de los mismos. Miyagawa y cols. (1988)⁵¹ utilizaron un modelo cobayo-rata y observaron que el trasplante de corazón fue rechazado rápidamente a pesar de la ausencia de anticuerpos anti-cobayo; además, el pre-tratamiento de los receptores con CVF produjo sobrevivencia del injerto de 17.5 minutos a 3 días y decremento en la cantidad de C3 depositado en el tejido, pero no de C4, C2 o C5, lo que sugiere que el complemento

por sí solo puede ser un potente efector en el rechazo hiperagudo.

Leventhal y cols. (1993)⁵² desarrollaron una forma purificada de CVF, de la cual fue removida previamente la fosfolipasa A por cromatografía líquida. El producto resultante (CVF purificado, 60 U/kg) fue administrado a mandriles 12 horas previas y posteriores del trasplante de corazones porcinos, el trasplante cardíaco sobrevivió 68 horas con reducción de C3 y con menos toxicidad que el grupo control; sin embargo, la observación histológica del injerto reveló rechazo vascular agudo con depósitos de IgM y C4, lo que sugiere que en el mandril, pero no en el cobayo o la rata, la reducción de C3 no es suficiente para bloquear la respuesta de la ruta clásica del complemento.

Se han propuesto otras estrategias para inhibir los efectos del complemento, incluyendo la infusión de varios inhibidores, tales como C1 (C1 inh) y el receptor del complemento tipo I (CRI). El inhibidor C1 es una proteína regularizadora presente en la ruta de activación clásica, cuando es adicionado al suero humano en cultivo con células endoteliales porcinas previene la citotoxicidad y la activación endotelial. En modelos cobayo-rata la infusión del receptor del complemento tipo I, glicoproteína que inhibe ambas rutas de activación, dio como resultado sobrevivencias significativas del injerto de 17 ± 4 a 747 ± 100 minutos y de 22.8 ± 13.7 a 551.7 ± 497.3 minutos.⁵³

Finalmente, se están investigando otros agentes solubles para evitar o revertir el rechazo hiperagudo tales como el factor acelerador del decaimiento (DAF), una membrana proteica que previene la activación de C3 y de C5, el cual no ha sido transferido genéticamente con buen resultado en óvulos de ratón. La expresión genética de DAF ha sido localizada en una amplia variedad de tejidos animales, de manera similar que en los humanos.⁵⁴ Estos estudios preliminares han permitido el desarrollo de cerdos transgénicos que expresan tanto DAF como el co-factor de la membrana proteica y CD59.⁵⁵⁻⁵⁷ Sin embargo, existe

evidencia de que el rechazo hiperagudo es mediado por los componentes finales del complemento. Brauer y cols. (1993)⁵⁷ demostraron que en trasplantes de corazón entre cobayos y ratas deficientes de C6 no ocurrió el evento. El MAC o el C5b pueden causar lisis de las células endoteliales y ocasionar la interrupción de la integridad de los vasos sanguíneos, la salida del contenido vascular y la exposición de las plaquetas a la matriz subyacente formando trombosis, mientras que la lisis de las células endoteliales que se observa en las lesiones avanzadas no es común en el curso inicial del rechazo. Consistente con lo anterior, Diamond y cols. (1996)⁵⁸ observaron que la expresión de CD59 humano en cerdos transgénicos no previene el rechazo temprano del injerto, aunque la formación del MAC puede ser inhibida sustancialmente.

Futuras direcciones en la experimentación

138

El principal cuestionamiento que existe en el xenotrasplante de tejidos discordantes es si un injerto observa como resultado de una activación una respuesta inmunológica que pueda ser controlada como en una situación de alotrasplante. Los materiales biológicos tales como la insulina y las válvulas cardíacas de cerdos han sido utilizadas con singular entusiasmo. El desarrollo de terapias celulares permitirá el uso de islotes celulares porcinos modificados para la producción de insulina capaz de evitar la respuesta del sistema inmunológico. Uno de los caminos para prevenir el rechazo hiperagudo y agudo vascular será la producción de cerdos "Knockout" que supriman o interrumpan al gene que codifica para $\alpha(1-3)$ galactosil transferasa (*Xenotransplantation. First transgenic cloned pigs revealed*. Abril de 2001. www.agbiotech.net). La expresión de la molécula α -galactosa en la superficie endotelial de los tejidos porcinos está basada en la función de ese gene; si estas moléculas pudieran estar enmascaradas o no funcionales, en-

tonces no serían blancos antigénicos de los Nab's anti- α Gal. Un método genético alternativo, el cual ha sido realizado satisfactoriamente, es la producción de cerdos transgénicos que sintetizan otro oligosacárido (α -fructosa), o los animales que poseen genes humanos que codifican para las glicoproteínas regularizadoras del complemento (DAF o CID55),⁵⁵⁻⁵⁷ el cofactor de la membrana proteica (MCP-1 o CD46)⁶⁰ o de la protectina (CD59),⁵⁹ las cuales previenen la lisis celular por inhibición de los pasos iniciales de la cascada del complemento.

Referencias

1. Cooper DKC, Groth CG, McKenzie IFC. Xenotransplantation: This new form of treatment might benefit millions. *BMJ* 2000; 320(7238): 868.
2. Reemtsma K, McCracken BH, Schlegel JU, Pearl MA, Pearce WC et al. Renal heterotransplantation in man. *Ann Surg* 1964; 160:384-410.
3. Michaels MG, Simmons RL. Xenotransplant associated zoonoses: strategies for prevention. *Transpl* 1994; 57: 1-7.
4. Fung J. Xenotransplantation. Subhuman primates as donors. *Path Biol* 1994; 42(3): 221-223.
5. Auchincloss H Jr. Xenogeneic transplantation: a review. *Transpl* 1988; 46: 1-20.
6. Niekrasz M, Ye Y, Rolf LL. The pig as organ donor for man. *Transplant Proc* 1992; 24: 625-626.
7. Sachs HD. The pig as a xenograft donor. *Path Biol* 1994; 42(3): 217-219.
8. Cozzi E, White GJD. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med* 1995; 1(9): 964-966.
9. Neuzil DF, Rozga J, Demetrial AA, Moscioni AD, Ro MS et al. Use of a novel bioartificial liver in a patient with acute liver insufficiency. *Surg* 1993; 113: 340-343.
10. Makowa L, Cramer VD, Hoffman A, Breda M, Sheen L et al. The use of a pig liver xenograft for temporary support of patient with fulminant hepatic failure. *Transpl* 1995; 59(12): 1654-1659.
11. McMorrow IM, Cornrack CA, Nazarey PP, Sachs DH, DerSimonian H. Relationship between ABO blood group and levels of Gal α 3 Galactose-reactive human immunoglobulin G. *Transpl* 1997; 64(3): 546-549.
12. Ogden D, Sitprija V, Holmes J. Function on the baboon renal heterograft in man and comparison with renal homograft function. *J Lab Clin Med* 1965; 65(3): 370-386.
13. Hardy JD, Chavez CM, Kurrus FD. Heart transplantation in man: Developmental studies and report of a case. *Jam Med Assoc* 1964; 188: 1132.
14. Bailey LL, Nehlsen-Cannarella SL, Concepcion W, Jolley WB. Baboon to human cardiac xenotransplantation in a neonate. *J Am Med Assoc* 1985; 254: 3321-3329.
15. Giles G, Boehmig H, Amemiya H, Halgrimson C, Starzl T. Clinical heterotransplantation of the liver. *Transplant Proc* 1970; 2(4): 506-512.
16. Metcalfe S. Immunomodulation for transplantation tolerance. *Eye* 1995; 9: 192-195.

17. Starzl ET, Fung J, Tzakis A, Todo S, Demetris JA et al. Baboon to human liver transplantation. *Lancet* 1993; 341: 65-71.
18. Bach FH, Robson CS, Ferran C, Winkler H, Millan TM et al. Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection. *Immunol Rev* 1994; 141: 5-30.
19. Calne RY. Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant Proc* 1970; 2: 550-553.
20. Starzl ET, Marchioro TL, Peters G, Kirkpatrick CH, Wilson WEC et al. Renal heterotransplantation from baboon to man: experience with 6 cases. *Transpl* 1964; 2: 752-776.
21. Vanhove B, Bach FH. Human xenoreactive natural antibodies-avidity and targets on porcine endothelial cells. *Transpl* 1993; 56: 1251-1255.
22. Platt JL, Lindman BJ, Chen H, Spitalnik SL, Bach FJ. Endothelial cell antigens recognized by xenoreactive human natural antibodies. *Transpl* 1990; 50: 817-822.
23. Gambiez L, Salame E, Chereau C, Calmus Y, Carsoso J et al. The role of natural IgM in the hyperacute rejection of discordant heart xenografts. *Transpl* 1992; 54: 577-583.
24. Fischel RJ, Matas AJ, Perry E, Dalmaso A, Noreen H et al. Plasma exchange, organ perfusion and immunosuppression reduce "natural" antibody levels as measured by binding to xenogeneic endothelial cells and prolong discordant xenograft survival. *Transplant Proc* 1992; 24: 574-575.
25. Roslin MS, Zisbrod Z, Burack JH, Tranbaugh RF, Strashun A et al. Fifteen day survival in pig to baboon heterotopic cardiac transplantation. *Transplant Proc* 1992; 24: 572-573.
26. Alvarado GC, Cotterell HA, McCurry RK, Collins HB, Magee CJ et al. Variation in the level of xenoantigen expression in porcine organs. *Transpl* 1995; 59(11): 1589-1596.
27. Geller RL, Rubinstein P, Platt JL. Variation in expression of porcine xenogeneic antigens. *Transpl* 1994; 58: 271-277.
28. Platt JL, Holzknicht ZE. Porcine platelet antigens recognized by human xenoreactive natural antibodies. *Transpl* 1994; 57: 327-335.
29. Cooper CKD, Koren E, Oriol R. Oligosaccharides and discordant xenotransplantation. *Immunol Rev* 1994; 141: 31-58.
30. Galili U. Interaction of the natural anti Gal antibody with α -galactosyl epitopes: a mayor obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today* 1993; 14: 480-482.
31. Good H, Cooper DKC, Malcom AJ, Ippolito RM, Koren E et al. Identification of carbohydrate structures which bind human anti-porcine antibodies: implications for discordant xenografting in man. *Transplant Proc* 1992; 24: 559-562.
32. Galili U, Mandrell RE, Hamadeh RM, Shohet SB, Griffiss JM. The interaction between the human natural anti- α -galactosyl IgG (anti-Gal) and bacteria of the human flora. *Infect Immunol* 1988; 57: 1730-1735.
33. McMorro I, Comrack C, Sach DH, DerSimonian H. Crossreactivity of human anti-pig IgG and IgM natural antibodies with alpha 1, 3 Gal. *Transpl* 1996; 28: 547.
34. Cooper DK, Good AH, Koren E et al. Identification of alpha-galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man. *Transpl Immunol* 1: 198.
35. Luderitz O, Simmons DAR, Westphal O. The immunochemistry of *Salmonella* hemotype VI O-antigen. The structure of oligosaccharides from *Salmonella* group V 04 lipopolysaccharides. *Biochem J* 1965; 97: 820-824.
36. Jansson PE, Lindberg AA, Lindberg B, Walling R. Structural studies on the hexose region of the core lipopolysaccharide from enterobacteriaceae. *Eur J Biochem* 1981; 115: 571-574.
37. Geyer R, Geyer H, Strem S, Hunsmann G, Schneider J et al. Major oligosaccharides in the glycoprotein of friend murine leukemia virus: structure elucidation by one-and two-dimensional proton nuclear magnetic resonance and methylation analysis. *Biochem* 1984; 23: 5628-5633.
38. Avila JL, Rojas M, Galili U. Immunogenic Gal- α 1-3Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic american *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J Immunol* 1989; 142: 2828.
39. Towbin H, Rosenfelder G, Wieslander J, Avila JL, Rojas M et al. Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American Cutaneous Leishmaniasis and normal individuals recognize terminal galactosyl α (1-3) galactose epitopes. *J Exp Med* 1987; 166: 419-425.
40. Gabrielli A, Leoni P, Danieli G, Hermann K, Krieg T et al. Antibodies against galactosyl α (1-3) galactose in connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 375.
41. Gabrielli A, Cundela M, Pisani E, Hermann K, Wieslander J et al. Antibodies against terminal galactosyl α (1-3) galactose epitopes in systemic sclerosis (scleroderma). *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 31-35.
42. Leoni P, Rupoli S, Salvi A, Sambo P, Cinciripini A et al. Antibodies against terminal galactosyl α (1-3) galactose epitopes in patients with idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 1993; 85: 313-320.
43. Johnston PS, Lim SML, Wang MW. Hyperacute rejection of xenografts in the complete absence of antibody. *Transplant Proc* 1991; 23: 877-879.
44. Pruitt SK, Baldwin WM, 3rd, and Marsh HC Jr. The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute xenograft rejection. *Transpl* 1991; 52: 868-873.
45. Geller RL, Bach FH, Vercellotti GM, Nistler RS, Bolman RM 3rd, et al. Activation of endothelial cells in hyperacute xenograft rejection. *Transplant Proc* 1992; 24: 592.
46. Takeshita K, Arakawa K, Okamoto M, Akioka K, Fujiwara Y et al. The anticoagulant effect of antithrombin III on hyperacute xenograft rejection. *Transplant Proc* 1996; 28(2): 631-632.
47. Thomas H, Maillet F, Letourneur D, Jozefovicz J, Fisher E et al. Sulfonated dextran inhibits complement activation on complement-dependent cytotoxicity in an *in vitro* model of hyperacute xenograft rejection. *Mol Immunol* 1996; 33(7/8): 643-648.
48. Kobayashi T, Taniguchi S, Ye Y, Niekraz M, Kosanke S et al. Delayed xenograft rejection in C3-depleted discordant (pig-to-baboon) cardiac xenograft treated with Cobra Venom Factor. *Transpl Proc* 1990; 28(2): 560.
49. Adachi H, Rosengard BR, Hutchins TS, Baumgartner WA, Borkon AM. Effects of cyclosporin, aspirin, and cobra venom factor on discordant xenograft survival in rats. *Transplant Proc* 1987; 19: 1145-1148.
50. Kemp E, Steinbruchel D, Starklint H, Larsen S, Henriksen I et al. Renal xenograft rejection: prolonging effect of captopril, ACE inhibitors, prostacyclin, and cobra venom factor. *Transplant Proc* 1987; 19: 4471-4474.
51. Miyagawa S, Hirose H, Shirakura R. The mechanism of discordant xenograft rejection. *Transpl* 1988; 46: 825-830.
52. Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW, Platt JL, Manivel CJ et al. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transpl* 1993; 55: 857-866.
53. Dalmaso AP, Platt JL. Prevention of complement mediated activation of xenogeneic endothelial cells in an *in vitro* model of xenograft hyperacute rejection by C1 inhibitor. *Transpl* 1993; 56: 1171-1176.
54. Cary N, Moody N, Yannoutsos N, Wallwork J, White GJD. Tissue expression of human decay accelerating factor, a regulator of complement activation expressed in mice: a potential approach to inhibition of hyperacute xenograft rejection. *Transplant Proc* 1993; 25: 400-401.
55. McCurry RK, Kooyman LD, Alvarado GC, Cotterell HA, Martin JM et al. Human complement regulatory proteins protect swine-

- to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med* 1995; 1(5): 423-427.
56. White GJD, Cozzi E, Langford G, Oglesby T, Wang WM et al. The control of hyperacute rejection by genetic engineering of the donor species. *Eye* 1995; 9: 185-189.
57. Akami T, Arakawa K, Okamoto M. The role of human CD59 antigens in discordant xenotransplantation between humans and nonprimates. *Transplant Proc* 1993; 25: 394-395.
58. Brauer RB, Baldwin WM 3rd., Daha MR, Pruitt SK, Sanfilippo F. Use of C6-deficient rats to evaluate the mechanism of hyperacute rejection of discordant cardiac xenografts. *J Immunol* 1993, 151(12): 7240-7248.
59. Diamond LE, McCurry KR, Martin MJ, McClellan SB, Ollidham ER et al. Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium. *Transpl* 1996; 61(8): 1241-1249.
60. Diamond LE, Quinn CM, Martin MJ, Lawson J, Platt JL et al. A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. *Transpl* 2001; 71(1): 132-142.