

LA RESPOSTA CEL·LULAR EN EL XENOTRASPLANTAMENT

J. Martorell

La supervivència de l'empelt després d'un any, en el trasplantament d'òrgans entre éssers humans, supera el 80% en la majoria de casos. Aquests bons resultats determinen que el nombre de candidats a trasplantament d'algun dels òrgans creixi de manera espectacular, mentre que el nombre d'òrgans disponibles està pràcticament estancat, atesa l'escassetat de donants humans. La simultaneïtat d'aquests dos fenòmens determina que es consideri la possibilitat d'utilitzar altres fonts d'òrgans per a trasplantament i concretament, la possibilitat d'utilitzar animals com a donants d'òrgans.

Entre les possibles espècies candidates a donants, els primats queden descartats per la seva difícil cria en captivitat, així com per altres raons de tipus ètic i de transmissió d'infeccions. D'entre les altres espècies, sembla existir un cert consens sobre la possibilitat que el porc podria ésser un bon candidat a donant d'òrgans.

Existeixen, però, seriosos obstacles per a mantenir òrgans porcins funcionant en el cos humà. La raó és el rebuig del sistema immunitari de tot allò que li és estrany.

El primer dels obstacles per al trasplantament d'òrgans procedents d'animals (no primats) a humans és l'existència d'un rebuig hiperagut (ó *hiper acute rejection*, HAR), causat per la presència en els humans d'anticossos naturals contra l'epítip α Gal (1-3) Gal¹. Aquests anticossos activen el complement i ocasionen la retracció de les cèl·lules endotelials. Aquesta retracció deixa el subendoteli al descobert, i dona lloc a la formació d'agregats de plaquetes a la paret vascular.

Aquest obstacle sembla que té possibilitats d'ésser superat gràcies a diverses tècniques (vegeu altres articles d'aquest volum). Entre aquestes tècniques hi ha la construcció d'animals transgènics que expressin determinats gens. Avui és possible transfectar al porc gens que codifiquen per enzims que poden modificar l'estructura glúcica diana dels anticossos naturals². També és possible fer expressar a la membrana de les cèl·lules porcines molècules amb capacitat per a inhibir l'activació del complement humà³. Totes aquestes possibilitats fan que el rebuig hiperagut tingui possibilitat d'ésser superat a mig termini.

Tipus de resposta cel·lular

Preveient el fet que el rebuig hiperagut no sigui un obstacle insalvable, cal avançar-se als obstacles que poden sorgir a continuació i molt concretament a la possibilitat que existeixi una resposta cel·lular contra els antigens porcins.

Cal, doncs, preguntar-se: ¿Existeix una resposta cel·lular per reconeixement directe de l'humà de MHC-classe-II porcí (*swine leucocitary antigens*, SLA), semblant a la que apareix en l'al·lotrasplantament? ¿Hi deu haver algun altre tipus de resposta cel·lular que agredixi l'òrgan empeltat? Etc. Totes aquestes preguntes treuen cap a d'altres de més importants com ara són: Fins a quin punt les estratègies immunosupressores que utilitzem per a l'al·lotrasplantament ens seran útils o suficients per a controlar la resposta cel·lular en el xenotrasplantament? I, fins a quin punt el poc que coneixem sobre la tolerància de l'al·loempelts serà extrapolable als xenoempelts? Ja podem avançar aquí que, a més de la resposta limfocitària T característica de l'al·lotrasplantament, ens trobarem amb problemes afegits desencadenats per cèl·lules i mecanismes de reconeixement que juguen un paper tan sols secundari en l'al·lotrasplantament, com ara les cèl·lules *natural killer* (NK).

El rebuig retardat

Per les dades que es tenen fins ara, s'ha pogut comprovar que els òrgans que aconsegueixen superar la primera fase de rebuig hiperagut són infiltrats ràpidament per macròfags i cèl·lules NK⁴. Les cèl·lules NK són unes cèl·lules amb capacitat citotòxica que s'encarreguen de detectar la manca d'expressió d'antígens HLA. L'interferir l'expressió en membrana del antígens HLA-classe-I és un mecanisme utilitzat per alguns virus per a escapar-se del reconeixement del sistema immunitari. Quan una cèl·lula NK detecta una cèl·lula que no expressa HLA-classe-I, interpreta que la cèl·lula està infectada i la destrueix per un procés d'inducció d'apòptosi que aleshores fragmenta el DNA i evita la propagació del virus intracel·lular.

El perquè en alguns models de xenotrasplantament es produeix un reclutament d'aquest tipus de cèl·lules no és encara del tot clar, però sembla que hi puguin intervenir tres tipus de fenòmens: 1) La secreció de quimiocines (MCP-1, MCP-2, MIP-1 β i RANTES); 2) La interacció a través dels receptors per la fracció cristal·litzable (o FC) de les immunoglobulines, presents a les NK, i 3) Les interaccions del tipus lectina (proteïnes que uneixen carbohidrats), en les quals podrien intervenir receptors de cèl·lules NK, que pertanyen a la família de les lectines i que podria proporcionar un senyal d'activació de l'activitat NK⁵.

Dades *in vitro* del nostre laboratori indiquen que la interacció entre monòcits o cèl·lules NK humanes amb cèl·lules de porc té, a més, implicacions funcionals.

Concretament, hem observat que: 1) Les cèl·lules PBMC humanes destrueixen per lisi les cèl·lules porcines marcades amb

Cr51, amb una interacció que implica la participació de molècules clàssiques d'adhesió amb CD18⁶; i 2) Els factors solubles produïts per monòcits humans indueixen les cèl·lules endotelials porcines a produir òxid nítric, una substància involucrada en l'extravasació dels monòcits⁷. En la inducció d'òxid nítric, no hi intervien els anticossos naturals i no pot reproduir-se utilitzant TNF humà recombinant.

Molt probablement, l'alta susceptibilitat de les cèl·lules de porc a ser lliades per les NK humanes és deguda al fet que els antigens MHC-classe-I (SLA-I) són incapaços d'interaccionar amb els receptors NK humans i, per tant, d'inhibir la funció citotòxica natural d'aquestes cèl·lules.

Totes aquestes dades indiquen que, a més de la possible resposta cel·lular T en el xenotrasplantament del porc a l'humà ens trobarem amb un nou mecanisme que s'ha anomenat de rebuig retardat (*Delayed xenograft rejection, DXR*), un tipus de rebuig que no es troba (o que es poc evident) en l'al·lotrasplantament.

El rebuig agut

L'existència d'una resposta per reconeixement directe de les cèl·lules T del MHC-classe-II del porc (SLA-II) no ha estat encara pròpiament evidenciada *in vivo*, però nombrosos indicis *in vitro* semblen indicar que hi ha una resposta per al reconeixement directe dels antigens MHC-classe-II del porc per part dels limfòcits T humans. De fet, es dona *in vitro* una resposta del tipus de cultiu mixt limfocitari (MLC) que s'ha anomenat Xeno-MLC. Aquest fet implica no només que hi ha una capacitat del receptor de la cèl·lula T humana (TCR) de reconèixer els antigens SLA-II sinó també que, a més, algunes molècules implicades en els senyals accessoris, funcionen correctament. L'activació per reconeixement directe implica un conjunt de senyals accessoris entre molècules de la cèl·lula presentadora i la cèl·lula responedora^{8,9}. D'entrada, no era clar que totes aquestes interaccions entre molècules humanes i porcines haguessin de funcionar correctament i de fet n'hi ha que no funcionen. Per desgràcia, la majoria de les interaccions moleculars involucrades en la resposta cel·lular T que s'han descrit funcionen correctament en el model porc-humà (taula I)⁸⁻¹⁰. L'acumulació de limfòcits amb els TCR específics, en un determinat òrgan, també precisa de les interaccions entre les molècules d'adhesió. Moltes però no totes les interaccions de les molècules d'adhesió funcionen en el model porc/humà (taula II)⁹. De fet, moltes interleucines humanes no són funcionals amb cèl·lules de porc.

Tot sembla indicar, que en la resposta de l'humà davant del porc hi ha una expansió clonal ampla amb generació de T citotòxiques semblant a la que pot trobar-se en l'al·lotrasplantament.

Propostes de solució

Si bé el rebuig agut pot no implicar un problema bàsicament diferent respecte de l'al·lo-trasplantament i, molt probable-

ment, la medicació immunosupressora actual podria controlar la resposta limfocitària T responsable del rebuig agut, el rebuig retardat amb l'activació de NK i monòcits implica l'existència de mecanismes de rebuig nous que no estem habituats a controlar. En contrapartida, l'ús d'animals ens permet introduir canvis genètics capaços de modificar les característiques moleculars de l'òrgan a empeltar. D'entre les propostes que s'han fet per a solucionar aquest problema, cal destacar-ne dos¹¹:

1) Transfectar molècules de HLA-classe-I humanes al porc per tal que, en expressar-se a la membrana, interactuin amb els receptors NK i protegeixin les cèl·lules del porc de l'atac per les NK humanes. Concretament, s'ha proposat la transfecció d'una molècula no clàssica, l'HLA-G, que juga un paper important en la protecció del fetus contra l'atac del sistema immunològic matern².

2) La transfecció de la fucosil transferasa, un enzim capaç d'emascarar l'epítoc glucídic α Gal (1-3) Gal i de convertir-lo en la inofensiva estructura del grup sanguini O. Aquesta estratègia inicialment s'havia dissenyat per a evitar la unió dels anticossos naturals, però a més ha demostrat que disminueix la susceptibilitat a la lisi per NK i l'adhesió del monòcits, ja que molt probablement disminueix els punts d'ancoratge de les molècules amb activitat lectina¹².

Conclusió

La possibilitat que el trasplantament d'òrgans procedents d'animals pugui solucionar el problema de l'escassetat d'òrgans passa de forma cíclica per períodes d'optimisme i de pessimisme, en funció dels avanços tecnològics i de l'adquisició de nous coneixements, els quals de vegades impliquen nous

TAULA I
Molècules senyalitzadores (interaccions porc-humà)

Porc		Humà	Senyal
CD80	=>	CTLA4lg/CD28	Sí
CD86	=>	CTLA4lg/CD28	Sí
LFA3	=>	CD2	Sí
MHC-II	=>	CD4	Sí
CD95	<=	CD95L	Sí
MHC-I	=>	KIRs	No

TAULA II
Molècules d'adhesió (interaccions porc-humà)

Molècula d'adhesió	Lligand	Mol. humana lligand porc	Mol. Porc lligand humà
CD11a/CD18	CD50, 54, 102	Sí	Sí
CD31	CD31	No	No Det.
CD34	CD62 L	No	No Det.
CD44	Mat.Extracel.	Sí	Sí
CD49d/29	CD106, Fibron.	Sí	Sí
CD49e/29	Fibronectina	No Det.	No
CD49f/29	Laminina	No Det.	Sí
CD62E.P.L	Sialil-LeX	Sí	Sí

obstacles i de vegades avantatges inesperats. El que sí sembla cert és que la resposta cel·lular de l'home davant del porc té components que depenen dels limfòcits T. Aquest component no sembla insalvable, atès que es disposa d'eines per a controlar aquests limfòcits T. Però també hi ha components que depenen d'altres tipus de resposta, com la de les cèl·lules NK o les dels monòcits, que ens són molt menys conegudes. Fer prediccions sobre si serem o no capaços en el futur d'eliminar o controlar aquestes respostes és arriscat. El que sí és ben segur és que el lluitar contra aquest nou repte té moltes probabilitats d'ensenyar-nos moltes coses de com funciona el sistema immunològic i, en el pitjor dels casos, molt probablement ens ajudarà a conèixer millor els mecanismes de rebuig en l'al·lotrasplantament.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Lin SS, Kouyman DL, Daniels IJ, Daggett CW, Parker W, Lawson JH et al. The role of natural anti-Gal alpha 1-3Gal antibodies in hyperacute rejection of pig-to-baboon cardiac xenotransplants. *Transpl Immunol* 1997; 5: 212-218.
2. Artrip JH, Kwiatkowski P, Michler RE, Wang SF, Tugulea S, Ankersmit J et al. Target cell susceptibility to lysis by human natural killer cells is augmented by alpha (1,3) galactosyltransferase and reduced by alpha(1, 2)-fucosyltransferase. *J Biol Chem* 1999; 274: 10717-10722.
3. Schmoekel M, Bhatti FN, Zaidi A, Cozzi E, Pino-Chavez G, Dunning JJ et al. Xenotransplantation of pig organs transgenic for human DAF: an update. *Transplant Proc* 1997; 29: 3157-3158.
4. Hancock WW. Delayed xenograft rejection. *World J Surg* 1997; 21: 917-923
5. Inverardi I, Clissi B, Stolzer AL, Bender JR, Sandrin MS, Parodi R. Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionarily conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissues. *Transplantation* 1997; 63:1318-1330.
6. Martorell J. Respuesta inmunológica celular a xenoinjertos. En: Arias M, Gómez Fleitas M, De Francisco ALM, ed. *Xenotrasplante*. Barcelona: SandozPharma 1990.
7. Millan O, Rojo I, Gaya A, Vives J, Martorell J. Nitric Oxide production by pig endothelial cells in response to human derived injury. *Transplantation* 1998; 66:1362-1368.
8. Warrens AN, Simón AR, Theodore PR, Sykes M. Human-porcine receptor-ligand compatibility within the immune system: relevance for xenotransplantation. *Xenotransplantation* 1999; 6: 75-78
9. Simon AR, Warrens AN, Sykes M. Efficacy of adhesive interactions in pig-to-human xenotransplantation. *Immunol Today* 1999; 20: 323-330
10. Millan O, Rojo I, Juan M, Vilardell C, Yague J, Vives J, Martorell J. Human T-cell response to L14 pig cell line transfected with human ligands CD80 and CD86. *Transplant Proc* 1999; 31: 2630.
11. Sandrin MS, McKenzie IF. Recent advances in xenotransplantation. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 527-531.
12. Kwiatkowski P, Artrip JH, Edwards NM, Lietz K, Tugulea S, Michler RE, et al. High-level porcine endothelial cell expression of alpha(1,2)-fucosyltransferase reduces human monocyte adhesion and activation. *Transplantation* 1999; 67: 219-226.

LA RESPUESTA CEL-LULAR EN EL XENOTRASPLANTAMENT

Un cop establert que el refús hiperagut pot no ser un obstacle insalvable per a la pràctica de xenotrasplantaments, cal considerar la possibilitat de l'aparició d'una resposta cel·lular contra les cèl·lules de l'empelt.

S'ha demostrat que, a banda de la resposta limfocitària T, característica de l'al·lotrasplantament, en el xenotrasplantament apareixen problemes desencadenats per cèl·lules i mecanismes de reconeixement que juguen un paper secundari en l'al·lotrasplantament, com les cèl·lules assassines naturals (*natural killer* o NK) i els monòcits. Aquests mecanismes de refús són menys coneguts i estem menys habituats a controlar-los. Tot i així, l'ús d'animals per a obtenir òrgans per a trasplantament permet introduir canvis genètics capaços de modificar les característiques moleculars de l'òrgan a trasplantar i protegir-lo de l'atac de les cèl·lules NK humanes i de l'acció dels anticossos naturals.

LA RESPUESTA CELULAR EN EL XENOTRASPLANTE

Una vez establecido que el rechazo hiperagudo puede no ser un obstáculo insalvable para la práctica de xenotrasplantes, debe considerarse la posibilidad de la aparición de una respuesta celular contra las células del injerto. Se ha demostrado que, aparte de la respuesta linfocitaria T, característica del alotrasplante, en el xenotrasplante aparecen problemas desencadenados por células y mecanismos de reconocimiento que juegan un papel secundario en el alotrasplante, como las células asesinas naturales (*natural killer* o NK) y los monocitos. Estos mecanismos de rechazo son menos conocidos y estamos menos habituados a controlarlos. Sin embargo, el uso de animales para obtener órganos para trasplante permite introducir cambios genéticos capaces de modificar las características moleculares del órgano a trasplantar y protegerlo del ataque de las células NK humanas y de la acción de los anticuerpos naturales.

CELLULAR RESPONSE IN XENOTRASPALANTATION

After establishing that hyperacute rejection may not be an insuperable obstacle in xenotransplantation, the possibility of the development of a cellular immune response against the graft cells must be discussed.

It has been demonstrated that apart from the T-lymphocyte response, a characteristic of allotransplantation, xenotransplantation produces a series of problems due to cells and mechanisms of recognition that play a secondary role in allotransplantation such as natural killer cells and monocytes. These mechanisms of rejection are less well known and there is less experience in their control. However, when animals are used to obtain transplant organs genetic changes can be introduced that are capable of modifying the molecular characteristics of the transplant organ and of protecting it from attack by human natural killer cells and the action of natural antibodies.

RESULTATS ASSOLITS EN XENOTRASPLANTAMENT

Josep M Cruzado^a

Revisió històrica del xenotrasplantament clínic

Als primers anys del segle XX, a causa del desenvolupament de la tècnica quirúrgica, que permetia les anastomosis vasculares, va sorgir la possibilitat de poder substituir la funció d'un òrgan fracassat per un de sa provinent d'un altre individu, és dir, el trasplantament d'òrgans. En aquells anys, la definició de mort era ambigua, la qual cosa implicava problemes clínics i ètics per tal d'aconseguir òrgans d'humans. Per aquest motiu es considerà el xenotrasplantament com a la solució ideal. Els coneixements sobre la immunologia del trasplantament eren en fase embrionària i tot just començaven els primers esforços adreçats a identificar, per tècniques serològiques, les diferències entre individus.

El primer intent de xenotrasplantament clínic sembla que es pot atribuir a Ullmann l'any 1902, en intentar trasplantar un ronyó de porc heterotòpicament en el colze esquerre d'una dona urèmica, però fracassà per problemes tècnics. L'any 1906, Jaboulay, dugué a terme els primers xenotrasplantaments clínics en implantar, també heterotòpicament, al colze de dos pacients urèmics, un ronyó de porc i un ronyó de cabra, respectivament, encara que al tercer dia van haver d'extreure'ls pel seu aspecte gangrenós. Aquestes experiències descoratjadores, juntament amb altres pel que fa a l'al·lotrasplantament experimental, van fer caure els investigadors en una fase de desànim, on se suposava que els òrgans fracassaven per problemes tècnics insuperables, encara que avui dia sabem que, probablement, els xenoempelts ho feien per rebuig hiperagut i els al·loempelts per rebuig cel·lular agut. Els trasplantaments es van abandonar i, a banda de les experiències de Neuhof als anys 20, van haver de passar gairebé 50 anys per a tornar a intentar els xenotrasplantaments.

Aquest segon període d'interès en el xenotrasplantament comprèn des de finals dels anys 50 als primers 60. Podem citar tres circumstàncies com a responsables d'aquest ressorgiment dels xenotrasplantaments. La primera era la necessitat de desenvolupar el trasplantament per a tractar els pacients amb insuficiència irreversible d'òrgans vitals; la segona eren els greus problemes per a la procuració d'òrgans humans (no existia encara el concepte de mort cerebral i, a

més a més, la donació voluntària de viu plantejava problemes de tipus ètic), i la tercera era l'efectivitat de l'immunosupressor 6-mercaptopurina en el control de l'al·lorebuig cel·lular agut.

Primer Reemtsma, a la Tulane University de Nova Orleans, i després Starzl van dur a terme diversos xenotrasplantaments renals de primat a humà i van aconseguir supervivències de fins a 9 mesos en un dels casos. Aquests resultats, considerats pobres des de la perspectiva terapèutica, coincidiren amb la instauració als anys 60 de la diàlisi reglada com a tractament substitutiu renal, el desenvolupament amb èxit de la procuració d'òrgans de donant cadàver i amb l'esclat de la immunologia de l'al·lotrasplantament. Tot plegat es va concretar en l'al·lotrasplantament clínic com a alternativa terapèutica per al tractament de la insuficiència dels òrgans.

Així doncs, a partir de l'any 1965 el xenotrasplantament es va pràcticament abandonar, tot i que aquest any es produïren grans avenços en el coneixement de la fisiopatologia del xeno-rebuig. Efectivament, Clark proposà que el rebuig hiperagut es produïa a causa de la unió d'anticossos del receptor a l'empelt i a l'activació del complement. Nelson va demostrar que el factor del verí de cobra era capaç d'allargar la supervivència dels xenoempelts, Marceau va destacar la rellevància de l'endotelí en el rebuig hiperagut, i Perper i Najarian van suggerir que la presència de xenoanticossos explicava la supervivència inferior del xenotrasplantament entre espècies filogenèticament llunyanes, respecte del xenotrasplantament entre espècies pròximes, xenotrasplantaments anomenats més endavant per Calne als anys 70 com a discordant i concordant, respectivament. Per tant, encara que semblava paradoxal, a finals dels anys 60 es tenia ja coneixement de la seqüència de fets del xeno-rebuig hiperagut, del paper de la coagulació, de les plaquetes, els leucòcits i els xenoanticossos naturals. Des dels anys 60 i fins a la dècada dels 90 només hi ha descrita una experiència de xenotrasplantament cardíac de babuí a humà. No és fins a principis dels anys 90, amb l'al·lotrasplantament perfectament consolidat com a una opció terapèutica més de la pràctica clínica, quan hi ha un ressorgiment de l'interès pel xenotrasplantament a causa de l'enorme desequilibri entre l'escassetat d'òrgans i el nombre de pacients en llista d'espera.

Aquest nou impuls va fer que cirurgians com Religa i Makowka, l'any 1992, o Starzl, l'any 1993, practiquessin els darrers xe-

^aServei de Nefrologia. Hospital de Nefrologia. Hospital de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat. (Barcelona)