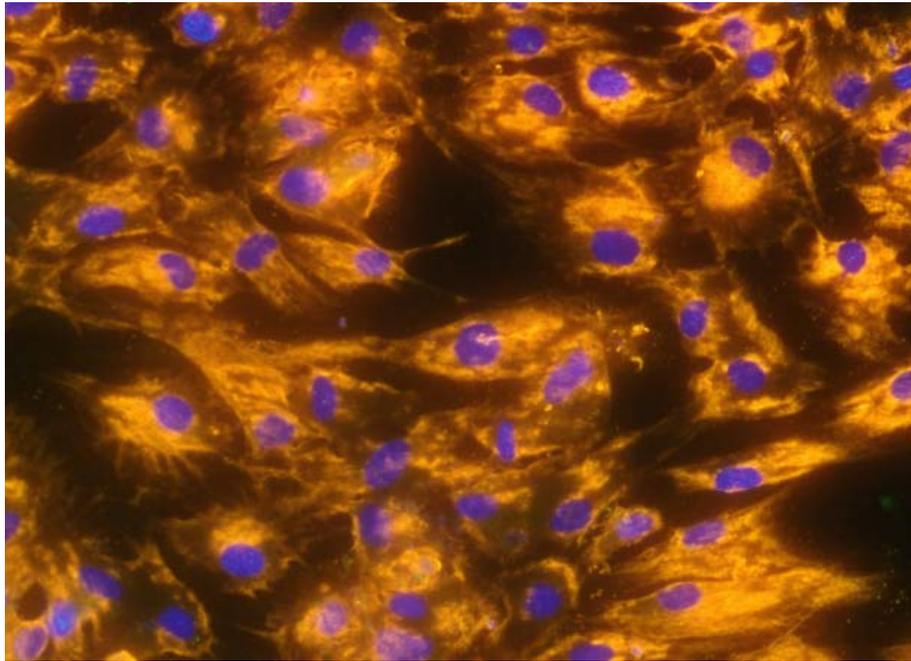




UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA CELULAR E MOLECULAR



MODELOS ANIMALES PARA EL ANÁLISIS DEL
XENOTRASPLANTE Y LA TERAPIA CELULAR
COMO ALTERNATIVAS AL ALOTRASPLANTE DE
ÓRGANOS

Isabel Moscoso Galán
A Coruña, 2007

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

**MODELOS ANIMALES PARA EL ANÁLISIS DEL XENOTRASPLANTE Y LA
TERAPIA CELULAR COMO ALTERNATIVAS AL ALOTRASPLANTE DE
ÓRGANOS**

Memoria para aspirar al grado de
Doctor en Biología
presentada por

Isabel Moscoso Galán

2007

D^a. Nieves Doménech García, Investigadora del Programa de Promoción de la Investigación del Ministerio de Sanidad y Consumo en el Complejo Hospitalario Juan Canalejo-Marítimo de Oza de A Coruña,

CERTIFICA:

Que **Isabel Moscoso Galán,** Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo: **“Modelos animales para el análisis del Xenotrasplante y la Terapia Celular como alternativas al alotrasplante de órganos”**

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al grado de Doctor en Biología.

Dra. Nieves Doménech García

Unidad de Investigación

C.H.U. Juan Canalejo

En A Coruña, 18 de Diciembre de 2006



DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA
CELULAR E MOLECULAR

Campus da Zapateira s/n
15071 A Coruña. España
Teléfono: 981 16 70 00
Fax: 981 16 70 65

El presente trabajo, “Modelos animales para el análisis del xenotrasplante y la terapia celular como alternativas al alotrasplante de órganos”, presentado por Isabel Moscoso Galán para aspirar al grado de Doctor en Biología, dirigido por la Dra. Nieves Domenech García, de la Unidad de Investigación del hospital Juan Canalejo de A Coruña, ha sido realizado bajo mi tutela.

Revisado el texto, estoy conforme con su presentación para ser juzgado.

Dr. Horacio Naveira Fachal
Profesor Titular de Genética

En A Coruña, 18 de Diciembre de 2006

A mis padres

A Marcos

Agradecimientos:

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra Nieves Doménech García el haberme dado la oportunidad de incorporarme al grupo y poder realizar esta tesis.

Al Dr. Horacio Naviera Fachal por tutelar este trabajo y sobre todo por haber despertado mi interés en el mundo de la investigación.

A mis compañeros de grupo durante estos años, en especial a los que han colaborado directamente en este trabajo, Tomás, Isa, Patricia, Tamara, Dolores y por supuesto a Pury a quien debo agradecer lo mucho que me ha enseñado sobre inmunohistoquímica y parte de esta tesis.

A los compañeros de otros grupos del labo, a los que han estado durante años y a los nuevos. A Pilar a la que debo agradecer toda su ayuda y apoyo en todo este tiempo. A Sonia Pértega por su gran ayuda en la realización de los análisis estadísticos. A los veterinarios de cirugía experimental por haberme proporcionado las muestras sin las cuales no podría haber realizado esta tesis.

A mis amigos, en especial a May por compartir 12 años de nuestra vida dentro y fuera del trabajo, y sobre todo este último año en el que las dos sufrimos nuestras tesis. A Mónica por ser tan estupenda amiga y compañera de piso, creo que nunca tendré mejor convivencia con nadie. A las niñas, los niños del grupo, a todos en general, en realidad me gustaría nombraros a todos pero creo que los agradecimientos serían más largos que algunas partes de esta tesis. Gracias a todos por los buenísimos momentos que hemos pasado juntos.

A Marcos, sólo has tenido que vivir la mitad de esta tesis y a pesar de no entender mucho este mundo, quiero agradecer tu apoyo y hacerme olvidar las complicaciones que he tenido durante este tiempo sólo con tu compañía.

A mis padres, mi sobrino, mi hermana, mis abuelos y a mi familia en general, que son los que más han tenido que soportarme, antes y durante el tiempo que he tardado en hacer esta tesis, por vuestro apoyo en todos los momentos. Muchas gracias.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Trasplante	3
1.1. Definición, historia y situación actual	3
1.2. Organización del sistema inmune	5
1.2.1. El complemento y su activación	5
1.2.2. Inmunoglobulinas	7
1.2.3. Complejo mayor de histocompatibilidad	9
1.2.4. Células del sistema inmune	11
1.3. Respuesta inmune en el trasplante	13
2. Alternativas al trasplante de órganos sólidos	16
2.1. Xenotrasplante	16
2.1.1. Barrera inmunológica	18
2.1.1.1. Tipos de rechazo en el xenotrasplante	18
2.1.1.2. Estrategias para prevenir el rechazo	22
2.1.2. Barrera infecciosa	29
2.1.2.1. Posibilidad de xenozoonosis	29
2.1.2.2. Retrovirus Endógeno Porcino (PERV)	31
2.1.3. Barrera fisiológica	34
2.2. Terapia celular	36
2.2.1. Tipos de células empleados	36
2.2.2. Terapia celular aplicada a reparación cardíaca	40
2.2.2.1. Miocardiopatías	40
2.2.2.2. Regeneración con células exógenas	41
2.2.2.3. Regeneración con células endógenas	43
2.2.2.4. Experiencia clínica de la aplicación de la Terapia Celular a la regeneración cardíaca	44
2.2.2.5. Cuestiones por resolver	45
2.2.3. Terapia celular aplicada a otras enfermedades	46
2.3. Órganos artificiales	49
2.3.1. Corazón artificial	49
2.3.2. Hígado artificial	50
2.3.3. Riñón artificial	51
2.3.4. Pulmón artificial	52
II. OBJETIVOS	53
III. MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. Animales de estudio	59
2. Protocolos de tratamientos de inmunosupresión de los babuinos receptores del xenotrasplante	59
3. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), plasmas y sueros	60
4. Determinación de xenoAcs en los sueros de los babuinos	60
4.1. Ensayo de cuantificación de Acs anti- α Gal por ELISA	60
4.2. Ensayo de cuantificación de Acs anti-hemolíticos porcinos (APA)	61
4.3. Determinación de Acs anti-células porcinas por citometría de flujo	62

4.4. Determinación de Acs anti-linfocitos o monocitos porcinos por citometría de flujo a partir de sangre total	63
5. Técnicas celulares.....	63
5.1. Líneas celulares	63
5.2. Aislamiento y cultivo de mioblastos o miocitos porcinos	64
5.3. Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales (CMMp) a partir de médula ósea (MO) porcina	65
5.4. Inducción de las CMMp al fenotipo miogénico mediante tratamiento con 5-azacitidina	65
5.5. Inmortalización de las CMMp	65
5.6. Citometría de flujo para la caracterización antigénica de mioblastos, cardiomiocitos, CMMp y CMMp diferenciadas con 5-azacitidina	66
6. Técnicas bioquímicas y electroforéticas.....	67
6.1. Preparación de los lisados.....	67
6.2. Separación y aislamiento con bolas magnéticas de la población de CMMp de MO	68
6.3. Electroforesis, transferencia y revelado.....	68
7. Técnicas morfológicas e inmunohistoquímicas.....	70
7.1. Estudio morfológico e inmunohistoquímico de los tejidos procedentes de los babuinos receptores del xenotrasplante	70
7.1.1. Congelación de las muestras.....	70
7.1.2. Estudio morfológico en los xenoinjertos	70
7.1.3. Estudio inmunohistoquímico de los xenoinjertos y otros órganos	71
7.1.4. Detección de la expresión de PERV en los xenoinjertos y otros órganos.....	71
7.2. Caracterización fenotípica de mioblastos, cardiomiocitos, CMM y CMM diferenciadas	72
7.2.1. Inmunohistoquímica indirecta para la detección de expresión de Actina muscular, Conexina-43, Desmina y Troponina T	72
7.2.2. Inmunofluorescencia indirecta para la detección de expresión de Vimentina con tres fluorocromos.....	73
7.3. Tinciones para identificación de adipocitos, condrocitos y osteocitos.....	73
7.3.1. Tinción Oil-Red-O para adipocitos.....	74
7.3.2. Tinción con azul alcian para condrocitos.....	74
7.3.3. Tinción con Safranina O para condrocitos.....	74
7.3.4. Tinción con rojo alizarina S para osteocitos	74
7.3.5. Tinción de Von Kossa al nitrato de plata para osteocitos.....	75
8. Técnicas de biología molecular	75
8.1. Extracción de ARN del plasma de cerdos y babuinos, y de ADN de las CMSP de babuinos	75
8.2. Detección de PERV por RT-PCR o PCR en plasma o CMSP	76
8.3. Detección de la presencia de secuencias porcinas por PCR en CMSP.....	77
9. Análisis estadísticos.....	77
10. Tampones y reactivos	78
IV. RESULTADOS.....	83
1. Análisis de la respuesta inmune en el modelo de xenotrasplante cardiaco heterotópico de cerdo transgénico hDAF en babuinos.....	85

1.1. Grupos de animales estudiados.....	85
1.2. Niveles de Acs IgM e IgG anti- α Gal y APA en los animales no tratados con GAS914	87
1.3. Niveles de Acs IgM e IgG anti- α Gal y APA en los animales tratados con GAS914	93
1.4. Diferencias en los niveles de Acs IgM e IgG anti- α Gal y APA en los animales no tratados y tratados con GAS914.....	99
1.5. Nivel de Acs anti-CMSP de cerdo, L35 y AOC-40 en los animales no tratados y tratados con GAS914	101
1.5.1. Acs inducidos no anti- α Gal en los animales tratados con GAS914.....	108
1.6. Estudio anatomopatológico e inmunohistoquímico de los xenoinjertos en los animales no tratados y tratados con GAS914.....	110
1.6.1. Análisis anatomopatológico.....	110
1.6.2. Análisis inmunohistoquímico	112
1.6.3. Activación del endotelio de los xenoinjertos en los animales tratados con GAS914 en ausencia de Acs anti- α Gal	128
2. Estudio de la posibilidad de infección por PERV en el modelo de xenotrasplante de xenoinjertos de cerdos transgénicos en babuinos tratados con GAS914.....	131
2.1. Grupos de animales estudiados.....	131
2.2. Depleción de Acs IgM e IgG anti- α Gal antes y después del trasplante con GAS914.....	132
2.3. Detección de las secuencias de PERV por RT-PCR en el plasma de los receptores y donantes de los xenoinjertos porcinos.....	133
2.4. Estudio de la presencia de Acs anti-PERV en el suero de los receptores de xenoinjertos porcinos.....	136
2.5. Detección de las secuencias de PERV por PCR en CMSP de los receptores de xenoinjertos porcinos	137
2.6. Detección de microquimerismo de células porcinas por PCR e inmunohistoquímica en las CMSP y tejidos de los babuinos receptores de xenoinjertos porcinos.....	139
3. Obtención y caracterización de células útiles para su uso en un modelo porcino de regeneración cardiaca	149
3.1. Obtención y caracterización de mioblastos	149
3.2. Obtención y caracterización de CMMp.....	154
3.3. Diferenciación de CMMp a cardiomiocitos	156
3.4. Obtención y caracterización de las líneas inmortalizadas de CMMp.....	163
3.5. Diferenciación de las líneas de CMMp inmortalizadas a cardiomiocitos ..	167
V. DISCUSIÓN.....	187
1. Xenotrasplante de órganos de cerdos transgénicos a babuinos	189
1.1. Barrera inmunológica en el xenotrasplante heterotópico de corazón de cerdo hDAF en babuinos	190
1.1.1 Eficacia del transgen hDAF en la prevención del RHA o el RVA	190

1.1.2. Efecto del tratamiento con el polímero GAS914 sobre los niveles de los Acs anti- α Gal, APA y anti-células porcinas, y en la prevención del RVA	194
1.1.3. Producción de Acs inducidos no anti- α Gal citotóxicos o no citotóxicos tras el xenotrasplante de cerdo hDAF en babuinos.....	198
1.2. Barrera infecciosa en el xenotrasplante de órganos de cerdos transgénicos a babuinos.....	200
1.2.1. Análisis de la posible transmisión de PERV a babuinos con fuerte inmunosupresión y depleción persistente de Acs anti- α Gal	200
1.2.2. Presencia de xenoquimerismo en babuinos sometidos a un xenotrasplante	204
2. Obtención de células porcinas para el desarrollo de modelos preclínicos de terapia celular aplicada a regeneración cardíaca utilizando el cerdo como modelo biomédico	206
2.1. Caracterización fenotípica de mioblastos porcinos	206
2.2. Caracterización y diferenciación a cardiomiocitos de CMMp primarias e inmortalizadas.....	207
2.3. Comparación del potencial uso clínico de mioblastos esqueléticos y CMM	212
VI. CONCLUSIONES.....	215
VII. BIBLIOGRAFÍA	219
VIII. ABREVIATURAS.....	259

I. INTRODUCCIÓN

1. Trasplante

1.1. Definición, historia y situación actual

El trasplante es la transferencia de órganos, células o tejidos de una localización a otra entre uno o varios seres vivos. Comienza varios siglos atrás como una práctica primitiva y desde entonces ha evolucionado como una realidad moderna gracias a que la medicina contemporánea ha superado muchos desafíos y obstáculos para alcanzar el éxito en el trasplante de órganos, que actualmente incluye el trasplante de tejidos, órganos parciales y órganos completos. Además, diariamente se llevan a cabo con éxito, entre otros, trasplantes de médula ósea (MO), válvulas cardíacas, venas y córnea.

El trasplante se puede clasificar de acuerdo tanto por la relación genética entre el donante y el receptor como por el lugar anatómico del implante. Según la relación genética se definen cuatro clases: 1) en el autotrasplante, el donante y el receptor son el mismo individuo; 2) en el isotrasplante o trasplante singénico, el donante y el receptor son genéticamente idénticos (por ejemplo gemelos monocigóticos); 3) en un alotrasplante u homotrasplante, el donante y el receptor no están genéticamente relacionados pero pertenecen a la misma especie; y 4) en el xenotrasplante o heterotrasplante, el receptor y el donante son de especies diferentes. Basándonos en el lugar de implante, el trasplante se puede definir como ortotópico y heterotópico. El trasplante ortotópico se refiere a aquel en el que el injerto del donante es implantado en la posición anatómicamente correcta en el receptor a diferencia del trasplante heterotópico que se refiere a la colocación del injerto en el receptor en un lugar diferente al de su anatomía habitual (López-Navidad A *et al.*, 1997).

Históricamente, A. Carrel pionero en las técnicas de cirugía vascular es conocido como el padre fundador del trasplante experimental de órganos. Su trabajo descrito en “El Trasplante de Venas y Órganos” sirvió de base para el establecimiento de la cirugía vascular y trasplante de órganos en los años 30. Sin embargo, la mayoría de los primeros intentos en humanos, que comenzaron con el trasplante renal en 1936, no tuvieron éxito hasta el descubrimiento de los inmunosupresores en los años 50.

A principios de los años 60, se pensaba que las donaciones de órganos de cadáver eran una práctica imposible y que los donantes vivos eran la única fuente disponible de órganos para trasplante, hasta que surgió el concepto de muerte cerebral en lugar del cese de circulación que previamente definía la muerte. La aceptación del concepto de

muerte cerebral produjo un gran aumento del número de órganos disponibles para la donación y además ayudó a la mejora de la preservación de los órganos extraídos.

J. Murray y H. Harrison llevaron a cabo el primer trasplante de riñón con éxito entre gemelos idénticos en diciembre de 1954. T. Starzl realizó el primer intento de trasplante de hígado humano en 1963, pero el primer paciente no sobrevivió a la cirugía. En cuanto al trasplante de pulmón, el primero se realizó en junio de 1963 por J. D. Hardy, el receptor sobrevivió 8 días tras el trasplante. En diciembre de 1967 se realizó con éxito el primer trasplante cardíaco en humanos, por C. Barnard en Sudáfrica. El receptor del trasplante era un hombre de 54 años con un fallo isquémico. El primer trasplante cardiopulmonar se realizó en septiembre de 1968 por D. Cooley y el receptor sobrevivió sólo 14 horas (López-Navidad A *et al.*, 1997).

En la actualidad, gracias sobre todo a los inmunosupresores, ha aumentado la supervivencia de todos los tipos de trasplante a nivel mundial, siendo España el país del mundo con mayor número de trasplantes de órganos de donante cadáver.

	Nº de trasplantes	Pacientes en lista de espera
Trasplantes renales	2200	4152
Trasplantes renales de vivos	87	-
Trasplantes hepáticos e intestinales	1070	2028
Trasplantes cardíacos	287	447
Trasplantes corazón-pulmón	2	6
Trasplante unipulmonar-bipulmonar	53+114 (167)	351
Trasplantes pancreáticos	96	198
Total	3909	7182

Tabla 1: Trasplantes realizados en España en el año 2005. Donantes cadáver 1546, % donantes multiorgánicos 82,2%. Edad media de los donantes 50,7±19,3 años. Datos proporcionados por la Organización Nacional de Trasplantes.

Sin embargo, a pesar de este gran número de trasplantes realizados en España (Tabla 1), tanto en nuestro país como en el resto del mundo existe un gran déficit de órganos disponibles debido a que el número de pacientes en lista de espera para trasplante supera con creces el número de donantes y que esta lista de espera aumenta cada año. Para solucionar este problema, en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en buscar

alternativas al trasplante de órganos sólidos, siendo las tres principales la realización de xenotrasplantes, la aplicación de terapia celular y el uso de los órganos artificiales.

En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de la posibilidad del desarrollo de las dos primeras y el modelo animal experimental elegido para ello ha sido el cerdo dadas sus enormes similitudes fisiológicas y anatómicas con los humanos.

1.2. Organización del sistema inmune

1.2.1. El complemento y su activación

Complemento, es el nombre dado a un complejo grupo de unas 20 proteínas (denominados por letras o números C1-C9) que, junto con los mecanismos de coagulación, fibrinólisis y la formación de quininas, constituye uno de los principales sistemas enzimáticos en cascada del plasma. Estos sistemas producen una respuesta rápida y muy amplificada a un estímulo desencadenante, donde el producto de una reacción es un catalizador enzimático de la siguiente.

Existen diferentes rutas de activación del complemento (Figura 1):

- La ruta clásica es muy selectiva y está acoplada a la inmunidad específica a través de los anticuerpos (Acs). Sólo se activa una vez que los Acs se han unido a un antígeno y colabora con ellos ayudándoles en su eliminación. Cuando un Ac del isotipo IgM, IgA, IgG₁, IgG₂ o IgG₃ se une al antígeno sufre un cambio conformacional que permite la unión al primer componente de la vía clásica C1q y la activación de esta vía.
- La ruta alternativa se activa de forma espontánea en respuesta a la presencia de muchos microorganismos. En realidad constituye un estado de activación permanente del componente C3 que genera C3b. En ausencia de microorganismos o antígenos extraños, esta pequeña cantidad de C3b será rápidamente inactivada por otra proteína del complemento denominada factor B para generar C3b inactivo (iC3b). Sin embargo, ante la presencia de superficies activadas, este C3b generado se va unir a ellas covalentemente lo que le protege de la acción inactivadora del factor B y permite el inicio de la activación del complemento por la vía alternativa.
- Recientemente se ha descrito una tercera vía de activación por un mecanismo independiente de Acs y que inicia una lectina denominada MBL (lectina que se une

a manosa). La MBL se une a patógenos y activa una serín proteasa y es capaz de inducir la actividad lítica del complejo de ataque de membrana (MAC *membrane attack complex* ó C5b9) y la promoción de fagocitosis por la vía clásica. Existe otra proteína, denominada proteína C-reactiva, que es capaz de unirse a la fosfatidilcolina (abundante en muchos microorganismos) y de iniciar la activación del complemento por la vía clásica (Regueiro JR *et al.*, 2002).

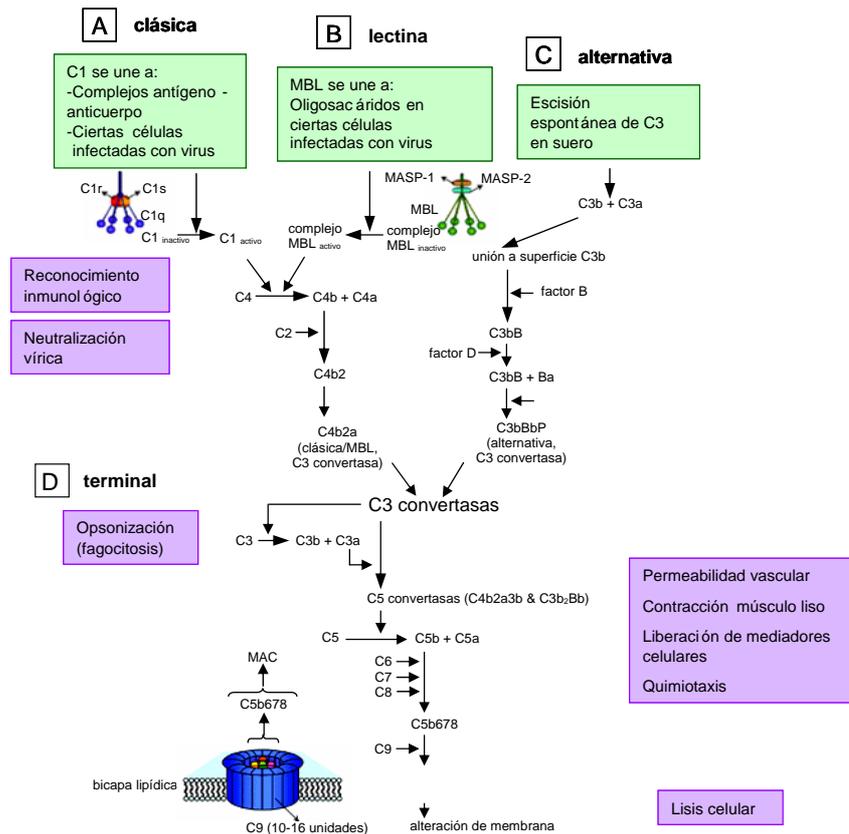


Figura 1: Rutas, componentes y activación del complemento. MASP: serín-proteasa asociada a MBL (<http://www.socgenmicrobiol.org.uk>).

Las funciones biológicas del complemento son:

- Reacciones de adherencia: Las células fagocíticas poseen receptores para el C3b y el iC3b que facilitan la adherencia de los microorganismos tapizados de C3b a la superficie celular.
- Fragmentos con actividad biológica: El C3a y C5a, los pequeños péptidos separados de las moléculas progenitoras durante la activación del complemento, poseen varias acciones importantes. Los dos péptidos actúan directamente sobre los fagocitos, en especial los neutrófilos, para estimular el importante aumento del consumo de

oxígeno asociado con la producción de metabolitos del oxígeno y para incrementar la presencia de los receptores de superficie que reaccionan con C3b e iC3b. Además son capaces de desencadenar la liberación de mediadores a partir de los mastocitos y sus equivalentes de la circulación, los basófilos. El C5a es un poderoso agente quimiotáctico para los neutrófilos, capaz de actuar directamente sobre el endotelio capilar para producir vasodilatación y un aumento de la permeabilidad, un efecto que en apariencia se prolonga por acción del leucotreno B₄, liberado a partir de neutrófilos, macrófagos y mastocitos activados.

- Lesiones de la membrana: La formación del MAC en una célula puede producir la lisis celular de la misma, en algunos casos este proceso presenta una relativa ineficacia debido a que el complemento tiene dificultades para lisar la membrana celular por la acción de las proteínas reguladoras del complemento (CRP, *complement regulating proteins*) de las células autólogas (Roitt I, 1994).

1.2.2. Inmunoglobulinas (Igs)

Las Igs ó Acs son proteínas altamente específicas que son producidas en respuesta a antígenos específicos por los linfocitos B. Estos Acs en su forma unida a la membrana constituyen el receptor de antígenos de la célula B. Los linfocitos B secretan Acs sólo tras su diferenciación inducida por la interacción del antígeno con el Ac de membrana de este tipo celular.

Si tomamos como ejemplo el tipo de Ac más abundante, la IgG es una molécula en forma de Y con una región bisagra en la cual el sitio de combinación con el antígeno se encuentra en el extremo de cada brazo de la Y (Figura 2). La estructura básica es un tetrapéptido compuesto por dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas unidas por puentes disulfuro intercatenarios. Estas cadenas pueden separarse por reducción de los enlaces disulfuro y acidificación. La región bisagra tiene un elevado contenido de prolina, que la hace vulnerable al ataque proteolítico, así la molécula puede ser escindida por acción de la papaína para formar dos fragmentos idénticos, cada uno con un único sitio de combinación para el antígeno (Fab; fragmento de unión con el antígeno), y un tercer fragmento por el que se ancla a la célula, denominado Fc (fragmento cristalizable). La pepsina actúa en un punto diferente y escinde el Fc del remanente de la molécula, por lo que queda un fragmento 5S grande

denominado $F(ab')_2$ por ser divalente con respecto a la unión con el antígeno al igual que el Ac original.

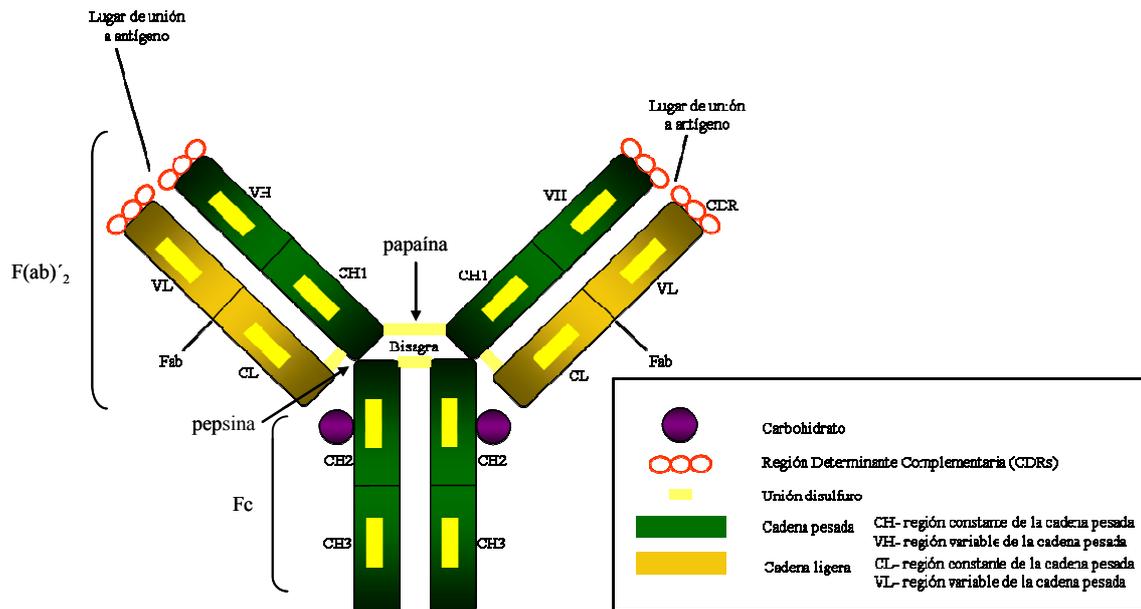


Figura 2: Estructura de la IgG. (<http://student.biology.arizona.edu>).

Las posiciones N-terminales tanto de las cadenas H como de las cadenas L presentan considerable variabilidad, mientras que las partes remanentes de las cadenas son relativamente constantes y se agrupan en un número restringido de estructuras. Por consenso, se habla de regiones constantes (C) y variables (V) de las cadenas H y L. Ciertas secuencias de las regiones variables muestran una notable diversidad y un análisis sistemático localiza estas secuencias hipervariables en tres segmentos sobre la cadena L y en tres sobre la cadena H, que son las regiones determinantes complementarias (CDR).

Las Igs se clasifican en:

- **Isotipos:** En base a la estructura de las regiones constantes de las cadenas H, las Igs se clasifican en grupos principales denominados clases que pueden subdividirse en subclases. En el ser humano, por ejemplo, existen cinco variantes isotípicas o clases: IgG, IgA, IgM (Figura 3), IgD e IgE que se pueden diferenciar no sólo por sus secuencias sino también por las estructuras antigénicas a que dan origen estas secuencias. Del mismo modo, las regiones constantes de las cadenas L existen en formas isotípicas denominadas κ y λ asociadas con todos los isotipos de cadenas H.

Como las cadenas L de un Ac dado son idénticas, las Igs son κ o λ pero nunca mixtas.

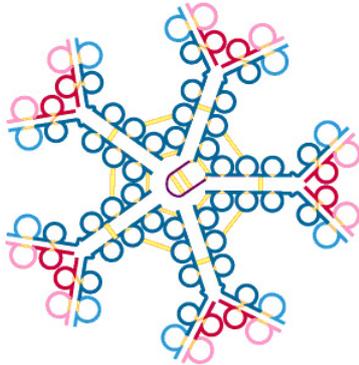


Figura 3: Estructura de la IgM

(www.lib.mcg.edu/edu/esimmuno/ch3/ch3img/igm.jpg).

- **Alotipos:** Este tipo de variación depende de la existencia de formas alélicas (codificadas por alelos o genes alternativos en un único locus) que proveen marcadores genéticos. De manera similar a cómo los eritrocitos de individuos genéticamente diferentes pueden diferir en términos del sistema A, B, O de grupos sanguíneos, las cadenas H de Igs difieren en la expresión de sus grupos alotípicos.
- **Idiotipos:** serían uno o más de los determinantes antigénicos específicos de la región variable de una molécula de Ig.

Según se ha visto es posible obtener Acs que reconozcan variantes isotípicas y alotípicas, también es posible obtener anti-sueros específicos contra moléculas de Acs individuales y discriminar entre un Ac monoclonal (AcMo) y otro sin considerar las estructuras isotípicas o alotípicas (Roitt I, 1994).

1.2.3. Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*)

Aunque originalmente se descubrieron al estudiar el trasplante, las moléculas del MHC no sólo están implicadas en fenómenos de rechazo si no que su función principal es que el sistema inmune de un individuo pueda diferenciar entre “lo propio y lo extraño”.

El **MHC** es un conjunto de moléculas proteicas de la superficie celular cuya función biológica es presentar a los linfocitos T péptidos derivados de proteínas intracelulares. Las moléculas de MHC junto con los péptidos que presentan son reconocidas por los linfocitos T a través de su receptor antigénico TCR (*T cell receptor*). Cuando existen patógenos dentro de la célula, la presentación de péptidos extraños por el MHC llevará

al desencadenamiento de la respuesta inmune. Este complejo se denomina HLA (*Human Leukocitary Antigen*) en humanos y SLA (*Swine Leukocitary Antigen*) en el cerdo. Tomando como ejemplo los humanos, existen tres clases de moléculas HLA: clase I, clase II y clase III (Regueiro JR *et al.*, 2002). Las moléculas de clase I se componen de una cadena peptídica pesada de 43 kDa unida por enlace no covalente con un péptido más pequeño de 11kDa, que se denomina β_2 -microglobulina. La mayor parte de la cadena pesada está organizada de modo que forma tres dominios globulares (α_1 , α_2 y α_3) que sobresalen de la superficie celular, un segmento hidrofóbico ancla la molécula sobre la membrana y una corta secuencia hidrofílica lleva el extremo C-terminal hacia el citoplasma. Las moléculas de clase II son glucoproteínas transmembrana que se componen de 2 cadenas polipeptídicas α y β , con peso molecular de 34kDa y 28kDa, respectivamente, estas moléculas tienen una estructura igual que la cadena H de las moléculas de clase I. Por último, las moléculas de clase III son en su mayoría componentes del complemento, como C2, C4 y factor B, entre otros.

Una de las características principales del sistema MHC es la **gran variabilidad** entre individuos con un sistema muy polimórfico basado en alelos múltiples. En el sistema HLA clase I, existen tres tipos de loci A, B y C, y de éstos las moléculas HLA-A y HLA-B son las más polimórficas. Los loci de clase II se denominan DP, DQ, DR y son también muy polimórficos, sobre todo las cadenas DQ α , DQ β y DR β , mientras que las DP β algo menos. Del resto de las cadenas DR α y la β_2 -microglobulina son invariables en su estructura. Los cambios de aminoácidos responsables de este polimorfismo están restringidos a los dominios α_1 y α_2 de la clase I y a los dominios α_1 y β_1 de la clase II. Pueden generarse formas alélicas múltiples por numerosos mecanismos: mutaciones puntuales, recombinación, entrecruzamiento homólogo pero desigual y conversión génica.

En cuanto a su **distribución tisular**, en esencia, todas las células nucleadas transportan moléculas de clase I que se expresan en abundancia sobre las células linfoides, algo menos en el hígado, el pulmón y el riñón, y sólo de forma aislada en el cerebro y el músculo esquelético. La única excepción es la superficie del trofoblasto que no presenta componentes HLA-A, HLA-B o HLA-C. Las moléculas de clase II se encuentran en forma más restringida, asociadas en general con linfocitos B, células presentadoras de antígeno (APC, *antigen presenting cell*) y macrófagos, sin embargo, cuando son activados por agentes tales como el interferón γ , tanto el endotelio capilar como muchas

células epiteliales pueden expresar moléculas de clase II en la superficie y un aumento de la expresión de clase I.

Además, parece ser que el MHC está implicado en numerosos fenómenos no inmunológicos, muchos de ellos posiblemente con base hormonal. Así, existen evidencias de que las moléculas clase I pueden actuar como componentes de los receptores de algunas hormonas como insulina, factor de crecimiento epidérmico, interleuquina (IL) 2, hormona luteinizante, hormona Beta adrenérgica y hormona muscarínica colinérgica (Cremaschi GA *et al.*, 1994; Roitt I, 1994).

1.2.4. Células del sistema inmune

En el sistema inmune existen dos tipos principales de respuestas frente a organismos extraños, la respuesta innata y la respuesta adaptativa, y ambas respuestas dependen de las actividades de los leucocitos.

La **respuesta innata** se produce frente a infecciones y está mediada por los granulocitos y macrófagos. Tiene como principio el reconocimiento de lo “ajeno o extraño”, pero de forma inespecífica, es decir, actúa igual ante cualquier agente agresor y no varía la intensidad de su respuesta aunque se repita la agresión más de una vez. Forman parte de la respuesta innata el complemento, los factores humorales, la fagocitosis, la respuesta inflamatoria, la acción de los interferones y la acción de las células “asesinas naturales” (*natural killers* o NK) (Castellanos R *et al.*, 2000).

La **respuesta inmune adaptativa** es la forma de respuesta inmunológica con mayor nivel de especialización y elaboración de sus recursos. Está mediada principalmente por la acción de los linfocitos y tiene la capacidad de producir una protección prolongada después de padecer una enfermedad infecciosa o vacunación. Aparece normalmente después que algunos elementos de la respuesta innata se han desplegado en medida variable y la mayor parte de las veces en perfecta armonía con ésta, porque la activación de la respuesta adaptativa está originada en los fenómenos y los elementos representados en la respuesta innata (Regueiro JR *et al.*, 2002).

Los **macrófagos** son células representativas de la línea monocítica macrofágica, altamente fagocíticas implicadas en la respuesta inmune inespecífica, que además producen y liberan un número de citocinas proinflamatorias importantes (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, INF α , TNF α , Factor Tisular). Estas características son claves para los procesos de presentación antigénica y de inflamación. Los macrófagos, como el sistema

de complemento, son elementos de enlace entre respuestas innatas y adaptativas (Bach FH *et al.*, 1996), y en el estadio maduro pueden vivir desde semanas hasta años. Cuando localizan la presencia de patógenos pueden responder de dos modos, fagocitándolos y digiriéndolos o liberando factores solubles y producir inflamación (Regueiro JR *et al.*, 2002).

Los **polimorfonucleares** son fagocitos profesionales de respuesta aguda. Aparecen en el sitio de la inflamación atraídos por mediadores quimiotácticos y al igual que los macrófagos pueden actuar primaria e independientemente de la presencia de Acs, complemento u otros factores del plasma (Al-Mohanna F *et al.*, 1997). A diferencia de los macrófagos, tienen una vida media menor y presentan un típico núcleo multilobulado y gránulos abundantes en el citoplasma. Según reaccionen sus gránulos a diferentes colorantes histológicos, se pueden dividir en **neutrófilos**, **eosinófilos** y **basófilos** que son capaces de liberar al exterior celular el contenido de sus gránulos y causar inflamación en presencia de diferentes estímulos (Regueiro JR *et al.*, 2002).

Los **mastocitos** están próximos a los vasos sanguíneos y esto les permite regular localmente la permeabilidad vascular. Los patógenos los activan liberando gran cantidad de mediadores inflamatorios preformados.

Las **células NK** son células altamente citotóxicas con dos mecanismos de destrucción: uno mediado por perforinas y otro que funciona mediante la unión al ligando FAS a su receptor celular que induce apoptosis. Además de su función citotóxica natural, las NK pueden combinar su acción con elementos de la respuesta humoral por el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de Acs (ADCC) y por la liberación de las citoquinas que producen (INF γ , TNF α e IL). Estas células son notablemente citotóxicas contra las células xenogénicas (Chan DV *et al.*, 1996; Inverardi L *et al.*, 1992).

Las **plaquetas** son esenciales para la hemostasia normal y para desarrollar distintas funciones en respuesta al daño vascular. Para ello detienen inicialmente las hemorragias formando tapones plaquetarios, estabilizan el balance hemostático al contribuir con la actividad procoagulante haciendo que la cascada de coagulación forme fibrina y promueven la reparación vascular al estimular la migración de células endoteliales y la migración y proliferación de células lisas.

Los **linfocitos T** son los elementos centrales de la respuesta inmunológica adaptativa y su activación da lugar a la elaboración de mecanismos efectores, a su expansión clonal, a la generación de la memoria inmunológica y a la regulación de la propia respuesta inmune y se caracterizan por la expresión del marcador CD3. Existen 2 tipos principales

de linfocitos T, los T *helper* que expresan además CD4 y los T citotóxicos que expresan CD8, ambos maduran en el timo.

Los **linfocitos B** se diferencian en el hígado durante la vida fetal y en la MO en adultos. La principal característica de los linfocitos B es su capacidad de producir Acs o Igs. Estas moléculas forman parte del receptor específico para antígeno de los linfocitos B. La mayoría de los linfocitos B que producen Igs (células plasmáticas) se encuentran en la MO, ganglios y bazo y apenas circulan (Regueiro JR *et al.*, 2002).

1.3. Respuesta inmune en el trasplante

Las formas clínicas de respuesta contra los órganos trasplantados son los **rechazos** y aunque éstos pueden tener diversas adaptaciones en el tiempo, intensidad y forma de aparición (Halloran PF, 2002), existen dos tipos principales: rechazo humoral y rechazo celular según estén implicados principalmente los Acs o las células, respectivamente (Figura 4).

Para que se lleve a cabo el reconocimiento antigénico se tienen que producir 3 tipos de señales. La fase inicial del rechazo es el reconocimiento de los linfocitos T del receptor del trasplante de las moléculas del MHC del donante que se convierten, en esta situación particular, en antígenos y constituye la señal 1. Numerosos estudios sugieren que en el trasplante las moléculas del MHC pueden ser reconocidas por el TCR por dos mecanismos distintos: 1) la presentación directa, donde el péptido y el MHC del donante son presentados directamente al TCR del receptor, siendo así posible incluso el reconocimiento aislado de las regiones del MHC (esto sucede habitualmente durante el alotrasplante por la alta frecuencia de precursores T respondedores), y 2) la presentación indirecta, donde los antígenos del órgano donado son procesados por las APC del receptor y presentados al TCR del receptor en el contexto de su propio MHC, esta presentación es mediada principalmente por MHC clase II, como sucede habitualmente con la mayor parte de los antígenos presentados durante cualquier respuesta inmune fuera de los modelos de trasplante (Gill R *et al.*, 1995). La respuesta que se produce no es tan intensa como la presentación directa, pues sólo uno de cada 1000-10000 linfocitos T reconocen un péptido extraño (Regueiro JR *et al.*, 2002).

Tanto la presentación directa como la indirecta desencadenan una serie de reacciones, para las que son necesarias las señales 2 y 3 (Rothstein DM *et al.*, 2003). La señal 2 se produce tras la unión de CD28 a uno de los dos ligandos (B7-1 o B7-2), expresado en

APC maduras (células dendríticas (DC, *dendritic cell*), células B, monocitos y macrófagos), desencadenando la producción de IL-2, la expansión clonal alo-antígeno específica y la adquisición de un fenotipo memoria/efector (co-estimulación positiva) (Jenkins MK *et al.*, 1991). Una segunda molécula de superficie, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), que se une por B7-1 o B7-2 libera una señal que inhibe la respuesta (co-estimulación negativa). La señal 3 está proporcionada por la IL-2 *in vitro* (Curtsinger JM *et al.*, 1999) e *in vivo* (Schmidt CS *et al.*, 1999) y el subconjunto de las DC CD8 α + se sabe que es importante para la presentación de antígenos a las células T CD8 inmaduras, ya que pueden producir IL-2 tras su activación (Pooley JL *et al.*, 2001; Maldonado-López R *et al.*, 2001; Pulendran B *et al.*, 1999) (Figura 4).

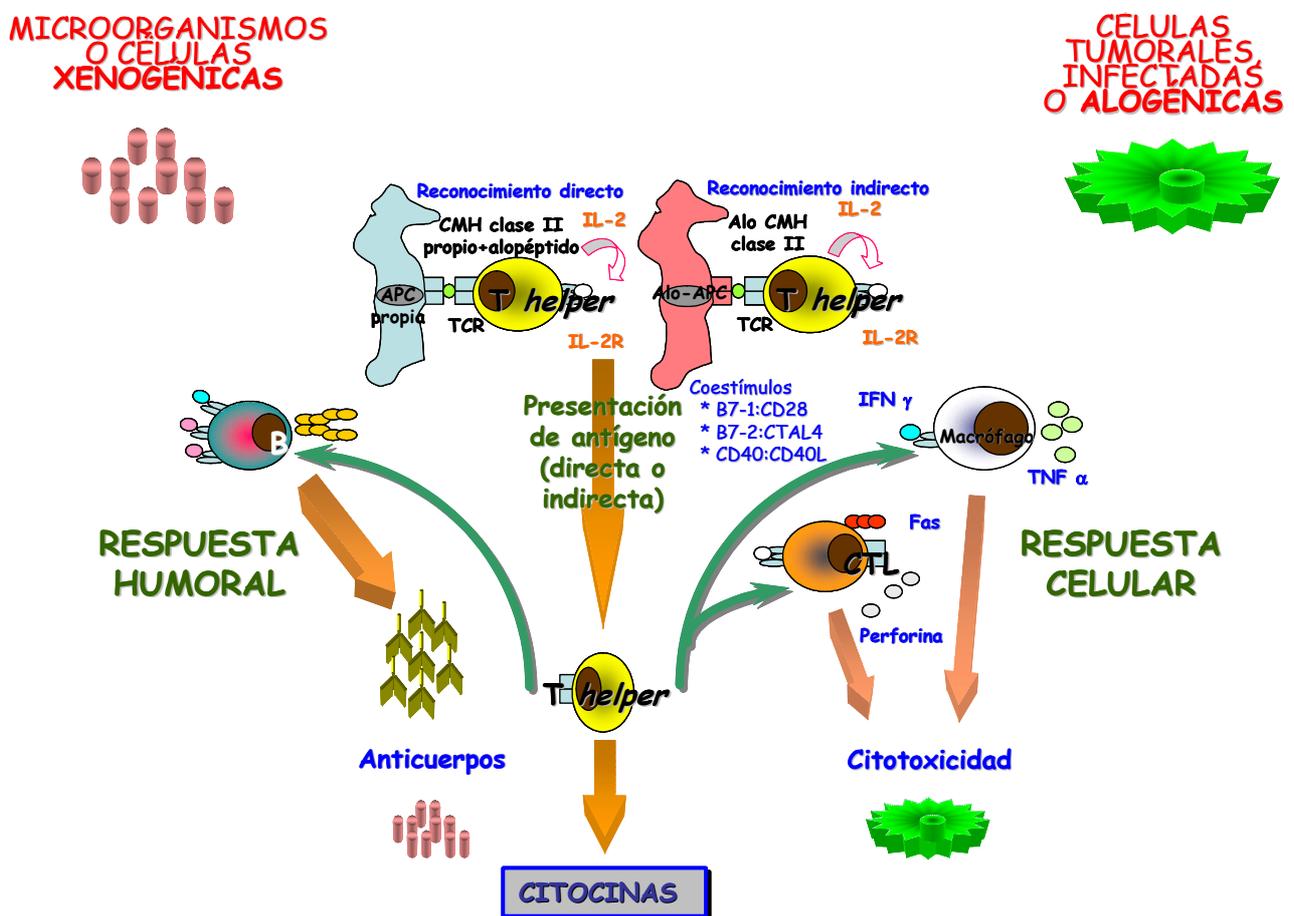


Figura 4: Reconocimiento antigénico por las APC y principales tipos de respuesta del sistema inmune.

Tras el reconocimiento antigénico de las APC a los linfocitos T *helper* y la producción de citoquinas, se desencadenará la respuesta, que dependiendo del antígeno procesado

será principalmente de tipo humoral si ésta proviene de microorganismos o células xenogénicas, o de tipo celular si proviene de células tumorales infectadas o alogénicas.

En el **rechazo humoral** se sabe que intervienen mecanismos mediados por Acs que pueden producirse de forma temprana o tardía tras el trasplante (Terasaki PI, 2003). También pueden intervenir Acs preformados en un individuo sensibilizado. Los Acs producidos por los linfocitos T activados por las células T *helper* reaccionan con los antígenos del injerto presentes en las células endoteliales vasculares, activando la vía clásica del complemento y al final se produce una necrosis rápida del tejido trasplantado (Cotts WG *et al.*, 2001). El fallo del injerto a largo plazo se manifiesta por un deterioro gradual de la patología y función del injerto. Los mecanismos de deterioro del injerto son complejos incluyendo daño del tejido por factores inmunológicos y no inmunológicos, y puede suceder con o sin evidencia de rechazo activo. Las terapias de inmunosupresión estándar anti-células T parecen tener una eficacia limitada en el tratamiento o prevención del rechazo y/o fallo humoral del injerto, indicando que hay otras respuestas inmunológicas involucradas en la patogénesis de este proceso.

Un criterio mínimo de diagnóstico de rechazo humoral incluye la presencia de inflamación y de depósitos de Igs y complemento en las células endoteliales de los capilares. Los marcadores inmunohistológicos demuestran que también se produce un aumento de la presencia de macrófagos (Hammond EH *et al.*, 1991; Olsen SL *et al.*, 1993). En el alotrasplante, un gran número de estudios han correlacionado la presencia de depósitos de C4d en el injerto con la presencia de alo-Acs y este hallazgo está asociado con el rechazo humoral y a un pobre desenlace del injerto. Otros métodos para evaluar el rechazo humoral incluyen la presencia de depósitos de componentes del complemento C1q y C3 (Hammond EH *et al.*, 1989), depósitos de IgM e IgG o complemento en la microvasculatura (Hammond EH *et al.*, 1991) o la presencia de fibrinógeno o fibrina puede ser parte del proceso (Labarrere CA *et al.*, 2001, Rodríguez ER, 2003). Este tipo de respuesta será analizada detenidamente más adelante en la tesis.

El **rechazo celular** es una respuesta inmune de células T y como tal, se puede dividir en diversas fases específicas: proliferación y expansión clonal, la diferenciación y desarrollo de las funciones efectoras, y la generación de una población memoria estable (Itano AA *et al.*, 2003). Los linfocitos T citotóxicos (CTL, *Cytotoxic T Lymphocytes*) se activan tras el reconocimiento directo o indirecto. La maduración de las CTL requiere una segunda señal que puede ser proporcionada o bien por factores coestimuladores presentes en células APC profesionales o por citoquinas secretadas por los linfocitos T

cooperadores (IL-2). Las CTL son predominantemente CD8+. La IL-2 juega un papel importante en la activación y maduración de CTL, y parece que tanto el IFN- γ como la IL-12 pueden contribuir a la diferenciación de las CTL. La diferenciación de las CTL implica la adquisición de la maquinaria necesaria para llevar a cabo la lisis celular de las células diana la cual llevan a cabo mediante la producción de gránulos citolíticos específicos que se unen a la membrana. Estos gránulos contienen perforinas en forma monomérica que al ser excitadas por las CTLs porilamerizan. Como consecuencia de la exocitosis del contenido de los gránulos, la perforina, que en el gránulo está en forma de monómero, polimeriza (Podack ER *et al.*, 1991; Cohen JJ *et al.*, 1992). La muerte se produce por una combinación de apoptosis y lisis osmótica. Otro mecanismo por el que los CTL pueden inducir la muerte de las células diana es a través de la expresión de Fas (CD95) ligando que comparten con otros linfocitos T activados la expresión de FasL, pudiendo transmitir señales de inducción a la apoptosis en células diana que expresen Fas funcional en su membrana (Cohen JJ *et al.*, 1992; Berke G, 1994; Castañer Alabau L *et al.*, 1999).

2. Alternativas al trasplante de órganos sólidos

2.1. Xenotrasplante

El trasplante de órganos o tejidos entre diferentes especies que se conoce hoy como xenotrasplante, es una idea tan antigua como la del alotrasplante. Hace más de doscientos años ya se experimentó trasplantando piel de ranas y sangre de caprinos a humanos con diferentes dolencias. En 1906 se realizaron los primeros xenotrasplantes renales pero el poco éxito obtenido con los mismos frenó el desarrollo de más estudios y retardó su avance por décadas (Samstein B *et al.*, 2001).

A principios de 1960, el desarrollo de la inmunosupresión farmacológica permitió que los alotrasplantes renales mejoraran la supervivencia y se renovó el interés por el uso de animales como donantes, porque el concepto de muerte cerebral no existía y la posibilidad de acudir a órganos humanos estaba limitada a escasos cadáveres. A partir de entonces se xenotrasplantaron riñones, hígados y corazones a humanos en un periodo de tiempo variable hasta alcanzar un total de 53 ensayos en 1996, de ellos, 46 se habían realizado con órganos procedentes de primates no humanos y 8 se habían obtenido de otros mamíferos (Cooper DK *et al.*, 2002). La supervivencia promedio para los

primeros fue de 6 semanas, excepto un paciente con un trasplante renal doble de chimpancé que logró sobrevivir 9 meses (Reemtsma K, 1969), el rechazo de los órganos procedentes de otros mamíferos no primates se produjo en minutos u horas (Cooper DK *et al.*, 2002).

El hecho de que la mayoría de las diversas experiencias clínicas hayan utilizado diferentes especies de primates como donantes es lógico por las similitudes anatómicas y fisiológicas de estos animales con los humanos. Sin embargo, su posible uso como donantes implica diversas dificultades ya que se reproducen lenta e ineficazmente en cautividad, están en peligro de extinción y pueden transmitir infecciones, además existen problemas éticos (Daar AS, 1997). Una especie alternativa para el trasplante sería otra más alejada filogenéticamente, con facilidad de manejo en cautividad, que se reproduzca rápida y eficazmente y que además tuviera similitudes anatómicas y fisiológicas con los humanos, y el cerdo cumple todos estos requisitos.

El xenotrasplante se divide en dos tipos, concordante y discordante, según la discrepancia entre las especies donante y receptora. El xenotrasplante **concordante** es aquel en el que donante y receptor pertenecen al mismo orden zoológico y no suelen existir Acs preformados o naturales en el donante frente al receptor, por ejemplo sería el caso del trasplante entre humanos y primates no humanos, rata-hámster o ratón-rata. El xenotrasplante **discordante** es aquel realizado entre especies no pertenecientes al mismo orden zoológico y en este caso sí existen Acs naturales en el receptor frente a antígenos del donante que producen un fuerte rechazo, ejemplos de esto serían el trasplante entre cerdo-primates o cerdo-perro. Hoy se sabe que las respuestas al rechazo no siguen exactamente distancias filogenéticas y que otros factores pueden influir sobre las mismas.

Para analizar los fenómenos y los distintos tipos de rechazo que se producen tras un xenotrasplante se han utilizado a nivel experimental diversos modelos con animales pequeños por su fácil manejo como los modelos cobaya-rata, ratón-conejo, cobaya-ratón, rata-ratones presensibilizados y rata-ratones *knockout* (Zhang Z *et al.*, 2000). Sin embargo, antes de la aplicación del xenotrasplante en humanos es necesario realizar ensayos en otros animales de mayor tamaño como modelo preclínico. En este sentido y debido al tema de la tesis, en esta introducción nos vamos a centrar en el modelo de xenotrasplante discordante cerdo-babuino.

A la hora de considerar al cerdo como posible fuente de órganos para los humanos existen tres importantes barreras que hay que superar: 1) que se produce una potente

respuesta inmunológica en el receptor contra el injerto, 2) que puede existir un riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas, además de 3) la posible existencia de incompatibilidades fisiológicas.

2.1.1. Barrera inmunológica

Siguiendo el modelo de rechazo que tiene lugar en el alotrasplante de receptores con Acs contra antígenos HLA del donante, o que reciben un órgano ABO incompatible, el rechazo de los órganos de cerdo en primates humanos y no humanos se ha considerado que puede ser: hiperagudo (RHA), vascular agudo (RVA) (también denominado xenogénico tardío) y el celular ó crónico. Esta división indica en general el tiempo transcurrido desde el trasplante, así el RHA tiene lugar entre minutos y horas después del trasplante, el RVA o xenogénico tardío tiene lugar más tarde en días, el celular en días o meses, y por último el crónico en meses o años. Además de diferentes tiempos de supervivencia, estos tipos de rechazo también implican distintas lesiones histológicas y mecanismos inmunológicos.

2.1.1.1. Tipos de rechazo en el xenotrasplante

- **RHA**

Después de la revascularización del injerto, el RHA se inicia por la unión de Acs naturales xenoreactivos (xenoAcs) al endotelio, que activan el complemento a través de la vía clásica. Tras la activación del complemento se produce una retracción de las células endoteliales que determina la pérdida de la integridad vascular y el trasvase de elementos del suero a los tejidos. El MAC es liberado y alcanza las células endoteliales vasculares, se activan los leucocitos y plaquetas circulantes y el factor tisular se expresa en el endotelio, con lo que se inicia la coagulación. (Pruitt SK *et al.*, 1993). La trombosis se produce de una forma incontrolada consecuencia, en parte, de la pérdida de los inhibidores de la coagulación localizados en la célula endotelial.

En condiciones generales, el complemento es activado y las CRPs se expresan en las células endoteliales vasculares, siendo su función inhibir el daño de las células o tejido y en consecuencia la activación excesiva del complemento. Entre estas moléculas reguladoras se encuentran el *Decay accelerating factor* (DAF ó CD55), el inhibidor de

la lisis reactiva de membrana (CD59), el cofactor de proteína de membrana (MCP ó CD46) y el factor homólogo de restricción (HRF) (Atkinson JP *et al.*, 1991; Lachman P, 1991); cada una inhibe la activación del complemento a diferente nivel. DAF inhibe el complejo enzimático que activa los componentes C3 y C5 del complemento a C3b y C5b acelerando su destrucción, MCP es un cofactor del factor B mediando la inactivación de C3b y combina ambos aceleración-destrucción y actividad de activación, y CD59 inhibe la formación del MAC. En el xenotrasplante cerdo-primate se piensa que lo que ocurre es que las CRPs de las células endoteliales del cerdo no pueden inhibir la activación del complemento humano debido a la diferencia en la estructura molecular (Fodor WL *et al.*, 1994), por ello, el injerto sufre daños importantes como resultado de la citotoxicidad mediada por complemento. Como resultado, el sulfato de heparina de las células endoteliales desaparece y las plaquetas se activan para formar un trombo de fibrina (McCurry KR *et al.*, 1995), y esto conduce a un estado de hipercoagulación que finalmente interrumpe el flujo de sangre.

Sería razonable pensar que en el modelo de xenotrasplante cerdo-primate, los xenoAcs naturales reconocen un amplio número de antígenos de cerdo, sin embargo no es así y cerca del 80% de los Acs de primates capaces de fijar complemento y producir un RHA son IgM e identifican una sola estructura: los azúcares de tipo α Galactosa (1-3) β Galactosa, denominados genéricamente α Gal (Tanemura M *et al.*, 2000). Este sacárido se encuentra presente en las células de todos los mamíferos inferiores y monos del Nuevo Mundo, en los que sustituye a los azúcares responsables de los grupos ABO, ya que poseen una enzima, la α 1-3galactosiltransferasa, que determina la producción de α Gal. Los humanos, y monos del Viejo Mundo tienen el gen responsable de la síntesis del enzima inactivado y presentan Acs naturales contra α Gal. Los antígenos α Gal no son una población homogénea (McKane W *et al.*, 1998) sino que engloba diferentes tipos de azúcares en forma de disacárido (DI), trisacáridos tipo 2 y tipo 6 (T2 y T6) mayoritariamente (Figura 5) y también pentasacáridos, que están ampliamente distribuidos en las células vasculares endoteliales porcinas. Los Acs anti- α Gal están probablemente dirigidos contra enterobacterias que se han adquirido durante el proceso evolutivo.

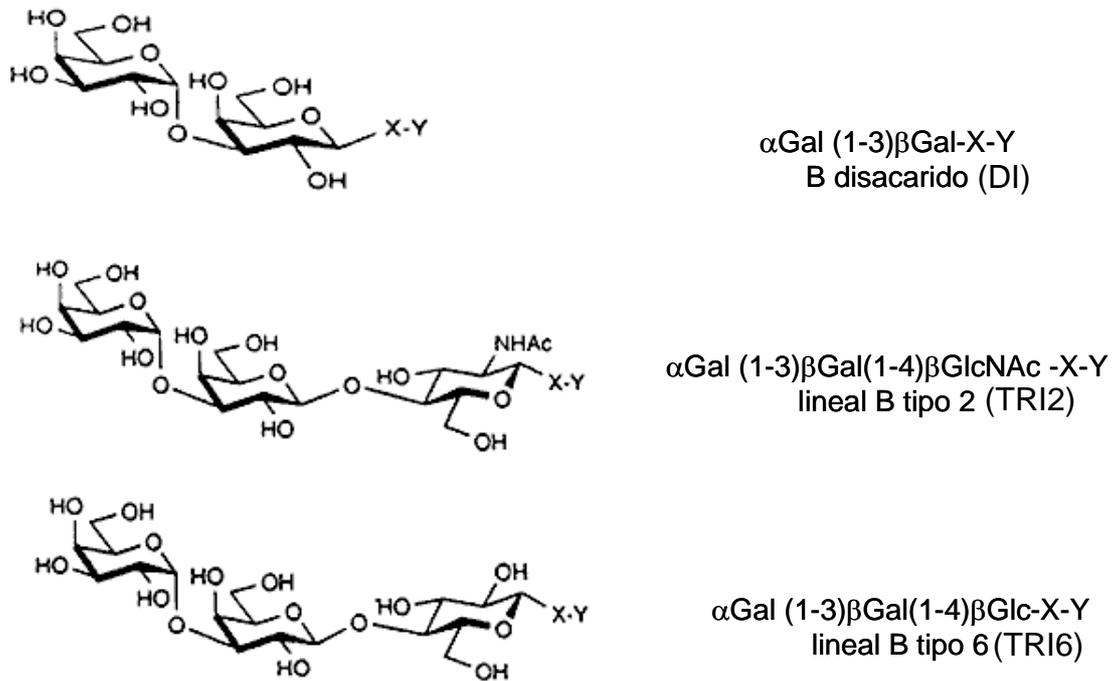


Figura 5: Estructura de galactosa- α (1-3)-galactosa (Gal- α (1-3)-Gal).

También se sabe que si el sitio de unión al antígeno α Gal se bloquea con tratamiento con el azúcar Galactosil-1, el RHA disminuye (Kobayashi T *et al.*, 1999); y que si el gen α (1-3) Galactosiltransferasa se expresa en la línea celular COS (línea de riñón de mono verde africano), los productos del gen se unen a los xenoAcs humanos y activan el complemento (Kobayashi T *et al.*, 1999).

- **RVA**

Si se logra evitar el RHA, los xenoinjertos porcinos tras su trasplante en primates pueden llegar a sufrir RVA que se caracteriza por un cambio isquémico, hemorragia intersticial y coagulación intravascular debida a hipercoagulación (Platt JL *et al.*, 1998) y a veces va acompañado de infiltración de monocitos y células NK. Se sabe que el mecanismo de este rechazo es por la activación de células endoteliales del injerto por los xenoAcs, lo que causa deposición de fibrina (Figura 6) (Ahn C *et al.*, 2004).

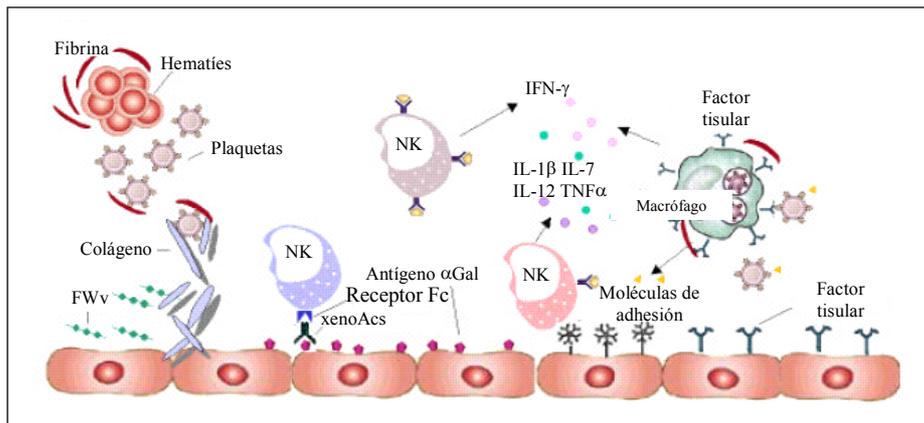


Figura 6: Esquema del RVA (Ahn C *et al.*, 2004).

Cuando los xenoAcs se unen a los residuos α Gal en las células endoteliales, las activan y se aumenta la producción de IL-1 que induce la vasoconstricción, causando inflamación y daño isquémico. Además, las células endoteliales activadas inducen la activación de las plaquetas, vasodilatación y liberación de citoquinas (Platt JL *et al.*, 1998; Millan MT *et al.*, 1997).

- **Rechazo mediado por células**

Si se logra controlar el RHA y el RVA, el xenoinjerto mantiene su función debido al fenómeno que se denomina “acomodación”. La acomodación es un fenómeno donde las células endoteliales vasculares muestran resistencia al daño mediado por Acs, aunque el nivel de xenoAcs se reestablezca al nivel original en 1-3 semanas después de eliminar los xenoAcs antes del xenotrasplante (Lin SS *et al.*, 2000; Lin Y *et al.*, 1998). Después de que se produzca la acomodación, se puede producir rechazo mediado tanto por células NK como por los linfocitos T. Las células NK muestran citotoxicidad a las células endoteliales vasculares, mientras que los linfocitos T son presentados con los xenoantígenos directamente o indirectamente e inducen un rechazo celular más severo que ha sido observado en alotrasplante (Sachs DH *et al.*, 1995). Hasta ahora no se ha observado la existencia del rechazo crónico en xenotrasplante cerdo-primate, debido posiblemente a que los receptores no sobreviven el suficiente tiempo para que se produzca (Ahn C *et al.*, 2004).

2.1.1.2. Estrategias para prevenir el rechazo

Por todo lo expuesto anteriormente, la mayoría de los métodos utilizados para evitar o minimizar el rechazo en el xenotrasplante están dirigidos sobre todo a eliminar los xenoAcs y/o a inhibir la acción del complemento, y además se utilizan inmunosupresores farmacológicos que ayudan a minimizar el rechazo.

- **Estrategias dirigidas a la eliminación o disminución de xenoAcs**
 - Perfusión de órganos: Los primeros intentos para eliminar los xenoAcs consistieron en la perfusión de plasma o sangre del receptor de órganos de cerdos donantes tales como hígados o riñones, mediante lo cual los Acs quedaban absorbidos por las células de los tejidos ajenos (Moberg AW *et al.*, 1971; Terman DS *et al.*, 1979).
 - Intercambio plasmático mediante plasmaféresis por el cual parte de los Acs del plasma son eliminados: En el modelo de trasplante renal de cerdo-babuino ha conseguido eliminar los Acs α Gal y prolongar la funcionalidad de órgano hasta 22 días en que aparece RVA. Sin embargo, tanto este método como el anterior logran sólo la disminución transitoria de los Acs y existe un incremento del riesgo de infección debido a la agammaglobulemia y la manipulación (Alexandre GP *et al.*, 1989).
 - Absorción de Acs o inmunoadsorción extracorpórea (EIA): Este procedimiento se ha realizado de dos formas: a) utilizando columnas con matrices de proteína A o proteína G conocidas por su alta capacidad de unirse inespecíficamente a regiones Fc de los Acs, con las que se han obtenido modestos resultados (Palmer A *et al.*, 1989) por la predisposición a las complicaciones infecciones derivadas de la agammaglobulemia y b) utilizando matrices con oligosacáridos dirigidos a eliminar específicamente Acs anti- α Gal, que ha sido el método más utilizado. Utilizando este segundo método *in vitro*, columnas con oligosacáridos α Gal de tipo TRI6 solo, o en combinación con oligosacáridos DI, eliminaron la mayoría de los xenoAcs citotóxicos de cerdo de sueros humanos que no habían sido expuestos a antígenos porcinos (Xu Y *et al.*, 1998; McKane W *et al.*, 1998). *In vivo*, las

columnas que contienen el oligosacárido TRI6 por si solos reducen la mayoría de los xenoAcs citotóxicos antes del trasplante, previniendo el RHA de órganos de cerdo no transgénico trasplantados en primates no humanos (Xu Y *et al.*, 1998). De todos modos, no está claro si las columnas que contengan varios tipos de oligosacáridos α Gal, en lugar de un único tipo, proporcionen alguna ventaja para la prevención del RVA. Algunos autores han mostrado que *in vitro* sueros humanos tienen Acs de tipo IgM e IgG anti- α Gal que no pueden ser eliminados con inmunoabsorbentes que contengan un único fenotipo α Gal (McKane W *et al.*, 1998). Sin embargo, a pesar de que con este método se prolonga la supervivencia y los animales sufren menos RVA, estos mueren por complicaciones relacionadas con la EIA (Richards AC *et al.*, 2002); por lo que se deben mejorar las técnicas de EIA y reducir la mortalidad y morbilidad en primates no humanos (Lin SS *et al.*, 1998; Lin SS *et al.*, 2000; Watts A *et al.*, 2000). El efecto de esta técnica aumenta si se combina con una esplenectomía y terapia con inmunosupresores. También se pueden eliminar los xenoAcs con una inyección intravenosa de carbohidratos usando Acs anti-idiotipo (Latinne D *et al.*, 1994; Simon PM *et al.*, 1998).

- Animales *knockout*: La presencia de Acs naturales contra el epítipo α Gal, junto con la alta densidad de residuos α Gal en la mayoría de la células porcinas (Tanemura M *et al.*, 2000), sugiere que la eliminación de la actividad galactosiltransferasa (Posekany KJ *et al.*, 2002) podría proporcionar un método práctico para superar tanto el RHA como el RVA y el daño crónico del tejido asociado a la unión del Ac a este epítipo. En base a esta premisa, y tras la obtención de cerdos clonados (Polejaeva IA *et al.*, 2000) por transferencia nuclear con células somáticas, se han podido lograr cerdos *knockout* para el locus α -1,3-galactosiltransferasa ($\text{Gal}^{-/-}$) (Kolber-Simonds D *et al.*, 2004).

Los cerdos *knockout* $\text{Gal}^{-/-}$ generados no expresan α Gal en ninguno de los tejidos testados (Dor FJ *et al.*, 2004), por lo que no inducen la producción de Acs anti- α Gal y han hecho posible diversos estudios de xenotrasplantes de cerdo a babuino en ausencia de los efectos de los Acs naturales anti- α Gal. Cuando se utilizaron los cerdos $\text{Gal}^{-/-}$ como donantes en trasplantes renales ortotópicos, utilizando un protocolo dirigido a la inducción de tolerancia mediada por células T al trasplantar conjuntamente tejido del timo vascularizado del donante (Kamano C *et al.*, 2004; Yamada K *et al.*, 2005), los babuinos receptores no mostraron evidencia de rechazo

histológicamente (por inmunohistoquímica no se vieron evidencias de depósitos de IgG), mientras que los riñones de los animales control sufrieron un rechazo celular y humoral severo (fuerte marcaje para IgG en glomérulos y capilares peritubulares). En el caso de la utilización de los animales *knockout Gal^{-/-}* en el xenotrasplante de corazón, incluso en ausencia de otras terapias dirigidas hacia la eliminación de Acs anti- α Gal o complemento, se demostró que no se produce RHA, que se reduce el RVA y se aumenta la supervivencia del injerto por encima de estudios previos que utilizaban corazones de cerdos normales o cerdos transgénicos para hDAF (Kuwaki K *et al.*, 2005).

- **Estrategias dirigidas a inhibir la acción del complemento**

Existen diversas estrategias para intentar bloquear la activación del complemento, de las cuales las principales son:

- Eliminar el complemento del suero: El complemento del suero puede eliminarse con drogas, como el factor de veneno de cobra (CVF) (Glasgow SC *et al.*, 2006). También con la administración de reguladores del complemento, constituyen una familia de moléculas que controlan de forma natural al complemento *in vivo*, pudiendo actuar sobre las fases solubles de activación en el sistema del complemento (factor H, proteína enlazante de C4, factor inhibidor de C1, carboxipeptidasas N) (Kobayashi T *et al.*, 1996; Pruitt SK *et al.*, 1997). Algunas de estas proteínas ancladas a las membranas se obtienen de forma soluble por modificaciones genéticas eliminando los extremos transmembrana e intracitoplasmáticos de su estructura. La administración de estas sustancias como CVF, factor H o carboxipeptidasas N, produce efectos secundarios (Rollins SA *et al.*, 1995).
- Obtención de animales transgénicos: Las moléculas CRPs no solubles del complemento son específicas de especie y por lo tanto sólo son activas en la especie que las expresa. Como consecuencia el RHA se produce, al menos en parte, por la incapacidad de las CRPs, expresadas en las células del xenoinjerto, para controlar la activación del complemento del receptor. Una forma más específica de evitar esta activación ha sido la producción de cerdos transgénicos que expresan en la

- membrana de sus células CRPs humanas (hCRPs) como CD59, DAF y MCP, tanto de forma individual como combinadas entre ellas.
- El trasplante de órganos de cerdos transgénicos para las hCRPs (Figura 7) ha permitido evitar el RHA en el trasplante de cerdo a primates no humanos, pero los órganos se rechazan después de un periodo de tiempo variable por RVA (Schuurman HJ *et al.*, 2003). En el caso de xenotrasplantes a babuinos de corazones de cerdos transgénicos para las hCRPs expresadas individualmente, se han logrado supervivencias de hasta 3 meses utilizando cerdos que expresan hMCP (McGregor CG *et al.*, 2005) y de hasta 29 días con cerdos transgénicos para hDAF, solos o en combinación con inmunoadsorciones (Brandl U *et al.*, 2005; Ashton-Chess J *et al.*, 2003). Resultados de supervivencia similares se obtuvieron cuando se utilizan riñones de cerdos transgénicos hDAF en combinación con un cotrasplante del timo del cerdo donante (para producir tolerancia), con lo que se logró retrasar la aparición del RVA a los 30 días (Shimizu A *et al.*, 2005). En el caso de xenotrasplante de hígado transgénico para hDAF en primates sin embargo, los resultados obtenidos han mostrado que aunque se logra superar el RHA, los animales solo sobreviven pocas horas (Sánchez A *et al.*, 2003) debido posiblemente a factores relacionados con cuestiones fisiológicas o funcionales del órgano trasplantado. Si se utilizan como donantes animales transgénicos para hCD59, los órganos trasplantados no sufren RHA, y se logra mejorar la función del xenoinjerto si se comparan los resultados con los obtenidos con órganos porcinos normales tanto para xenotrasplante de corazón como de riñón (Kroshus TJ *et al.*, 1996).
 - Cuando se utilizan animales que expresan combinaciones de varias CRPs, los resultados parecen controvertidos a la hora de dilucidar si se aumenta el éxito del xenotrasplante. Por ejemplo, animales trasplantados con corazones hDAF/hCD59 mostraron supervivencias similares a los trasplantados con corazones porcinos transgénicos sólo para hDAF (Mañez R *et al.*, 2000; Lin SS *et al.*, 1998; Cowan PJ *et al.*, 2000). Por el contrario, si se ha visto que utilizando animales trasplantados con riñones porcinos que expresan hDAF/CD59h y H-transferasa (HT) se logra retrasar el RVA si se compara con animales a los que se les trasplantan riñones porcinos que sólo expresan hDAF/HT (Cowan PJ *et al.*, 2000; Ashton-Chess J *et al.*, 2004). Existen también estudios realizados con hígados procedentes de cerdos triples transgénicos para CD55, CD59 y H-transferasa que demostraron la ausencia

de RHA, aunque los babuinos sólo sobrevivieron de 13 a 24 horas (Ramírez P *et al.*, 2005).

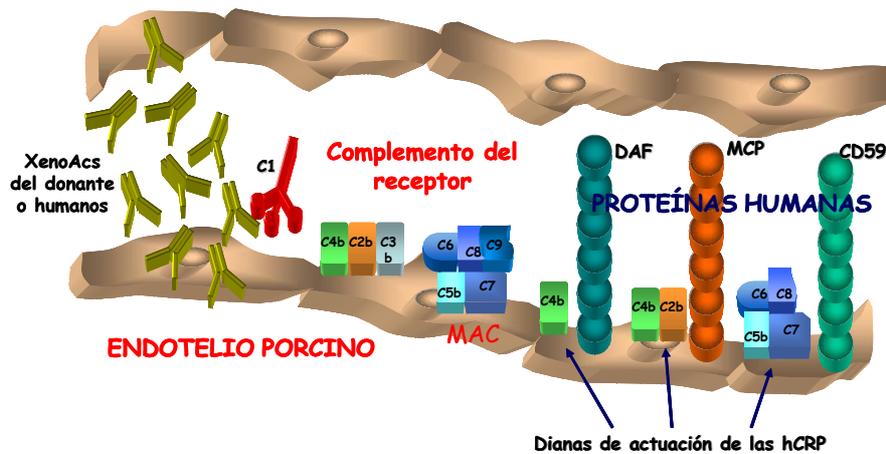


Figura 7: Esquema del escenario de los componentes del complemento en el xenoinjerto de cerdos transgénicos para las hCRPs.

- **Inmunosupresores farmacológicos**

Debido a que la respuesta inmunológica que se produce tras el xenotrasplante es sobre todo humoral, los inmunosupresores van dirigidos principalmente contra la producción de los Acs más que frente a las células T, y actúan a diferente nivel y son diferentes según el tipo de xenotrasplante.

El **tacrolimus** es capaz de controlar la supervivencia del injerto eficientemente en situaciones especiales como hígados concordantes e injertos no vascularizados; su capacidad para controlar el rechazo en otros órganos sólidos es limitada (Gudas VM *et al.*, 1989). Cuando se combina con terapias que eliminan o inhiben la producción de Acs, la supervivencia del injerto mejora espectacularmente. De hecho el tacrolimus a menudo tiene un efecto sinérgico cuando se usa en estas combinaciones (Celli S *et al.*, 1993; Nishimori H *et al.*, 1994). En principio se demostró este efecto combinando el tacrolimus con una esplenectomía en una gran variedad de modelos animales (Celli S *et al.*, 1993; Carobbi A *et al.*, 1992). Sin embargo se necesitan técnicas menos invasivas si el xenotrasplante se convirtiera en una opción clínica viable.

El **micofenolato mofetil (MMF)** parece no ser muy efectivo para prolongar la supervivencia del xenoinjerto cuando se usa como monoterapia. A pesar de esta ineffectividad, se ha demostrado en varios modelos de xenotrasplante que combinado con otros inmunosupresores tiene una considerable eficacia. La función de MMF

combinado con tacrolimus es superior a la de la azatioprina, 15-deoxispergualina (DSG) mizoribina y metotrexato (Murase N *et al.*, 1993). MMF tiene la capacidad de inhibir cambios vasculares crónicos y su rendimiento moderado en inhibir respuestas humorales combinado a su vez con su moderada toxicidad, lo hacen una buena elección para muchas combinaciones concordantes (Brazelton TR *et al.*, 1997).

El **sirolimus** tiene un efecto limitado en la supervivencia del injerto que depende del modelo de xenotrasplante utilizado. Sirolimus inhibe potente y eficientemente la producción de los tres tipos principales de Acs IgG, IgM e IgA *in vitro* sugiriendo que es útil para controlar el rechazo mediado por Acs (Chen H *et al.*, 1992; Luo H *et al.*, 1992). En terapias combinadas, el sirolimus tiene interacción con muchos inmunosupresores (Yatscoff RW *et al.*, 1994), por ejemplo interactúa de forma aditiva con Igs anti-linfocitos para prolongar los xenoinjertos de piel (Brazelton TR *et al.*, 1997).

La **ciclosporina** se utiliza en combinación con muchos otros inmunosupresores y su eficacia depende del tipo de trasplante y animales que se utilicen para ello. Cuando se trasplantan corazones de ratas Lewis en ratones, el uso de la ciclosporina aumenta la supervivencia (Wang H *et al.*, 2006). Sin embargo, la supervivencia de corazones de hámster en ratas no se ve aumentada con la administración de este inmunosupresor (Koyamada N *et al.*, 2005). Cuando se combina con transfusiones de sangre del receptor, en un modelo de trasplante de corazón de hámster-rata, también aumenta la supervivencia (Vriens PW *et al.*, 2005). En un modelo de trasplante de riñón de cerdo transgénico hDAF a babuino, la combinación de ciclosporina y otros inmunosupresores aumentan la supervivencia hasta 90 días (García B *et al.*, 2004).

En xenotrasplantes de ratón a rata se induce tolerancia mediante tratamiento con **ciclofosfamida** teniendo una supervivencia de más de 6 meses, sin Acs citotóxicos ni reacciones de hipersensibilidad (Chernyakhovskaya IY *et al.*, 1994). La ciclofosfamida combinada con esteroides, en un xenotrasplante cardiaco de cerdo transgénico a primate no humano alargó la supervivencia hasta 63 días (Hancock WW, 1997).

En nuestro estudio nos hemos centrado en el **GAS914** (Novartis Pharma AG, Basel, Suiza) (Figura 8), que se ha utilizado en combinación con otros inmunosupresores para analizar su eficacia. El GAS914 es una matriz de polilisina lineal soluble con una media de longitud de 1000 lisinas y con un 25% de cadenas laterales conjugadas con residuos α Gal en forma de TRI2 ($\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}\beta(1,4)\text{GlcNAc}$) de aproximadamente 500kDa de peso molecular. Está probado que el GAS914 absorbe la mayoría de los Acs anti-

Gal α (1,3)Gal trisacáridos. *In vitro*, el GAS914 es un potente inhibidor de la unión a las células de los Acs anti- α Gal tanto de tipo IgM como IgG así como de la hemólisis de los eritrocitos porcinos dependiente de complemento por el suero humano. El GAS914 también es muy eficaz *in vivo* eliminando los Acs anti- α Gal en primates no humanos, sin producir efectos secundarios y con una mínima activación del complemento y sin producir además respuesta inmune frente a carbohidratos y/o la matriz de polilisina (Katopodis AG *et al.*, 2002). El tratamiento con GAS914 reduce la severidad del RVA de órganos de cerdo hDAF en babuinos receptores (Mañez R *et al.*, 2001b). Se ha visto que con la administración de GAS914 a babuinos con trasplantes ortotópicos de corazones de cerdo hDAF, se obtienen supervivencias de hasta 25 días, además de una inmediata y significativa reducción de los Acs anti-Gal IgG e IgM. Sin embargo, la reducción es independiente de la dosis y forma de aplicación del GAS914 (Brandl U *et al.*, 2005). Cuando se trasplantan riñones de cerdo hDAF a babuinos y los receptores se tratan con GAS914, también se eliminan eficientemente los Acs circulantes, evitando el RHA (Lam TT *et al.*, 2005). En este modelo, en el que se neutralizan los Acs anti- α Gal con inmunosupresión combinada con GAS914, el RVA que se produce se relaciona con Acs no anti- α Gal (Chen G *et al.*, 2006).

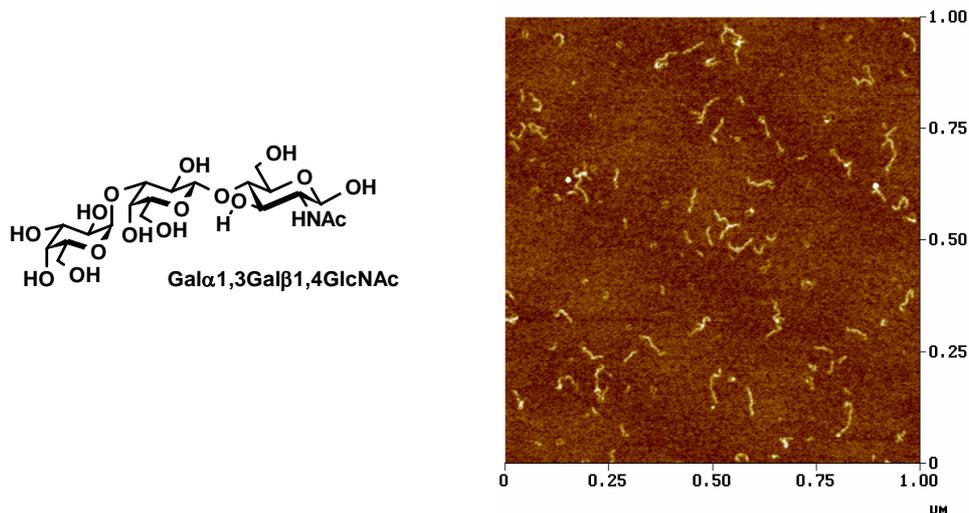


Figura 8: Estructura del GAS914 (Katopodis AG *et al.*, 2002).

En el xenotrasplante también se utilizan como inmunosupresores **AcMos** que bloquean algunos factores implicados en el mecanismo de la reacción inmunológica como las ILs, el TNF o como el CD3, CD4 y CD8 (Hammond-McKibben D *et al.*, 2005), CD20 (Davila E *et al.*, 2006), CD25 o Basiliximab (Honey CR *et al.*, 1999) y CD40L (Lehnert AM *et al.*, 2000).

En la figura 9 se muestra un resumen de algunos de los posibles mecanismos de prevención del rechazo en el xenotrasplante. En la actualidad, ninguno de estos avances solo puede evitar el RVA. La supervivencia prolongada del xenoinjerto en primates no humanos se podría obtener si se combinan varios de ellos (Richards AC *et al.*, 2002).

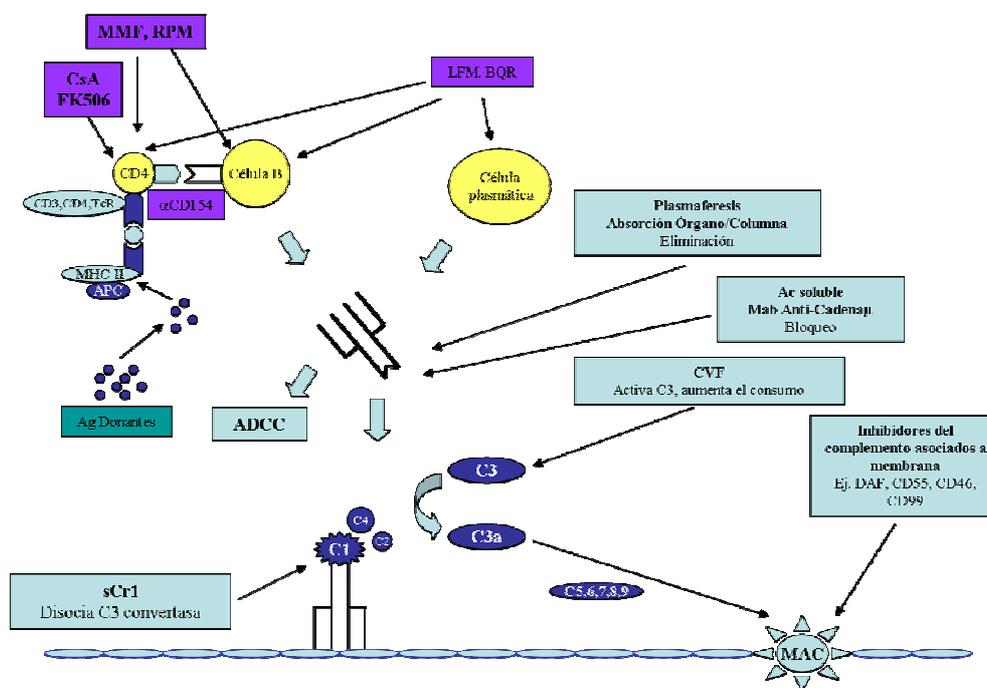


Figura 9: Resumen de mecanismos de prevención de xenorechazo (Cooper DKC *et al.*, 1997).

2.1.2. Barrera infecciosa

2.1.2.1. Posibilidad de xenofoonosis

Además de la barrera inmunológica, una cuestión no menos importante que concierne al posible uso en clínica del xenotrasplante es la potencial transmisión de patógenos a través del xenoinjerto al ser humano. En el caso del xenotrasplante, los datos experimentales sugieren que la fuerte inmunosupresión necesaria para evitar el rechazo podría aumentar el espectro de infecciones oportunistas ya que deberá incluir también aquellas enfermedades que afectan a la especie utilizada como fuente. Por todo ello la xenofoonosis es uno de los mayores argumentos en contra de la práctica clínica del xenotrasplante en humanos (Chapman L *et al.*, 1995; Collignon P *et al.*, 2001).

La probabilidad de que un microorganismo específico de una especie animal desarrolle una enfermedad en humanos es desconocida. Teóricamente podría ser bastante alta en el

caso de microorganismos zoonóticos en condiciones normales (por ejemplo el *Toxoplasma gondii*), aquellos microorganismos similares a otros que causan infecciones en el alotrápante (como el citomegalovirus CMV), los microorganismos con capacidad para infectar un espectro amplio de especies (por ejemplo *Pneumocystis carinii*) y aquellos microorganismos que pueden replicarse *in vitro* en células humanas. Además, todas las especies animales tienen virus que persisten dentro de las células del huésped en un estado de latencia. Entre estos destacan los herpesvirus y los retrovirus.

Por el momento se desconoce si los virus no humanos representan un riesgo de enfermedad para los humanos, ya que existen evidencias contradictorias. Así, es posible infectar *in vitro* neuronas y fibroblastos humanos con el virus de la pseudorabia porcina o el CMV de babuinos respectivamente (Spector DH *et al.*, 1990; Michaels MG *et al.*, 1997), e infectar *in vivo* tanto animales de experimentación como humanos con virus procedentes de otras especies (Levy JA, 1977; Lusso P *et al.*, 1990; Allan JS *et al.*, 1998). El reciente ejemplo de SARS (síndrome respiratorio agudo severo) ha demostrado claramente el riesgo de transmisión de patógenos virales xenogénicos a humanos (Normile D *et al.*, 2003). El xenotrasplante de un órgano puede causar estas infecciones, como se demostró en los dos últimos receptores humanos de un hígado de babuino en los que se detectó la presencia de retrovirus de simios (Allan JS *et al.*, 1998). Sin embargo, otros patógenos habituales como el CMV porcino que infecta de forma subclínica al 90% de estos animales, no ha podido infectar *in vitro* células humanas (Tucker AW *et al.*, 1999). Por lo tanto, el posible riesgo de transmisión a los humanos de un microorganismo debe estudiarse de forma individualizada, ya que existen importantes diferencias incluso para un mismo patógeno procedente de dos especies distintas. De todas formas, no es de esperar que las xenosis o xenozoosis bacterianas, fúngicas, parasitarias y víricas, causadas tanto por patógenos comunes como específicos de especie exógenos, impliquen un riesgo especial para el receptor del xenoinjerto y menos para la salud pública. El motivo es que este tipo de infecciones pueden prevenirse en el animal utilizado como fuente de órganos.

La obtención de animales mediante cesárea y su mantenimiento en áreas cerradas y aisladas, en las que se selecciona de forma prospectiva únicamente aquellos que son negativos para todos los patógenos conocidos, permite reducir al mínimo las infecciones que estos animales pueden padecer. La utilización para xenotrasplante de estos animales, conocidos como libres de gérmenes específicos (LGE), minimizaría el riesgo de transmisión tanto de las zoonosis clásicas como de las posibles xenosis o

xenozoonosis transmitidas por el xenotrasplante. La mayor facilidad con la que se pueden obtener cerdos LGE es otra de las ventajas de esta especie animal como potencial fuente de órganos, mientras que es muy complicado criar primates no humanos en estas condiciones. El establecimiento de rigurosos protocolos de evaluación clínica y microbiológica, utilizando tanto animales inmunocompetentes como inmunodeprimidos, debe permitir la eliminación de cualquier animal que presente signos de infección, sea portador de microorganismos latentes similares a los que causan infección en el alotrasplante (CMV, virus *Epstein Barr* EBV, *Toxoplasma gondii*) o de patógenos para distintas especies. Además de estas causas de exclusión para cualquier animal, pueden incluirse criterios específicos según el órgano que se trasplante. Así, la presencia de *Mycoplasma sp* descartaría animales como posible fuente de xenoinjertos de pulmón, o el virus *Coxsackie* de xenoinjertos cardiacos.

Mientras que el CMV porcino se ha erradicado de los lechones por destete temprano de la madre, se ha visto recientemente que la infección de CMV está asociada con el daño del injerto en modelos de xenotrasplante de cerdo a primate y es debido a que la presencia de CMV aumenta como patógeno transmisible en receptores de un xenotrasplante cuando están inmunosuprimidos (Gollackner B *et al.*, 2003; Bucher P *et al.*, 2005).

2.1.2.2. Retrovirus Endógeno Porcino (PERV, *porcine endogenous retrovirus*)

Con la producción de animales LGE el riesgo de transmisión de infecciones quedaría limitado a aquellas causadas por patógenos, todos ellos virus, que pueden ser transmitidos verticalmente a la descendencia. Los virus porcinos cuya transmisión vertical es actualmente conocida son los retrovirus endógenos (Patience C *et al.*, 1997). Aunque no son patógenos en el huésped, estos retrovirus pueden ser xenotrópicos o capaces de infectar otras especies. Los retrovirus endógenos, cuyo material genético consiste en ARN en lugar de ADN, son copias de genomas de retrovirus exógenos integrados en el genoma del hospedador por largos periodos de tiempo, 10 millones de años en algunos casos. Se han encontrado múltiples copias de retrovirus endógenos en múltiples vertebrados, la mayoría son defectivos debido a mutaciones deletéreas (Klymiuk N *et al.*, 2002). Sin embargo, generalmente son infecciosos por un corto periodo de tiempo después de integrarse cuando consiguen mutaciones *knockout* durante la replicación del ADN del huésped. Participan en procesos, como especiación

recombinación, ontogénesis, regulación de especificidad del tejido y expresión génica. Se ha sugerido, en los últimos años, que los retrovirus endógenos humanos juegan un papel en ciertos tipos de cáncer y enfermedades autoinmunes. Aunque no se conoce si causan directamente la enfermedad, es posible que estén involucrados en mecanismos patológicos (Christensen T *et al.*, 2003).

En el caso de la especie porcina, en general los PERV tienen un tamaño de 8-10 Kb (Figura 10) y su genoma está compuesto por diferentes regiones, la región *R* que permite la transferencia de ADN, tiene una longitud de 12 pb a 235 pb y se encuentra situada a ambos extremos del genoma. La región *U5* que contiene información única, es la primera región copia en la reversotranscripción y a veces es esencial para el inicio de la misma. La región *gag* contiene información para la síntesis de las proteínas internas del virión que forman la matriz, cápside y estructura de la neurocápside. La región *pro* que codifica la proteasa del virión, proteína responsable de los anclajes proteolíticos que se generan durante la maduración del virión. La región *pol* que dirige la síntesis de la reversotranscriptasa y de la integrasa. La región *env* que codifica las proteínas de los componentes de la envuelta viral, superficie y transmembrana, determina el tropismo viral y el rango del hospedador. La región *U3*, que es aproximadamente la copia invertida de *U5*, que contiene señales que actúan en cis necesarias para la replicación del virus y forma la región 5' de la LTR. Y la región *poli-A*, que es una modificación común a la mayoría de de los ARNs, se añade de forma postranscripcional. Mutaciones en esta región tienen poco efecto en el empaquetamiento del genoma o en la replicación (Mang R, 2001).

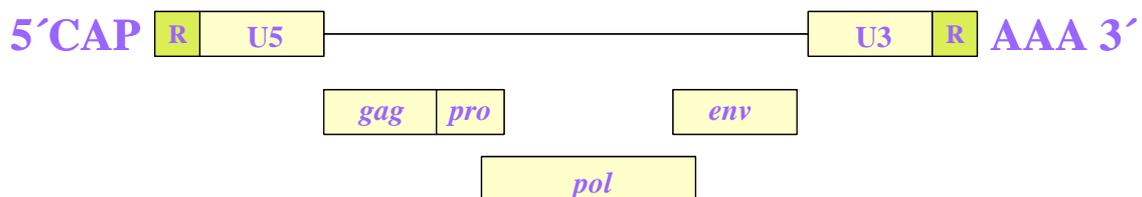


Figura 10: Estructura del genoma de PERV (Mang R, 2001).

Entre los PERV que se podrían transmitir de un órgano, tejido o células vivas de cerdo destacan dos: el PERV de tipo II y el del tipo IV que se ha demostrado tienen la capacidad de infectar células humanas *in vitro* (Patience C, 1997), esta capacidad de infección de ambos tipos de PERV también se ha evidenciado *in vivo*, en un modelo de

ratones SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) a los que se les transplantó islotes pancreáticos porcinos (van der Laan LJ *et al.*, 2000; Deng YM *et al.*, 2000).

Sin embargo, en contradicción con estas observaciones, otros estudios han mostrado ausencia de transmisión de PERV en modelos de primates no humanos inmunodeprimidos a los que se les trasplantaron pulmones, hematíes y células endoteliales porcinas (Martin U *et al.*, 2002). Además, la transmisión de PERV a primates no humanos nunca ha sido observada *in vivo* después de su exposición a diversos tejidos porcinos (Magre S *et al.*, 2003). También en humanos no se ha observado infección de PERV tras las investigaciones realizadas en un grupo de 160 personas que estuvieron en contacto con órganos, tejidos o células vivas de cerdo (Paradis K *et al.*, 1999). Existen otros estudios que informan sobre experiencias en humanos receptores de tejidos porcinos (Ej. bioreactor hepático extracorpóreo porcino) y que tampoco han mostrado evidencias de transmisión de PERV (Magre S *et al.*, 2003; Irgang M *et al.*, 2003).

Estas discrepancias entre los resultados *in vitro* e *in vivo* pueden tal vez ser explicadas por la presencia de inmunidad natural contra PERV en humanos y/o primates no humanos (Blusch J *et al.*, 2002). En apoyo de la hipótesis, dos estudios han demostrado la existencia de inmunidad natural frente a PERV en el suero humano. Primero, se ha mostrado que el suero humano puede inhibir la infectividad por PERV de células humanas *in vitro* y que esta inactivación viral es a través de la vía clásica mediada por complemento (Fujita F *et al.*, 2003). Otros estudios con ratones SCID confirman los resultados previos mostrando que el suero humano o los Acs anti- α Gal que contienen, pueden inhibir la infección de las células humanas por PERV *in vivo* (McKane BW *et al.*, 2003). Existen datos que indican que el mecanismo mediado por complemento por el que los Acs anti- α Gal pueden inactivar a los retrovirus se inicia tras la unión de estos xenoAcs al epítipo α Gal que se expresa en la envuelta del retrovirus (Rother RP *et al.*, 1995).

Los cerdos normales de forma natural expresan antígenos α Gal que pueden provenir de las partículas de PERV que se incorporan a partes de la membrana celular y sus tejidos son destruidos por Acs naturales dirigidos contra éstos (McKane BW *et al.*, 2003; Weiss RA *et al.*, 1998), sin embargo en cerdos *knockout* Gal⁻/Gal⁻ esto no sucede (Korsgren O *et al.*, 2003) al no expresar el antígeno α Gal, los tejidos no serían atacados por los xenoAcs y las partículas de PERV se expresarían durante un largo periodo de tiempo. Estos resultados sugieren que existe riesgo asociado a los cerdos *knockout* como

donantes para xenotrasplantes a humanos (Kurihara T *et al.*, 2003; Korsgren O *et al.*, 2003) y que el uso de tejidos de estos cerdos podría estar asociado con un aumento del riesgo de transmisión de PERV.

En resumen, aunque las primeras investigaciones realizadas en primates no humanos y humanos que han recibido órganos o tejidos vivos de cerdo demuestran que no existe una replicación de los PERV en los mismos (Paradis K *et al.*, 1999), el posible impacto de los retrovirus xeno-zoonóticos no se podrá conocer hasta que se realicen experiencias clínicas de xenotrasplante. Esto va a exigir que, al menos inicialmente, los receptores y su círculo familiar directo acepten, para poder recibir este tipo de trasplantes, una monitorización durante toda su vida que permita detectar cualquier posible infección xenogénica.

2.1.3. Barrera fisiológica

Por último, la última barrera a superar sería la fisiológica. Aunque se lograran resolver las dos anteriores, esto no garantizaría el éxito del xenotrasplante cerdo-primate debido a las diferencias fisiológicas de ambas especies al estar tan separadas filogenéticamente. Aunque está bien establecido que algunas proteínas xenogénicas, como la insulina, pueden funcionar correctamente en el humano, no se conoce cómo y por cuánto tiempo el xenoinjerto desempeñará sus funciones en un medio distinto del suyo y para el que genéticamente no ha sido preparado. Los datos de que se dispone en xenotrasplantes de cerdo a primates no humanos sugieren que órganos como el corazón y el riñón pueden funcionar correctamente en humanos, al menos durante unos meses (Schmoeckel M *et al.*, 1998; Zaidi A *et al.*, 1998). Sin embargo, en el caso del corazón se produjeron algunos fallecimientos por arritmias y bajo gasto cardiaco (Schmoeckel M *et al.*, 1998). El xenotrasplante riñón de cerdo en monos *Cynomologus* ha demostrado que funciona hasta 35 días (Zaidi A *et al.*, 1998). Sin embargo, también se ha asociado con una persistente anemia en el receptor por la incapacidad de la eritropoyetina de cerdo para sustentar una eritropoyesis en los primates.

En el caso del hígado es todavía más difícil predecir si los injertos de cerdo podrán funcionar correctamente en humanos, dada la complejidad de la función hepática y el elevado número de proteínas vitales que sintetiza este órgano. Estos cambios ya pudieron observarse entre especies más próximas como los últimos xenotrasplantes de hígado de babuino en humanos, en los que las proteínas totales, albúmina, colesterol y

ácido úrico disminuyeron significativamente en los receptores, adquiriendo el perfil habitual de los babuinos (Starzl TE *et al.*, 1994). Aunque la trascendencia funcional de los cambios que se produjeron en estos casos no fue muy grande a corto plazo, se desconoce si la correcta fisiología del receptor puede mantenerse de forma indefinida, o lo que ocurrirá con un hígado de una especie más alejada del hombre en la escala filogenética como el cerdo.

En general, las variaciones fisiológicas y bioquímicas que existen entre estas especies incluyen densidad sanguínea, metabolismo hepático, enzimas y hormonas. Es de particular importancia la incompatibilidad de los factores de coagulación que puede conducir al desarrollo de un estado pro-coagulante en el injerto con la subsiguiente trombosis. La deficiencia en el control de los factores de coagulación por tales incompatibilidades, incrementa la susceptibilidad a fenómenos de coagulación vascular diseminada observada en varios modelos incluyendo experimentos *in vitro* o *in vivo* cerdo/humano (Lawson JH *et al.*, 1997). Se han de considerar estudios de ingeniería genética para evitar estas barreras (Bucher P *et al.*, 2005).

Como resumen final de esta parte podríamos concluir que debido a las múltiples barreras que hay que superar actualmente los modelos preclínicos en xenotrasplante no son eficaces debido a que no consiguen supervivencias lo suficientemente prolongadas, aunque poco probable, existe un riesgo potencial de transmisión de infecciones entre especies, y a la posible existencia de incompatibilidades fisiológicas. Todo ello en conjunto ha hecho que el éxito de los modelos preclínicos en xenotrasplante ha sido menor de lo esperado y que su paso a clínica puede suponer la existencia de muchas más complicaciones que las existentes en el alotrasplante. Se ha propuesto por ello que el xenotrasplante se pueda utilizar sólo como tránsito al alotrasplante hasta que se encuentre el órgano necesario (Ahn C *et al.*, 2004), por lo que se sigue investigando en este tema para resolver todas las complicaciones surgidas pero al mismo tiempo se buscan nuevas alternativas al trasplante de órganos sólidos, entre las que destaca en los últimos años la aplicación de Terapia Celular.

2.2. Terapia celular

2.2.1. Tipos de células empleados

La propiedad regenerativa tisular es una de las grandes pérdidas que acontecen después del desarrollo embrionario. Sin embargo, para paliar esta importante pérdida, la naturaleza utiliza un elaborado y complejo mecanismo conocido como reparación, a través del cual intenta asegurar si no la restauración completa al menos el mantenimiento de la homeostasis en un alto porcentaje de casos. Cuando el proceso natural reparativo no es posible o suficiente para restaurar la estructura y la función, hoy en día el desarrollo científico nos permite ayudar a este proceso, suministrando, en la medida de lo posible, los elementos más similares a los dañados para lograr la reparación. En este momento cuando aparece la terapia celular que es el proceso que mediante la utilización de células intenta reparar el tejido y restaurar la estructura y la función del tejido u órgano lesionado sintetizándolo *in situ* (Strauer BE *et al.*, 2005). Con la aparición de la terapia se está intentando solucionar múltiples patologías médicas, de las que algunas ya se han llevado a la clínica con éxito y otras todavía en fase de investigación. En todas estas aproximaciones de terapia celular se plantean varios problemas comunes siendo uno de los principales la fuente de obtención de las células. La fuente ideal sería aquella que suministrase células con las siguientes condiciones: fácilmente accesibles, multipotentes para diferenciarse o transdiferenciarse en células órgano específicas, altamente proliferativas, no mutagénicas y que no fuesen reconocidas por el sistema inmune.

Por esto, aunque desde el principio se han estado utilizando poblaciones celulares totalmente diferenciadas obtenidas a partir de tejidos adultos, dada la poca versatilidad de estas células, en los últimos años se han buscado fuentes alternativas entre las que destacan la utilización de células madre embrionarias, células de cordón umbilical o células madre de tejidos adultos que tienen más capacidad de diferenciación (Tabla 2).

Tipo	Origen	Marcadores
Embrionarias	Blastocito (células masa interna) (alogénicas)	-
Cordón umbilical	Sangre cordón umbilical (alogénicas)	CD34+, CD133+
Tejidos adultos	Células madre hematopoyéticas de MO (autólogas)	CD45+
	Células mesenquimales de MO (estromales, autólogas)	CD45-
	Mioblastos esqueléticos (células satélite, autólogas)	CD56+
	Sangre (autólogas)	CD34+

Tabla 2: Tipos de células utilizados en terapia celular.

Las células madre son células primitivas capaces de autorenovarse y diferenciarse en linajes específicos (Fuchs E *et al.*, 2000). Poseen potencial para desarrollarse en muchos tipos celulares diferentes, tejidos o quizás órganos y pueden ser utilizadas como tratamiento en muchas enfermedades como problemas cardiovasculares, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y daños en la médula espinal, etc. (Daar AS *et al.*, 2003). La definición de células madre es controvertida y ha sido ampliamente examinada en el contexto de un órgano o tejido.

El cigoto y las células derivadas de las últimas dos divisiones constituyen la mayoría de las células primitivas (células totipotentes) que son capaces de formar el embrión así como partes de la placenta. Las células de la masa interna del blastocisto pueden formar todos los tipos celulares derivadas de las tres capas germinales que son designadas como células pluripotentes, éstas son las **células madre embrionarias** capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares adultos.

El descubrimiento de la sangre de cordón umbilical como fuente de células madre ha despertado un gran interés en este campo y hay varias iniciativas para emplearlas con fines terapéuticos. Las **células de cordón umbilical** contienen un gran número de células progenitoras de granulocitos-macrófagos, sus marcadores de diferenciación principales son CD34 y CD133 (Ballen KK, 2005). La sangre de cordón umbilical contiene 10 veces más células madre que la MO, además estas células cuando se trasplantan en pacientes producen en la mayoría de los casos la reconstitución de células hematopoyéticas y del sistema inmune. Las ventajas de estas células son que no suponen ningún riesgo para el donante, tienen bajo riesgo de infección viral del injerto,

y la identificación del donante y su disponibilidad son rápidas. La mayor desventaja es que en el receptor la velocidad de recuperación de las células hematopoyéticas es menor que cuando se utiliza MO (O'Brien TA *et al.*, 2006).

Generalmente se considera que las células madre se encuentran en el adulto están destinadas a uno o pocos linajes que están irreversiblemente restringidos en su capacidad de diferenciación (Dawn B *et al.*, 2005) (Figura 11). Las **células madre de MO** han sido estudiadas con gran detalle. Encerradas en huesos y extendidas en múltiples localizaciones, la médula es el órgano más protegido de los seres humanos (incluso más que el cerebro) y por este motivo, parece apropiado para albergar células que tengan potencial para regenerar varios tejidos (Dawn B *et al.*, 2005). Éste es un órgano principalmente hematopoyético, donde se generan multitud de células sanguíneas cuyo marcador de diferenciación es el CD45. Todas las células hematopoyéticas de diferentes linajes como eritrocitos, plaquetas, granulocitos, macrófagos, linfocitos y/o aquellos diferentes estadios de diferenciación, como progenitores y células maduras, derivan del mismo precursor, **células madre hematopoyéticas** pluripotentes. Estas células madre hematopoyéticas se utilizan para trasplante en varias enfermedades, entre ellas varios tipos de cáncer, como el linfoma non-Hodgkin (Steingass SK, 2006) y enfermedades autoinmunes (Griffith LM *et al.*, 2006). Las células endoteliales progenitoras circulantes (EPCs) también derivan de células madre hematopoyéticas de MO (Asahara T *et al.*, 1999), e, históricamente, son el objetivo de la angiogénesis terapéutica de todos los estudios utilizando MO o sus derivados circulantes para miocardio isquémico.

Además la MO contiene células estromales que se diferencian y proliferan, produciendo matrices extracelulares y citoquinas (Takagi M, 2005), a las que se denomina **células madre mesenquimales** (CMM) que no expresan el antígeno CD45 (Haverson K *et al.*, 2001) y constituyen una población totalmente diferente de las células madre hematopoyéticas y que son consideradas multipotentes, con la capacidad de replicarse en estado indiferenciado y diferenciarse en linajes del tejido mesenquimal (Pittenger MF *et al.*, 1999; Prockop DJ, 1997). Su papel es contribuir a la regeneración de los tejidos mesenquimáticos (hueso, cartílago, músculo, ligamento, tendón, tejido adiposo y estroma). Se han aislado y cultivado CMM humanas, y lo que es mejor, se ha logrado su diferenciación controlada hasta células con rasgos típicos de osteocitos, condrocitos o adipocitos (Campagnoli C *et al.*, 2001). Estas células muestran un fenotipo estable que permanece como una monocapa *in vitro*. De forma similar, CMM de varias especies

animales han sido purificadas, expandidas y diferenciadas hacia la estirpe osteogénica (Jaiswal N *et al.*, 1997), condrogénica (Johnstone B *et al.*, 1998), adipogénica o tendogénica (Young RG *et al.*, 1998). Los cultivos expandidos de CMM derivadas de MO son predominantemente homogéneos, tanto en base a su morfología, como en su producción de moléculas de citoquinas, inmunofenotipo y respuesta a estímulos (Majumdar MK *et al.*, 2003). Aunque aún no han encontrado un marcador molecular, se sabe que presentan rasgos intermedios entre las células madre embrionarias y otras células madre de adulto. Un reciente hallazgo muy interesante es la aparente inmunotolerancia de las CMM. Así, se ha descrito que CMM humanas no estimulan la proliferación de linfocitos totales o células T aisladas de individuos alogénicos *in vitro* (Tse WT *et al.*, 2003), y CMM alogénicas se pueden implantar sin rechazo a pacientes para prolongar la supervivencia de injertos de piel (Bartholomew A *et al.*, 2002) o para mejorar diversas enfermedades (Fouillard L *et al.*, 2003). Aunque existe aún cierta controversia al respecto, si se confirma esta observación puede tener profundas implicaciones clínicas, dado que la capacidad de poseer una especie de donador universal podría ser de un valor inapreciable para la estrategia de terapia celular, pues permitiría el éxito tanto del alotrasplante como del xenotrasplante sin inmunosupresión. Otra población de células madre adultas la constituyen las células satélite del músculo esquelético o **mioblastos**, que son células madre miogénicas cuyo marcador de diferenciación es el CD56, responsables del crecimiento muscular postnatal, reparan y mantienen el músculo esquelético. Los mioblastos residen bajo la lámina basal de las fibras esqueléticas musculares y se activan y proliferan cuando hay un daño muscular para generar suficientes mioblastos para la diferenciación muscular y la formación de miotúbulos (Chen JC *et al.*, 2003; Borg K *et al.*, 1993). Estas células también se utilizan para trasplante en diferentes enfermedades como fallo cardíaco (Wollert KC *et al.*, 2006) y distrofia muscular de Duchenne (Mouly V *et al.*, 2005). El músculo estriado es capaz de reparar lesiones mediante la proliferación de mioblastos, maduración y fusión hasta producir miotúbulos (Taylor MV, 2000; Kessler PD *et al.*, 1999).

Por último, las células de **sangre periférica**, derivada de células progenitoras, se utilizan tanto para reparación cardíaca clínica (Assmus B *et al.*, 2002) como para neovascularización en enfermedad oclusiva arterial periférica (Losordo DW *et al.*, 2004).

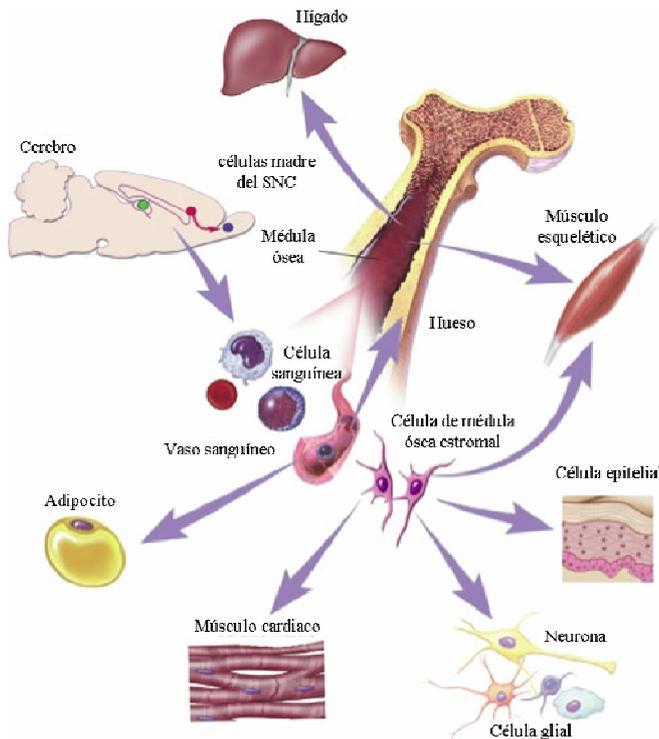


Figura 11: Tipos celulares que derivan de células madre adultas (<http://stemcells.nih.gov>, 2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk, Caitlin Duckwall).

2.2.2. Terapia celular aplicada a reparación cardiaca

2.2.2.1. Miocardiopatías

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en USA y Europa, y el infarto de miocardio es la principal causa de fallo cardiaco crónico. Estudios sobre la incidencia en España indican que el fallo isquémico cardiaco es una enfermedad frecuente, con rangos del orden de 200 y 50 nuevos infartos de miocardio por año, por 100000 hombres y 100000 mujeres respectivamente (Marrugat J *et al.*, 2004), la prevalencia en angina de pecho es de 7,3% en hombres y 7,5% en mujeres y las enfermedades cerebrovasculares tienen tasas por 100000 habitantes de rangos entre 364 para hombres y 169 para mujeres, con edades comprendidas entre 69 años o más (Medrano A *et al.*, 2006; Tomás L *et al.*, 2001; Gutiérrez Fuentes JA *et al.*, 2000). Todos estos datos han determinado que este tipo de enfermedades sean una prioridad en la política sanitaria (Plan Integral de Cardiopatía Isquémica, 2003).

Cuando las terapias convencionales (farmacológicas sobre todo) fracasan, ésta es la patología que lleva con más frecuencia al trasplante cardiaco que es el principal método de terapia para fallo orgánico terminal, sin embargo la marcada discrepancia en la demanda y la disponibilidad de órganos hace que el trasplante no cubra las necesidades

clínicas (Bardy GH *et al.*, 2005), por lo que se necesitan de forma urgente nuevas estrategias para mejorar la prognosis y la calidad de vida de los pacientes. Se han propuesto diferentes técnicas de trasplante celular como alternativa al trasplante de órganos, entre las que destaca por sus prometedoras aplicaciones la terapia celular basada en células madre o progenitoras. Esto ha llevado a que en los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias para inducir regeneración cardíaca y por tanto, mejorar el funcionamiento miocárdico usando las propias células del paciente en diversos ensayos clínicos (Strauer BE *et al.*, 2005; Wollert KC *et al.*, 2004; Schachinger V *et al.*, 2004). Sin embargo, aún existen numerosas dudas sobre cuales serían las células utilizadas más adecuadas, cual sería la mejor vía de administración de estas células, si es conveniente o necesaria la aplicación de citoquinas (Lee MS *et al.*, 2004) y por último, si el corazón es capaz de repararse con células residentes sin necesidad de células exógenas (Müller P *et al.*, 2005).

2.2.2.2. Regeneración con células exógenas

Los mecanismos de reactivación o preservación de la proliferación de cardiomiocitos y regeneración en humanos (Pasumarthi KBS *et al.*, 2002) no son obviamente suficientes para evitar la formación de una cicatriz y que progrese el fallo cardíaco después de un infarto de miocardio o se pierda la función contráctil con sobrecarga de la presión o volumen (Packer M *et al.*, 1992; Mann DL *et al.*, 1999). El trasplante de células exógenas como los cardiomiocitos fetales o neonatales, los mioblastos esqueléticos o las células madre embrionarias o adultas podrían reconstruir el tejido miocárdico lesionado. Las ventajas de utilizar unas u otras no están todavía claras y es motivo de controversia pues, con la posible excepción de las células madre embrionarias, no hay ningún tipo celular que se haya probado que funciona a nivel experimental de forma definitiva como un cardiomiocito electromecánicamente integrado (Hodgson DM *et al.*, 2004).

Se ha comprobado que las líneas celulares derivadas de **células madre embrionarias** humanas pueden cultivarse *in vitro* y dan lugar a agregados llamados cuerpos embrioides que se diferencian y dan lugar a tejidos de las tres capas germinales. Utilizando este sistema de diferenciación de las células madre humanas se ha conseguido generar de forma reproducible cardiomiocitos a partir de ellas. En cocultivos, estos cardiomiocitos formaron un sincitio funcional con tejido cardíaco preexistente con un potencial de acción sincronizado y fuerza mecánica de propagación

(Kehat I *et al.*, 2004). La formación de cardiomiocitos dentro de cuerpos embrioides es un poderoso instrumento para la investigación sobre el inicio de la cardiomiogénesis, sobre la diferenciación de los precursores celulares del corazón humano, el desarrollo de la excitabilidad, el acoplamiento de la excitación-contracción y el conocimiento de las señales moleculares involucradas en estos procesos. Además de forma potencial los cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas podrían funcionar como marcapasos biológicos y como reparadores de la función mecánica (Shim W *et al.*, 2004).

Los **miocitos fetales o neonatales** humanos se diferencian hacia un fenotipo de cardiomiocito adulto cuando se mantienen en un ambiente adecuado y mantienen una cierta capacidad de proliferación (Patterson MJ *et al.*, 2000). En estudios realizados en rata, cuando se reparten en el tejido de cicatrización del miocardio, se diferencian hacia un fenotipo celular que puede servir como sustituto del tejido miocárdico dañado (Li F *et al.*, 1996).

La plasticidad de las células de **músculo esquelético o mioblastos**, junto con su capacidad de responder a estímulos eléctricos, ha sugerido la posibilidad de que los mioblastos puedan ser convertidos en fibras musculares capaces de producir trabajo cardíaco (Chiu RC *et al.*, 1995). La idea de utilizar el músculo esquelético como forma de reconstruir el músculo cardíaco lesionado data de principios de los años 30, sin embargo recientemente se ha podido demostrar que la cardiomioplastia dinámica es capaz de mejorar la función cardíaca. Se han establecido protocolos de mantenimiento y crecimiento de mioblastos autólogos originados en músculo esquelético (Taylor MV, 2000). Los mioblastos expandidos, *in vivo* pueden ser implantados de forma intramural o por vía intraarterial (Herrerros J *et al.*, 2003). Los primeros experimentos con mioblastos obtenidos de músculo esquelético permitieron determinar que dichas células son capaces de injertarse en el corazón de animales de experimentación. Una vez implantados, se ha podido demostrar que dichos mioblastos son capaces de continuar con su proceso de diferenciación normal y que el medioambiente existente en el corazón permite dicha diferenciación en células musculares funcionales. Así, utilizando modelos de rata (Jain M *et al.*, 2001), oveja (Rajnoch C *et al.*, 2001), perros (Marelli D *et al.*, 1992) y conejo (Atkins BZ *et al.*, 1999) en los que se induce un infarto de miocardio, se ha podido demostrar que el trasplante de mioblastos autólogo es capaz de producir una mejoría de la función cardíaca.

Otra posible fuente es la utilización de células de MO, aunque los resultados son controvertidos. Un estudio sugiere que la inyección directa de **células madre hematopoyéticas** produce una amplia regeneración miocárdica en ratones (Orlic D *et al.*, 2001a), sin embargo en otro estudio también en ratones no se encuentra diferenciación en cardiomiocitos tras la inyección directa de células madre hematopoyéticas (Murry CE *et al.*, 2001). Otros autores han demostrado que tras su inyección las células madre hematopoyéticas se fusionan con los cardiomiocitos de ratones receptores dando lugar a células híbridas, pero éstas son muy pocas para influenciar en la función contráctil (Murry CE *et al.*, 2006).

La otra población mayoritaria de MO, las **CMM**, parecen ser óptimas para su uso en cardiomioplastia celular por su gran capacidad de expandirse *in vitro* (Wang JS *et al.*, 2000). Las CMM humanas han sido aisladas, cultivadas y diferenciadas en células con características similares a los miocitos de corazón tras su tratamiento con 5-azacitidina (Strauer BE *et al.*, 2002; Makino S *et al.*, 1999). Del mismo modo, las CMM de otras especies han mostrado que experimentan diferenciación miogénica (Tomita S *et al.*, 1999; Wakitani S *et al.*, 1995). Otros estudios recientes *in vitro* han definido el concepto de transdiferenciación de CMM en cardiomiocitos al demostrar la fusión espontánea entre células de MO cultivadas conjuntamente con células madre embrionarias sin necesidad de ser tratadas con 5-azacitidina y la adquisición de fenotipo de cardiomiocito (Terada N *et al.*, 2002). En este sentido, se ha logrado una reprogramación de CMM a cardiomiocitos en células de ratón *in vitro* (Fukuda K, 2001). En un estudio reciente se ha demostrado que el implante de células de MO se diferencian a miocitos y vasos coronarios, mejorando la función del corazón dañado *in vivo* (Orlic D *et al.*, 2001c). Un reciente estudio demostró que el trasplante de CMM por si solas mejora la función cardíaca en el modelo porcino infartado (Shake JG, 2002), así como la angiogénesis y la miogénesis (Tomita S *et al.*, 2002). Otros autores han demostrado una mejora de estos resultados cuando se cotrasplantan en el cerdo CMM humanas junto con cardiomiocitos fetales humanos (Min JY *et al.*, 2002).

2.2.2.3. Regeneración con células endógenas

Los corazones de mamíferos han perdido la capacidad de proliferar cuantitativamente de forma suficiente respondiendo a varias lesiones justo después del nacimiento. Sin embargo, el dogma que postulaba que el corazón es un órgano postmitótico e incapaz de

regenerarse tras una lesión, a lo largo de la vida, ha sido puesto en duda en diversos trabajos (Li F *et al.*, 1996; McGill CJ *et al.*, 1995; Soonpaa MH *et al.*, 1998). Ahora se sabe que la mayoría de miocitos adultos presentes en el corazón están diferenciados terminalmente, pero que sin embargo existe una pequeña población de miocitos con capacidad de división que continuamente se están renovando y que se generan a partir de la diferenciación de células madre cardiacas (Kajstura J *et al.*, 2004). Es interesante que estudios recientes muestren cierta capacidad de regeneración de cardiomiocitos en varias condiciones patológicas, como fallo cardiaco (Kajstura J *et al.*, 1998), trasplante cardiaco ortotópico (Müller P *et al.*, 2002; Quaini F *et al.*, 2002) o infarto de miocardio (Orlic D *et al.*, 2001b; Beltrami AP *et al.*, 2001). Estos datos sugieren la existencia de células madre cardiacas endógenas (Anversa P *et al.*, 2002a) o células progenitoras de cardiomiocitos extracardiacos (Laflamme MA *et al.*, 2002) en el corazón de los mamíferos. La identificación y aislamiento que se ha hecho de estas células en el corazón adulto, capaces de entrar en división al ser estimuladas con factores de crecimiento, son una muestra evidente de que el corazón se encuentra en un proceso continuo de crecimiento, muerte y renovación celular (Torella D *et al.*, 2005); sin embargo, todos resultados son aún controvertidos (Glaser R *et al.*, 2002).

2.2.2.4. Experiencia clínica de la aplicación de la Terapia Celular a la regeneración cardiaca

Los resultados positivos obtenidos tras los experimentos con animales animaron a muchos investigadores a utilizar la técnica de terapia celular para cardiomioplastia en humanos. Las primeras experiencias en ese sentido demostraron que la inyección percutánea de mioblastos autólogos de origen esquelético en el ventrículo izquierdo en la insuficiencia cardiaca crónica tras un infarto de miocardio es factible y mejora la motilidad regional (Siminiak T *et al.*, 2005). Actualmente se está desarrollando a nivel europeo el ensayo MAGIC que analiza la posibilidad de atajar la disfunción ventricular crónica post-infarto con el trasplante de mioblastos de forma rutinaria a la vez que se realiza la revascularización quirúrgica (Hagege AA *et al.*, 2006).

En cuanto a la experiencia clínica de la aplicación de células de MO en regeneración miocárdica, ésta ha experimentado un crecimiento exponencial durante los últimos años y existen numerosos estudios que han demostrado que el procedimiento puede mejorar parámetros asociados con la supervivencia, y es seguro y factible en la mayoría de los

casos (Lee MS *et al.*, 2004). En el estudio TOPCARE-AMI, tanto con células progenitoras circulantes como con células derivadas de MO, demostraron la seguridad del método y efectos favorables en la remodelación del ventrículo izquierdo (Schachinger V *et al.*, 2004). En el primer ensayo clínico aleatorio (Wollert KC *et al.*, 2005) demostraron una mejoría en la fracción de eyección ventricular 12 meses después de la inyección coronaria de MO en pacientes infartados, determinado por técnicas de resonancia magnética. En resumen, se puede decir que sin tener en consideración si las células utilizadas eran autólogas o alogénicas, o el tipo de células, los estudios demuestran que existen mejoras de la disfunción sistólica o diastólica, perfusión miocárdica, tamaño del infarto, anomalías en la movilidad regional de la pared, y menos sistemáticamente, remodelación y volumen ventricular. Además, estos resultados parecen ser independientes del lugar y modo de suministro, tanto de pacientes con enfermedad coronaria arterial (aguda o crónica) o cardiomiopatía no isquémica, y tanto si el suministro es intracardiaco o intracoronario (Caplice NM *et al.*, 2003; Caplice NM *et al.*, 2005; Gnecci M *et al.*, 2005).

De forma paralela se han iniciado estudios clínicos de fase I para investigar la seguridad de la infusión intravenosa de CMM alogénicas en pacientes con infarto agudo de miocardio. La evidencia actual soporta de una manera robusta la necesidad de seguir investigando en terapia celular como una nueva estrategia de reparación cardiaca tras el infarto y asegura que las CMM serán una de las líneas celulares preferidas candidatas para esta aplicación (Zimmet JM *et al.*, 2005).

2.2.2.5. Cuestiones por resolver

Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios experimentales y ensayos clínicos realizados permanecen aun muchas cuestiones por aclarar y existen numerosas controversias. Por ejemplo, si las células madre se diferencian o no en cardiomiocitos adultos (Chien KR, 2004) y, si lo hacen, si la diferenciación celular tiene lugar en un número suficiente para ser fisiológicamente efectiva. La plasticidad de las células madre adultas ha sido debatida y cuestionada, y los cambios observados podrían ser potencialmente resultado de artefactos microscópicos y fusión celular. Las discrepancias enfatizan otras explicaciones potenciales, como el papel de la inflamación y angiogénesis, cambios en la estructura y geometría del tejido, y si los efectos paracrinos

producen una reparación celular o no (Caplice NM *et al.*, 2004). En algunos modelos animales con fallo cardiaco, los beneficios parecen ser transitorios (Dai W *et al.*, 2005). Además, en algunos casos se ha documentado la existencia de arritmias ventriculares malignas después del trasplante de mioblastos (Siminiak T *et al.*, 2005), pero no está claro si la arritmias son consecuencia del método de revascularización o inyección de las células. También pueden existir problemas de transformación oncogénica, aunque afortunadamente no se ha detectado un aumento de la frecuencia de tumores en los estudio clínicos hasta la fecha (Singh SK *et al.*, 2003) pero la posibilidad existe sobre todo cuando se utilizan células madre embrionarias o pluripotentes. Otra posibilidad es que las células se sitúen en órganos como hígado, bazo y pulmones después de ser inyectadas (Aicher A *et al.*, 2003). También puede suceder que exista una diferenciación celular no intencionada, en modelos animales se ha demostrado que monocitos derivados de células sanguíneas periféricas pueden actuar como células multipotentes y en otros estudios de trasplante directo de células de MO no seleccionadas en un infarto agudo de miocardio se demostró la inducción de calcificaciones intramiocárdicas significativas (Yoon YS *et al.*, 2004).

En un modelo canino se ha demostrado que se pueden producir también aterogénesis y obstrucción coronaria acelerada aunque los mecanismos se desconocen (Vulliet PR *et al.*, 2004; Gersh JB *et al.*, 2006).

Por tanto debemos resaltar el hecho de que la seguridad de la terapia con células madre no está totalmente demostrada y que para establecer un perfil de seguridad definitivo deben reclutarse miles de pacientes en ensayos clínicos y realizar un seguimiento lo suficientemente largo.

2.2.3. Terapia celular aplicada a otras enfermedades

Durante los últimos años, además de para reparación cardiaca, se ha estudiado la posibilidad de aplicación de la terapia celular como tratamiento para otras enfermedades y reparación de diferentes tejidos.

Una de las enfermedades en las que más se ha intentado aplicar la terapia celular es la **diabetes**. Los primeros artículos de terapia celular aparecen en los años 70 en los que se realizaban trasplantes de islotes pancreáticos en ratas (Leonard RJ *et al.*, 1973). Posteriores estudios, en los años 90, se basaban en el desarrollo de líneas celulares de células beta derivadas de ratones transgénicos que eran capaces de mantener el nivel de

glucosa durante meses (Fleischer N *et al.*, 1998). A partir del año 2000, se desarrollaron distintos experimentos en roedores, como el desarrollo de células de pituitaria de rata GH3 transfectadas con ADNc de proinsulina humana, obteniéndose producción de insulina (Meoni C *et al.*, 2000) o el trasplante de tejido exocrino de pez en ratones diabéticos alcanzando normoglucemia (Wright JR *et al.*, 2001). En otros estudios se utilizaron células madre derivadas a células beta que reestablecen concentraciones de glucosa normales (Soria B *et al.*, 2001). También se utilizaron células embrionarias humanas para diferenciarlas en células pancreáticas (Passier R *et al.*, 2003).

En los últimos años se ha visto que factores angiogénicos y SHB (factor de traducción proteica) ayudan a la diferenciación de células madre embrionarias a células productoras de insulina que expresan PDK-1 (marcador pancreático endodérmico) (Saldeen J *et al.*, 2006). También se producen estructuras similares a islotes en biorreactores a partir de tejido pancreático de cerdos neonatos, lo que sugiere que posteriormente esta técnica podría utilizarse con tejido humano (Chawla M *et al.*, 2006). En humanos el trasplante de islotes aislados de donantes de páncreas también ha demostrado ser una interesante terapia celular para el tratamiento de la diabetes (Soria B *et al.*, 2005).

Otra importante enfermedad en la que se está intentando la aplicación de la terapia celular es el **Parkinson**. Los primeros estudios datan de los años 90, utilizando un polímero para encapsular las células dopaminérgicas (derivadas de tejido adrenal y embrionario) que se trasplantaban para proporcionar una barrera semipermeable e inmunológica. Mediante esta técnica se logró una recuperación en el comportamiento en modelos animales de roedores y primates (Emerich DF *et al.*, 1992). Posteriormente, se demostró que una población enriquecida de células madre neurales del cerebro medio de ratón tenían electrofisiología y comportamiento de neuronas, pudiendo servir como terapia de sustitución de células (Kim JH *et al.*, 2002). Otros autores (Dezawa M *et al.*, 2005) lograron un método de inducción para desarrollar neuronas funcionales, células de músculo esquelético y células de Schwann a partir de CMM humanas y murinas en ratones *mdx-nude* con degeneración muscular que mejoraban su enfermedad. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los modelos animales son escasos y no está claro si la función de las células empleadas es como la de las células dopaminérgicas mesencefálicas normales. En un estudio clínico con tejido mesencefálico embrionario humano trasplantado en pacientes de Parkinson, el injerto de células dopaminérgicas

pudo reinervar el *estriatum* denervado y dar lugar a una reducción significativa de los síntomas (Lindvall O *et al.*, 2003).

En el caso del **hígado**, el uso de EPC permitió mantener los niveles normales de transaminasas, bilirrubina, proteínas totales y albúmina, y además fueron efectivas no sólo en la prevención de la fibrosis sino también en regeneración del hígado con daño crónico en ratas (Ueno T *et al.*, 2006). La terapia celular con células madre abre también una puerta a la **nefrología regenerativa**. Tanto las células embrionarias como las células madre adultas de MO pueden proporcionar una fuente de progenitores renales con potencial terapéutico (Vigneau C *et al.*, 2006). En **hipertensión pulmonar** se han utilizado células regenerativas como EPCs que potencialmente pueden contribuir a la reparación vascular, solas o combinadas con terapia génica o células del músculo liso pulmonar con lo que se mejora la hemodinámica pulmonar (Stewart DJ *et al.*, 2004). Estudios recientes en **regeneración de médula espinal** demostraron que la administración de células estromales sistémicas y locales en ratas parapléjicas, como consecuencia de un daño severo en la médula espinal, proporcionan una clara y progresiva recuperación funcional, que sugiere una diferenciación neuronal y reconstrucción de médula espinal (Vaquero J *et al.*, 2006). En la **enfermedad de Huntington** hasta ahora la terapia celular de reparación para proteger la neurodegeneración no ha demostrado ser efectiva (Dunnett SB *et al.*, 2004).

Se han obtenido también buenos resultados aplicando la terapia celular en la **distrofia muscular de Duchenne** cuando se utilizan precursores de células satélite con potencial miogénico en modelos animales, sin embargo los resultados de los ensayos clínicos con pacientes muestran evidencias desalentadoras (Negróni E *et al.*, 2006).

Por último, datos experimentales sugieren que para la **reparación de cartílago** en pacientes con osteoartritis se podrían utilizar CMM humanas que provienen de membrana sinovial y que podrían ser diferenciadas en condrocitos (Gimeno MJ *et al.*, 2005). Actualmente se están realizando ensayos clínicos en humanos como autoimplantes de condrocitos en lesiones de rodilla, entre otros, obteniendo buenos resultados en la función de la rodilla, disminución del dolor y la hinchazón a los tres años (Fu FH *et al.*, 2005).

2.3. Órganos artificiales

El uso de órganos artificiales es una de las posibles alternativas al trasplante alogénico, pero actualmente la tecnología sólo permite utilizarlos como alternativa temporal previa al trasplante para prolongar la vida de un paciente en lista de espera. Algunos de los órganos artificiales utilizados actualmente son: el corazón artificial, hígado artificial, riñón artificial e incluso pulmón artificial, y cada uno con varios modelos según la empresa que los ha desarrollado y los diferentes estadios en su desarrollo.

2.3.1. Corazón artificial

Actualmente a nivel mundial se están utilizando varios sistemas de asistencia circulatoria mecánica, bombas centrífugas o dispositivos de asistencia neumática, cuyos objetivos son mantener circulación sistémica y evitar el fallo multiorgánico. Entre ellos:

- *Sistema ECMO*: es un sistema que contiene una bomba centrífuga Bio-Medicus (Bio-Medicus Co, Eden Prairie, MN, USA) y un sistema de oxigenación. La cánula del flujo de salida es la aorta ascendente y la cánula venosa es la aurícula derecha.
- *Thoratec*: La bomba se sitúa en posición paracorpórea y el sistema consiste en ventrículos protésicos con un volumen de 65ml y cánulas apropiadas para el flujo hacia la aurícula o ventrículo y conexiones arteriales hacia el exterior. Los dispositivos ventriculares son controlados tanto con una unidad neumática hospitalaria como con una unidad portátil (Figura 12).
- *Novacor LVAS*: Este sistema se implanta parcialmente. El dispositivo es dirigido por energía eléctrica solenoide y tiene válvulas porcinas en el flujo hacia el interior y hacia el exterior (Figura 13). El dispositivo ventricular es controlado tanto hospitalariamente como con una unidad portátil de la misma manera que el *Thoratec*.

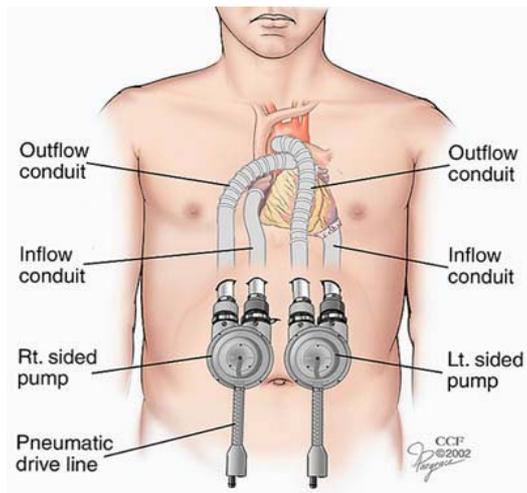


Figura 12: Esquema de *Thoratec* (www.clevelandclinic.org).

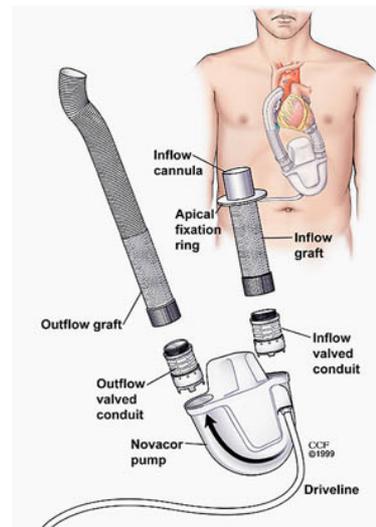


Figura 13: Esquema de *Novacor LVAS* (www.clevelandclinic.org).

- *Medos-HIA VAD system*: El sistema es dirigido de forma neumática, disponible en tres tamaños ventriculares 10, 25, y 60ml. El sistema no está unido a heparina y tiene válvulas de tres capas de poliuretano (Minami K *et al.*, 2005).

2.3.2. Hígado artificial

Los objetivos de la terapia con dispositivos de asistencia del hígado son: 1) en el fallo hepático agudo, recuperar al paciente hasta unos niveles normales y recuperar al estado de antes de la descompensación; mientras que 2) en el fallo hepático crónico son prevenir la progresión al fallo hepático y mejorar el final de la función del órgano en aquellos casos de fallo multiorgánico. Para ello se utilizan dos tipos de dispositivos:

- **Bioartificiales:** Es un dispositivo bioartificial en el que se incorporan dentro los bioreactores de cultivos aislados de hepatocitos. Aunque no se conoce la cantidad mínima de hepatocitos requerida para proporcionar suficiente función hepática, parece que se necesitan aproximadamente 150-450 g de células (o 10^{10} hepatocitos), que proporcionan la función del 10-30% de la masa normal del hígado. Los hepatocitos porcinos, evaluados en ensayos clínicos tales como *Demetriou's HepatAssist BAL device, Academic Medical Center - BAL (AMC-BAL)*, son los más utilizados en los sistemas de soporte hepático. En cuanto al bioreactor, el diseño más básico consiste en una columna que contiene capilares de fibra entre la cual el plasma/sangre del paciente circula mientras que los hepatocitos se localizan en el espacio entre fibras. El plasma se puede separar, calentar y oxigenar en un circuito

secundario antes de ser perfundido a través de los capilares del bioreactor. Una membrana con un aislamiento de 50-150 kDa separa los dos compartimentos, a través de la cual se intercambian sustancias entre el plasma/sangre y los hepatocitos. Mientras que la mayoría de las toxinas y el transporte de proteínas (como albúmina) pueden atravesarla y sustancias más grandes como Igs, complementos, virus y células no pueden atravesarla.

- **Artificiales:** son sistemas novedosos, basados en el uso de albúmina a la que se unen las sustancias que forman la mayoría de las toxinas que se acumulan en el fallo hepático, mientras que las grandes moléculas (Igs, factores de crecimiento) que podrían ser fisiológicamente importantes y no se pierden debido al uso de una membrana de pequeño tamaño de poro. Este sistema ha sido desarrollado en la última década y está actualmente bajo una amplia investigación clínica denominada máquina MARS (Teraklin AG, Rostock, Alemania) (Jalan R *et al.* 2004).

2.3.3. Riñón artificial

La mortalidad de los individuos que sufren fallo renal agudo es sorprendentemente alta y no ha descendido significativamente desde el comienzo de la diálisis hace 30 años. Las nuevas terapias de sustitución renal tienen como objetivo evitar el daño renal, mejorando el cuidado de apoyo y la tecnología de diálisis. Sin embargo, el impacto potencial de estas terapias en los resultados clínicos en el fallo renal agudo es aún un tema de investigación intensiva y de gran controversia. En cada caso hay que tener en cuenta la modalidad de diálisis, características de la membrana dializadora y estrategias de dosis.

Los dializadores consisten en membranas semipermeables típicamente configuradas en una construcción de fibra hueca (Figura 14). El material de la membrana tiene un impacto importante en las características del dializador, principalmente su compatibilidad con los componentes sanguíneos y su permeabilidad a toxinas de varios pesos moleculares. Las membranas de diálisis se clasifican según si derivan o no de celulosa. Las que no derivan de celulosa son polímeros sintéticos y son generalmente más biocompatibles pero más caras (Teehan GS *et al.*, 2003).

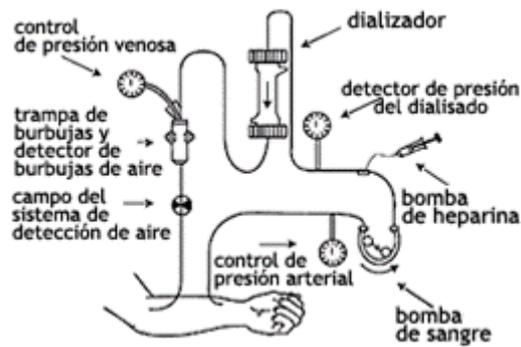


Figura 14: Esquema de un dializador (<http://www.dialyse-45.net>).

2.3.4. Pulmón artificial

Un dispositivo de asistencia pulmonar, u órgano artificial, tiene un papel de mantener a los pacientes como tránsito o alternativa a un trasplante. Aunque la oxigenación extracorpórea a través de una membrana ha sido utilizada con éxito como apoyo a corto plazo cuando hay un fallo pulmonar, la complejidad inherente y su coste hacen que no se use a largo plazo (Haft JW *et al.*, 2001), esto hace necesario buscar otros modelos de pulmón artificial alternativos que eviten estas complicaciones.

II. OBJETIVOS

1. El xenotrasplante de órganos sólidos porcinos no se ha implantado en los trasplantes clínicos por dos razones. Por un lado, no se ha alcanzado una supervivencia de injerto durante un largo periodo de tiempo en modelos preclínicos con primates no humanos y, además, existe un riesgo desconocido para el receptor, y para la sociedad en general, de transmisión de agentes infecciosos tales como los PERV. Por ello, en un modelo *in vivo* de xenotrasplante de órganos de cerdos transgénicos en babuinos, los objetivos concretos de esta tesis han sido:

- Estudiar el papel de los xenoAcs anti- α Gal IgM e IgG y los Acs hemolíticos (APA) en el RVA.
- Analizar la eficacia de GAS914, una polilisina que contiene residuos de α Gal, para la neutralización de xenoAcs antes y después del xenotrasplante.
- Investigar el papel de la inmunosupresión y del GAS914 en la posible transferencia de PERV después de un xenotrasplante, desde los órganos del cerdo donante al babuino receptor.

2. La terapia celular basada en células autólogas crecidas *ex vivo* se ha propuesto como alternativa al trasplante de órganos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Con el fin de obtener una mejor aproximación a los posibles ensayos clínicos de terapia celular es esencial realizar experimentos en animales grandes fisiológicamente similares a los humanos como es el caso del cerdo. En base a esto, los objetivos concretos de esta tesis han sido.

- Aislar y caracterizar antigénicamente los mioblastos y las CMM porcinas.
- Obtener líneas celulares inmortalizadas de CMM porcinas.
- Estudiar la posible diferenciación a cardiomiocitos de las CMM primarias e inmortalizadas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de estudio

Todos los animales utilizados estaban incluidos en distintos protocolos de trabajo de la Unidad de Cirugía Experimental de la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo en A Coruña. Los procedimientos llevados a cabo sobre ellos siguieron el “Acuerdo europeo de protección de animales vertebrados para uso experimental” (BOE 25/10/1990).

Babuinos: eran *Papio anubis* de entre 4-25 kg de peso (suministrados por Consort Bioservices, Steymin, UK).

Cerdos transgénicos: eran de la raza *Large White* entre 2-5 meses de edad y 5-25 kg de peso, y transgénicos para la expresión homocigótica del gen DAF humano (hDAF) ó dobles transgénicos para DAF y MCP humanos (hDAF/hMCP) (Novartis Pharma, Basilea, Suiza).

Cerdos normales: eran de la raza *Large White* de entre 2-5 meses y 8-35 kg (suministrados por Coren SL, España).

2. Protocolos de tratamientos de inmunosupresión de los babuinos receptores del xenotrasplante

En cada caso que se aplicaron los siguientes inmunosupresores, las pautas correspondientes fueron:

- GAS914: 5mg/kg/día, en los días -17, -14, -11 y 1mg/kg/día desde el día -5 hasta el día del trasplante. Después 1mg/kg/12 horas desde el trasplante hasta el momento del rechazo.
- Ciclosporina (Csp): dosis variable para mantener 1000-1500 ng/ml en sangre diaria.
- Ciclofosfamida (Csf): 40-20-20 mg (días -2, 0, +2) ajustable según cuenta leucocitaria.
- Micofenolato mofetil (MMF): 35-100 mg/kg/día.
- FTY720 (fingolimod): 0,2-0,3 mg/kg/día.
- Basiliximab (AcMo anti-CD25): 20 mg (días 0, +4)
- Metilprednisona (Mdp, corticosteroide): 1-0,3 mg/ml/día en esquema decreciente.

3. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), plasmas y sueros

Para la elaboración de distintos experimentos se obtuvieron muestras de sangre periférica proveniente de cerdos (normales o transgénicos) o de babuinos, como fuentes de células, plasma o sueros.

Para la obtención de CMSP se utilizó sangre heparinizada que se diluyó 1:1 en suero fisiológico estéril (solución isotónica de cloruro de sodio al 0.9%). La sangre diluida se sometió a un gradiente de densidad con Histopaque 1077 (densidad 1,077 g/ml) (Sigma, USA). Se centrifugaron los tubos a 800x g durante 25 minutos a temperatura ambiente, se recogió el anillo de células de la interfase, y las células se lavaron con medio *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) (GIBCO, UK) por centrifugación a 400x g durante 10 minutos, 3 veces. Las células se contaron en una cámara Neubauer y su viabilidad fue cuantificada por coloración de azul Tripán (Sigma, USA). En algunos casos, se procedió a su congelación con medio de congelación consistente en 90% suero bovino fetal (SBF) (GIBCO, UK) y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (MERK, Alemania). De la parte superior del gradiente se recuperó el plasma (en este caso diluido 1:1 por el suero fisiológico añadido al principio).

Para la obtención de los sueros porcinos ó de babuinos se utilizó sangre sin anticoagulante que se dejó coagular a temperatura ambiente 40 minutos, se centrifugó 1800x g 10 minutos para separar el suero, éste se recogió y se mantuvo en frío hasta su uso, o se repartió en alícuotas y congeló a -80°C para su conservación. Para su uso como control, se obtuvieron muestras de sangre periférica humana procedentes de más de 30 individuos adultos sanos (*pool* de sueros estándar, SHN), siguiendo los pasos ya señalados con las muestras porcinas y de babuino.

La inactivación del complemento en el SBF empleado en los medios de cultivo se realizó por calor a 56°C durante 30 minutos.

4. Determinación de xenoAcs en los sueros de los babuinos

4.1. Ensayo de cuantificación de Acs anti- α Gal por ELISA

Para cuantificar la presencia de Acs específicos dirigidos a epitopes α Gal se utilizó un ensayo ELISA previamente establecido en el laboratorio (Máñez R *et al.*, 2001a). El

nivel de Acs anti- α Gal fue determinado detectando por separado α Gal, en forma de DI, T2 ó T6, utilizando para cada ensayo los diferentes antígenos α Gal en particular unidos a albúmina sérica humana (HSA) (14 residuos α Gal promedios por molécula de albúmina) en la placa. Para ello se recubrieron placas de 96 pocillos de 50 μ l del sacárido α Gal correspondiente a cada uno de ellos DI, T2 ó T6 *Gala1-3Gal β 1-4GlcNAc-HSA (3-Atom Spacer)* (Dextra Labs, UK) a 5 μ g/ml, en tampón bicarbonato pH 9,6 y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron con el tampón PBS y Tween-20 0,1%, y posteriormente se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con el mismo tipo de tampón al 0,5%. En cada pocillo se añadieron 50 μ l de las muestras de sueros diluidas de forma seriada y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se prepararon independientemente dos tipos de placas, una para la medición de IgG y otra para IgM. Tras la incubación, ambas placas se lavaron seis veces y se añadieron 50 μ l de Ac secundario anti-IgG humana (γ específicos) o anti-IgM humana (μ específicos) marcados con peroxidasa (Sigma, USA) se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Las placas se lavaron de igual forma a la vez anterior, la reacción se visualizó con la adición de ortofenilendiamina (Sigma, USA) (0,4mg/ml) 100 μ l y peróxido de hidrogeno 30% (40 μ l/100ml) y se paralizó a los 5 minutos con 50 μ l ácido sulfúrico 1M. Las densidades ópticas (DO) se midieron en el lector espectrofotométrico Labsystems Multiskan[®]Plus (Thermo electron corporation, USA) a 492nm de longitud de onda. Paralelamente se incluyeron pocillos con tampón sin muestras como controles y cuyos valores de DO se restaron a los experimentales. Los resultados se expresaron con respecto al SHN, al que se le asignó el valor 1,000.

4.2. Ensayo de cuantificación de Acs anti-hemolíticos porcinos (APA)

Para la realización de este ensayo se siguió también un protocolo establecido previamente en el laboratorio (Máñez R *et al.*, 2001a). Sobre placas de fondo V (NUNC, Dinamarca), se colocaron 50 μ l de una dilución seriada de las muestras de sueros con solución para la fijación de complemento (CFD) (ICN Biomedicals Inc, USA). A cada pocillo se le añadieron 50 μ l de eritrocitos porcinos al 1% en CFD lavados previamente tres veces y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces a 400x g durante 10 minutos en el mismo tampón y se añadió a cada pocillo 150 μ l de complemento de conejo a la dilución óptima previamente determinada para cada lote (usualmente 1/20), incubándose nuevamente a 37°C por 1 hora.

Posteriormente se sedimentaron las células mediante una centrifugación y 100µl de los sobrenadantes con distintos grados de hemólisis se transfirieron a una placa de lectura de fondo plano (BD Falcon, USA). Por último se realizó la lectura de la densidad óptica (DO) de la placa a la longitud de 420nm en un lector Labsystems Multiskan® Plus. Paralelamente se procesaron un grupo de pocillos controles consistentes en: eritrocitos incubados con complemento sin la presencia de sueros para medir la lisis espontánea y un control de lisis máxima constituido por eritrocitos lisados por agua destilada 100µl. Los porcentajes de lisis (PC) específicos para cada dilución fueron calculados de la siguiente forma:

$$PC = (DO \text{ en cada dilución muestra} - DO \text{ lisis espontánea}) / (DO \text{ lisis máxima} - DO \text{ lisis espontánea}) * 100$$

4.3. Determinación de Acs anti-células porcinas por citometría de flujo

Se recogieron las células a emplear en cada caso (CMSP, L35 o AOC-40) y se lavaron 2 veces en tampón FACS de lavado (pág. 78) (BD Biosciences, USA), centrifugando a 350x g durante 5 min. Se pusieron 2.5×10^5 - 3.5×10^5 células por pocillo en una placa de 96 de fondo en V. Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 50µl de una dilución 1/5 de los sueros problema en tampón FACS de lavado. Se incubaron a 4°C durante 40 minutos. Después las células se lavaron 2 veces con 200µl/pocillo de tampón FACS de lavado. Posteriormente se añadieron a las células 50µl de una dilución 1/20 del Ac secundario, anti-IgM humana (µ específicos) (DAKO, Dinamarca) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y se incubaron a 4°C durante 30 minutos protegidos de la luz. Se lavaron 3 veces con tampón FACS de lavado, centrifugando y homogeneizando cada vez. Tras el último lavado se resuspendieron en 200µl/pocillo de tampón FACS de lavado y se mantuvieron protegidas de la luz a 4°C hasta el momento del análisis. Se utilizaron como controles sueros de cerdo normales y el SHN.

Para su análisis las células se transfirieron a tubos de citometría, y se analizaron 5000 por tubo en un citómetro FACScan a través del programa CellQuest. Se realizó un análisis de FL1 (FITC) en un histograma donde se observó la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) comparada con los controles negativos (células sin Ac primario).

4.4. Determinación de Acs anti-linfocitos o monocitos porcinos por citometría de flujo a partir de sangre total

En determinados experimentos se partió de sangre periférica anticoagulada completa (sin separar las CMSP) para realizar la citometría de flujo. Para ello, en este caso se utilizó solución lisante FACS (BD Sciences, USA) para eliminar los hematíes. Para ello se recogieron 100µl de sangre periférica anticoagulada con heparina en un tubo, se añadieron los sueros de los babuinos en la concentración adecuada, se incubó a temperatura ambiente 30 minutos en oscuridad, tras lo cual se añadieron 2ml de la solución lisante FACS al tubo que contenía la mezcla de sangre y sueros y se incubó durante 10-15 minutos, posteriormente se centrifugó a 300x g durante 7 minutos, se lavaron tres veces con tampón FACS de lavado, y se añadió el Ac secundario anti-IgM humana (μ específicos) (DAKO, Dinamarca) marcado con FITC. Se realizaron otros tres lavados con el tampón FACS de lavado y se transfirieron las células a tubos de citometría y se analizaron 5000 por tubo en un citómetro FACScan a través de del programa CellQuest. Se realizó un análisis de FL1 (FITC) en un histograma donde se observó la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) comparada con los controles negativos.

5. Técnicas celulares

5.1. Líneas celulares

AOC-40: Las células de la línea porcina AOC-40 son endoteliales, inmortalizadas por transfección con el plásmido pRNS-1 (Carrillo A *et al.*, 2002). Su cultivo se realizó en medio RPMI 1640 con 10% SBF (GIBCO, UK), 1% P/S (GIBCO, UK), 1% L-glutamina (GIBCO, UK) y geneticina 200µg/ml (GIBCO, UK) y sobre frascos de cultivos gelatinizados.

L35: Esta línea celular está derivada de linfocitos T porcinos y crece en suspensión en medio RPMI 1640 (GIBCO, UK) con 10% SBF, 1% P/S y 1% L-glutamina.

HEK-293: Es una línea celular humana de origen embrionario de riñón, que ha sido infectada con partículas endógenas del PERV tipo C producidas por la línea celular PK15. Sus condiciones de crecimiento fueron: medio DMEM, 10% SBF, 1% P/S, 1% L-glutamina.

Todas las células fueron mantenidas en frascos de cultivo 75cm² (BD Falcon, USA), estériles a 37°C y atmósfera húmeda con 5% CO₂.

5.2. Aislamiento y cultivo de mioblastos o miocitos porcinos

Para los cultivos se partió de 10g de músculo esquelético (mioblastos) o corazón (cardiomiocitos) provenientes de tejido porcino fresco conservado en PBS a 4°C. Tras lavar la muestra mediante agitación suave del frasco, el tejido se transfirió a una placa petri de 10cm (SORIA-GENLAB, España) a la que se añadió PBS para evitar que se secase. Se quitaron los restos de fascia y el tejido adiposo y la biopsia se cortó en pequeños fragmentos usando unas tijeras. El tejido troceado se transfirió a un tubo con 30ml de PBS, se mantuvo en agitación durante 5 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 100x g y se hicieron sucesivos lavados con PBS hasta que el sobrenadante estaba claro. Se añadió colagenasa IA (GIBCO, UK) a 1,5mg/ml/g de tejido en Medio 199 (GIBCO, UK) con 1% P/S. Se incubó a 37°C una hora con agitación. Se añadieron 20ml de Tripsina-EDTA 1x (GIBCO, UK) y se incubó de nuevo a 37°C una hora con agitación. La suspensión de tejido se pasó por un filtro de 40µm (BDBiosciences, USA) sobre un tubo con 1ml de SBF inactivado. Se añadió PBS hasta 45ml y se centrifugó 20 minutos a 300x g, se retiró el sobrenadante y se repitió el lavado con PBS. Se añadieron 10ml de medio *F-12 Nutrient Mixture* (HamF-12) (GIBCO, UK), 20% SBF, 1% P/S y 2mM L-glutamina. Se centrifugaron los tubos 10 minutos a 300x g, se retiró el sobrenadante y se añadieron otros 10ml del mismo medio. Seguidamente, las células fueron incubadas a 37°C en una cámara húmeda conteniendo 5% de CO₂, en un frasco de cultivo de 25cm² (BDBiosciences, USA). A las 48 horas se eliminó el sobrenadante. Las células se subcultivaron cuando alcanzaron alrededor del 80% de confluencia (aproximadamente a las 2 semanas) mediante tripsina (0,25% tripsina-EDTA). Las células se mantuvieron en cultivo hasta obtener el número necesario para cada experimento, normalmente después de 4 pases.

5.3. Aislamiento y cultivo de CMMp a partir de MO porcina

Se utilizaron como fuente de células de MO aspirados medulares, obtenidos de fémur, costilla o esternón de cerdos normales. Las células se extrajeron en condiciones estériles mediante una aguja y tras sucesivos lavados con HBSS, y se sometieron a un gradiente

de densidad (Histopaque, 1,077 g/ml) para eliminar las células no deseadas. Después las células de la interfase se lavaron con HBSS tres veces y se sembraron en frascos de cultivo a una densidad de 10^5 células/cm² en DMEM suplementado con 10% de SBF, con 1% P/S y 1% L-glutamina. Seguidamente, las células se incubaron a 37°C en una cámara húmeda conteniendo 5% de CO₂. A las 72 horas, se eliminaron las células no adherentes y se cambió el medio. Un pequeño número de células desarrolló colonias que fueron visibles entre los días 5 y 7. Las células hematopoyéticas, fibroblastos y otras células no adherentes se eliminaron durante los sucesivos lavados. Las células que quedaron, mayoritariamente CMM, fueron expandidas *in vitro* durante varias semanas sin perder su fenotipo, mediante subcultivos cuando alcanzaron una confluencia del 80%, para ello las células se despegaron con ayuda de tripsina (0,25% tripsina-EDTA). Las CMMp se mantuvieron en cultivo hasta obtener el número necesario para cada experimento, normalmente entre 3 y 4 pases.

5.4. Inducción de las CMMp al fenotipo miogénico mediante tratamiento con 5-azacitidina (Tomita S *et al.*, 1999)

Las CMMp se obtuvieron inicialmente siguiendo el protocolo descrito anteriormente pero después de las 48 horas de la eliminación de las células adherentes del cultivo de CMM se añadió 5-azacitidina (Sigma, USA) en una concentración de 10 mM, al medio de cultivo DMEM suplementado con SBF al 10%, 1% P/S, 1% L-glutamina. El medio se eliminó 24 horas más tarde, se añadió medio nuevo y las células se dejaron cultivando hasta 4 semanas cambiando el medio cada 2 ó 3 días. Tanto la concentración como el tiempo de actuación de la 5-azacitidina se establecieron previamente. Posteriormente las células se cultivaron a una concentración 5×10^4 en *chamber-slides* (BDBiosciences, USA) para determinar la diferenciación obtenida analizando la expresión de marcadores de cardiomiocitos por técnicas de inmunohistoquímica, como se explica posteriormente.

5.5. Inmortalización de las CMMp

Como los cultivos primarios de CMMp tenían limitaciones del tiempo en cultivo y en el número de células obtenidas se trató de obtener una fuente continua de células mediante la inmortalización de dichas células. La inmortalización de las células se realizó por

transfección de las CMM primarias con el plásmido pRNS-1 que contiene parte del genoma de SV40 y confiere resistencia a higromicina B. El ADN plasmídico se purificó utilizando *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, a una concentración de 1.5×10^5 células/pocillo en 2ml de medio DMEM suplementado con 10% SBF, con 1% P/S y 1% L-glutamina, se incubaron hasta llegar a un 50-80% de confluencia, y se transfectaron por un método mediado por liposomas. Brevemente, 6 μ l de lipofectamina (Invitrogen, UK) se mezclaron con 2 μ g de ADN del plásmido pRNS-1 en 194 μ l de Opti-Mem (GIBCO, UK) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la formación de los complejos ADN-lípido. Después de este tiempo las células se lavaron con medio RPMI 1640 sin suplementos. La mezcla se diluyó posteriormente en 800 μ l de Opti-Mem y se añadió a los cultivos. Después de 6 horas, se añadió medio de crecimiento RPMI 1640 con 10% SBF, 1% L-glutamina, 1% P/S, Sodio Piruvato 1mM (Gibco, UK) y 2-mercaptoetanol 0,55 μ M (Gibco, UK) a los cultivos. Después de 24 horas, los cultivos se lavaron y se añadió medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF, con 1% P/S y 1% L-glutamina. La selección de transformantes se llevó a cabo 5 días después con medio de crecimiento suplementado con higromicina B (Sigma, USA) 80 μ g/ml (Carrillo A *et al.*, 2002). Crecieron diversas colonias que se “picaron” y se cultivaron, y de todas ellas se seleccionaron sólo 4 líneas para posteriores estudios.

Las fotos de todos los cultivos celulares se realizaron en un microscopio *Olympus IX51*.

5.6. Citometría de flujo para la caracterización antigénica de mioblastos, cardiomiocitos, CMMp y CMMp diferenciadas con 5-azacitidina

Se recogieron las células del cultivo tras despegarlas con ayuda de tripsina (0,25% tripsina-EDTA) y se lavaron en tampón FACS de lavado dos veces, centrifugando a 300x g durante 5 min. Se pusieron 2.5×10^5 - 3.5×10^5 células por pocillo en una placa de 96 de fondo en V (NUNC, Dinamarca). Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 50 μ l de los diferentes AcMo (a las concentraciones adecuadas para cada uno previamente determinadas). Se homogeneizaron en el vórtex y se incubaron a 4°C durante 40 minutos. Se lavaron 2 veces con 200 μ l/pocillo con tampón FACS de lavado, centrifugando la placa y eliminando después el sobrenadante. Se añadió el Ac

secundario anti-Igs fracción F(ab')₂ murina marcada con FITC (DAKO, Dinamarca) o anti-Igs fracción F(ab')₂ murina marcada con ficoeritrina (PE) (DAKO, Dinamarca) se homogeneizaron en el vórtex y se incubaron a 4°C durante 40 minutos protegidos de la luz (Inmunofluorescencia indirecta). Cuando los Acs primarios estaban marcados con un FITC o PE no se realizó el segundo paso de la incubación con el Ac secundario (Inmunofluorescencia directa). Se lavaron tres veces con tampón FACS de lavado, centrifugando y homogeneizando cada vez. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 200µl/pocillo de tampón FACS de lavado. Se mantuvieron protegidas de la luz a 4°C hasta el momento del análisis.

Las células se transfirieron a tubos de citometría, y se analizaron 5000 por tubo en un citómetro FACScan (Becton Dickinson, USA) a través del programa CellQuest (Becton Dickinson, USA). Se realizó un análisis de FL1 (FITC) o FL2 (PE) en un histograma donde se observó la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) comparada con los controles negativos.

Los AcMo que se utilizaron fueron los que reconocen los siguientes antígenos:

Marcaje directo: anti-CD14 humano marcado con FITC (DAKO, Dinamarca), anti-CD44 murino marcado con FITC (BD Biosciences, USA), anti-CD56 humano marcado con PE (DAKO, Dinamarca), anti-CD90 humano marcado con FITC (BD Biosciences, USA), anti-CD106 humano (Serotec, Oxford, UK).

Marcaje indirecto: anti-CD29 porcino (BD Biosciences, USA), anti-CD31 humano (DAKO, Dinamarca) y los sobrenadantes de hibridomas BL3F1 (anti-CD11b porcino), 2A5 (anti-CD45 porcino), 6D8/8 (anti-CD46 porcino), BL6H4 (anti-SLA I) y BL1H7 (anti-SWC3) (cedidos por el Dr. Domínguez, CISA-INIA, Madrid). Todos los AcMo que no son anti-cerdo crosreaccionan con antígenos de cerdo.

6. Técnicas bioquímicas y electroforéticas

6.1. Preparación de los lisados

Tampón de lisis A (pág. 79): Se utilizó para lisados de CMMp, CMMp diferenciadas y cardiomiocitos. Se añadió tampón de lisis a una proporción de 1ml por cada 100x10⁶ células. Se calentó la muestra a 100°C durante 5 minutos. Se centrifugó a 17000x g durante 15 minutos a 4°C.

Tampón de lisis B (pág. 79): Se utilizó para lisados de HEK-293. Se añadió tampón de lisis a una proporción de 1ml por cada 100×10^6 células. Se dejó en hielo durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó a $17000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C .

En ambos casos el sobrenadante se congeló a -80°C hasta su uso y la concentración de proteínas en cada uno de los lisados celulares se determinó por un ensayo colorimétrico, con el kit comercial, *DC Protein Assay* (Bio-Rad, USA) basado en el método de Lowry.

6.2. Separación y aislamiento con bolas magnéticas de la población de CMMp de MO

Este tratamiento se realizó específicamente para la detección de expresión de conexina 43 en el lisado de CMMp obtenidas de MO porcina completa directamente sin el paso de adherencia a plástico para evitar la posible activación de las células. Para ello se utilizó el kit de las *Dynabeads* (DynaL Biotech, Noruega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó primero una selección negativa utilizando el sobrenadante del hibridoma 4D5/CR3 (anti-CD45 porcino) (cedido por el Dr. Domínguez, CISA-INIA, Madrid) a concentraciones saturantes unido a las bolitas magnéticas para separar las células CD45^+ (mayoritariamente células hematopoyéticas) de las CD45^- (población enriquecida en CMM).

Brevemente, las células se obtuvieron a partir de MO porcina como se describe en el punto 6.2, y se sometieron a un gradiente de densidad con Histopaque, después se lavaron con PBS pH 7,4, y sin someterlas a adherencia al plástico se incubaron junto con las *Dynabeads* marcadas con 4D5/CR3, para la separación de células CD45^+ , durante 15 minutos a 4°C en agitación, tras lo cual se recogieron las células no unidas (CD45^-) en PBS pH 7,4. Esta población CD45^- mayoritariamente CMM fueron utilizadas para obtener el lisado. Se comprobó la eficiencia de la separación por citometría de flujo para comprobar si eran células CD45^- y por inmunohistoquímica con el AcMo vimentina para comprobar que eran CMM.

6.3. Electroforesis, transferencia y revelado

- Electroforesis: A cada muestra de los lisados (30 μg /pocillo) se le añadió tampón de carga 5X (pág. 80), que contenía además 1% β -mercaptoetanol (Bio-Rad, USA) en

las muestras que se requerían condiciones reductoras. Se calentaron las muestras a 100°C durante 5 minutos y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS- PAGE) a al 10%. Las muestras se corrieron a 120 voltios durante 90 minutos.

- **Transferencia:** Previo a su uso, las membranas Immobilon-P^{S-Q} (di-fluoruro de polivinilideno) (Millipore.USA) se empaparon en metanol, agua y metanol alternativamente, durante 5 minutos cada uno. Posteriormente, los geles con las proteínas separadas se lavaron en tampón de transferencia (pág. 79) 15 minutos y se transfirieron a las membranas durante 35 minutos a 17 voltios, en un sistema de transferencia semi-seca (Bio-Rad, USA).
- **Incubación con Acs y revelado:** Las membranas con las proteínas transferidas se lavaron en PBS y se bloquearon en tampón bloqueo (pág. 80) durante 1 hora, se lavaron en tampón de lavado 4 veces durante 15 minutos con agitación, y se incubaron con los Acs primarios en la concentración adecuada en cada caso diluidos en tampón bloqueo toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron 4 veces en tampón de lavado (pág. 80) y se incubaron con los Acs secundarios en cada caso en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último se lavaron 4 veces y se revelaron en sistema ECL para *western-blot* (Amersham, UK) 0,125ml/cm², un sistema que aprovecha la oxidación del componente luminol por la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno con la consecuente emisión de luz que queda reflejada e una película radiográfica (AGFA, Bélgica). La exposición de la película al compuesto radiante se realizó a distintos tiempos entre 1 y 10 minutos. Alternativamente las membranas tras ser reveladas con ECL se visualizaron en imágenes digitalizadas por una cámara CCD LAS-3000 (Fuji-Film, Tokio, Japón).

Según el tipo de ensayo los Acs primarios y secundarios así como los lisados fueron los siguientes:

- **Detección de PERV:**
Lisados: HEK-293 como fuente de antígenos de PERV sin β-mercaptoetanol. Ac primario: sueros de los babuinos en tampón de bloqueo con BSA. Ac secundario: Proteína A/G Immunopurificada marcada con peroxidasa (Pierce, USA) en tampón de bloqueo con BSA. Control positivo: anti-SSAV-1 p29, anti-proteína 29 del virus del sarcoma de simio que cros-reacciona con la p30 de PERV (ViroMED Biosavetey Laboratories, Candem, NJ, USA) en tampón de bloqueo con BSA.

- Detección de Conexina 43:

Lisados: CMM ó cardiomiocitos con 1% β -mercaptoetanol. Ac primario: anti-conexina 43 murina que crosreacciona con la molécula porcina (BD Biosciences, USA) en tampón de bloqueo con leche desnatada en polvo 5%. Ac secundario: anti-Igs murinas marcada con peroxidasa (Amersham, UK) en tampón de bloqueo con leche desnatada en polvo 5%.

7. Técnicas morfológicas e inmunohistoquímicas

7.1. Estudio morfológico e inmunohistoquímico de los tejidos procedentes de los babuinos receptores del xenotrasplante

7.1.1. Congelación de las muestras

En todos los xenotrasplantes se obtuvo una biopsia del xenoinjerto antes del trasplante, otra biopsia 30 minutos después de la reperfusión, y por último una muestra recogida en el momento de la necropsia, también se recogieron en el momento de la muerte del animal receptor muestras de otros órganos. Todas las muestras de tejido se recubrieron con O.C.T.TM *Compound (optimum cutting temperature*, Sakura Tissue-Tek, USA) y se congelaron rápidamente en isopentano preenfriado y fueron guardadas a -80°C hasta su utilización. Los cortes se realizaron en el criostato a 4 μ m. Se fijaron en acetona a 4°C durante 10 minutos, se realizó un primer lavado con PBS durante 5 minutos y se inactivó la peroxidasa endógena con metanol 3% en H₂O₂ durante 10 minutos.

7.1.2. Estudio morfológico en los xenoinjertos

Para realizar el análisis anatomopatológico se realizaron tinciones con hematoxilina y eosina. Para ello las secciones se introdujeron 5 minutos en metanol y posteriormente se introdujeron en hematoxilina (PANREAC, España) 2 minutos, se aclararon en agua corriente hasta que viró el color, y por último se introdujeron en eosina (MERK, Alemania) 10 segundos, después se deshidrataron en alcoholes crecientes (96°, 100° y xilol), y se montaron en DePeX (VWR Internacional, Inglaterra).

7.1.3. Estudio inmunohistoquímico de los xenoinjertos y otros órganos

Para los estudios inmunohistoquímicos las preparaciones correspondientes se lavaron en PBS o TBS (según Ac) y se bloquearon con suero normal de cabra durante 10 minutos y posteriormente se incubaron durante 1 hora con AcMo específicos para las moléculas IgM, IgG y fibrina humanas (Serotec, Oxford, UK) y para C3, C4, C5b-9 humanos (DAKO, Copenhague, Dinamarca), otros AcMos empleados fueron los que reconocen las moléculas CD55 humano (DAF) (Pharmlingen, San Diego, USA), CD62 humano (Serotec, UK), y los sobrenadantes de los hibridomas de los Acs que reconocen las moléculas porcinas 5A6/8, CD46 y SWC3 (cedidos por el Dr. Domínguez, CISA-INIA, Madrid). Después se lavaron tres veces con PBS o TBS y se incubaron 30 minutos con el Ac secundario un polímero anti-Igs murinas marcada con peroxidasa (DAKO, Dinamarca).

7.1.4. Detección de la expresión de PERV en los xenoinjertos y otros órganos

Para estos estudios las preparaciones correspondientes se lavaron en PBS y se bloquearon con suero normal de cabra 20 minutos. Se retiró el suero del tejido y sin lavar se añadió el Ac anti-SSAV-1 p29. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS. Se incubaron con el Ac secundario anti-Igs de cabra (DAKO, Dinamarca) marcado con peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tanto para los estudios inmunohistoquímicos como para la detección de PERV, después del Ac secundario, las secciones se lavaron tres veces, 10 minutos cada vez con PBS. Tras lo cual se aplicó el cromógeno DAB (solución de cromógeno 3,3'-diaminobenzidina) (DAKO, Dinamarca) entre 3 y 5 minutos. Se lavó con agua bidestilada. Se contrastó con hematoxilina de Gill III (MERK, Alemania) de 2 a 5 minutos. Se lavó con agua y se deshidrató con alcoholes crecientes de 96°, 5 minutos y 100°, 5 minutos. Se aclaró con xilol otros 5 minutos y se montaron con DePeX.

7.2. Caracterización fenotípica de mioblastos, cardiomiocitos, CMM y CMM diferenciadas

7.2.1. Inmunohistoquímica indirecta para la detección de expresión de Actina muscular, Conexina 43, Desmina y Troponina T

Se sembraron las células correspondientes en *chamber-slides* de 8 pocillos (portaobjetos con pocillos para cultivo celular) a una concentración de 5×10^5 células por pocillo con medio HamF-12 para cardiomiocitos, RPMI 1640 para las líneas ó DMEM para la MO, suplementados con 10% SBF, 1% P/S y L-glutamina. Al llegar a la confluencia se cambió el medio por otro sin SBF, y se dejó otras 24 horas. Sin retirar el medio de cultivo se fijaron las células con 200µl/pocillo de formaldehído al 1% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Se extrajo la mezcla y se añadieron otros 200µl de formaldehído 1% en PBS por pocillo y se incubó otra hora a temperatura ambiente, posteriormente se hicieron tres lavados con 200µl de PBS por pocillo durante 30 minutos. Se realizó un pretratamiento con tritón X-100 al 0,1% para permeabilizar las membranas durante 5 minutos, 200µl por pocillo, después se realizó un lavado con PBS durante 10 minutos, 200µl por pocillo. Posteriormente se inhibió la peroxidasa endógena con metanol al 3% en peróxido de hidrógeno durante 10 minutos. Se hicieron tres lavados con PBS durante 10 minutos y posteriormente se incubó con los AcMos primarios anti-Actina muscular humana (DAKO, Dinamarca), anti-Desmina humana (BioGenex, USA), anti-Conexina 43 murina (BD Biosciences, USA) y anti-Troponina T murina isoforma cardíaca (LABVISION CORPORATION, USA), después de haber comprobado que reconocen también las correspondientes moléculas porcinas. Los AcMos se diluyeron en Tris-HCl pH 7,6 con BSA 1% una hora a temperatura ambiente. Después se realizaron tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno. Se incubó con el Ac secundario anti-Igs murinas conjugadas con un polímero marcado con peroxidasa en tampón Tris-HCl (*Polymered Envision plus monoclonal*; DAKO, Dinamarca) durante una hora a temperatura ambiente.

La cuantificación de la expresión de estos 4 antígenos expresados en las células analizadas se realizó con el programa *analySIS[^]D FIVE*.

7.2.2. Inmunofluorescencia indirecta para la detección de expresión de Vimentina con tres fluorocromos

La técnica se realizó en *chamber-slides* de 8 pocillos, 50000 células/pocillo. Primero se marcaron las células con DiO (Fluka Chemie, Suiza), una carbocianina que se intercala en las membranas lipídicas, a una concentración de 1 μ M en HBSS mediante dos incubaciones, una inicial de 5 minutos a 37°C o menos, y posteriormente otra de 15 minutos a 4°C. La incubación a menor temperatura permite el marcaje de la membrana celular y disminuye la endocitosis, esto reduce la localización del fluorocromo en las vesículas endoplasmáticas. Después del marcaje se lavaron las células en PBS se añadió medio fresco, se eliminó el medio y se fijaron las células con acetona 200 μ l/pocillo, 10 minutos a 4°C. Una vez realizada la fijación se dejaron secar las *chamber-slides* completamente a temperatura ambiente, tapadas para que no se perdiera la fluorescencia. Se añadieron 200 μ l/pocillo de tampón de lavado pH 7,4 (DAKO, Dinamarca) durante 5 minutos, se decantó. Se añadieron 200 μ l/pocillo de Tritón-100 (0,1%) 5 minutos, se decantó y se añadieron 200 μ l/pocillo de tampón de lavado pH 7,4 (DAKO, Dinamarca) durante 10 minutos. Se eliminó y se añadió en el pocillo el AcMo anti-Vimentina murina (abcam, Cambridge, UK) que crosreacciona con cerdo y se incubó el AcMo durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados con tampón de lavado 5 minutos cada uno. Se añadió el Ac secundario anti-Igs fracción F(ab)₂ murina marcada con PE (DAKO, Dinamarca) y se incubó durante 30 minutos. Se realizaron 3 lavados con tampón de lavado 5 minutos cada uno. Se añadieron 200 μ l/pocillo de DAPI para ver los núcleos (Sigma, USA) (50 ml tampón de lavado + 4 μ l DAPI) y se dejó incubando 30 minutos. Se realizaron 3 lavados con tampón de lavado 5 minutos cada uno. Se montaron las *chamber-slide* con medio acuoso Glicergel (DAKO, Dinamarca).

Las fotos de las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se realizaron en un microscopio *Olympus BX-UCB*.

7.3. Tinciones para identificación de adipocitos, condrocitos y osteocitos

Las CMMp tratadas con 5-azacitidina se sembraron a 5x10⁴ células/pocillo en *chamber-slides* y se dejaron crecer durante 24 horas con medio DMEM suplementado con SBF al 10%, 1% P/S, 1% L-glutamina hasta su uso. Las células se fijaron añadiendo 200 μ l de

formaldehído 1% al medio de cultivo y se dejaron durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se retiró el medio y se añadieron otros 200µl de formaldehído 10% y se incubó 1 hora. Con las muestras así preparadas se realizaron las correspondientes tinciones

7.3.1. Tinción Oil-Red-O (Sigma, USA) para adipocitos

Se retiró el formaldehído y se cubrió con isopropílico 60% que se retiró inmediatamente y se sumergieron las muestras en la solución de trabajo de Oil-Red-O durante 20 minutos, después se volvieron a cubrir con isopropílico 60% que se retiraron inmediatamente. Se lavaron en agua destilada y se incubaron en hematoxilina de Mayer (Sigma, USA) durante 5 minutos, se lavaron en agua destilada durante 10 minutos y se montaron con Glicergel.

7.3.2. Tinción con azul alcian (Fluka, Suiza) para condrocitos

Se retiró el formaldehído y se hidrataron en agua corriente. Las muestras se dejaron en azul alcian 1% en ácido acético glacial 3% durante 30 minutos, se lavaron en agua corriente. Después se dejaron en hematoxilina de Harris (PANREAC, España) 4 minutos y se lavaron en agua corriente. Después se deshidrataron con etanol 96° y etanol OH-100°, posteriormente se pasaron a xilol y se montaron con DePeX.

7.3.3. Tinción con Safranina O (Sigma, USA) para condrocitos

Se retiró el formaldehído y las muestras se hidrataron en agua corriente, se introdujeron en hematoxilina férrica de Weigert durante 7 minutos y se lavaron en agua corriente, después se tiñeron con Safranina O 0,1% en ácido acético glacial 1% durante 15 minutos. Después se deshidrataron con etanol 96° y etanol OH-100°, posteriormente se pasaron a xilol y se montaron con DePeX.

7.3.4. Tinción con rojo alizarina S (Sigma, USA) para osteocitos

Se retiró el formaldehído y las muestras se hidrataron en agua destilada. Se incubaron con la solución de rojo alizarina 2% pH 4,1 - 4,3 durante 5 minutos. Se dejaron durante

30 segundos en acetona y después 15 segundos en acetona-xilol 1:1. Después se pasaron a xilol y se montaron con DePeX.

7.3.5. Tinción de Von Kossa al nitrato de plata para osteocitos

Se retiró el formaldehído y las muestras se hidrataron en agua destilada, después se pasaron a una solución de nitrato de plata al 1% (PANREAC, España) tapada de la luz durante 1 hora aproximadamente. Se debe observar antes de sacar los portas de la solución anterior que el control positivo ha adquirido un color amarillo parduzco ó negro. Después se lavaron en agua destilada y se introdujeron en una solución de tiosulfato sódico al 2,5% (PANREAC, España) durante 15 minutos aproximadamente y se lavaron con agua destilada. Posteriormente se introdujeron 5 minutos en rojo nuclear 1% (MERK, Alemania) y se lavaron con agua destilada. Después se deshidrataron con etanol 96° y etanol OH-100°, posteriormente se pasaron a xilol y se montaron con DePeX.

8. Técnicas de biología molecular

8.1. Extracción de ARN del plasma de cerdos y babuinos, y de ADN de las CMSP de babuinos

La extracción del ARN se realizó con Trizol (Life Technologies-GIBCO). Para ello se homogeneizaron 300µl de plasma en 750µl de Trizol y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 200µl de cloroformo por cada 750µl de Trizol y los tubos se agitaron en el vortex 15 segundos. Después se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000x g 15 minutos a 4°C, recuperando la fase acuosa. Tras esto se añadieron 500µl de isopropanol por 750µl de Trizol inicial y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugando a 12000x g 15 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, después se añadió 1ml de etanol 70% por 1ml de Trizol inicial y se centrifugó a 3000x g 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar 5-10 minutos a temperatura ambiente. El ARN se resuspendió en H₂O+DEPC incubando 10 minutos a 60°C.

El ADN genómico se aisló de muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA utilizando las columnas QIAamp (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del manual. Brevemente, se trataron 200µl de sangre con 20µl de proteasa QIAGEN o proteinasa K, a la mezcla se le añadieron 200µl de un tampón de lisis suministrado en el kit, esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 56°C, después se añadieron 200µl de etanol (96°-100°). Esta mezcla se dispuso sobre la columna de centrifugación QIAamp que se sometió a una serie de centrifugaciones entre las cuales se fueron añadiendo tampones suministrados por el kit para lavar el ADN. Tras las centrifugaciones se añadieron 200µl de H₂O con 0,01% DEPC y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos obteniendo así el ADN genómico diluido.

La concentraciones y calidad del ARN y ADN se determinaron midiendo la absorbancia a 260nm y relación de absorbancia (260nm/280nm) con un espectrofotómetro Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech, USA) y mediante visualización en un gel de agarosa 1,5% marcado con bromuro de etidio 0,5µg/ml (Sigma, USA).

8.2. Detección de PERV por RT-PCR o PCR en plasma o CMSP

La detección molecular de secuencias de PERV en el plasma o en las CMSP se realizó por RT-PCR o PCR, respectivamente, con cebadores específicos del fragmento *proteasa- polimerasa* (Patience *et al.*, 1997; Paradis *et al.*, 1999) del virus, Fw 5'-GCTACAACCATAGGAAAAG-3' y Rv 5'-AACCAGGACTGTATATCTTGATCAG-3'. La RT-PCR se realizó usando el kit SUPERSRIPT ONE STEP RT-PCR con *Taq platinum* (Life Technologies-GIBCO). La mezcla de reacción (*QIAGEN onestep RT-PCR Kit*) contenía 5X QIAGEN Buffer (Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 12,5 mM MgCl₂, DTT, pH 8.7), dNTPs Mix (10mM de cada dNTP), Cebadores Fw (10µM), Cebadores Rv (10 µM), enzima RT-PCR, una concentración variable de ARN /ADN de plasma (0,05µg/µl ARN/ADN de plasma de mono receptor, 0,05µg/µl ARN/ADN de plasma del cerdo donante, 0,05µg/µl control positivo ARN/ADN extraído a partir de la línea celular HEK 293) y H₂O con 0,01% DEPC hasta 25µl.

Las condiciones de RT-PCR fueron: 50°C, 30 minutos para la RT; después 95°C, 5 minutos seguidos de 35 ciclos (94°C, 30 segundos, 55°C, 45 segundos, 72°C, 30 segundos) con un paso final de extensión de 72°C, 5 minutos. El ADNc amplificado se detectó en una electroforesis en gel de agarosa (BioWhittaker, USA) 1,5% marcado con

bromuro de etidio 0,5µg/ml. Las condiciones de la PCR fueron las mismas excepto el paso de RT.

8.3. Detección de la presencia de secuencias porcinas por PCR en CMSP

En el ADN procedente de las CMSP de algunos babuinos se amplificó también el gen de la subunidad II de la citocromo c oxidasa mitocondrial porcina (COII) por Nested PCR, para analizar la posible presencia de secuencias porcinas en las CMSPs de los animales xenotrasplantados. La reacción de PCR se realizó usando la enzima *Taq Pol* (Qiagen) con los siguientes cebadores específicos de la COII (Deng YM *et al.*, 2000).

Fw-out 5'-GCTTACCCTTTCCA ACTAGGCTTC-3' y

Rv-out 5'-TTCGAAGTACTTTAATGGGACAAG-3' (primera Nested)

Los cebadores para esta primera PCR están situados antes y después de la región que queremos amplificar.

Fw-in 5'-CACACACTAGCACAATGGATGCC-3' y

Rv-in 5'-GAGGATACTAATATTCGGATTGTTAT-3' (segunda Nested).

Los cebadores para la segunda PCR están situados justo en la región que queremos amplificar.

La reacción de PCR se realizó en una mezcla que contenía los cebadores de COII Fw-out y COII Rv-out en 50µl de mezcla que contenía 200ng de ADN, 200µM dNTPs, 10µM Tris-HCl, 50mM KCl y 1,5mM MgCl₂, sobre 30 ciclos (94°C, 30 segundos; 55°C, 30 segundos; 72°C, 45 segundos). De este producto de PCR se reamplificó 1 µl, usando los cebadores COII Fw-in y COII Rv-in por 30 ciclos (94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C 45 segundos y un paso final de extensión de 72°C, 5 minutos). El ADNc amplificado fue detectado en una electroforesis en gel de agarosa 1,5% y marcaje con bromuro de etidio 0,5µg/ml.

9. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos para los datos de ELISA se realizaron con el programa SPSS versión 12.0 para calcular si existían diferencias significativas en los niveles de Acs anti-αGal IgG e IgM de tipo DI, T2 T6 y APA entre el grupo de animales no tratados

que sufrieron RHA o RVA mediante el test no paramétrico de U de Mann-Whitney. Los datos se expresaron como media \pm DT. Para calcular si existían diferencias significativas entre los Acs anti- α Gal IgG e IgM DI, T2 T6 y APA antes del tratamiento con GAS914, antes del trasplante y en el momento de la necropsia se utilizó el test no-paramétrico de rangos con signo de Wilcoxon.

Los análisis estadísticos para los datos de citometría de flujo con sueros de babuinos y diferentes tipos celulares (CMSP, L35 y AOC-40 porcinos) se realizaron con el programa estadístico SPSS versión 12.0, con el se calculó si había diferencias significativas en las medianas de los niveles en los diferentes sueros a diferentes tiempos de recogida, antes del tratamiento, antes del trasplante y en el momento de la necropsia dentro de cada uno de los grupos de animales tratados con GAS914 (B.1 y B.2), no tratados con GAS914 con RVA (A.2) y no tratados con GAS914 con RHA (A.1) y si existían diferencias significativas entre antes del trasplante y necropsia entre los grupos tratados con GAS914 (B.1) y no tratados con GAS914 con rechazo agudo (A.2) utilizando para ello el test no paramétrico de U de Mann-Whitney. Los datos están expresados como mediana \pm desviación típica (DT).

Los análisis estadísticos para los datos de citometría de flujo en CMM y las 4 líneas establecidas de CMM (pBMC-2, pBMC-3, pBMC-4, pBMC-5) con diferentes AcMo se realizaron con el programa SPSS 12.0 utilizando el test no-paramétrico de U de Mann-Whitney. Los datos están expresados como media \pm DT.

Para todos los test realizados, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando la $p \leq 0,05$.

10. Tampones y reactivos

Tampón FACS de lavado

NaCl

EDTA disódico

Fosfato potásico monobásico (KH_2PO_4)

Fosfato potásico dibásico (K_2HPO_4)

Conservantes

Solución lisante FACS

30% Dietilenglicol

10% Formaldehído

Mezcla de sustancias no peligrosas para la salud

Tampón de lisis A:

- Tris-HCl 1.5M pH6.8 (Sigma, USA)
- 2% SDS (Bio-Rad, USA)
- 5% Glicerol (MERK, Alemania)

Tampón de lisis B:

- Tris-base 50mM (BioRad, USA)
- NaCl 155mM (Sigma, USA)
- EDTA 2mM (Sigma, USA)

Se guarda a 4°C.

Antes de usar se añadió:

- 0.2 % Tritón X-100 (Sigma, USA)
- 0.3% NP-40 (Sigma, USA)
- 0.1mM PMSF (Sigma, USA)

Tampón de transferencia 10X pH 8.2-8.4:

- Tris-base (50mM) (BioRad, USA)
- Glicina (40mM) (BioRad, USA)

Se añadió 20% de metanol antes de usar.

Tampón de electroforesis:

- Tris-base (25mM) (BioRad, USA)
- Glicina (200mM) (BioRad, USA)
- SDS (3.5mM) (Sigma, USA)

Acilamida/bisacilamida 30% (29:1):

- Acilamida 29.2 g (BioRad, USA)
- Bisacilamida 0.8 g (BioRad, USA)

Tampón de carga 5X:

- Tris-HCl 250 mM pH 6.8 (Sigma, USA)
- SDS 10% (Sigma, USA)
- Glicerol 30 % (MERK, Alemania)
- Azul de bromofenol 0.1mg/ml (Sigma, USA)

Tampón de lavado:

- Tris- HCl (10mM) (Sigma, USA)
- NaCl (100mM) (Sigma, USA)
- Tween 20 (1%) (PANREAC, España)

Tampón de bloqueo:

- Se añadió 1% de BSA (Sigma, USA) al tampón de lavado o leche desnatada en polvo al 5%.

Gel de separación (gel 1):

	10%
- Acrilamida/bisacrilamida 30%	33%
- Tris-base 1.5M pH 8.8	25%
- H2O destilada	40%
- SDS 10%	1%
- Persulfato amónico 10%	1%
- TEMED	0.1%

Gel de concentración (gel 2):

- Acrilamida/bisacrilamida 30%	16%
- Tris-base 1.5M pH 6.8	58%
- H2O estilada	25%
- SDS 10%	1%
- Persulfato amónico 10%	0.5%
- TEMED	0.1%

Tampón fosfato salino (PBS)

- Solución A: 0.2M fosfato sódico monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (MERK, Alemania)
- Solución B: 0.2M fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4) (MERK, Alemania)

Para 100ml de PBS pH 7,4: 9,5 ml de solución A + 40,5 ml de solución B + 50ml de H_2O destilada + 0,9% NaCl (Sigma, USA)

Tampón Tris salino (TBS) pH 7,4

- 50mM Tris-HCl (pH 7,4)
- 150mM NaCl

Tampón Bicarbonato pH 9,6

- NaHCO_3 100mM (Sigma.USA)
- Na_2CO_3 100mM (Sigma.USA)

Marcador molecular de proteínas:

Se empleó el marcador de proteínas *Kaleidoscope Prestained Standards* de *Bio-Rad* (Figura 15), que comprende desde 6,918 a 203,926 kDa, como referencia de tamaños en electroforesis de proteínas de geles de poliacrilamida.

Marcador molecular de ADN:

El marcador molecular empleado comprende desde 100 a 2072 pb de Invitrogen (Life Technologies-GIBCO) (Figura 16).

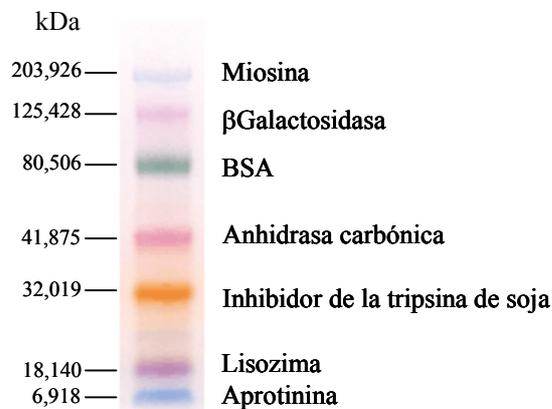


Figura 15: Marcador de peso molecular de proteínas.

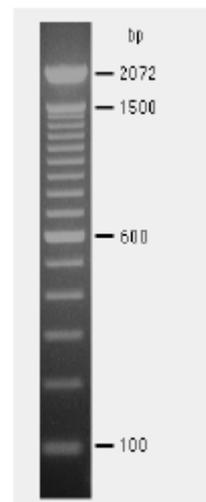


Figura 16: Marcador de peso molecular de ADN.

Oil-Red-O

- Solución A: Oil-Red-O 0,5% en agua destilada.
- Solución de trabajo: 60ml de solución A y 40ml de agua destilada, se dejó reposar 10 minutos y se filtró preferiblemente a 56°C.

Solución de hematoxilina férrica de Weigert

- Solución A: hematoxilina férrica (Fluka, Suiza) 1% en etanol 100° se dejó madurar durante 7 días.
- Solución B: Cloruro férrico 0,8% (MERK, Alemania), ácido clorhídrico 1%
- Se mezclaron las soluciones A y B en una proporción 1:1

IV. RESULTADOS

1. Análisis de la respuesta inmune en el modelo de xenotrasplante cardiaco heterotópico de cerdo transgénico hDAF en babuinos

1.1. Grupos de animales estudiados

El modelo experimental utilizado ha sido el xenotrasplante heterotópico de corazón de cerdos transgénicos hDAF en babuinos. De forma muy breve, el procedimiento quirúrgico empleado fue el siguiente: los corazones se extrajeron de cerdos anestesiados utilizando una técnica estándar. Una vez extraído, el corazón se conservó en solución Celsior® (SangStat, California, USA). Los babuinos fueron sedados con ketamina y atropina, y se intubaron. Con el animal en una manta térmica, se abrió el abdomen vía laparotomía en la línea media. Se expusieron la aorta y la vena cava inferior y se seccionaron. Se clampó la aorta abdominal proximal y distal. Se implantó el corazón porcino por anastomosis de la aorta del donante o tronco braquicefálico a la aorta abdominal del receptor y la arteria pulmonar del donante a la vena cava inferior del receptor. Se cerró la laparotomía. Se trasladó al animal en un incubador y se extubó.

Los animales que se utilizaron se pueden clasificar en dos grupos principales según si fueron o no tratados con GAS914, que a su vez se subdividieron en otros dos según el tipo de rechazo inmunológico que sufrieron:

Grupo A: Animales no tratados con GAS914 (n=10).

- Grupo A.1: Babuinos cuyos xenoinjertos sufrieron RHA (n=3).
- Grupo A.2: Babuinos cuyos xenoinjertos sufrieron RVA (n=7).

Grupo B: Animales tratados con GAS914 (n=8).

- Grupo B.1: Babuinos cuyos xenoinjertos sufrieron RVA leve (n=6).
- Grupo B.2: Babuinos cuyos xenoinjertos sufrieron RVA (n=2).

En la siguiente tabla (Tabla 3) se muestra un resumen de la información de estos animales.

Grupo	Individuos	Diagnóstico del injerto	Inmunosupresión	Tratamiento con GAS914	Supervivencia (días) ^a
A.1	B44, C58, C60	RHA	Csf, Csp, MMF, esteroides	NO	0,056±0,024
A.2	A14, A24, B32, B41, B42, B43, B47	RVA	Csf, Csp, MMF, esteroides	NO	17,57±7,09
B.1	C64, C66, C70, C74, C76, D10	RVA leve	Csf, Csp, MMF, esteroides	Antes y después del trasplante	26,33±22,01
B.2	D8, D12	RVA	50% Csf, Csp, MMF, esteroides	Antes y después del trasplante	5,5±2,12

Tabla 3: Grupos de animales del estudio, causa de fallo del injerto, inmunosupresión y supervivencia. Csf: ciclofosfamida, Csp: ciclosporina, MMF: micofenolato mofetil. ^aMedia ± DT.

En el grupo A (compuesto por 15 babuinos), en el primer lugar 5 animales (33%) murieron por causas no inmunológicas y complicaciones quirúrgicas, por lo que no se utilizaron para nuestro estudio, con una media de supervivencia de 3,75 días (rango 2-6 días), tres (20%) de los 15 corazones de cerdo hDAF experimentaron RHA (Grupo A.1) y rechazaron el órgano a una media de 1,33 horas, los 7 babuinos restantes (47%) sufrieron RVA (Grupo A.2) y rechazaron el órgano a una media de 17,57 días (rango de 10-29 días) de trasplante,. En el grupo B, 6 de los animales sufrieron RVA leve (75%) (Grupo B.1) y rechazaron el órgano a una media de 26,33 días (rango de 6-60 días), 2 sufrieron RVA (25%) (Grupo B.2) y rechazaron el órgano a una media de 5,5 días (rango de 4-7 días) (Figura 17).

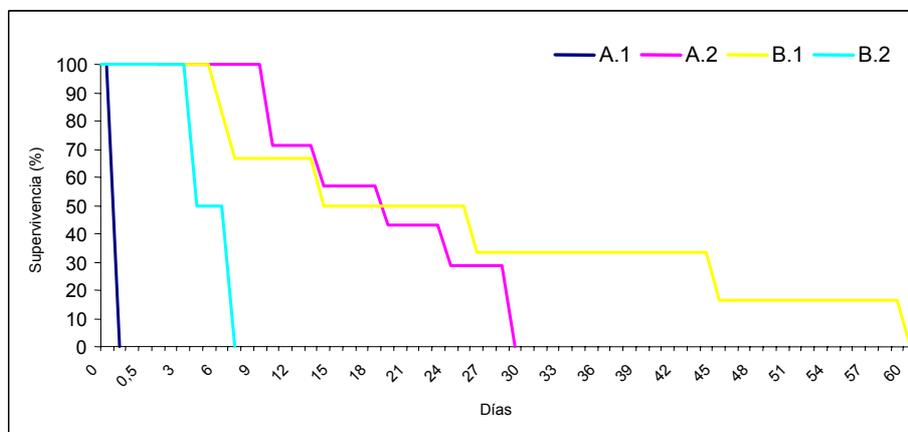


Figura 17: Supervivencia media (días) en cada uno de los grupos.

1.2. Niveles de Acs IgM e IgG anti- α Gal y APA en los animales no tratados con GAS914

Tanto en este grupo de animales como en el resto, los niveles en suero de Acs IgM o IgG frente a los residuos α Gal en forma de DI, T2 o T6 se analizaron por ELISA. Los niveles de APA se detectaron por citotoxicidad frente a hematíes de cerdo. Los niveles de Acs en ambos casos se normalizaron por comparación con el SHN (nivel 1000).

En este grupo compuesto por 10 babuinos, divididos en el Grupo A.1 (RHA) (n=3) y el Grupo A.2 (n=7) (RVA), se analizaron en los animales de cada grupo en conjunto los niveles de Acs en los sueros recogidos en dos puntos: antes del trasplante (PreTx) y en el momento de la necropsia o muerte del receptor (Necro) (Tabla 4).

GRUPOS	PreTx						
	IgM DI	IgM T2	IgM T6	IgG DI	IgG T2	IgG T6	APA
A.1	583,7 \pm 193,9	595 \pm 303,4	408 \pm 133,5	1069 \pm 536,5	390 \pm 399,9	402,7 \pm 246,6	1096,7 \pm 283,9
A.2	788,4 \pm 583,7	582,4 \pm 149,3	452 \pm 120,6	656,9 \pm 256,1	323,9 \pm 346,2	242 \pm 301,7	839,4 \pm 187,9

GRUPOS	Necro						
	IgM DI	IgM T2	IgM T6	IgG DI	IgG T2	IgG T6	APA
A.1	314,7 \pm 189,6	164,3 \pm 224,6	153 \pm 119,8	251,3 \pm 332,2	64,7 \pm 75,3	81 \pm 109,5	252,7 \pm 206,9
A.2	523,1 \pm 314,7	415 \pm 97,6	284,9 \pm 71,6	345,3 \pm 150,1	85,4 \pm 59,9	74,3 \pm 78,1	439,7 \pm 414,1

Tabla 4: Niveles de Acs IgM e IgG anti- α Gal DI, T2 y T6 y APA (Media \pm DT) en sueros de los grupos de babuinos A.1 y A.2. **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

Al analizar el Grupo A.1 (RHA), los resultados obtenidos mostraron que los niveles de Acs tanto IgM e IgG anti- α Gal DI, T2, T6 como APA disminuyeron notablemente el momento de la necropsia con respecto a antes del trasplante, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, seguramente debido a que el tamaño muestral es muy pequeño, 3 animales (Figura 18).

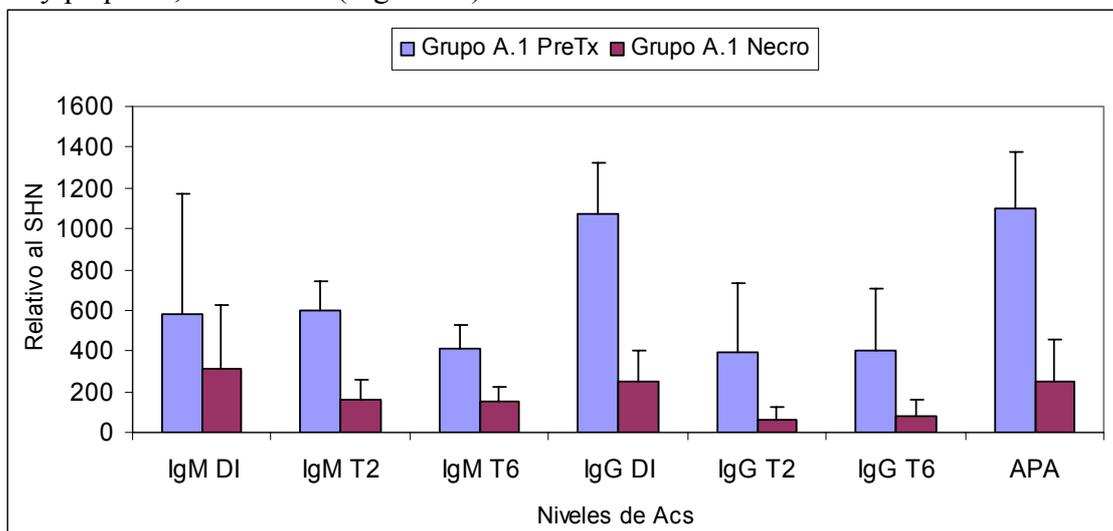


Figura 18: Media del nivel de Acs tipo IgM e IgG anti- α Gal DI, T2, T6 y APA en los sueros de los babuinos del Grupo A.1. **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

De forma similar en el Grupo A.2 (RVA), los niveles de Acs IgM e IgG anti- α Gal DI, T2, T6 y APA disminuían, mostrando en los resultados diferencias significativas en todos ellos cuando se comparaban los niveles en el momento de la necropsia con respecto a antes del trasplante (Figura 19).

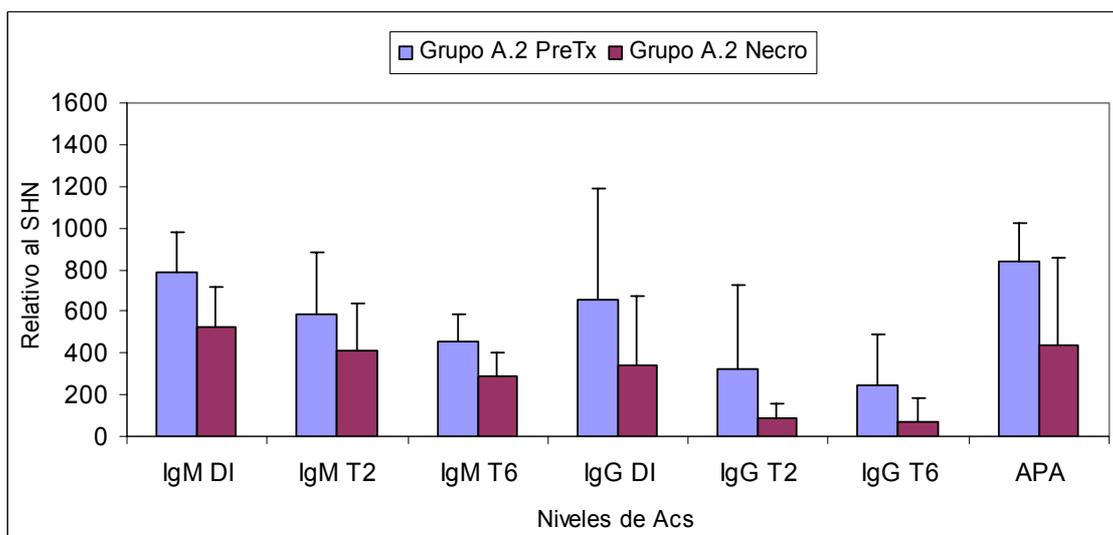
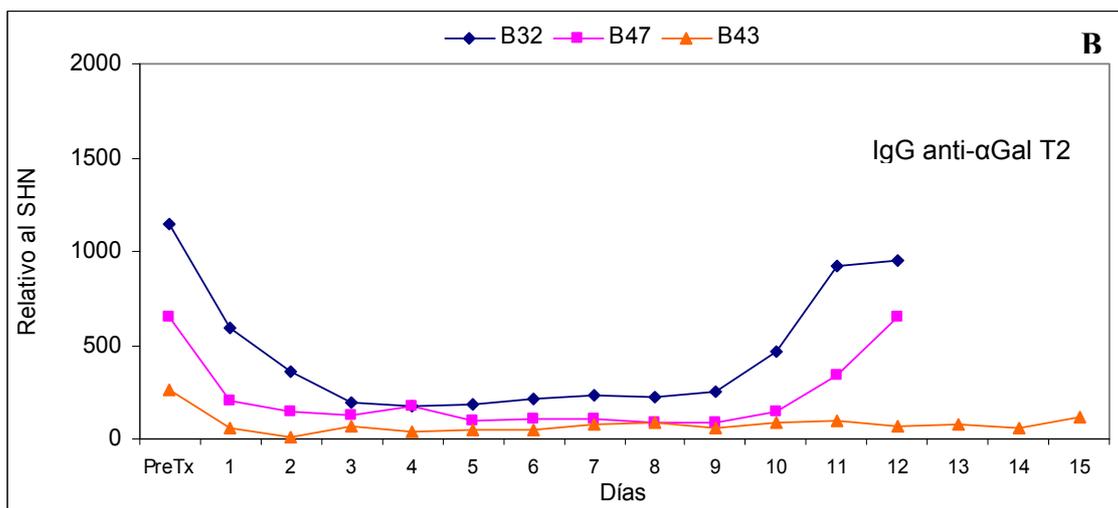
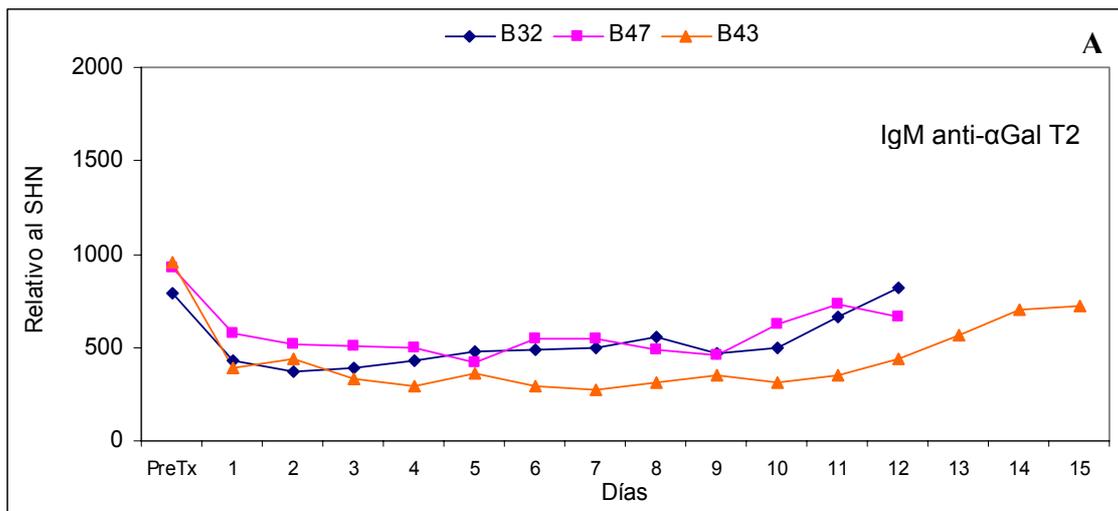


Figura 19: Media del nivel de Acs tipo IgM e IgG anti- α Gal DI, T2, T6 y APA en los sueros de los babuinos del Grupo A.2. IgM DI $p=0,012$, IgM T2 $p=0,012$, IgM T6 $p=0,018$, IgG DI $p=0,043$, IgG T2 $p=0,012$, IgG T6 $p=0,018$, y APA $p=0,036$. **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

Para analizar de forma más individual que ocurrió a lo largo del tiempo de trasplante con los animales del Grupo A.2 (RVA) se analizaron los niveles de Acs IgM e IgG anti- α Gal (en este caso sólo frente al T2, que es el azúcar mayoritario) y los APA. Para este análisis se dividieron a su vez en dos grupos de acuerdo a su supervivencia: los de menor supervivencia (B32, B47 y B43) y los de mayor supervivencia (B42, B41, A14 y A24).



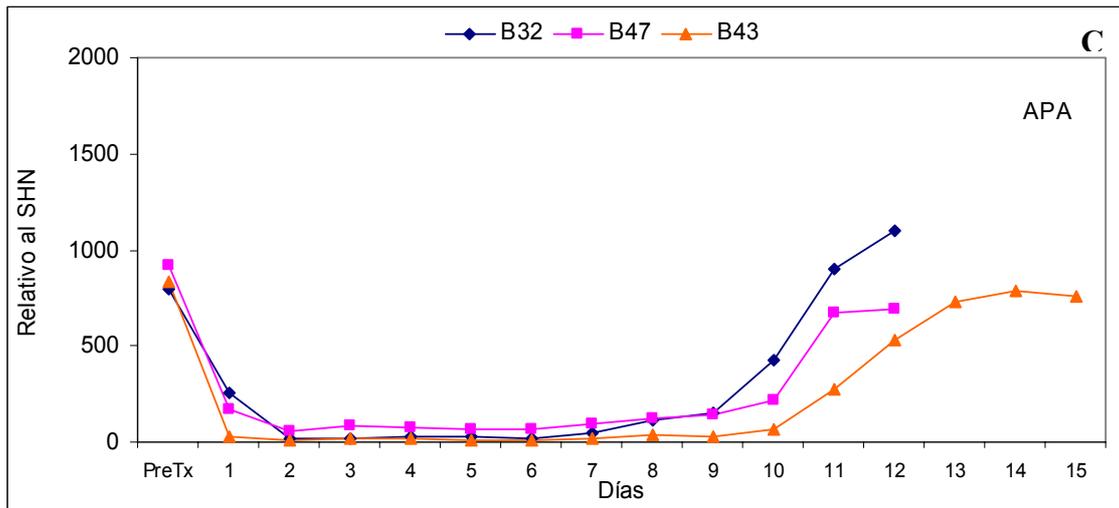
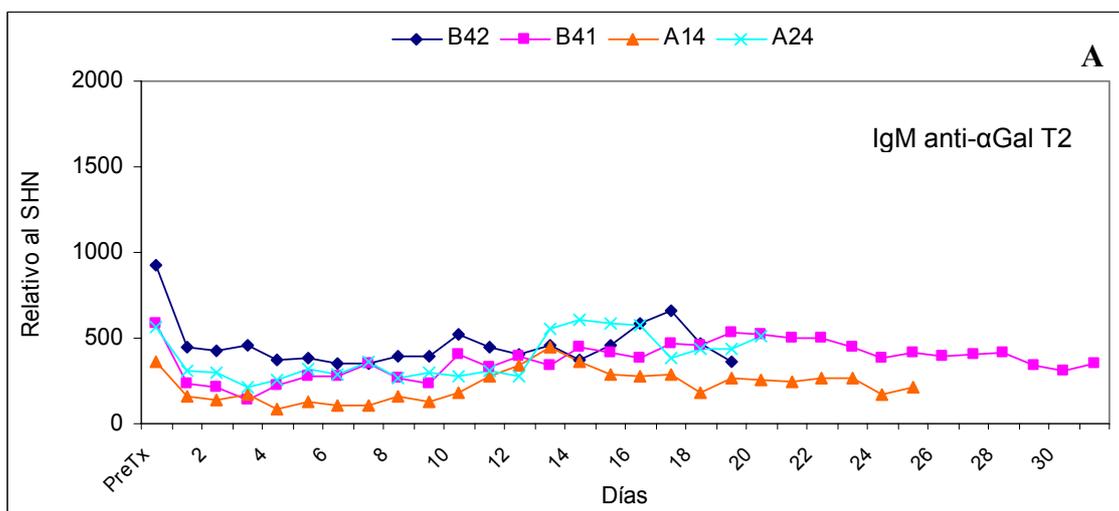


Figura 20: Evolución de los niveles de Acs IgM anti- α Gal T2 (A), IgG anti- α Gal T2 (B) y APA (C) a lo largo del tiempo del trasplante en los sueros de los babuinos de menor supervivencia del Grupo A.2. **PreTx:** antes del trasplante.

En los animales B32, B47 y B43, los Acs IgM, IgG anti- α Gal y APA a lo largo del tiempo tras el trasplante tendían a bajar inmediatamente después del trasplante ya que son absorbidos por el xenoinjerto, para volver a subir justo antes del rechazo prácticamente a los niveles de antes del trasplante siendo éstos sólo un 17,38% más bajos para las IgM, un 16,60% más bajos para las IgG y un 3,23% más bajos para los APA (Figura 20 A, B y C).



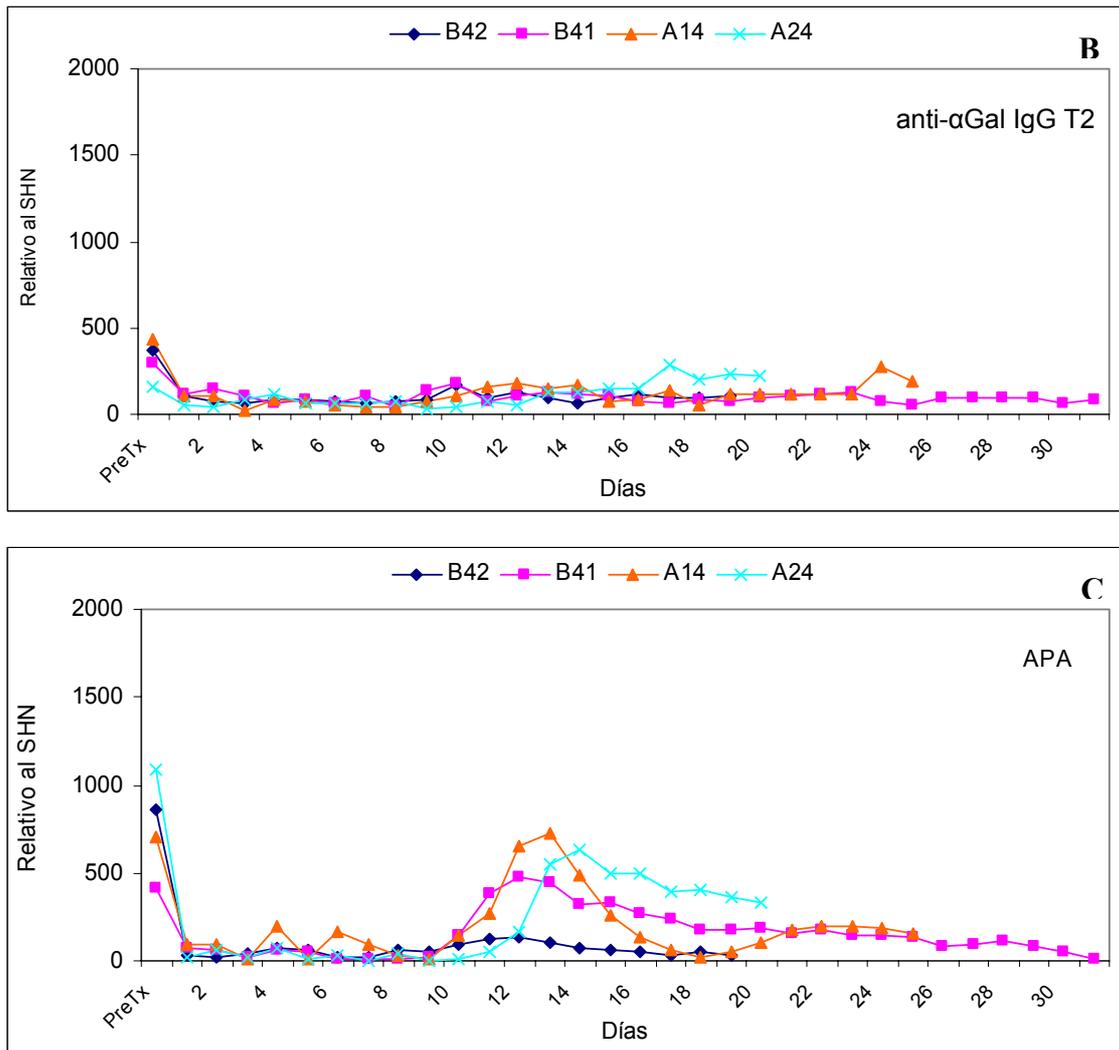


Figura 21: Evolución de los niveles de Acs IgM anti- α Gal T2 (A), IgG anti- α Gal T2 (B) y APA (C) a lo largo del tiempo del trasplante en los sueros de los babuinos de mayor supervivencia del Grupo A.2. **PreTx:** antes del trasplante.

En los babuinos B42, B41, A14 y A24 pertenecientes al Grupo A.2, los niveles de Acs IgM anti- α Gal T2 y APA medidos diariamente, mostraron un perfil similar al grupo A.1 en la primera quincena del trasplante pues inicialmente bajaron tras el trasplante, y aumentaron alrededor de los días 12-14, sin embargo tras estos días volvieron a bajar y se mantuvieron bajos hasta el momento de la necropsia. Los niveles de Acs en el momento de la necropsia correspondían a un 41,09% de los Acs IgM, un 51,98% de los Acs IgG y un 82,45% de los APA que tenían estos animales antes del trasplante. Los niveles de Acs IgG anti-Gal T2 se mantuvieron bajos y constantes desde el momento del trasplante hasta la necropsia del receptor (Figura 21 A, B y C).

Para analizar si había alguna diferencia en los niveles iniciales de Acs anti- α Gal ó APA, entre animales del Grupo A.1 y del Grupo A.2, que fuese la posible causa de que unos

sufriesen RHA y otros RVA, comparamos dichos niveles.

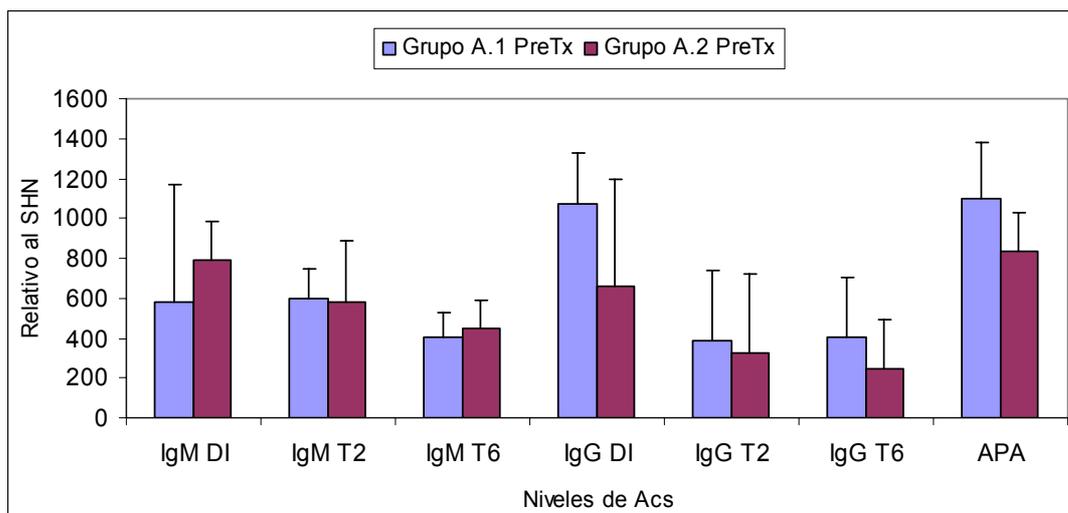


Figura 22: Media del nivel de Acs tipo IgM e IgG anti-αGal DI, T2, T6, y APA, en los sueros de los babuinos de los Grupos A.1 y A.2. APA $p=0,041$. **PreTx:** antes del trasplante.

Cuando se compararon los niveles de Acs IgM e IgG anti-αGal y APA antes del trasplante en los grupos A.1 y A.2 sólo existían diferencias significativas en los niveles de APA estos niveles eran más altos en el grupo A.1, siendo en el resto de Acs los niveles muy similares en ambos grupos (Figura 22). Este dato sugería que tal vez los niveles de Acs APA más altos estuviesen relacionados con la presencia de RHA.

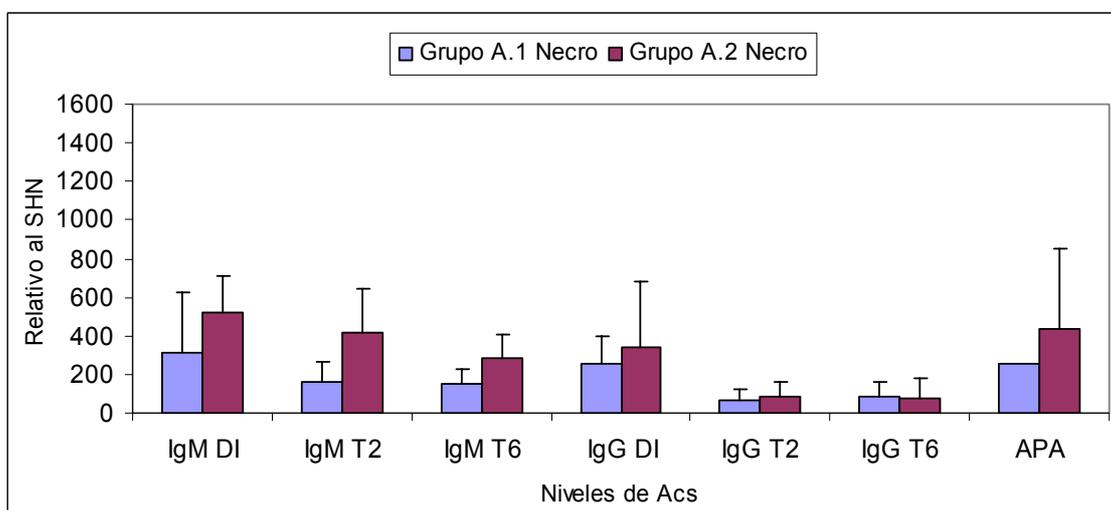


Figura 23: Media del nivel de Acs tipo IgM e IgG anti-αGal DI, T2, T6, y APA, en los sueros de los babuinos de los Grupos A.1 y A.2. **Necro:** necropsia.

Sin embargo, cuando se repitió ese mismo tipo de comparación pero en los sueros del momento de la necropsia no se detectaron diferencias significativas entre los Acs anti-αGal ni APA (Figura 23).

1.3. Niveles de Acs IgM e IgG anti- α Gal y APA en los animales tratados con GAS914

Este grupo, compuesto por 8 babuinos, se dividió a su vez en otros dos, el Grupo B.1 (RVA leve) (n=6) y el Grupo B.2 (n=2) (RVA). La única diferencia entre ellos fue que en los 2 animales del Grupo B.2 en el protocolo de inmunosupresión la dosis de ciclofosfamida fue reducida a la mitad. En este caso se analizaron, del mismo modo que en el grupo anterior, muestras de suero recogidas en tres puntos diferentes del proceso: antes de empezar el tratamiento con GAS914 (PreTto), justo antes de realizar el trasplante (PreTx) y en el momento de la necropsia (Necro) en los animales en conjunto (Tabla 5).

GRUPOS	PreTto						
	IgM DI	IgM T2	IgM T6	IgG DI	IgG T2	IgG T6	APA
B.1	465 ±488,8	544,3±239,5	473,8±245,9	373,3±477,9	528,6±234,3	293,8±245,6	900±424,6
B.2	304,5±140,7	453±65,76	161±12,7	63±43,8	249,5±168,99	141±63,6	685±48,08

GRUPOS	PreTx						
	IgM DI	IgM T2	IgM T6	IgG DI	IgG T2	IgG T6	APA
B.1	166,1±108,6	63,3±34,8	93,8±29,6	39,5±24,1	60,8±53,7	29±18,6	90,3±83,3
B.2	117,5±58,6	96,5±88,3	53,5±10,6	22±19,8	12±2,8	27,5±7,7	47,5±19,1

GRUPOS	Necro						
	IgM DI	IgM T2	IgM T6	IgG DI	IgG T2	IgG T6	APA
B.1	105,3±70,3	32,6±22,1	58,8±35,9	17±16,1	13,5±7,4	10,3±14,9	10,3±109,6
B.2	84±0	32,6±38,9	57±21,2	9±12,7	4±2,8	17±5,7	996±578,4

Tabla 5: Niveles de Acs IgM e IgG anti- α Gal DI, T2, T6 y APA (Media \pm DT) en sueros de los grupos de babuinos B.1 y B.2. **PreTto:** antes del tratamiento. **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

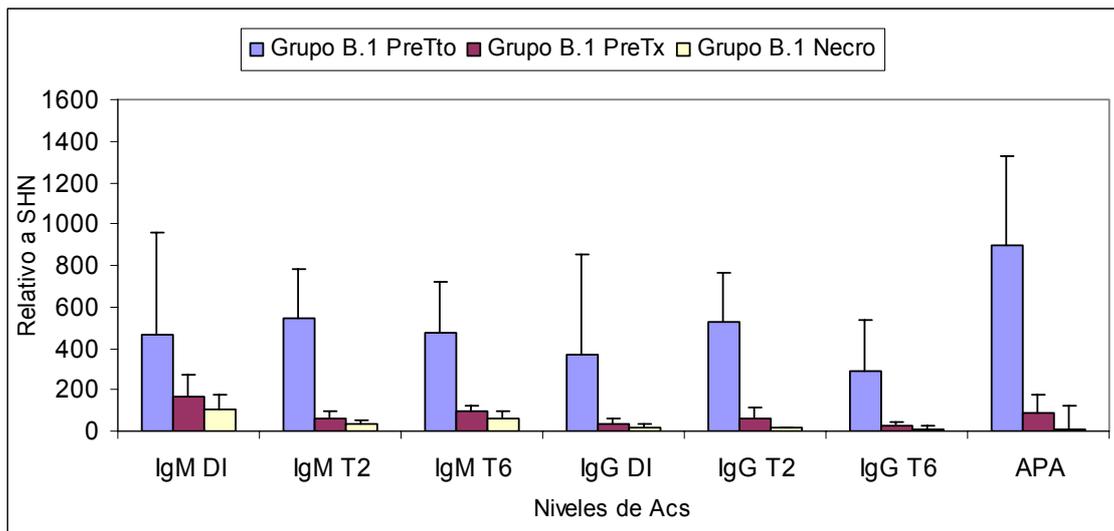


Figura 24: Media del nivel de Acs IgM e IgG anti- α Gal DI, T2, T6 y APA en los sueros de los babuinos del Grupo B.1. Diferencias significativas PreTto-PreTx: IgM DI $p=0,028$, IgM T2 $p=0,028$, IgM T6 $p=0,028$, IgG DI $p=0,028$, IgG T2 $p=0,027$, IgG T6 $p=0,028$ y APA $p=0,028$. Diferencias Pretx-Necro: IgM T6 $p=0,028$, IgG DI $p=0,028$, IgG T2 $p=0,027$ y IgG T6 $p=0,028$. **PreTto:** antes del tratamiento con GAS914. **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

En el Grupo B.1 (RVA leve) se observó un considerable descenso en los niveles de los Acs IgM e IgG anti- α Gal y APA antes del trasplante, que se mantuvieron bajos en el momento de la necropsia con respecto al momento antes de empezar el tratamiento. Se encontraron diferencias significativas en Acs IgM e IgG anti- α Gal DI, T2, T6 y en los APA en los babuinos de este grupo comparando antes del tratamiento con respecto al momento antes del trasplante, y en los Acs IgG anti- α Gal DI, T2, T6 y IgM anti- α Gal T6 si comparamos el momento antes del trasplante con respecto a la necropsia (Figura 24).

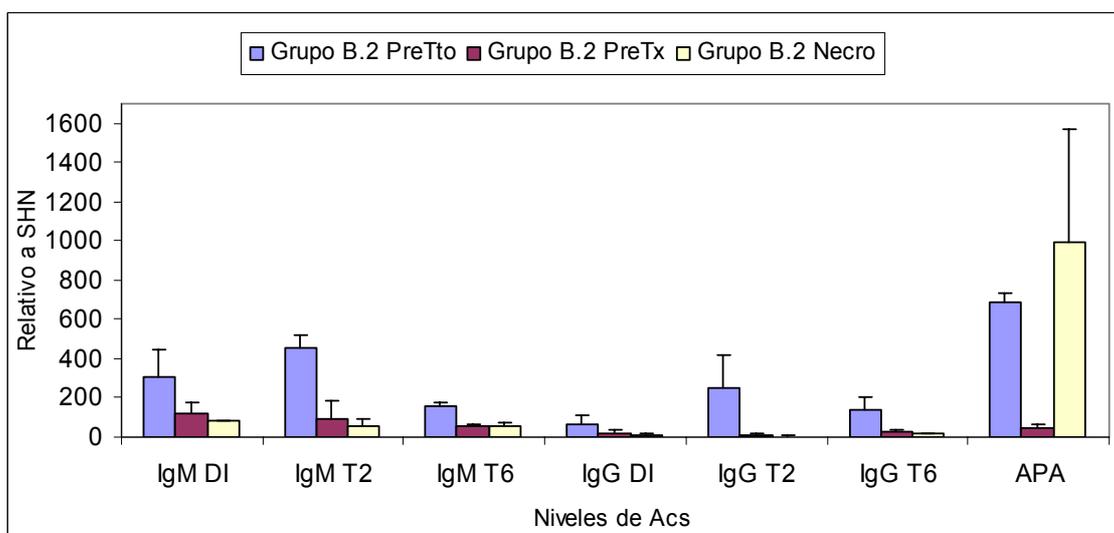
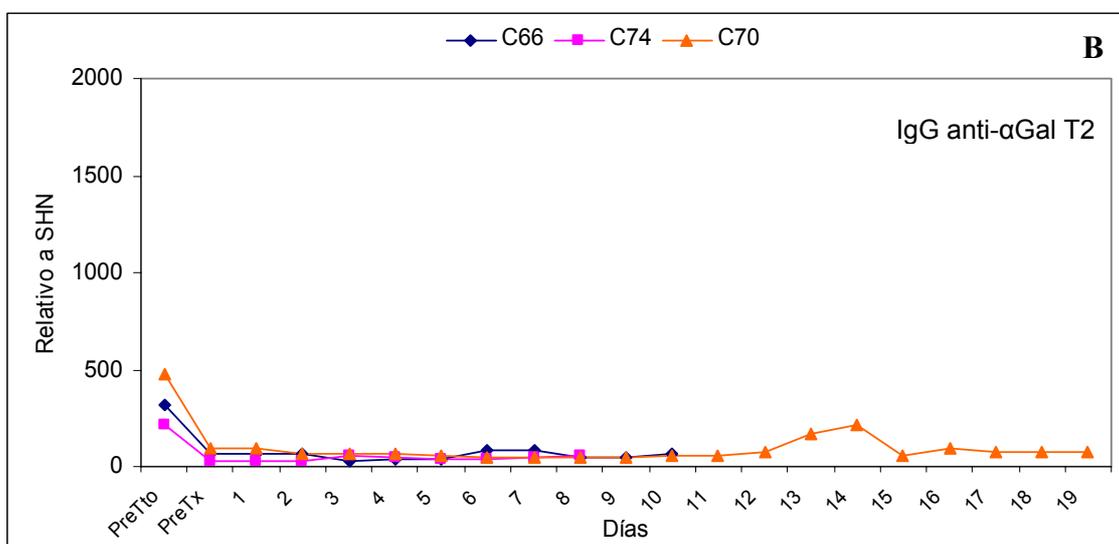
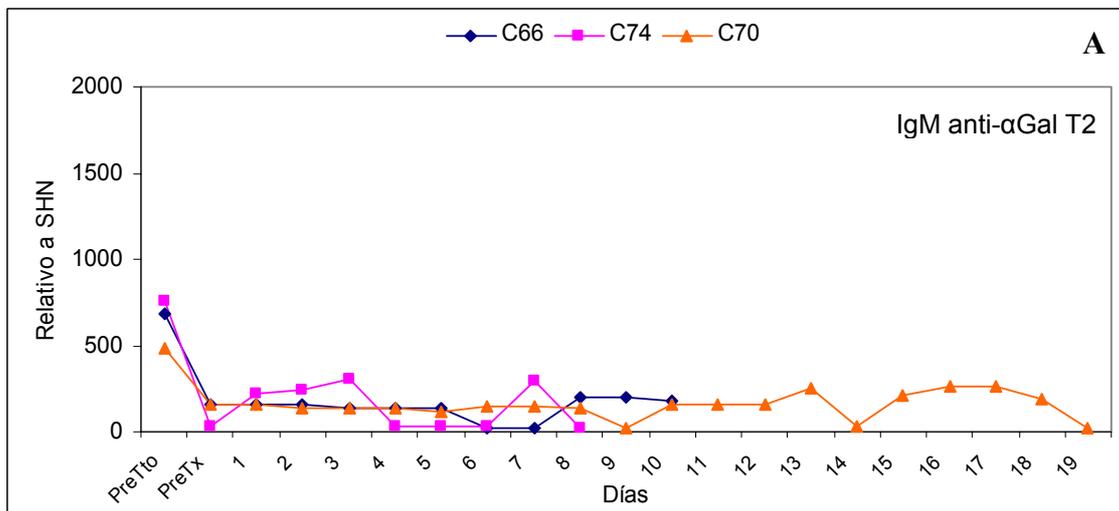


Figura 25: Media del nivel de Acs IgM e IgG anti- α Gal DI, T2, T6 y APA en los sueros de los babuinos del Grupo B.2 (GAS914 con RVA). **PreTto:** antes del tratamiento con GAS914. **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

No se detectaron diferencias significativas en los babuinos tratados con GAS914 del Grupo B.2 (RVA), entre los distintos tiempos a los que se recogieron las muestras de sueros debido al escaso tamaño muestral ($n=2$) aunque cabía esperar que existieran. Sin embargo destacan los niveles de APA antes del tratamiento con respecto al momento antes del trasplante y antes del trasplante con respecto a la necropsia, ya que los niveles descienden de $685 \pm 48,08$ a 48 ± 19 , y se elevan en la necropsia 20 veces más que antes del trasplante, hasta 996 ± 579 en el momento del RVA (Figura 25).

Al igual que para los animales no tratados con GAS914 para analizar de forma más individual los animales del Grupo B.1, se dividieron a su vez en dos grupos de acuerdo a su supervivencia: los de menor supervivencia (C66, C74, C70) y los de mayor supervivencia (C64, C76, D10) y se analizaron los Acs IgM e IgG anti- α Gal T2 y APA.



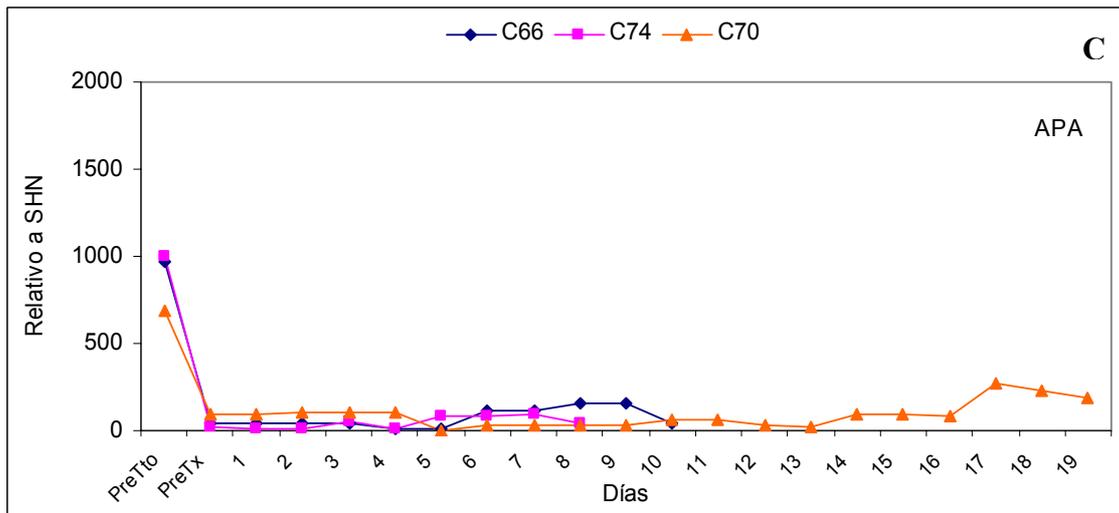
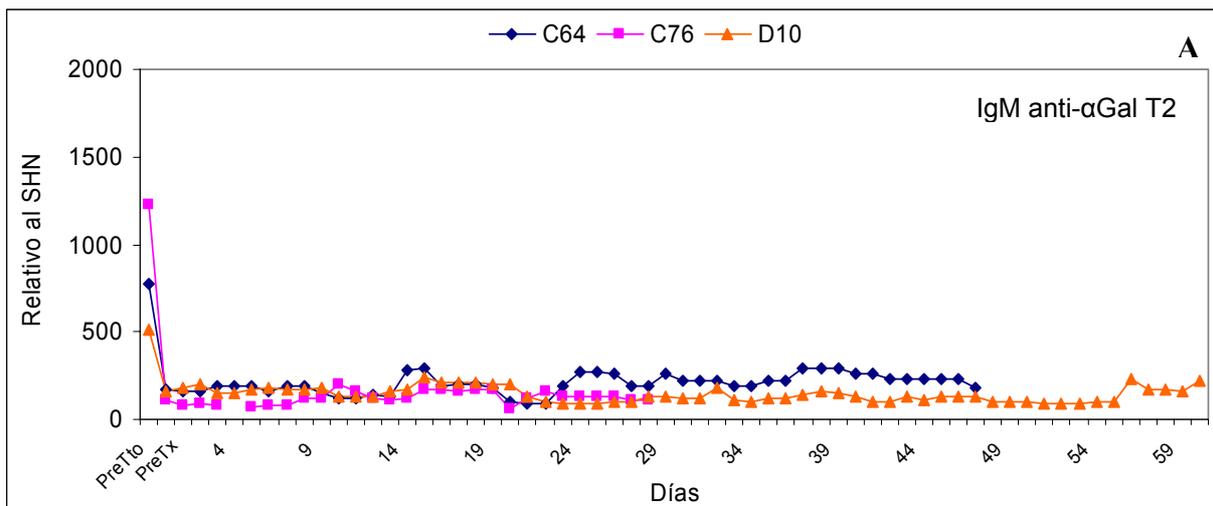


Figura 26: Evolución de los niveles de Acs IgM anti- α Gal T2 (A), IgG anti- α Gal T2 (B) y APA (C) a lo largo del tiempo del trasplante en los sueros de los babuinos de menor supervivencia del Grupo B.1 (RVA leve). **PreTx:** antes del trasplante.

En los babuinos C66, C74, C70 con menor supervivencia del Grupo B.1, los niveles antes del trasplante de Acs IgM e IgG y APA descendieron un 82,38%, 82,09% y 94,28% respectivamente comparándolos con los valores basales antes del tratamiento con GAS914, tras el trasplante se mantuvieron bajos y constantes diariamente hasta el momento de la necropsia en el que los niveles de Acs IgM e IgG y APA descendieron un 35,5%, 1,03% y 32,63% respectivamente con respecto a los niveles antes del trasplante (Figura 26 A, B y C).



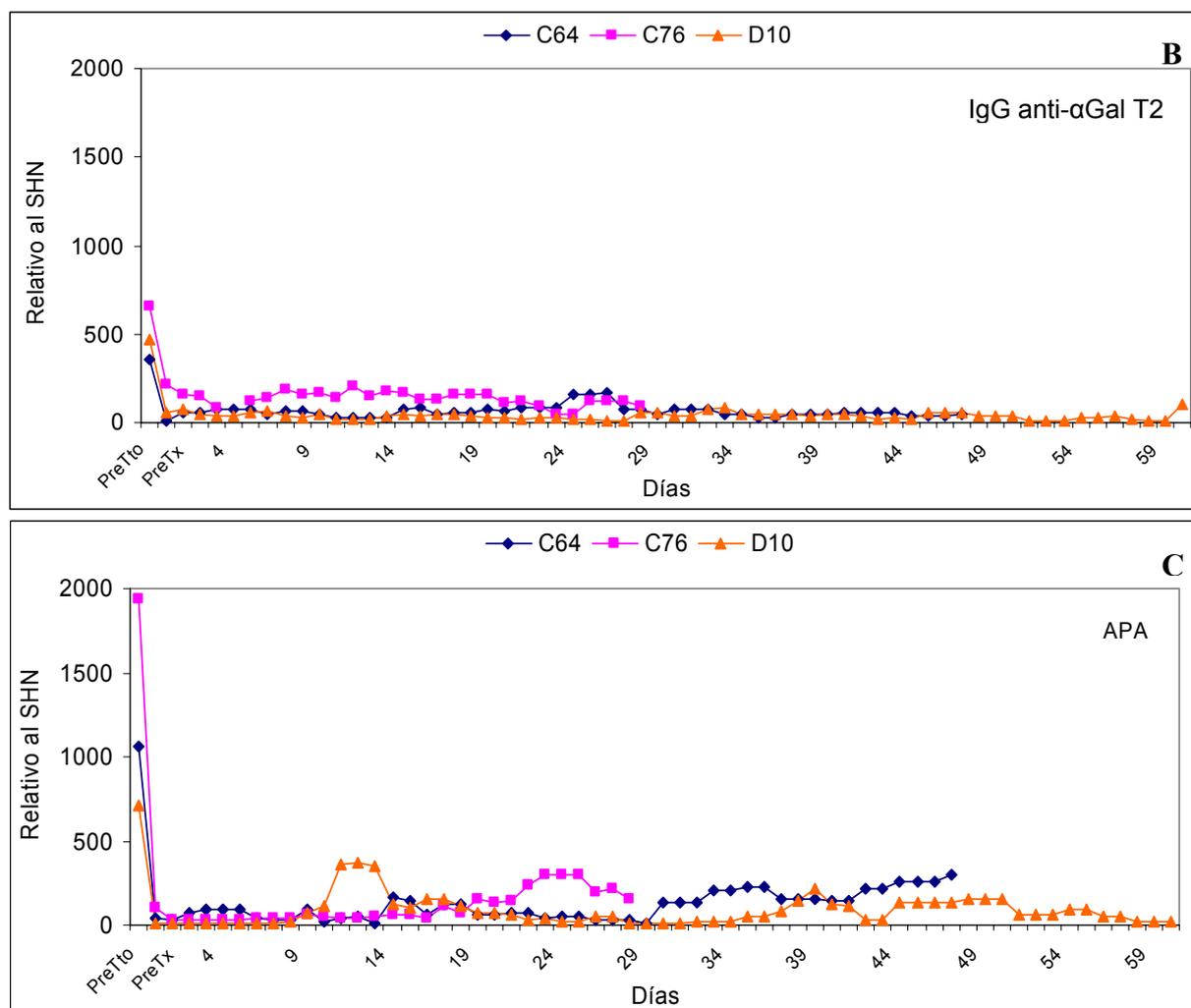


Figura 27: Evolución de los niveles de Acs IgM anti- α Gal T2 (A), IgG anti- α Gal T2 (B) y APA (C) a lo largo del tiempo del trasplante en los sueros de los babuinos de mayor supervivencia del Grupo B.1 (RVA leve). **PreTx:** antes del trasplante.

Se obtuvieron los mismos resultados al analizar los babuinos C64, C76, D10 del Grupo B.1 (RVA leve) con mayor supervivencia, los niveles de Acs IgM e IgG y APA antes del trasplante descendieron un 82,36%, 81,19% y 95,87% respectivamente, tras el trasplante se mantuvieron también bajos y constantes diariamente hasta el momento de la necropsia en el que los Acs IgM y APA aumentaron un 15,02% y 302% respectivamente, y los niveles de IgG descendieron un 46% (Figura 27 A, B y C).

También se analizaron de forma individual los niveles de Acs anti- α Gal IgM, IgG y APA en los babuinos del Grupo B.2 a lo largo del tiempo del trasplante.

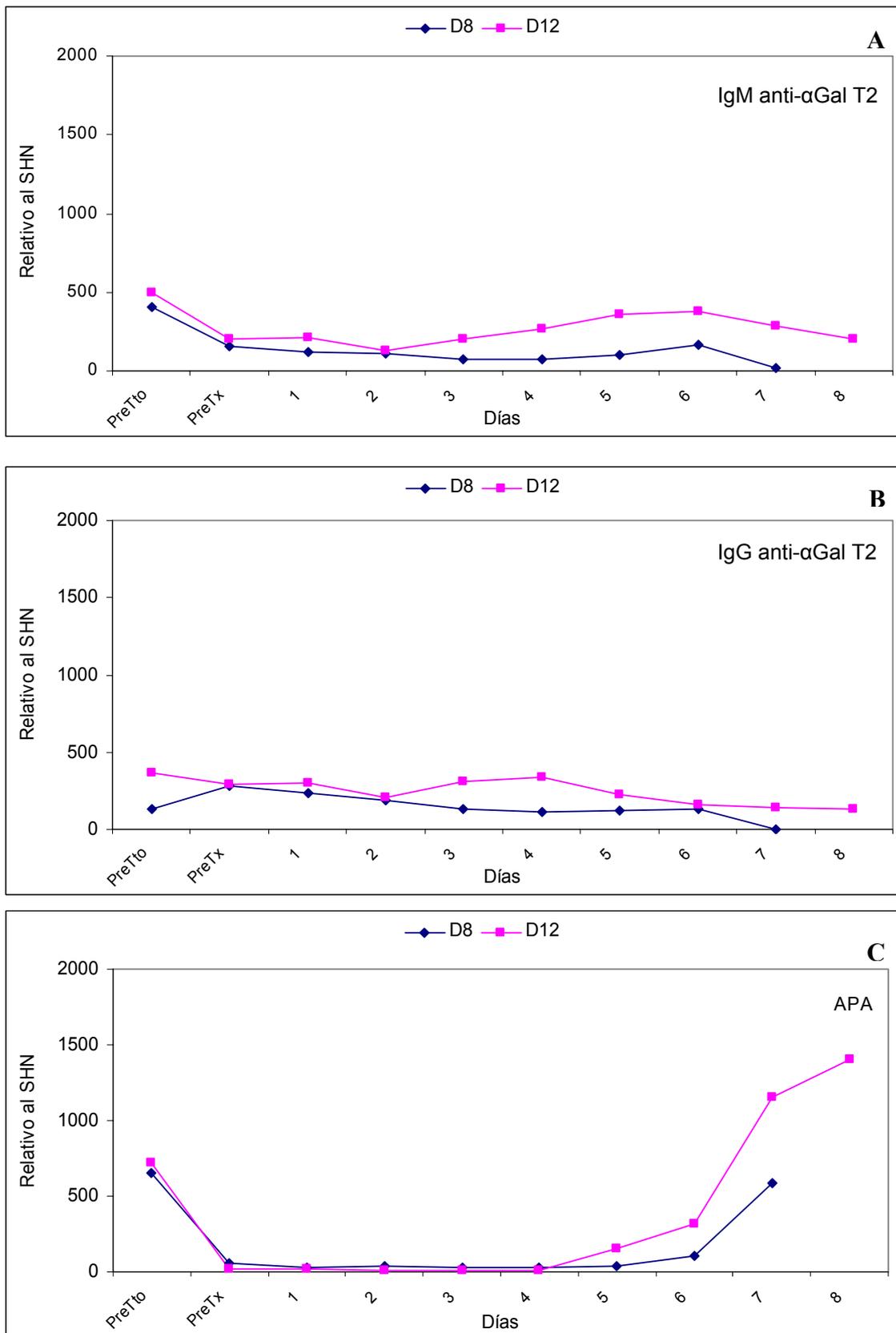


Figura 28: Evolución de los niveles de Acs IgM anti- α Gal T2 (A), IgG anti- α Gal T2 (B) y APA (C) a lo largo del tiempo del trasplante en los sueros de los babuinos del Grupo B.2 (RVA). **PreTx:** antes del trasplante.

En los babuinos D8 y D12 del Grupo B.2 (RVA), los Acs anti- α Gal IgM e IgG se mantuvieron bajos y constantes a lo largo de los días tras el trasplante hasta el momento de la necropsia, sin embargo los APA aunque al principio se mantuvieron constantes, aumentaron desde el día 4 tras el trasplante, hasta el momento de la necropsia (Figura 28 A, B y C), lo que confirma los resultados mostrados anteriormente en la figura 25, en el momento de la necropsia. Cuando se analizaron los datos del grupo B.2 en conjunto, los niveles de Acs IgM anti- α Gal T2 descendieron desde el momento antes del tratamiento hasta el momento antes del trasplante un 95,19%, los niveles de Acs IgG anti- α Gal T2 un 78% y los APA un 93,06%. Los niveles de Acs IgM anti- α Gal T2 desde el momento antes del trasplante hasta la necropsia descendieron un 66,66%, los niveles de Acs IgG anti- α Gal T2 un 65,97% y los APA aumentaron un 1996,84%.

Podríamos por tanto resumir que los datos obtenidos indican que el tratamiento con GAS914 antes del trasplante redujo el nivel de Acs en el momento del trasplante tanto en los Acs APA como de los IgM e IgG anti- α Gal DI, TRI2 y TRI6. En el grupo B.1 no se observó ningún incremento en el nivel de ninguno de estos Acs en el momento de la muerte del animal o del fracaso del xenoinjerto. De igual forma en el grupo B.2 no se encontró ningún cambio en el momento del RVA comparado con el nivel en el momento del trasplante para ambos tipos de Acs IgM e IgG anti- α Gal DI, TRI2 y TRI6. Sin embargo en este grupo se observó un incremento considerable de los Acs APA.

1.4. Diferencias en los niveles de Acs IgM e IgG anti- α Gal y APA en los animales no tratados y tratados con GAS914

Para poder comparar los resultados obtenidos en ambos grupos y analizar si existían diferencias entre animales no tratados y tratados con GAS914, se compararon los niveles de Acs IgM e IgG anti- α Gal DI, T2, T6 tipo y APA antes del trasplante y en el momento de la necropsia en animales del Grupo A.2 (No GAS914, RVA) y del Grupo B.1 (GAS914, RVA leve), al ser estos dos grupos los más homogéneos pues tienen un tamaño muestral similar y sólo se diferencian en el tratamiento o no con GAS914.

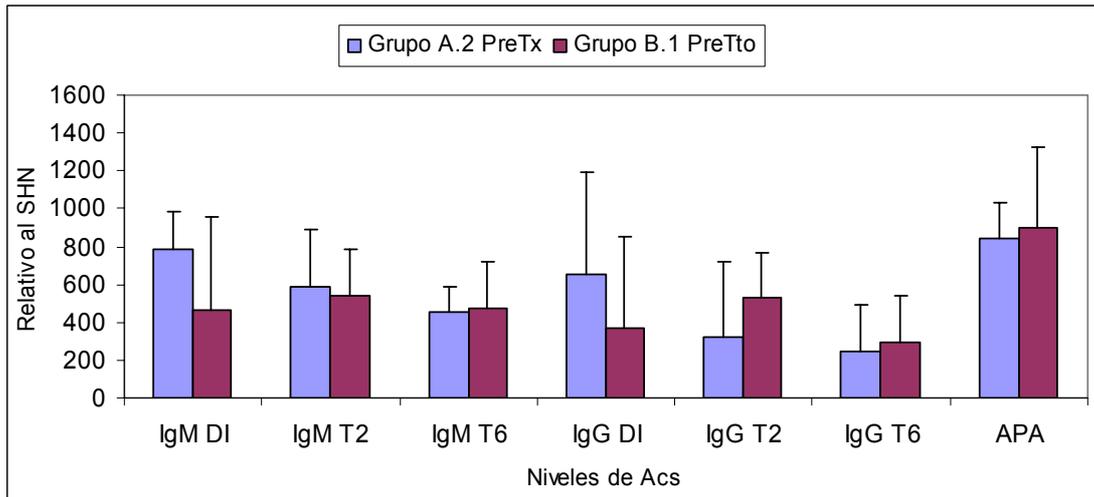


Figura 29: Media del nivel de Acs tipo IgM e IgG anti- α Gal DI, T2, T6 y APA en los sueros de los babuinos del Grupo A.2 y Grupo B.1. **PreTto:** antes del tratamiento. **PreTx:** antes del trasplante.

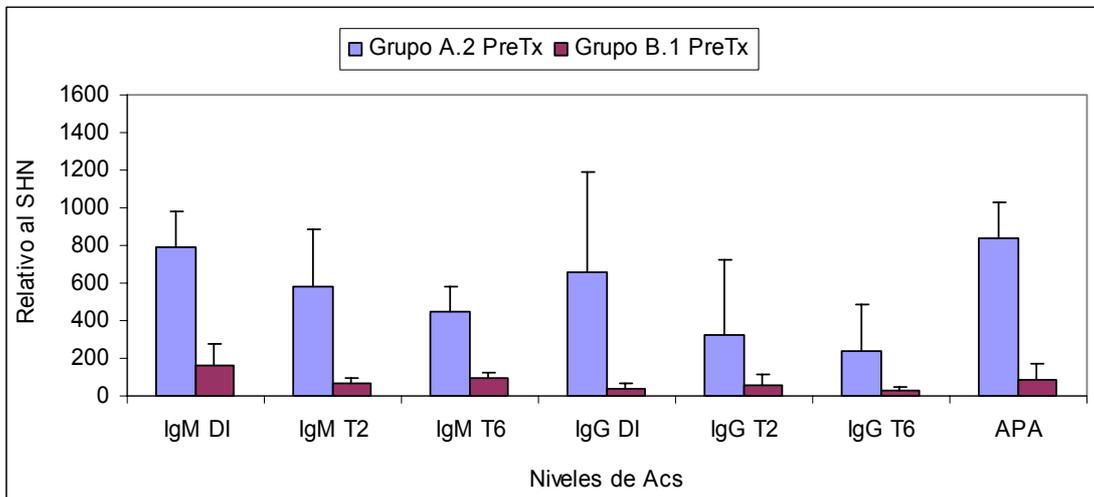


Figura 30: Media del nivel de Acs tipo IgM e IgG anti- α Gal DI, T2, T6 y APA en los sueros de los babuinos del Grupo A.2 y Grupo B.1. IgM DI ($p=0,002$), IgM T2 ($p=0,002$), IgM T6 ($p=0,002$), IgG DI ($p=0,003$), IgG T6 ($p=0,01$) y APA ($p=0,002$). **PreTx:** antes del trasplante.

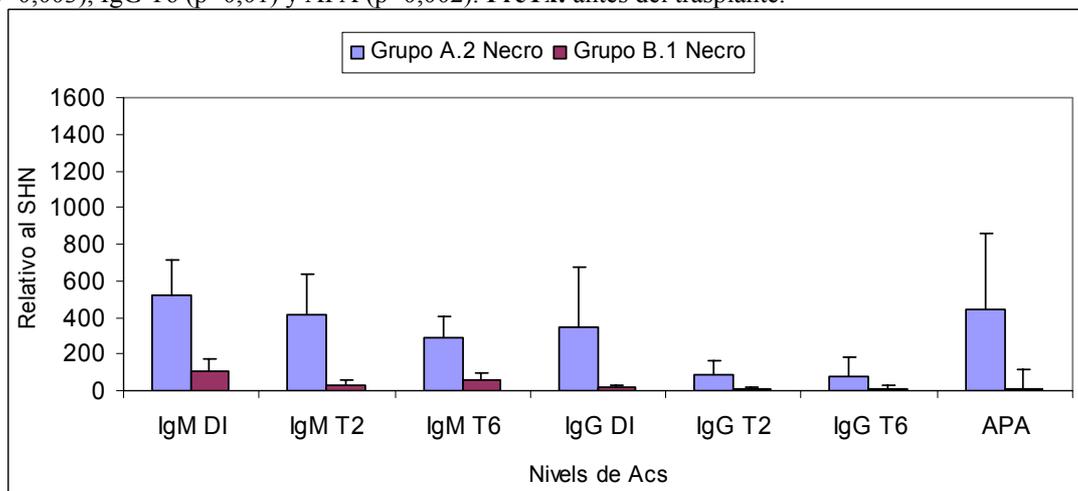


Figura 31: Media del nivel de Acs tipo IgM e IgG anti- α Gal DI, T2, T6 y APA en los sueros de los babuinos del Grupo A.2 y Grupo B.1. IgM DI ($p=0,002$), IgM T2 ($p=0,002$), IgM T6 ($p=0,002$), IgG DI ($p=0,003$) y IgG T6 ($p=0,031$). **Necro:** necropsia.

Cuando comparamos los datos de los sueros de los babuinos de los grupos A.1 y B.2 antes del trasplante y en el pretratamiento, respectivamente, no encontramos diferencias significativas entre ellos (Figura 29). Sin embargo si hacemos esta comparación con los niveles de Acs antes del trasplante, claramente fueron más elevados en el caso del Grupo A.2, existiendo diferencias significativas entre ellos para los Acs IgG anti- α Gal DI, T6 y IgM anti- α Gal DI, T2, T6 y APA, debido al tratamiento de los animales del Grupo B.1 con GAS914. En el momento de la necropsia como es de esperar los niveles de Acs también fueron más elevados en el caso del Grupo A.2 que en el grupo B.1 tratado con GAS914 existiendo diferencias significativas entre ellos para los Acs IgG anti- α Gal DI, T6 y IgM anti- α Gal DI, T2, T6 (Figuras 30 y 31). Todos los resultados en conjunto indican que el tratamiento de los babuinos receptores de un xenoinjerto porcino con el inmunosupresor GAS914 es muy eficaz para disminuir los niveles de Acs anti- α Gal y APA tanto antes como después del trasplante.

1.5. Nivel de Acs anti-CMSP de cerdo, L35 y AOC-40 en los animales no tratados y tratados con GAS914

Para analizar el nivel de Acs totales anti-células porcinas, no únicamente anti- α Gal, los sueros de los babuinos de los cuatro grupos se incubaron con diferentes tipos de células porcinas y el reconocimiento antigénico de los xenoAcs presentes en los sueros se determinó por citometría de flujo. En estos experimentos se analizaron sólo los Acs de tipo IgM, porque experimentos previos de este tipo en el laboratorio habían demostrado que eran los mayoritarios y ya que los de tipo IgG se encontraban a menores niveles permaneciendo bastante estables a lo largo del tiempo tras el xenotrasplante.

En el ensayo, los diferentes tipos de células (CMSP, L35 y AOC-40) se incubaron con los sueros de los babuinos recogidos en diferentes momentos antes del tratamiento con GAS914 (sólo en los grupos B.1 y B.2) (PreTto), antes del trasplante (PreTx) y en el momento de la muerte del animal (Necro). Posteriormente se incubaron con un Ac secundario IgM marcado con FITC. Se analizaron las distintas muestras en un citómetro de flujo con el programa CellQuest que nos dio como resultado la mediana de la intensidad de fluorescencia y los resultados que se presentan son las medias de 3-4 experimentos. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 12.0 utilizando el test de U de Mann-Whitney para comparar los niveles en los diferentes tiempos dentro de un grupo y para comparar los niveles de un tiempo determinado entre

dos grupos de animales (apartado 9 de Materiales y Métodos).

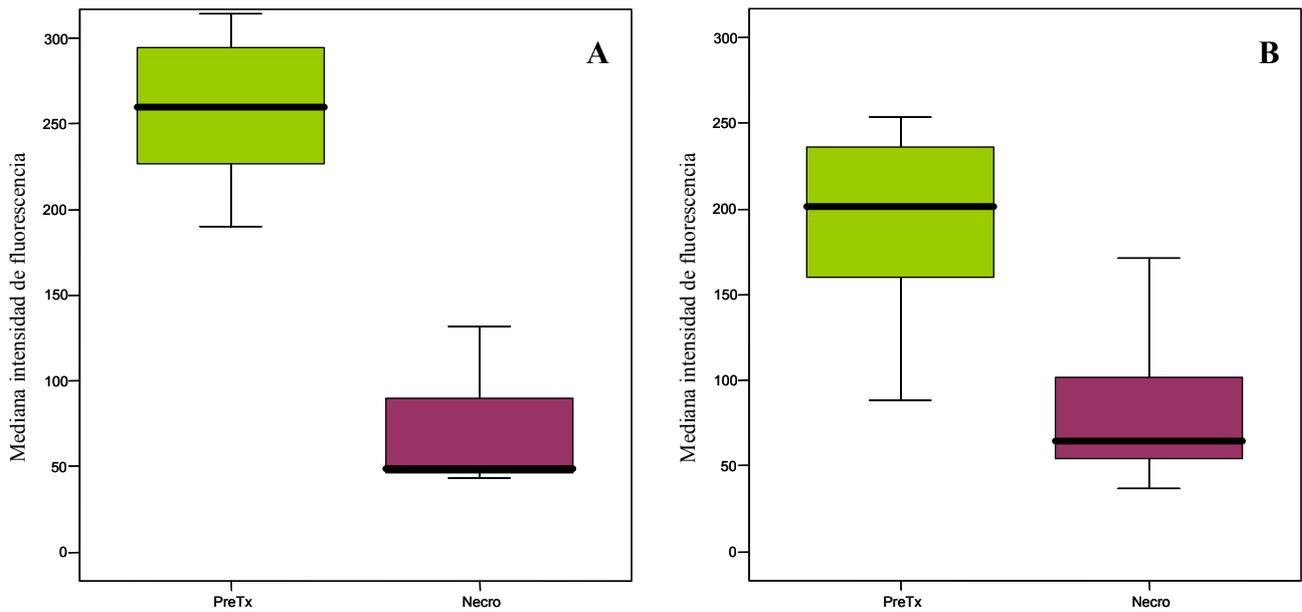


Figura 32: Nivel de Acs anti CMSP porcinas en babuinos del Grupo A.1 (A) y del Grupo A.2 (B) ($p=0,0156$). **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

En el caso de las CMSP porcinas con los sueros de los animales del Grupo A.1, no se detectaron diferencias significativas en el nivel de Acs antes y después del trasplante, probablemente debido a que el tamaño muestral es pequeño ($n=3$) (Figura 32A). En animales del Grupo A.2 si existieron diferencias altamente significativas en el nivel de Acs de este tipo antes y después del trasplante (Figura 32B).

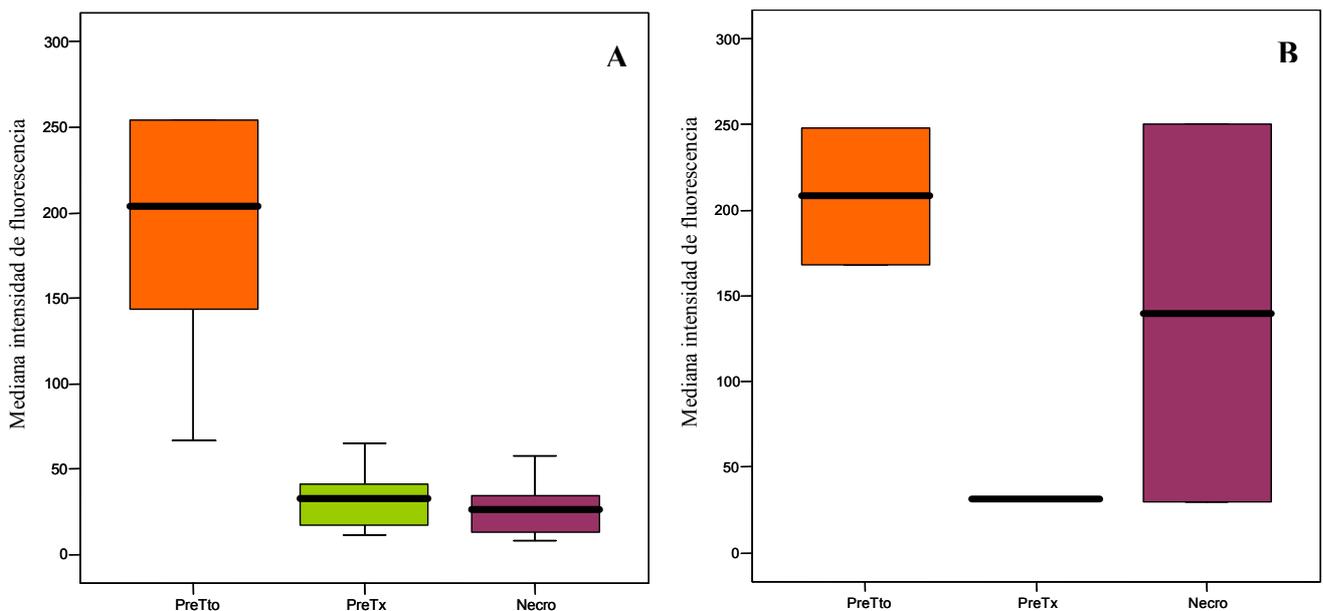


Figura 33: Nivel de Acs anti CMSP porcinas en babuinos del Grupo B.1 (PreTto-PreTx, $p=0,0312$) (A) y Grupo B.2 (B). **PreTto:** antes del tratamiento con GAS914. **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

Del mismo modo en animales del Grupo B.1 tratados con GAS914 se detectaron diferencias significativas en descenso notable del nivel de Acs anti-CSMP entre el momento antes del tratamiento con el punto antes del trasplante. Cuando se comparan los niveles de Acs antes del trasplante con el momento de la necropsia los niveles permanecen muy bajos y las diferencias no son significativas (Figura 33A). En el Grupo B.2 aunque las diferencias no son significativas los niveles bajan entre el momento antes del tratamiento y antes del trasplante y estos niveles parecen subir en el momento de la necropsia pero esto no es correcto probablemente debido a que se trata sólo de 2 animales (Figura 33B).

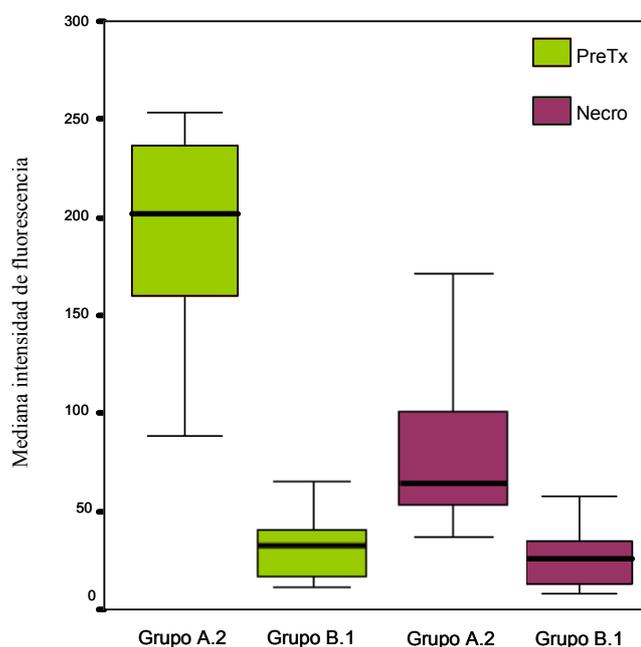


Figura 34: Nivel de Acs anti-CSMP porcinas en babuinos del Grupo A.2 y Grupo B.1 (PreTx $p=0,001$) (Necro $p=0,008$). **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

Al igual que en el caso de los específicos para anti- α Gal y los APA, se compararon los niveles de los Acs anti-CSMP entre los animales no tratados y tratados con GAS914 (no se incluyó el punto antes del tratamiento). Al comparar los niveles de estos Acs entre animales de los Grupos A.2 y B.1, se vio que existían diferencias significativas entre ellos tanto antes de trasplante como en el momento de la necropsia, siendo en ambos casos más bajos en el Grupo B.1 que en el Grupo A.2 (Figura 34).

Como las CMSP contienen diversos tipos celulares (linfocitos T y B, monocitos) quisimos estudiar si los Acs que observamos frente a las CMSP totales iban dirigidos a la población mayoritaria que es la de linfocitos T, para ello usamos la línea celular L35.

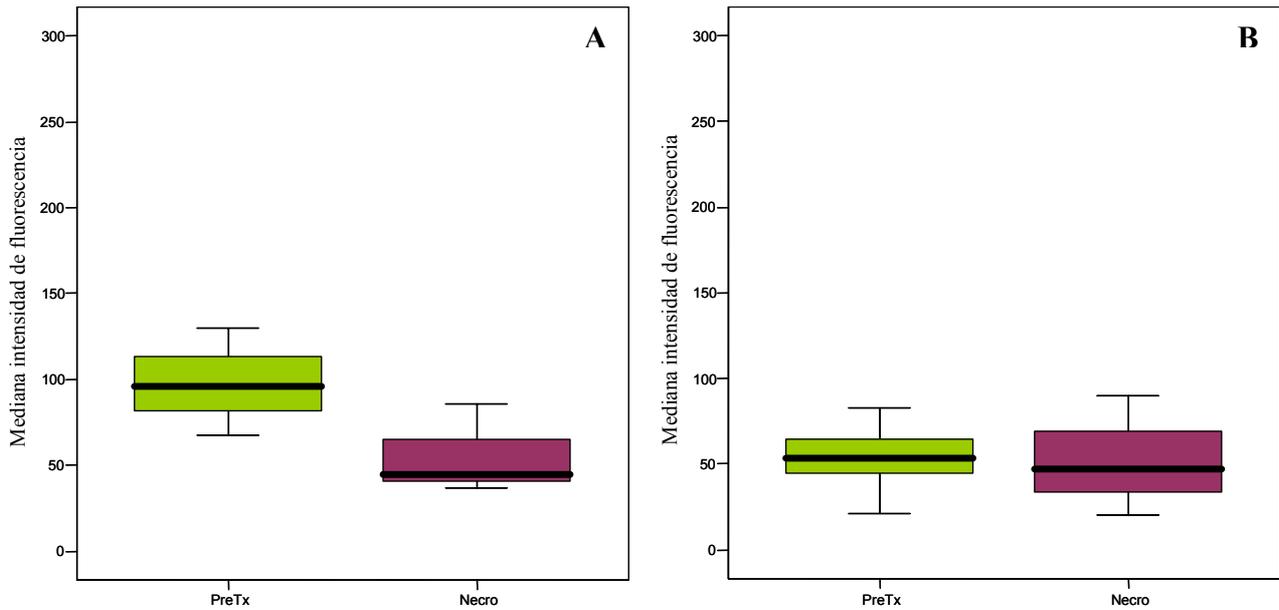


Figura 35: Nivel de Acs anti L35 en babuinos del Grupo A.1 (A) y del Grupo A.2 (B). **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

En el caso de la línea celular L35 los resultados obtenidos mostraron que ni en el Grupo A.1 (Figura 35A) ni en el Grupo A.2 (Figura 35B) existían diferencias significativas en los niveles de Acs antes y después del trasplante.

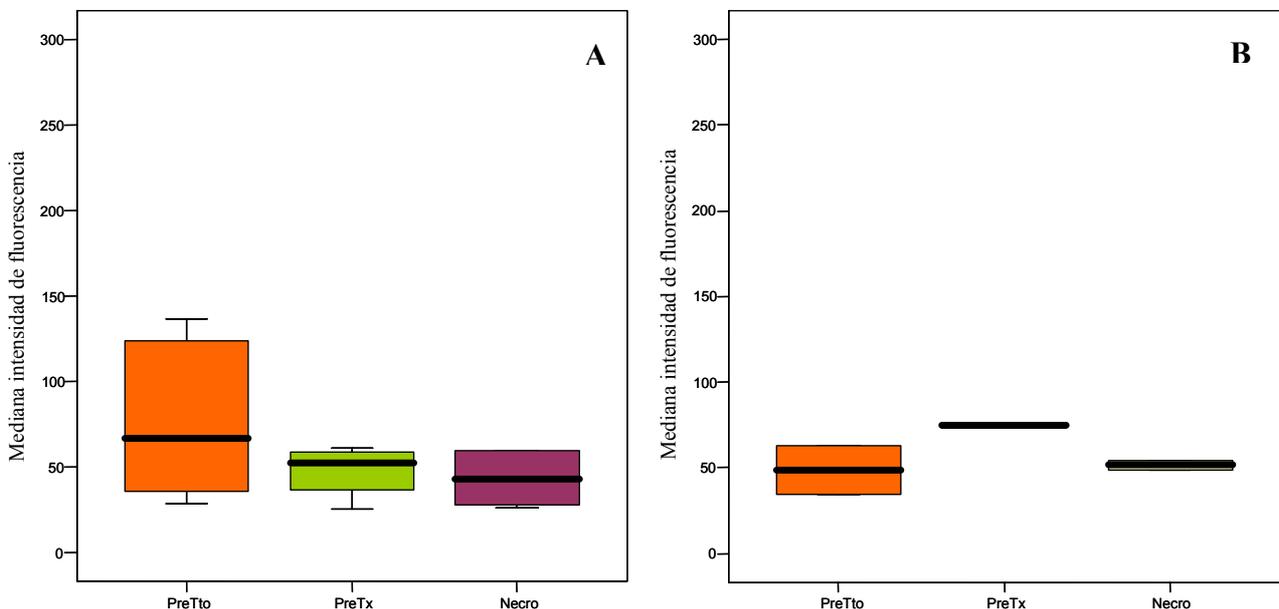


Figura 36: Nivel de Acs anti L35 en babuinos del Grupo B.1 (PreTto-PreTx, $p=0,0312$) (A) y Grupo B.2 (B). **PreTto:** antes del tratamiento con GAS914. **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

Sin embargo, en el Grupo B.1 existen diferencias significativas en los niveles de Acs antes del tratamiento, que descendieron antes del trasplante. Cuando se comparan los niveles de Acs antes del trasplante con los niveles en el momento de la necropsia éstos

también descendieron aunque las diferencias no son significativas (Figura 36A). En el Grupo B.2 no existían diferencias significativas entre los distintos puntos de recogida de los sueros (Figura 36B).

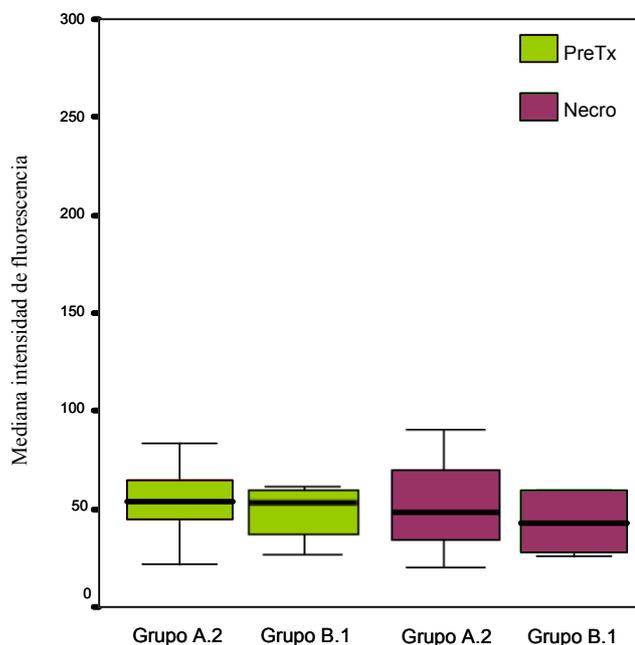


Figura 37: Nivel de Acs L35 en babuinos del Grupo A.2 y Grupo B.1 **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

Se compararon también los niveles de Acs antes del trasplante y en el momento de la necropsia entre animales del Grupo A.2 y animales del Grupo B.1 y no se detectaron diferencias significativas (Figura 37).

Todos estos resultados sugieren que aunque entre los Acs anti-CMSP totales hay Acs específicos de las células T (L35) éstos no parecen ser mayoritarios. Además, las diferencias obtenidas entre los puntos antes del tratamiento y antes del trasplante en los animales del grupo B.1 indican que el GAS914 también es capaz de eliminar este tipo de Acs.

De igual modo quisimos analizar si algunos de los Acs presentes en los sueros reconocían antígenos presentes en las células endoteliales porcinas, ya que éstas son las que están más en contacto con los sueros de los receptores y son las células atacadas por los Acs y el complemento en el momento del rechazo del injerto, para ello empleamos la línea celular AOC-40.

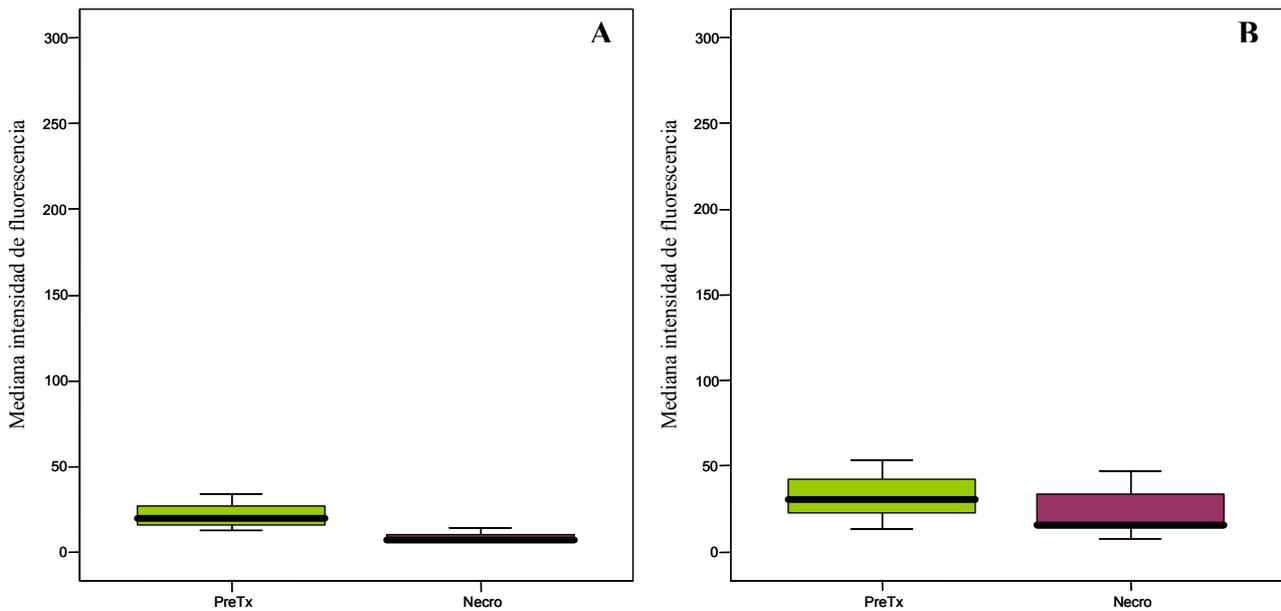


Figura 38: nivel de Acs anti células endoteliales porcinas en babuinos del Grupo A.1 (A) y del Grupo A.2 (B). **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

En el caso de la línea celular AOC-40, los resultados obtenidos mostraron que ni en el Grupo A.1 (Figura 38A) ni en el Grupo A.2 (Figura 38B) existían diferencias significativas en el nivel de Acs antes y después del trasplante.

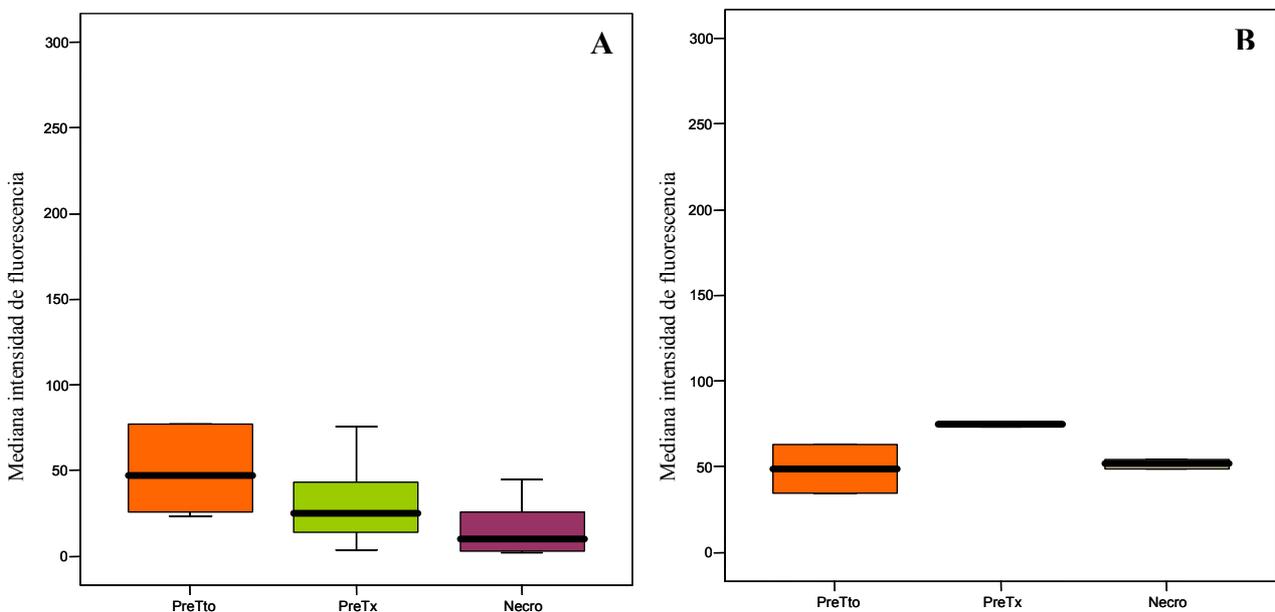


Figura 39: Nivel de Acs anti células endoteliales porcinas en babuinos del Grupo B.1 (PreTto-PreTx, $p=0,0312$) (A) y Grupo B.2. **PreTto:** antes del tratamiento con GAS914. **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

Sin embargo, al igual que con las L35, en el Grupo B.1 los niveles de Acs antes del tratamiento descendieron con respecto al momento antes del trasplante siendo estas diferencias significativas. Cuando se compararon los niveles de Acs antes del trasplante con respecto al momento de la necropsia, las diferencias no eran significativas (Figura 39A). En el Grupo B.2 no existieron diferencias significativas (Figura 39B).

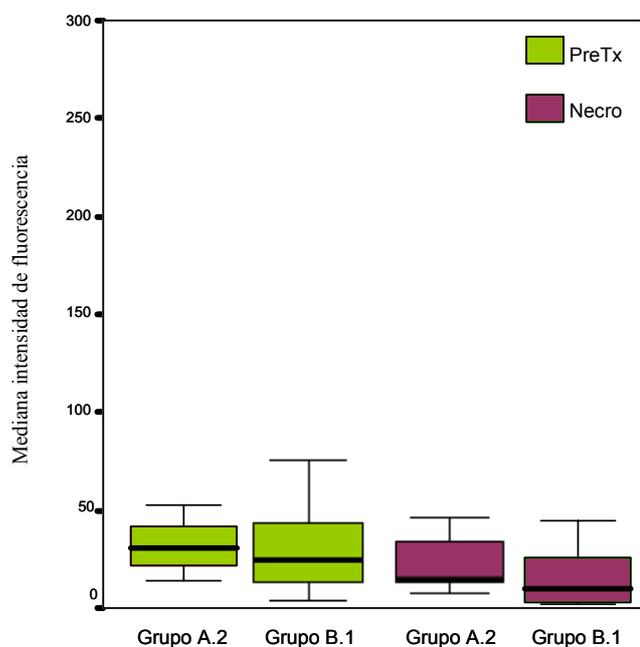


Figura 40: Nivel de Acs anti células endoteliales porcinas en babuinos del Grupo A.2 y Grupo B.1. **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

También se calculó si existían diferencias significativas en el nivel de Acs antes del trasplante y en el momento de la necropsia en el Grupo A.2 y en el Grupo B.1, y no se detectaron (Figura 40). Por tanto no parecía que los Acs de los sueros estuviesen dirigidos tampoco mayoritariamente a las células endoteliales.

En resumen cuando se analizaron los niveles de Acs anti-CMSP en todos los grupos disminuyeron tras el trasplante hasta la necropsia, en el caso de los Grupos A.1 y B.2 las diferencias no eran significativas probablemente debido al pequeño tamaño muestral de ambos grupos. Cuando se compararon los grupos A.2 y B.1, se observaron diferencias significativas tanto antes del trasplante como en la necropsia siendo más bajos niveles en el grupo B.1, esto se pudo deber al tratamiento con GAS914. Sin embargo, cuando se analizaron los niveles de Acs anti-L35 no existían diferencias significativas en ninguno de los grupos excepto en el grupo B.1 entre los niveles antes del tratamiento y antes del trasplante también debido al efecto del GAS914. A la vista de estos resultados podríamos decir que la mayoría de los Acs anti-CMSP no van dirigidos frente a linfocitos T, carecíamos de una línea celular equivalente de linfocitos B de cerdo para comprobar si iban dirigidos a este tipo de células. En el caso de los niveles de Acs anti células endoteliales sucede lo mismo que en el caso anterior y es que sólo existían

diferencias significativas para el Grupo B.1 antes del tratamiento con respecto al momento antes del trasplante, debido probablemente al efecto del tratamiento con GAS914. En todos estos resultados pude influir también la diferencia de expresión de los antígenos celulares, entre las diferentes células empleadas.

1.5.1. Acs inducidos no anti- α Gal en los animales tratados con GAS914

Los resultados obtenidos indicaban que el GAS914 disminuye drásticamente los niveles tanto de los xenoAcs anti- α Gal DI, T2 y T6 tanto de tipo IgM como IgG antes y después del trasplante. Sin embargo, en el caso particular de los dos animales del Grupo B.2, parecía que los Acs citotóxicos con otras especificidades pueden ser inducidos después del trasplante. Por ello, para tratar de estudiar frente a qué tipo de estructuras estaban dirigidos estos Acs aparentemente no anti- α Gal, en este grupo el estudio de los xenoAcs anti-células porcinas fue más exhaustivo y se analizó de forma individual la reactividad de los sueros a lo largo del xenotrasplante y para ello se escogieron sueros antes del tratamiento con GAS914, antes del trasplante y diariamente hasta el momento de la necropsia.

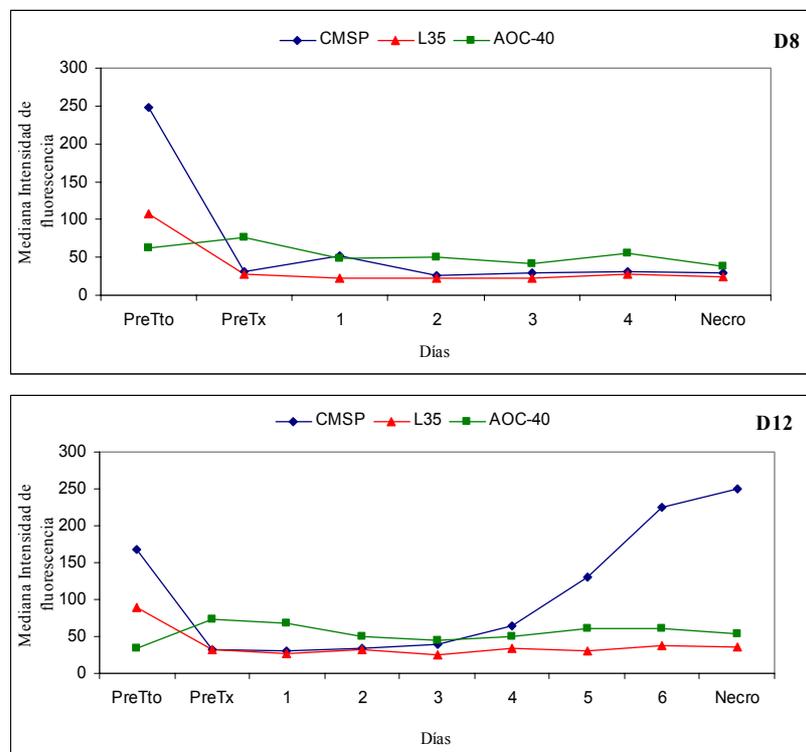


Figura 41: Nivel de Acs anti CMSP, L35 y AOC-40 en los sueros de los babuinos del Grupo B.2. **PreTto:** antes del tratamiento con GAS914. **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

En los resultados se puede observar que tanto en el D8 como en el D12, los niveles de Acs descendieron inmediatamente después del trasplante en los sueros de los babuinos cuando se enfrentaron a los tres tipos celulares. Tras el trasplante se mantuvieron los niveles bajos y constantes hasta el momento de la necropsia en el D8, sin embargo en el caso del D12 se observó un aumento de la reactividad al final del xenotrasplante frente a las CMSP que aumentó notablemente en el momento de la necropsia (Figura 41). Estos resultados sugerían que los Acs citotóxicos (posiblemente no anti- α Gal) reconocen moléculas en la superficie de las CMPS que no estaban presentes en las células T ni en las endoteliales. Para saber frente a qué población dentro de las CMSP (linfocitos o monocitos) iban dirigidos los Acs, se realizaron posteriormente citometrías de flujo con los mismos sueros de los babuinos D8 y D12 pero esta vez con sangre total para intentar separar ambas poblaciones. Se analizaron por separado las poblaciones de linfocitos (R1) y monocitos (R2) determinados por parámetros de tamaño y complejidad (Figura 42).

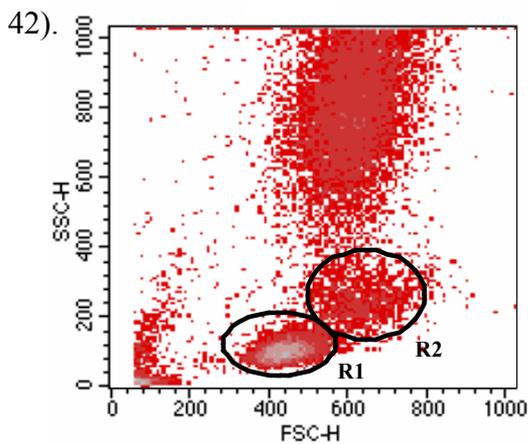


Figura 42: Poblaciones celulares en sangre periférica, linfocitos (R1) y monocitos (R2).

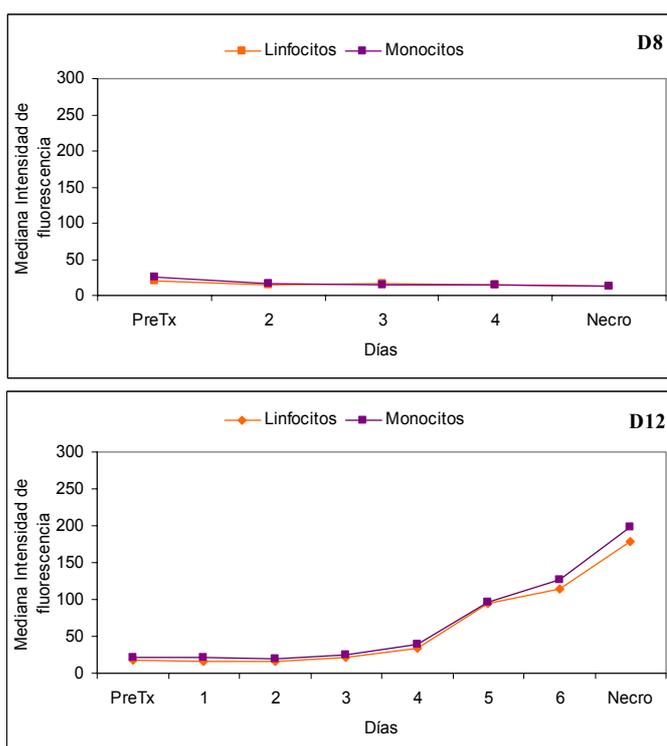


Figura 43: nivel de Acs anti linfocitos y monocitos porcinos de sangre periférica, en babuinos del Grupo B.2. **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

En este caso los niveles de Acs anti-linfocitos y anti-monocitos se mantuvieron constantes y bajos en el D8 como era esperable por los resultados obtenidos en las CMSP totales, pero en el D12 aumentaron mucho en la necropsia tanto para linfocitos como para monocitos, esto sugiere que las moléculas reconocidas por los Acs presentes en los sueros se expresaban en ambos tipos de células (Figura 43), aunque se necesitarían estudios más exhaustivos para saber cuáles.

1.6. Estudio anatomopatológico e inmunohistoquímico de los xenoinjertos en los animales no tratados y tratados con GAS914

En muestras del xenoinjerto obtenidas antes de la reperfusión, 30 minutos después del trasplante y en el momento de la muerte del receptor en todos los animales de cada uno de los grupos, se realizó un estudio anatomo-patológico que incluía el análisis morfológico en microscopía óptica con técnicas rutinarias de hematoxilina-eosina y estudio inmunohistoquímico para investigar la presencia de depósitos de IgM, IgG, C3, C4, C5b-9 y fibrina, así como la expresión del transgen hDAF y de CD31 (marcador de células endoteliales) como control positivo. Se muestran los resultados de un animal representativo de cada grupo.

1.6.1. Análisis anatomopatológico

Los injertos mostrados son del momento de la necropsia para determinar el grado de rechazo sufrido. Se realizó mediante una técnica de hematoxilina-eosina:

1. En el caso del babuino perteneciente al Grupo A.1 (C60), se muestra una histopatología de un miocardio transversal con necrosis celular, zonas con edemas, extravasación sanguínea, edema intersticial y adelgazamiento de las fibras. Las células de Purkinje necrosadas, trombosis vascular que incluye hemorragia intersticial, edema, trombosis, necrosis y apoptosis de cardiomiocitos, eosinofilia y nucleomegalia, características del RHA (Figura 44A).
2. En el caso del babuino perteneciente al Grupo A.2 (B41), en el endotelio se observan niveles altos de retracción, los trombos son organizados y pegados al endotelio tanto de fibrina como de plaquetas, nucleomegalia, ruptura, separación, grandes depósitos de fibrina, plaquetas. En el intersticio se ven muchas zonas de edema, y con mucha hemorragia. En el miocardio se observa alta eosinofilia,

pérdida de la capa basal, separación celular en el endotelio, ruptura, apoptosis y alto índice de necrosis, características de RVA (Figura 44B).

3. En el caso del babuino del Grupo B.1 (D10), menos necrosis celular (parece necrosis grasa) y edema que en los casos anteriores, fibras de colágeno, infiltración neutrofílica, edema, cierto grado de eosinofilia de las fibras, apoptosis, separación del endotelio, nucleomegalia, no se observó hemorragia extravascular, ni trombos de fibrina o plaquetas, que indicaría un RVA muy atenuado (Figura 44C).
4. En un babuino del Grupo B.2 (D12) en el momento de la necropsia se observó extravasación sanguínea (hemorragia), zonas de edema, niveles altos de retracción, trombos de fibrina, agregación plaquetaria, núcleos picnóticos (apoptosis), macrófagos y necrosis del miocardio, nucleomegalia, ruptura, separación de las fibras eosinofilia, características del RVA similar al babuino del grupo A.2 (Figura 44D).

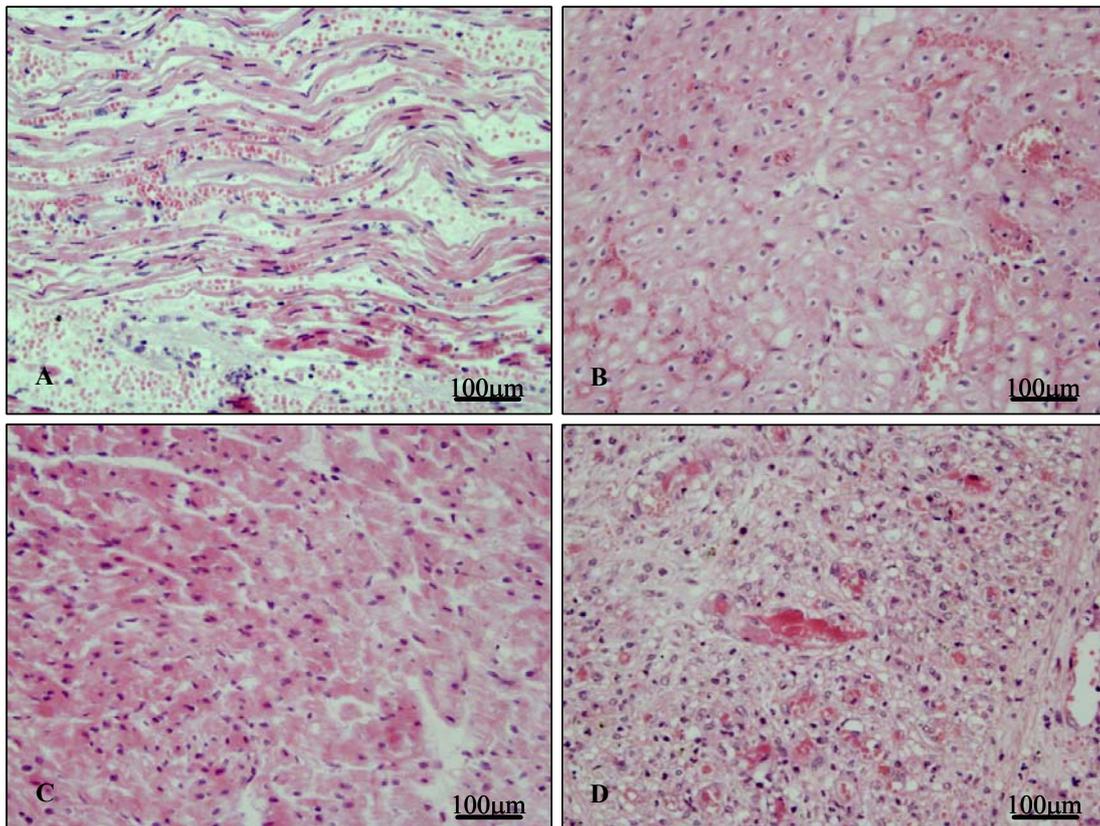


Figura 44: Hematoxilina-eosina en los xenoinjertos trasplantados A) babuino Grupo A.1 (C60), B) babuino Grupo A.2 (B41), C) babuino Grupo B.1 (D10) y D) babuino Grupo B.2 (D12), en el momento de la necropsia del receptor.

1.6.2. Análisis inmunohistoquímico

Babuinos no tratados con GAS914

1.- Grupo A.1: En general, los tres babuinos del Grupo A.1 mostraron las características típicas del RHA que se muestran en la figura correspondiente al babuino C60. En la biopsia tomada a este babuino C60 (Grupo A.1) antes del trasplante no se observaron depósitos de IgG, IgM C3, C4, C5b-9 ni fibrina (Figura 45). En la biopsia tomada 30 minutos después del trasplante ya se observaron depósitos de IgG, C5b-9; aunque pocos depósitos de IgM, C3, C4 y fibrina (Figura 46). En la biopsia del mismo babuino tomada en el momento de la necropsia, se observó un aumento significativo de los depósitos de IgG, IgM, C3, C5b-9; pocos depósitos de C4 y fibrina (Figura 47). En las biopsias correspondientes a los tres tiempos analizados hDAF se expresa en todas las células, lo que indica la presencia del transgen y CD31 se expresa en las células endoteliales, lo que sirve de marcador de los vasos y al mismo tiempo de control positivo de la técnica.

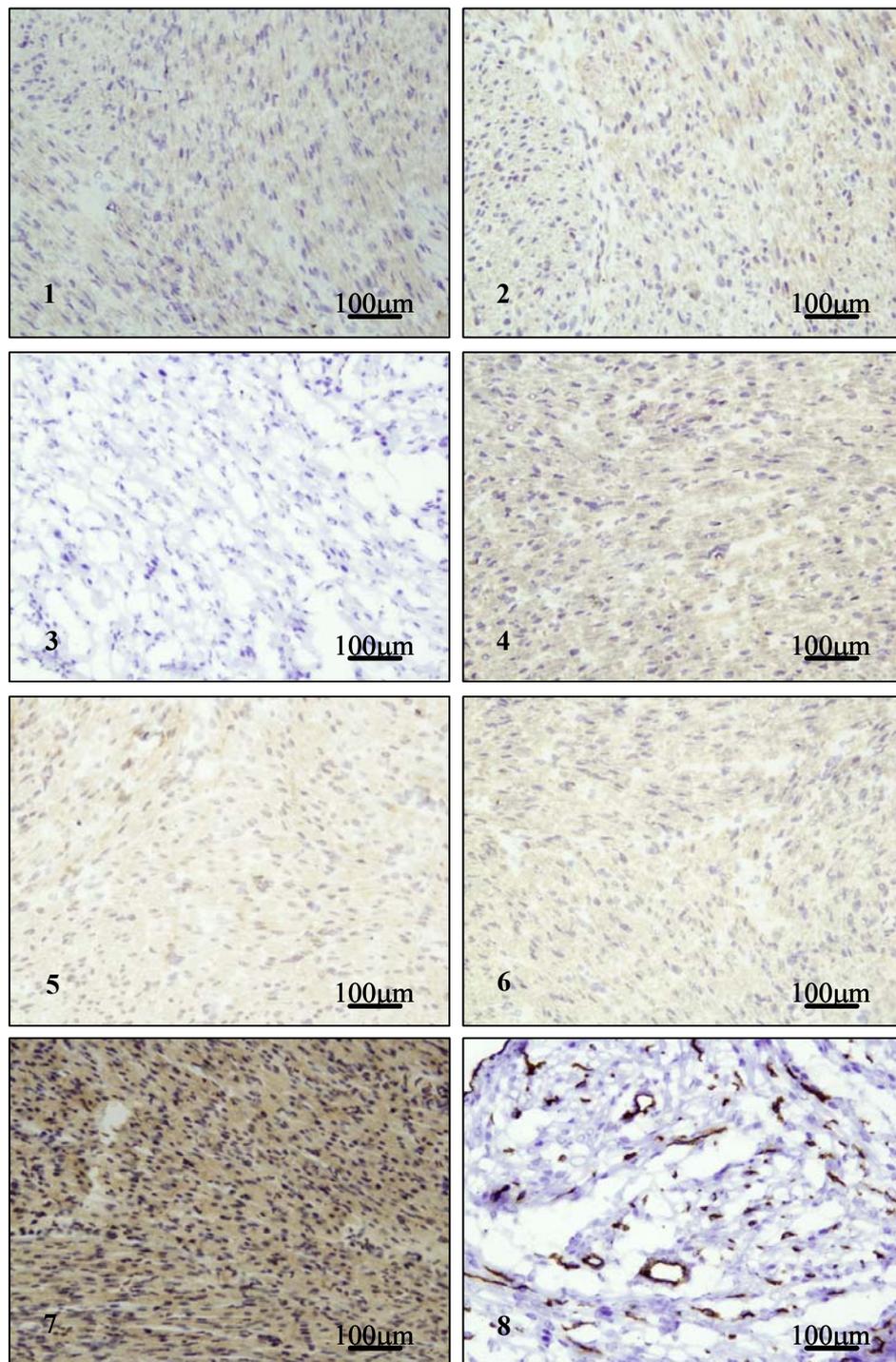


Figura 45: Inmunopatología de una biopsia de un xenoinjerto porcino hDAF trasplantado en el babuino C60 obtenida antes del trasplante, 1.-IgG, 2.-IgM, 3.-C3, 4.-C4, 5.-C5b-9, 6.-Fibrina, 7.-hDAF, 8.-CD31.

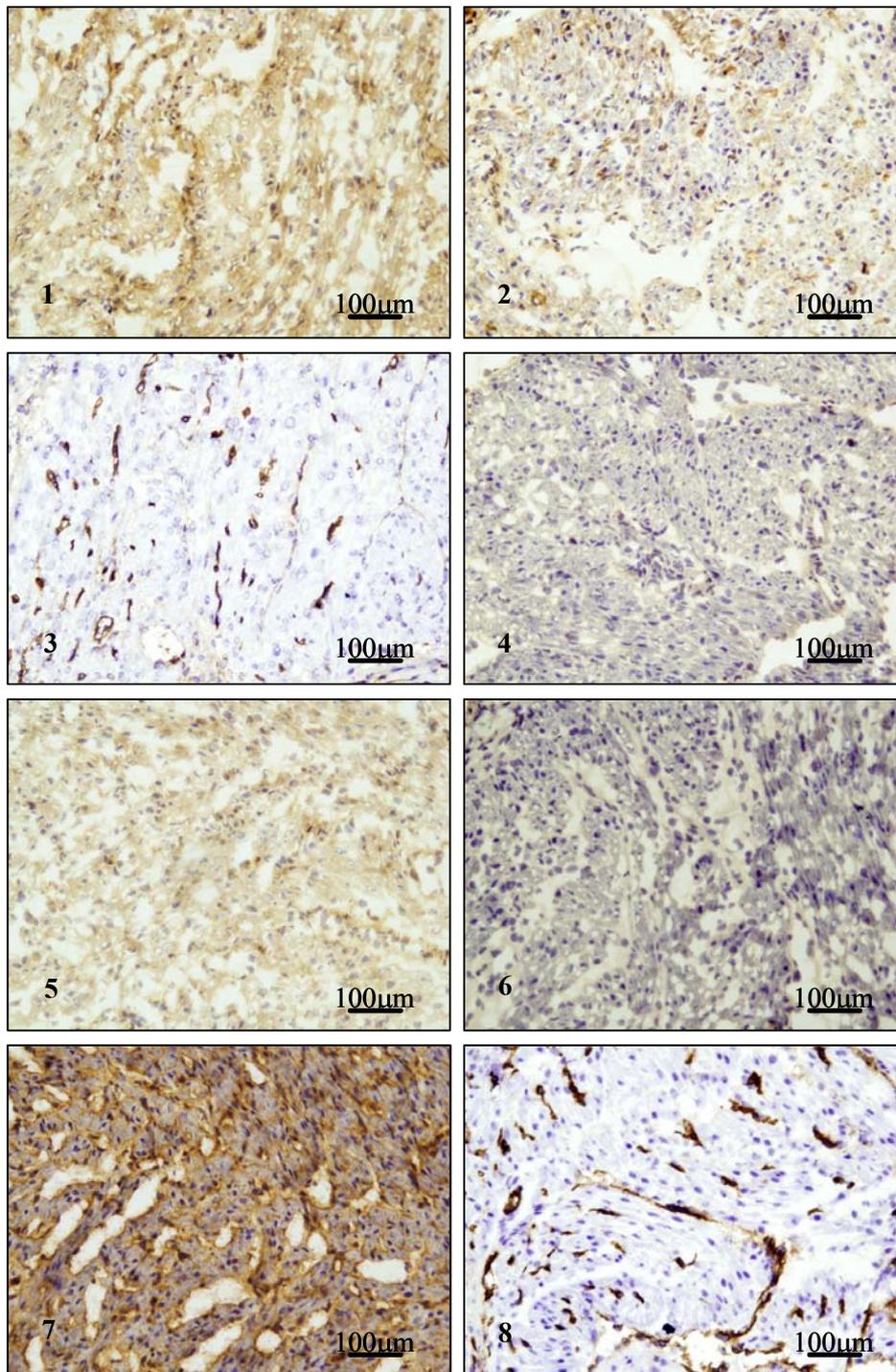


Figura 46: Inmunopatología de una biopsia de un xenoinjerto porcino hDAF trasplantado en el babuino C60 obtenida 30 minutos después del trasplante. 1.-IgG, 2.-IgM, 3.-C3, 4.-C4, 5.-C5b-9, 6.-Fibrina, 7.-hDAF, 8.-CD31.

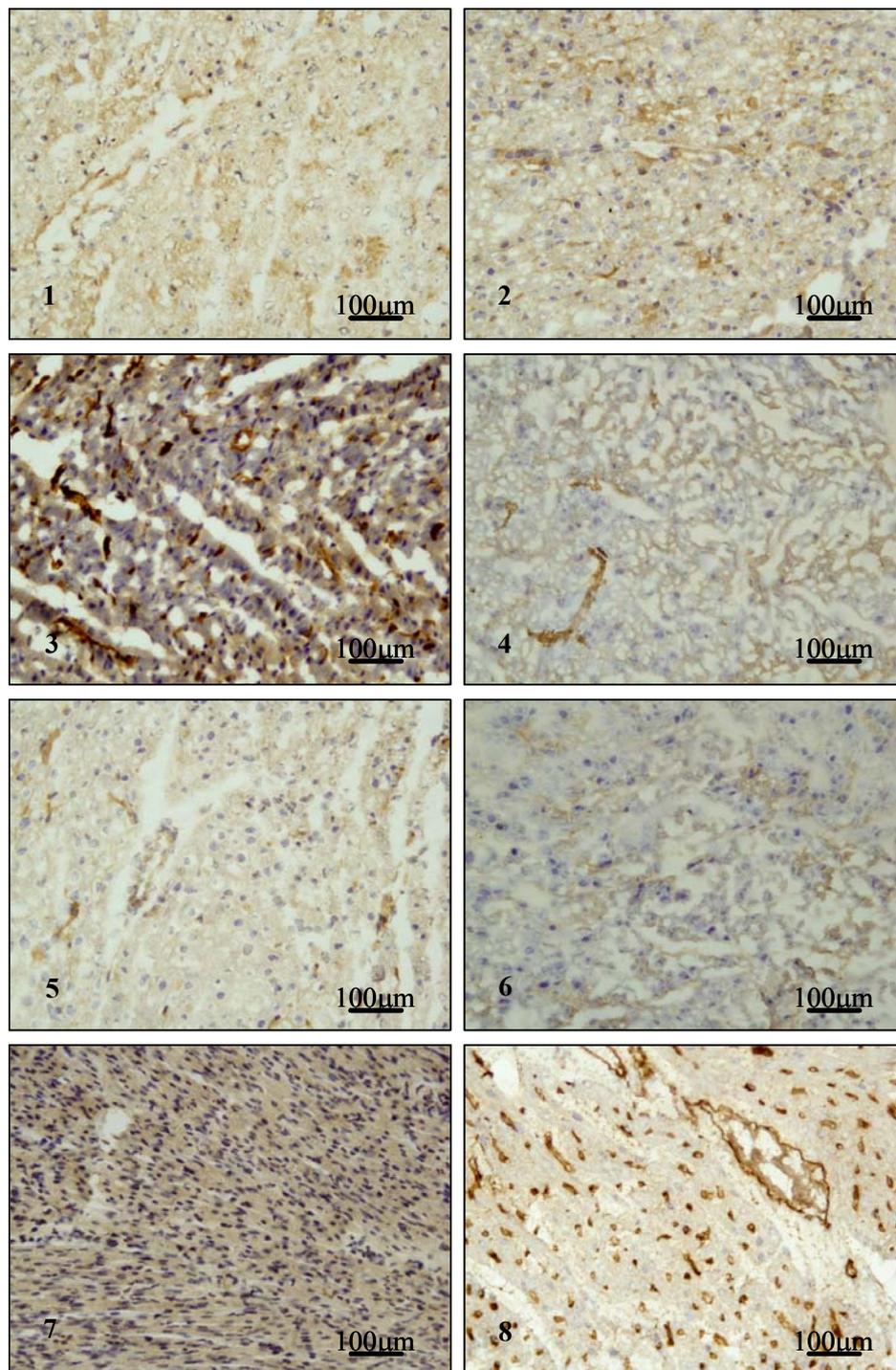


Figura 47: Inmunopatología de una biopsia de un xenoinjerto porcino hDAF trasplantado en el babuino C60 obtenida en el momento de la necropsia. 1.-IgG, 2.-IgM, 3.-C3, 4.-C4, 5.-C5b-9, 6.-Fibrina, 7.-hDAF, 8.-CD31.

2.- Grupo A.2: Los siete animales pertenecientes al Grupo A.2 sobrevivieron más de 10 días. En la biopsia tomada del babuino representativo B41 (Grupo A.2) antes del trasplante se observaron unos pocos depósitos de IgG (debido, probablemente, a la manipulación de la biopsia) ningún depósito de IgM, C3, C4, C5b-9 y fibrina (Figura 48). En la biopsia tomada 30 minutos después del trasplante se observaron depósitos de IgG, IgM, C3, C4, pocos depósitos de fibrina y ningún depósito de C5b-9 (Figura 49). El injerto obtenido en la autopsia el día 29 (cuando el animal murió tras cesar los latidos del corazón), mostró una imagen similar, se observaron depósitos de IgM, aunque menos de IgG, C3, C4, C5b-9 y fibrina (Figura 50). En todos los casos al igual que en el babuino del grupo A.1 se expresaron tanto el transgen hDAF en todas las células, como CD31 en los vasos.

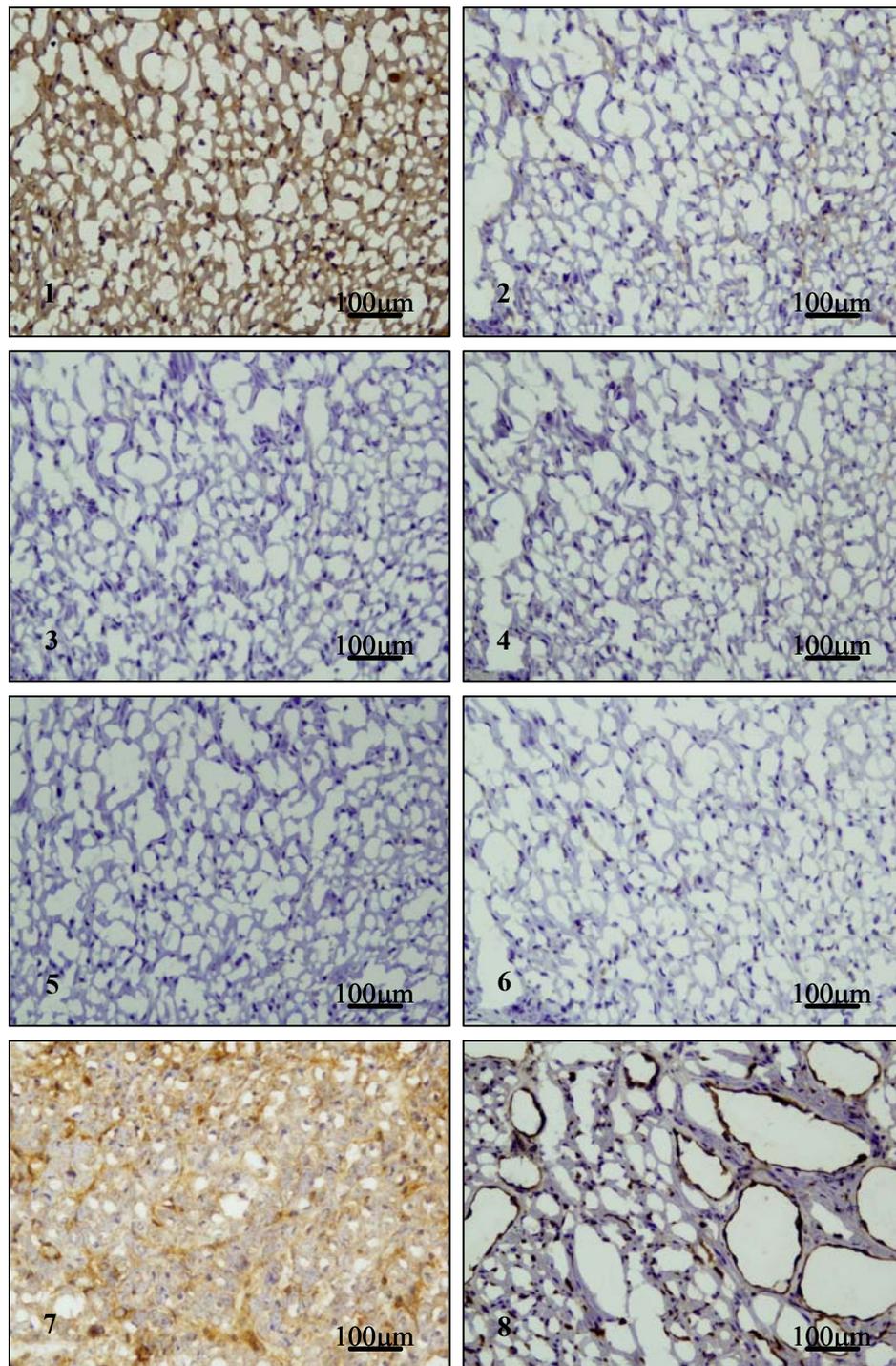


Figura 48: Inmunopatología de una biopsia de un xenoinjerto porcino hDAF trasplantado en el babuino B41 obtenida antes del trasplante, 1.-IgG, 2.-IgM, 3.-C3, 4.-C4, 5.-C5b-9, 6.-Fibrina, 7.-hDAF, 8.-CD31.

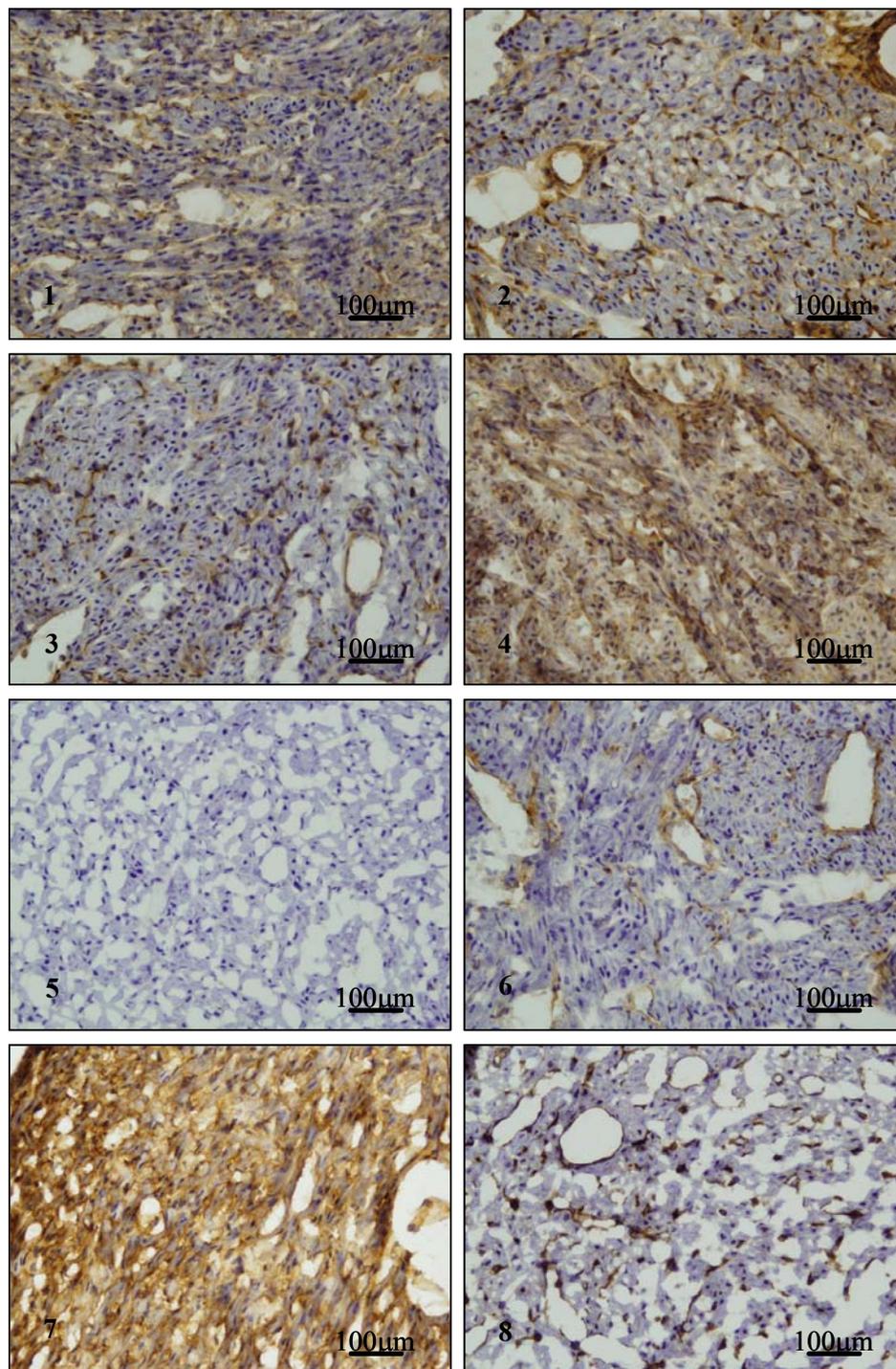


Figura 49: Inmunopatología de una biopsia de un xenoinjerto porcino hDAF trasplantado en el babuino B41 obtenida 30 minutos después del trasplante. 1.-IgG, 2.-IgM, 3.-C3, 4.-C4, 5.-C5b-9, 6.-Fibrina, 7.-hDAF, 8.-CD31.

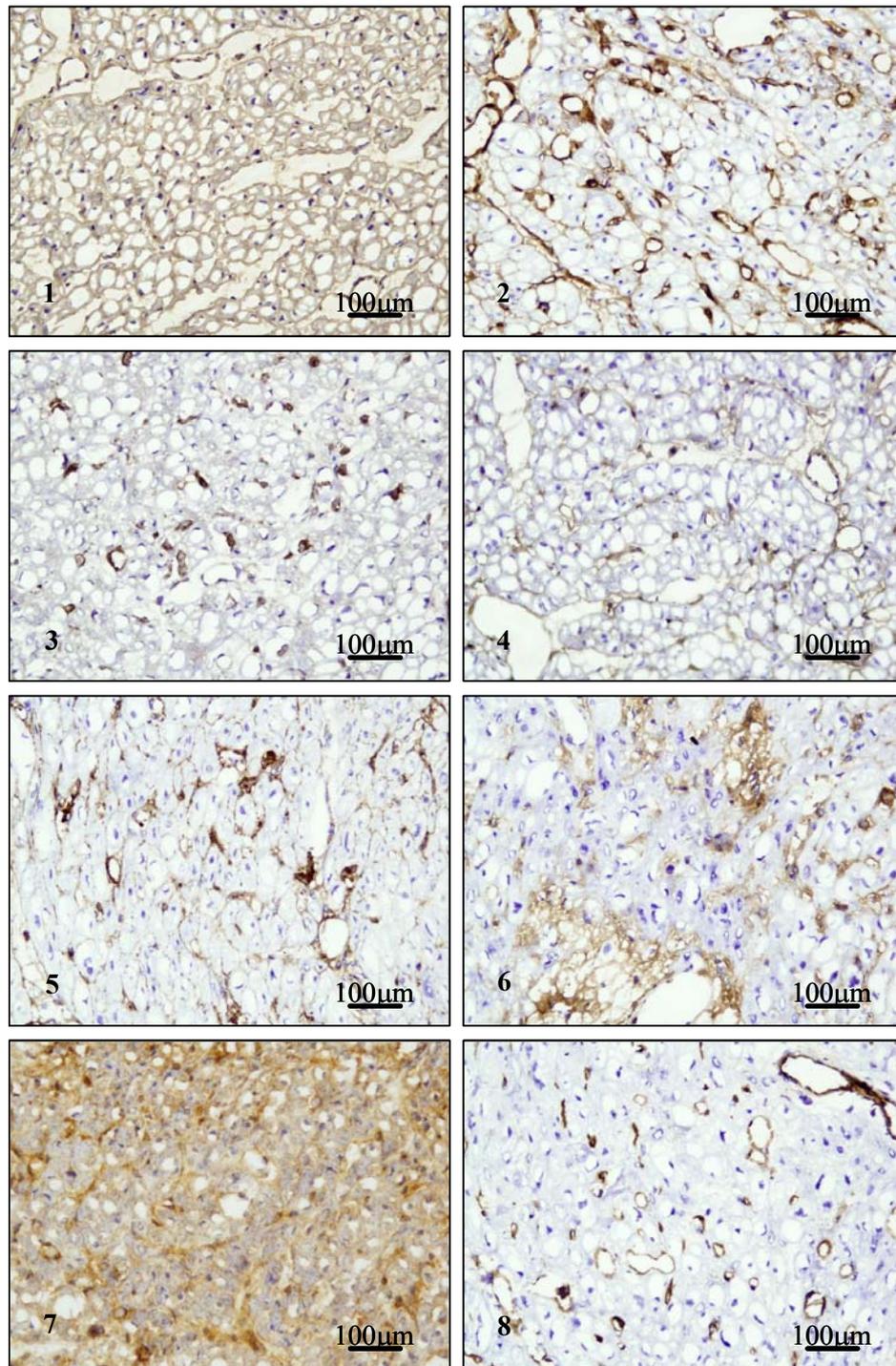


Figura 50: Inmunopatología de una biopsia de un xenoinjerto porcino hDAF trasplantado en el babuino B41 obtenida en el momento de la necropsia. 1.-IgG, 2.-IgM, 3.-C3, 4.-C4, 5.-C5b-9, 6.-Fibrina, 7.-hDAF, 8.-CD31.

Babuinos tratados con GAS914

3.- El animal representativo elegido del Grupo B.1 es el D10 que es al animal que más tiempo vivió tras el trasplante de todos los incluidos en el estudio.

En la biopsia tomada antes del trasplante, prácticamente no se observaron de IgG, IgM, C3, C4, C5b-9 ni fibrina (Figura 51). En la biopsia tomada 30 minutos después del trasplante, se observaron muy pocos depósitos de IgG y ninguno de los demás depósitos analizados (Figura 52). En la biopsia tomada en el momento de la necropsia, se observaron muy pocos depósitos de IgG, IgM, C3, C4, y ninguno de C5b-9 y fibrina (Figura 53). En todos los casos se expresaban hDAF y CD31.

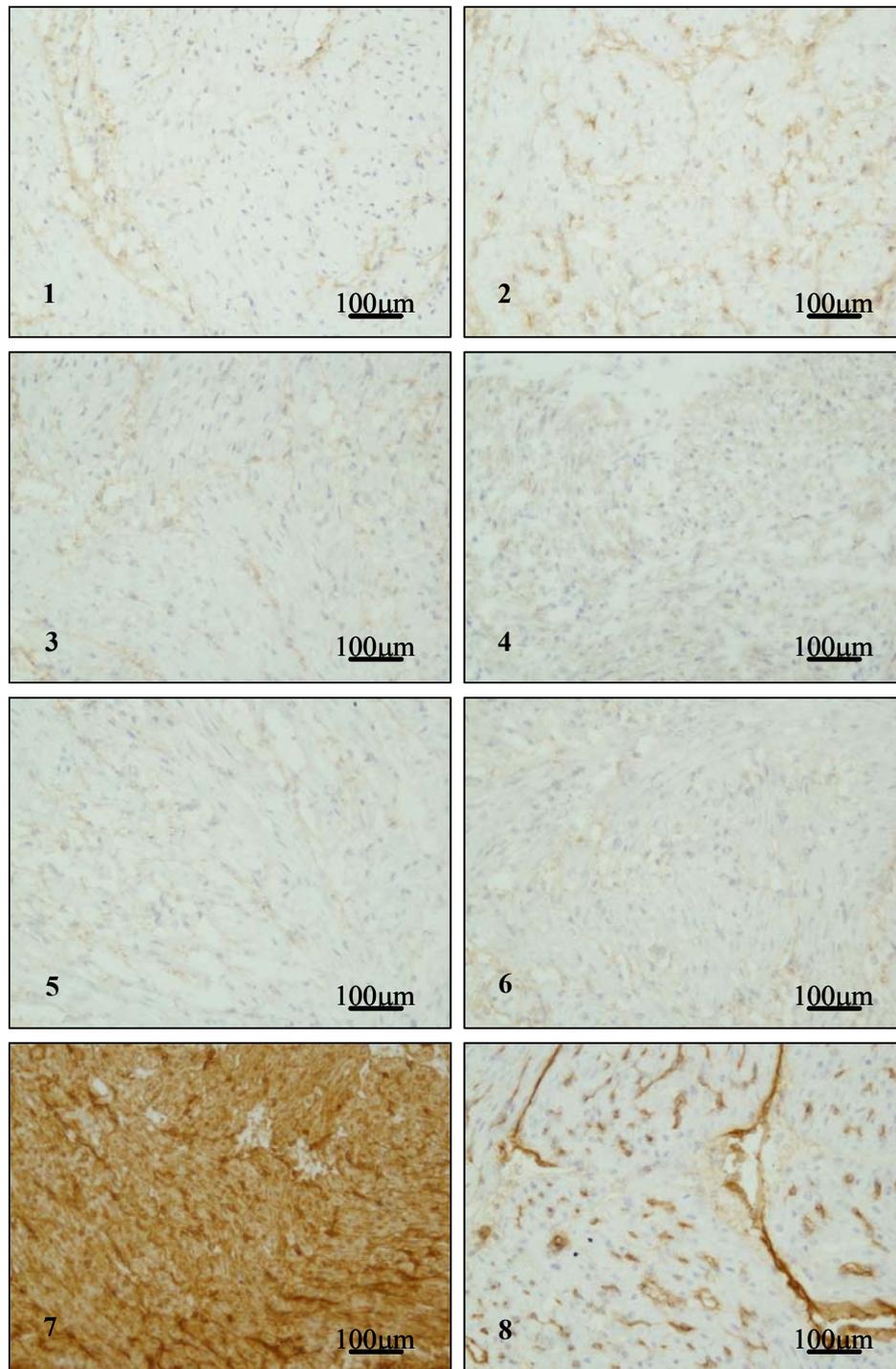


Figura 51: Inmunopatología de una biopsia de un xenoinjerto porcino hDAF trasplantado en el babuino D10 obtenida antes del trasplante 1.-IgG, 2.-IgM, 3.- C3, 4.-C4, 5.-C5b-9, 6.-Fibrina, 7.-hDAF, 8.-CD31.

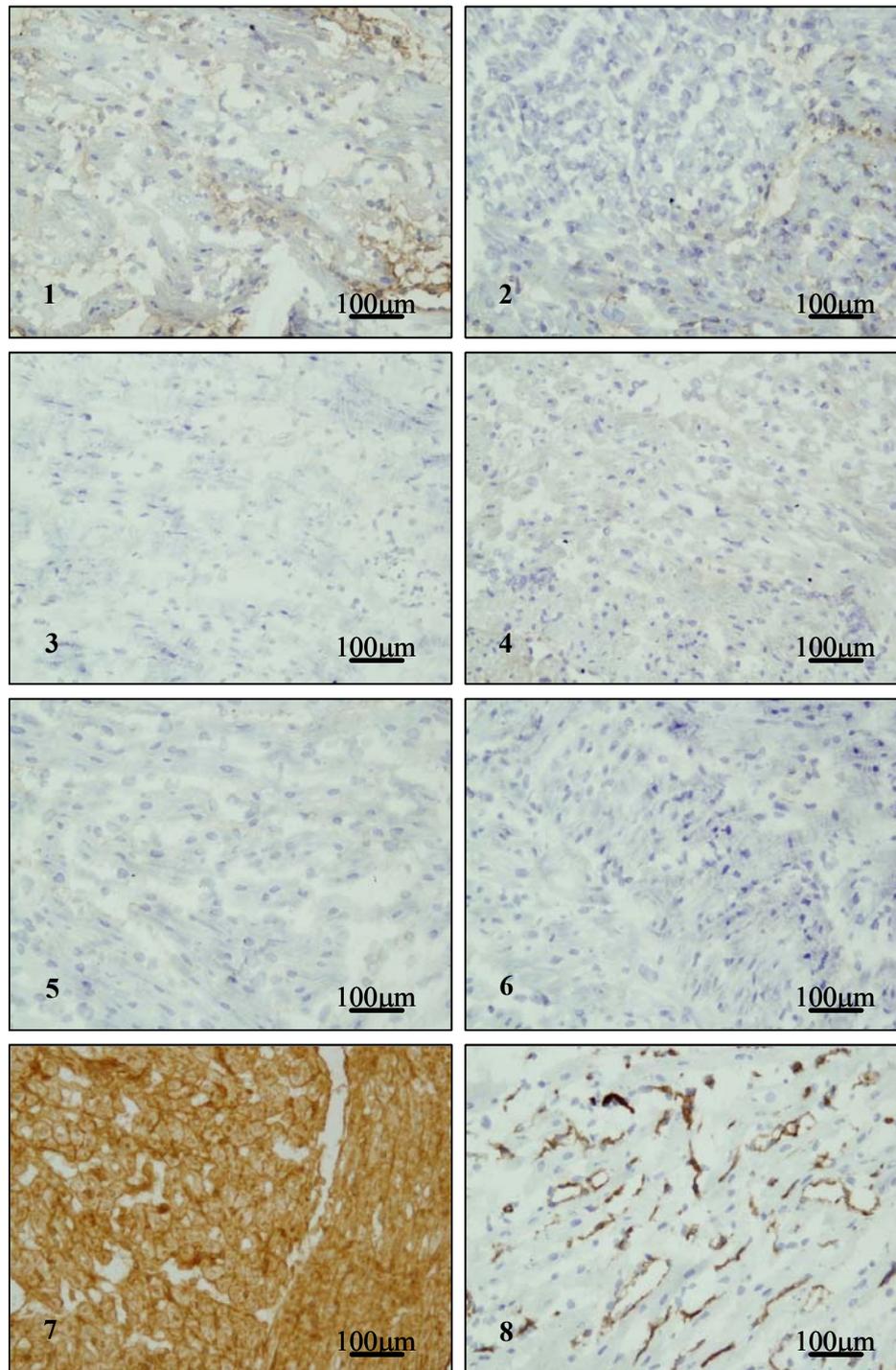


Figura 52: Inmunopatología de una biopsia de un xenoinjerto porcino hDAF trasplantado en el babuino D10 obtenida 30 minutos después del trasplante 1.-IgG, 2.-IgM, 3.-C3, 4.-C4, 5.-C5b-9, 6.-Fibrina, 7.-hDAF, 8.-CD31.

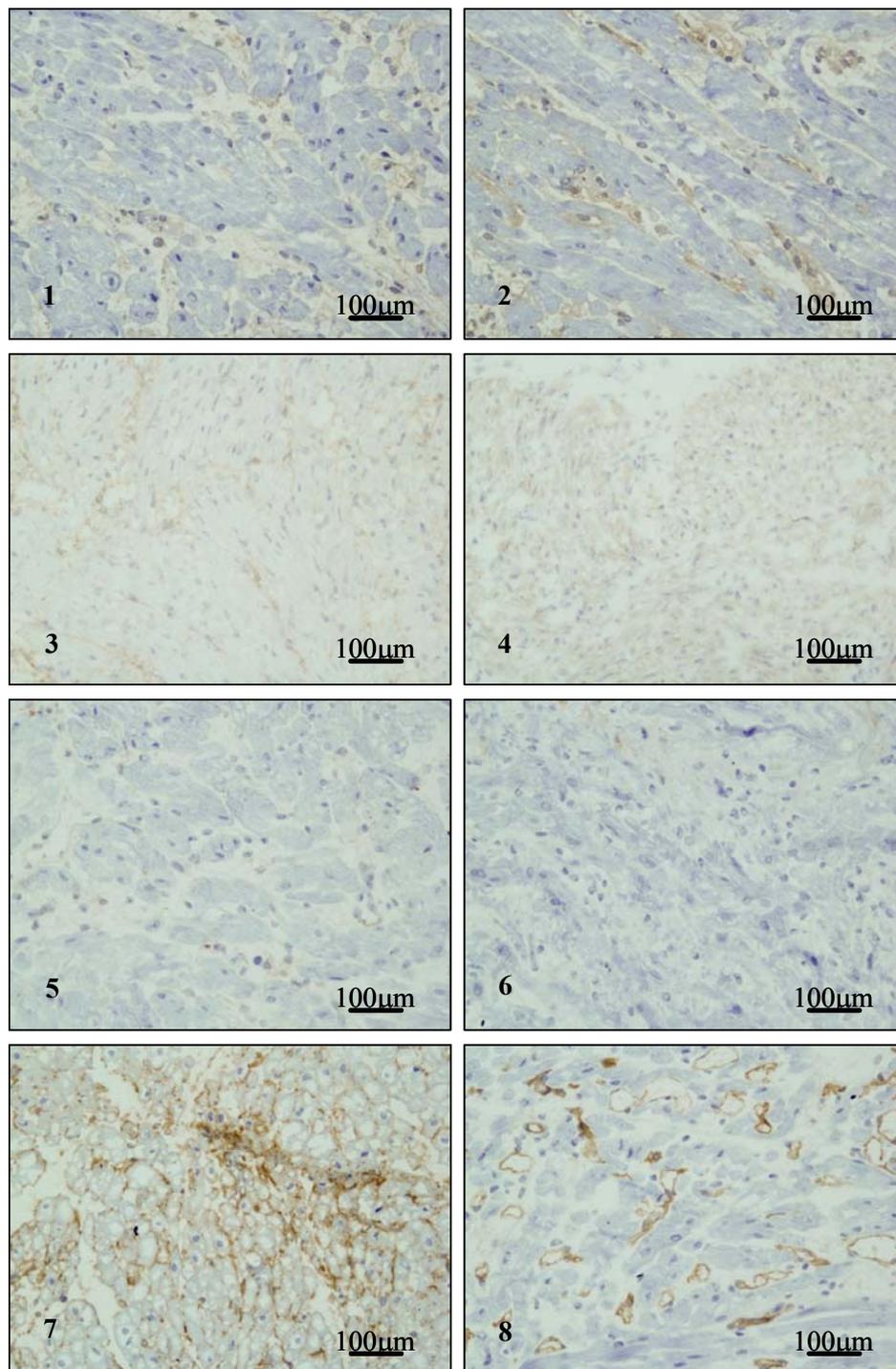


Figura 53: Inmunopatología de una biopsia de un xenoinjerto porcino hDAF trasplantado en el babuino D10 obtenida en el momento de la necropsia 1.-IgG, 2.-IgM, 3.-C3, 4.-C4, 5.-C5b-9, 6.- Fibrina, 7.- hDAF, 8.-CD31.

4.- El animal representativo elegido del Grupo B.2 es el D12, que fue el animal de mayor supervivencia en este grupo.

En la biopsia tomada antes del trasplante, se observaron pocos depósitos de IgG e IgM, y prácticamente ninguno de C3, C5b-9 y fibrina, la expresión de C4 pudo ser debida al fondo que se produce al ser un Ac policlonal (Figura 54). En la biopsia tomada 30 minutos después del trasplante, se observaron depósitos de IgG, IgM, C3 y fibrina, pocos depósitos de C5b-9, en este caso la expresión de C4 pudo ser debido a lo mismo que en caso anterior (Figura 55). En la biopsia tomada en el momento de la necropsia, se observaron depósitos de IgG, IgM, C3, C5b-9 y fibrina, la expresión de C4 parece correcta en este caso ya que estaba presente en vasos sanguíneos y capilares (Figura 56). Tanto el transgen hDAF, como el control positivo CD31 se expresaban en las células correspondientes en todos los tiempos.

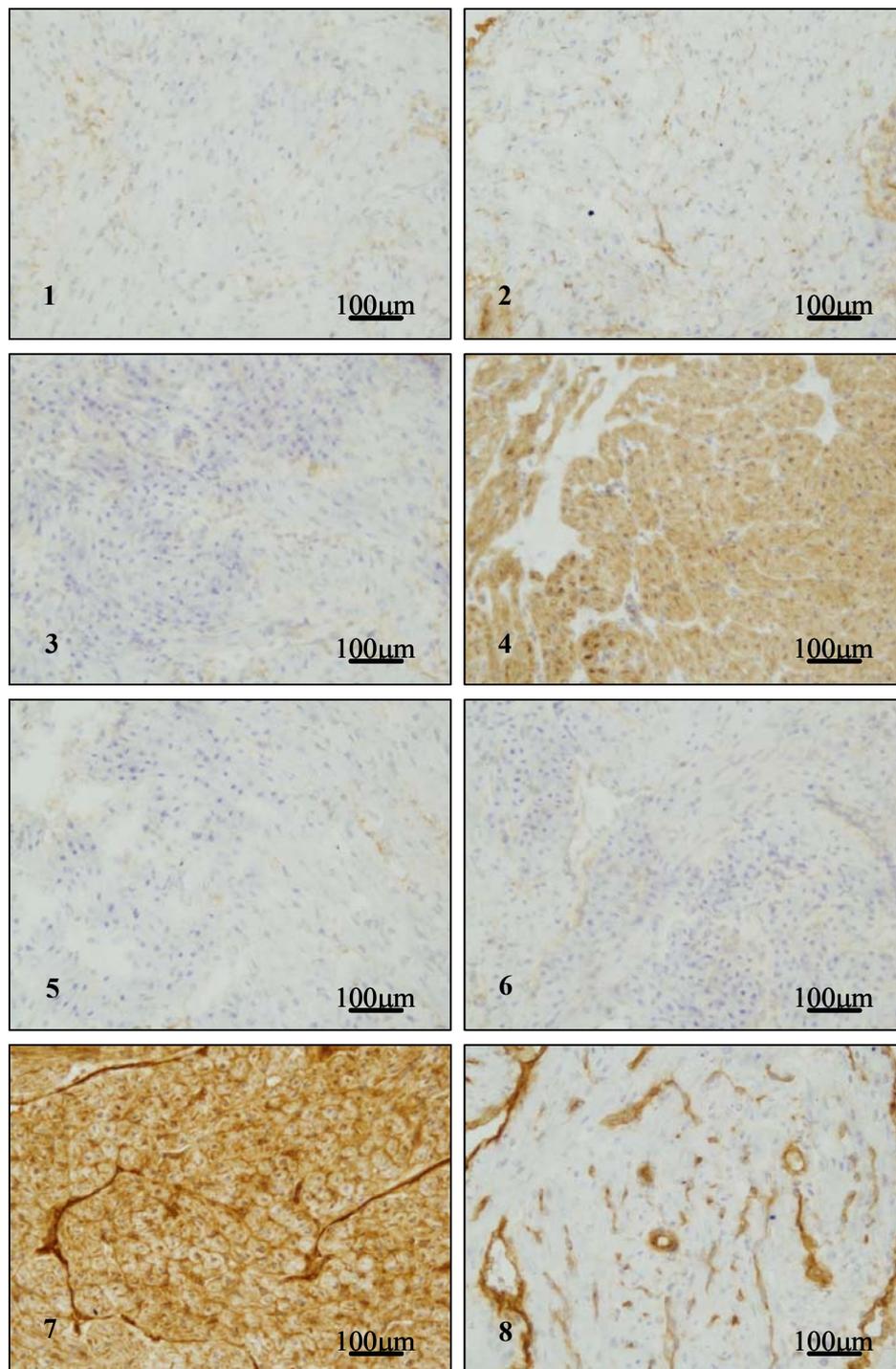


Figura 54: Inmunopatología de una biopsia de un xenoinjerto porcino hDAF trasplantado en el babuino D12 obtenida antes del trasplante 1.-IgG, 2.-IgM, 3.-C3, 4.-C4, 5.-C5b-9, 6.-Fibrina, 7.-hDAF, 8.-CD31.

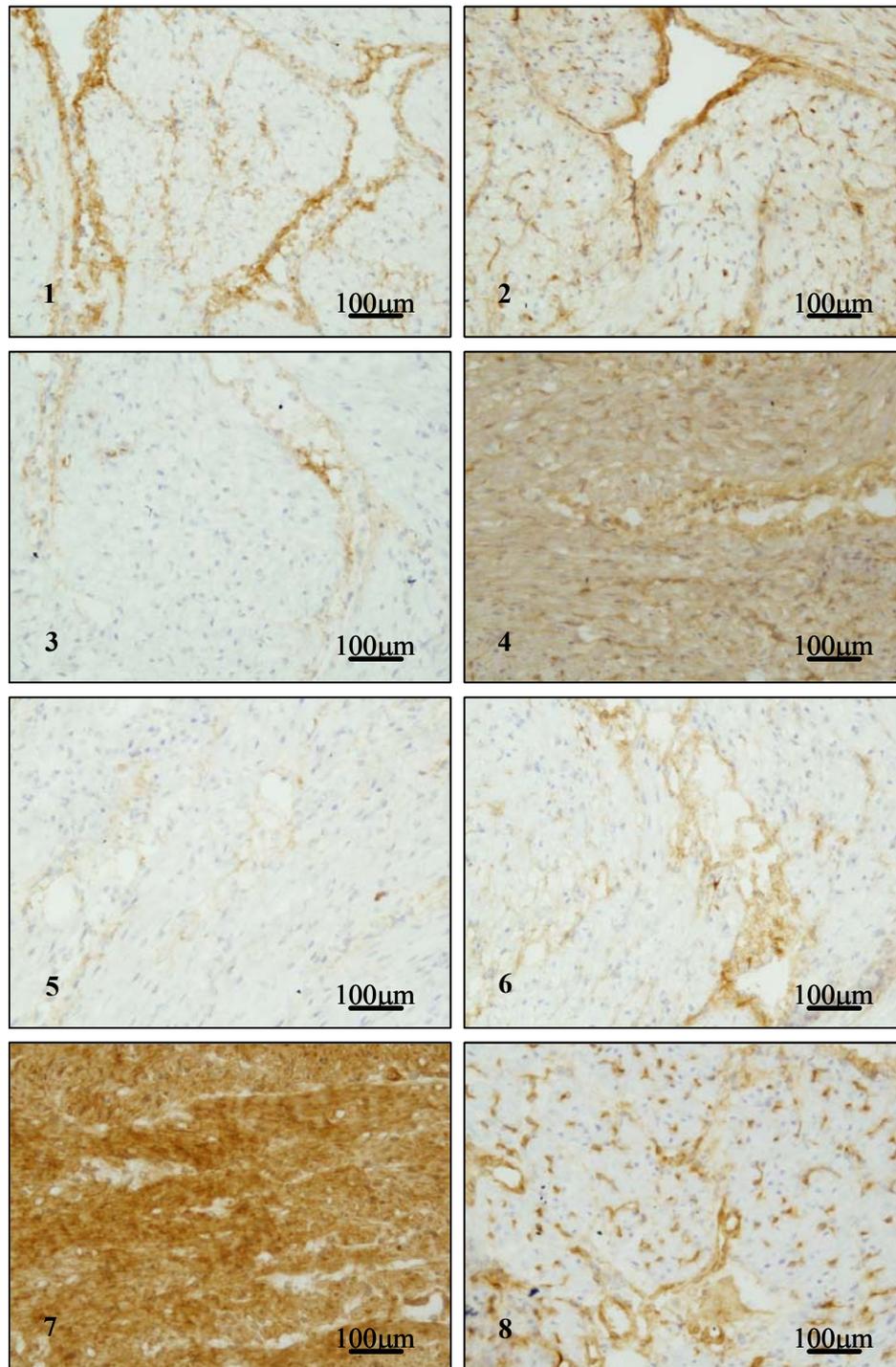


Figura 55: Inmunopatología de una biopsia de un xenoinjerto porcino hDAF trasplantado en el babuino D12 obtenida 30 minutos después del trasplante 1.-IgG, 2.-IgM, 3.-C3, 4.-C4, 5.-C5b-9, 6.-Fibrina, 7.-hDAF, 8.-CD31.

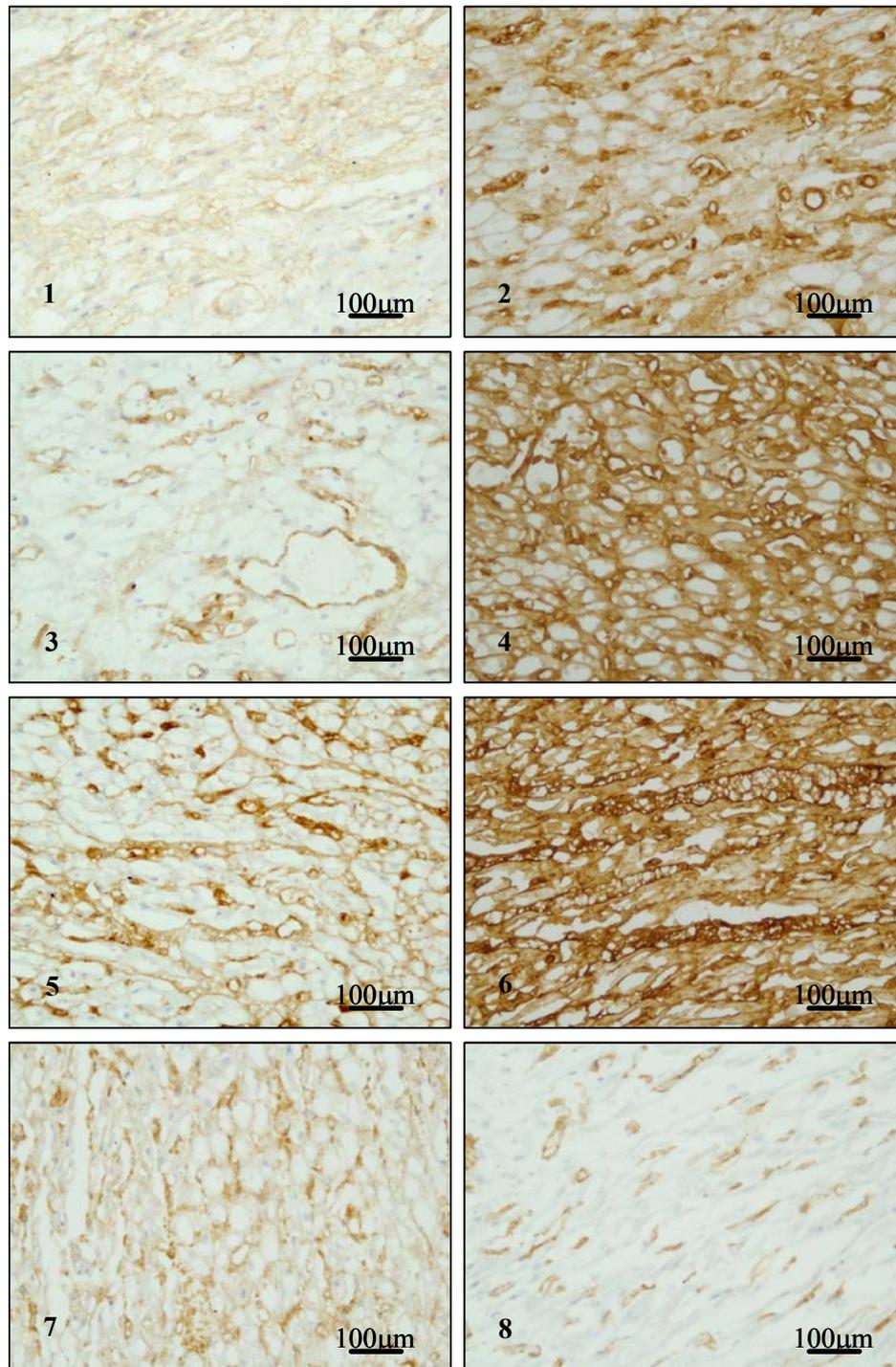


Figura 56: Inmunopatología de una biopsia de un xenoinjerto porcino hDAF trasplantado en el babuino D12 obtenida en el momento de la necropsia 1.-IgG, 2.-IgM, 3.-C3, 4.-C4, 5.-C5b-9, 6.-Fibrina, 7.-hDAF, 8.-CD31.

1.6.3. Activación del endotelio de los xenoinjertos en los animales tratados con GAS914 en ausencia de Acs anti- α Gal

Los resultados obtenidos con el Grupo B.1 indicaban que cuando se trasplantan xenoinjertos transgénicos para hDAF en babuinos tratados con GAS914, los Acs anti- α Gal y los APA disminuyen en el suero del babuino, pero que ésto no evita totalmente el RVA. Además, los resultados obtenidos en el Grupo B.2 sugieren que los xenAcs que participan en este tipo de rechazo no son sólo anti- α Gal. Por eso también se realizó un estudio del grupo de babuinos tratados con GAS914 para detectar la posible aparición de alteraciones morfológicas y fenotípicas del endotelio, causadas por los posibles Acs no α Gal. Para ello se realizaron técnicas de inmunohistoquímica en los xenoinjertos con dos Acs relacionados con la activación del endotelio, CD62E (selectina-E), implicada en los mecanismos de adhesión entre las células endoteliales porcinas y los leucocitos humanos que pueden contribuir al rechazo del xenoinjerto) (Rollins SA *et al*, 1994), y 5A6/8 (implicado en la activación de linfocitos y células endoteliales) (Doménech N *et al*, 2004). Como control positivo se utilizó de nuevo la expresión de CD31.

Las biopsias analizadas correspondían, al igual que en los estudios anteriores, al momento antes del trasplante, 30 minutos después del trasplante y en el momento de la necropsia y también se muestra sólo un animal representativo de cada grupo.

En las biopsias del babuino D10 (Grupo B.1) se observó que antes del trasplante prácticamente no había expresión de CD62E y 5A6/8. En la biopsia tomada 30 minutos después del trasplante se observó un ligero aumento en la expresión de CD62E y 5A6/8. En la biopsia tomada en el momento de la necropsia también había expresión de CD62E y 5A6/8 ligeramente mayor que la anterior (Figura 57).

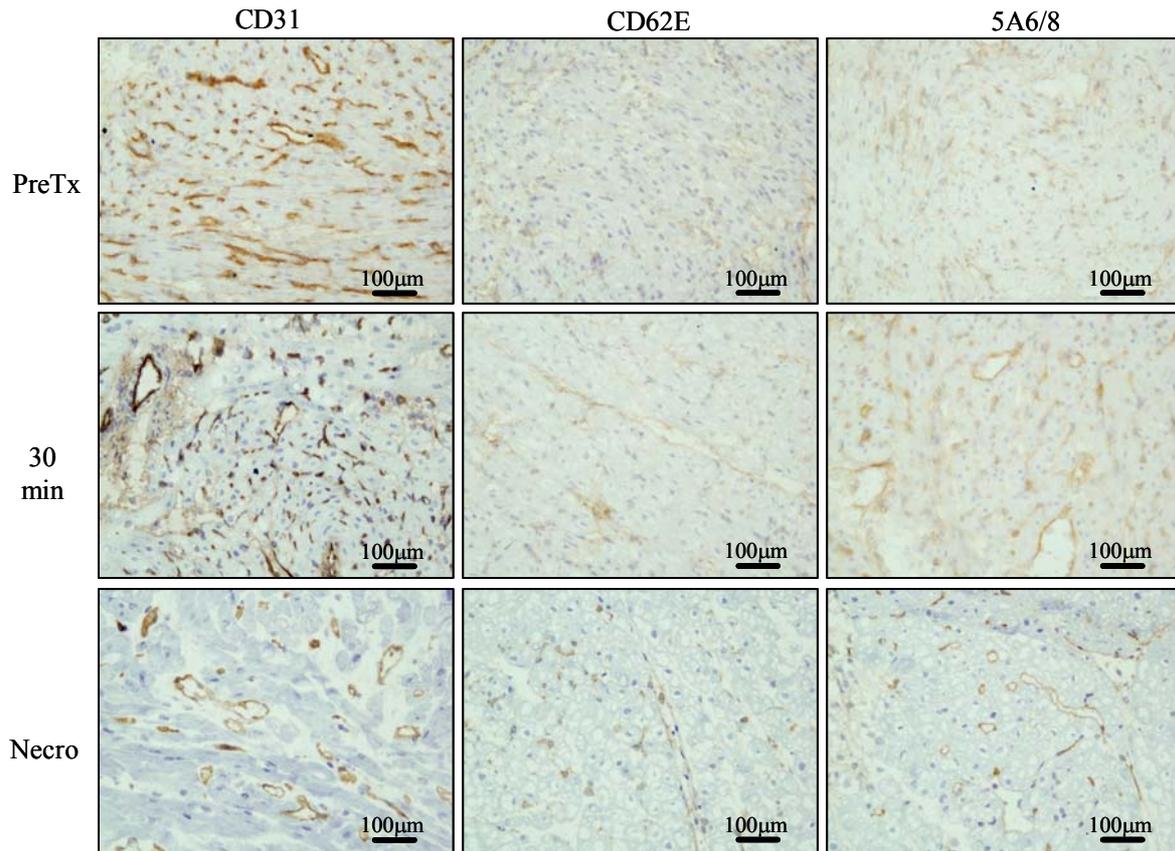


Figura 57: Inmunohistoquímica del xenoinjerto del babuino D10 (Grupo B.1).

También se tomaron biopsias de un babuino D12 (Grupo B.2) a los mismos tiempos que en los casos anteriores. En la muestra que se recogió antes del trasplante había expresión de 5A6/8 y muy poca expresión de CD62E. En la biopsia tomada 30 minutos después del trasplante se observó un aumento de la expresión de CD62E y algo menos de 5A6/8. Y en la biopsia tomada en el momento de la necropsia aumenta la expresión de ambos (Figura 58). Tanto en el caso de este babuino como en el del anterior D10, la expresión del antígeno CD31, utilizado como control positivo, se mantiene estable en todos los tiempos analizados.

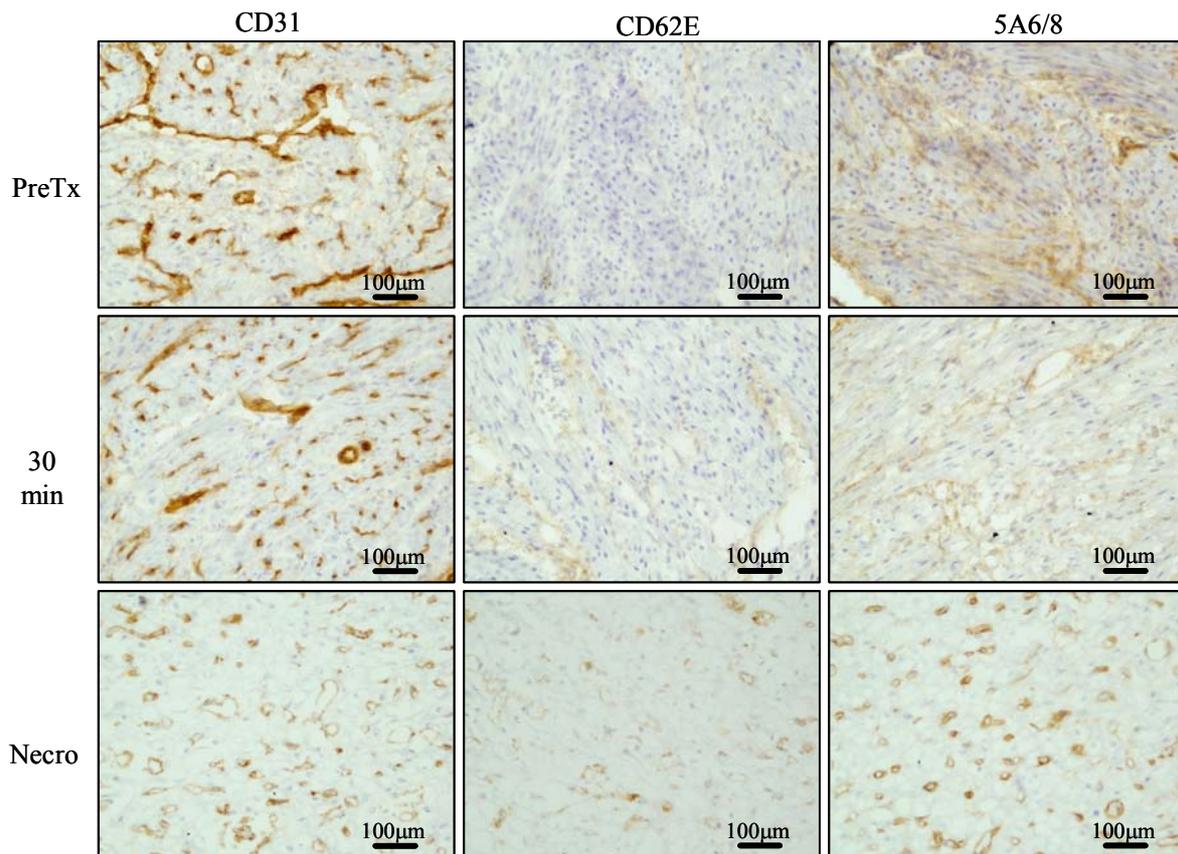


Figura 58: Inmunohistoquímica del xenoinjerto del babuino D12 (Grupo B.2).

Los datos obtenidos sugieren que durante el xenotrasplante de cerdos transgénicos para hDAF en babuinos se produce una activación del endotelio tanto en presencia como en ausencia de Acs anti- α Gal que, a la larga, puede tener un papel negativo en la supervivencia del injerto.

2. Estudio de la posibilidad de infección por PERV en el modelo de xenotrasplante de xenoinjertos de cerdos transgénicos en babuinos tratados con GAS914

2.1. Grupos de animales estudiados

El análisis de la posibilidad de transmisión de PERV a los babuinos receptores de xenoinjertos porcinos se realizó en muestras procedentes de 27 babuinos incluidos en distintos protocolos experimentales de xenotrasplante llevados a cabo en la Unidad de Investigación en los últimos años, que incluían, tanto xenotrasplantes de corazón (14) como de riñón (13), procedentes de cerdos transgénicos hDAF o dobles transgénicos hDAF/hMCP, tratados con distintos protocolos de inmunosupresión pero siempre con GAS914. Todos los protocolos de trasplante e inmunosupresión están representados en la tabla 6.

Grupos	Individuos	Órgano trasplantado	Protocolo de inmunosupresión	Tratamiento GAS914	Supervivencia (días) ^a
A (n=5)	C64, C70, C76, D10, D23	Corazón hDAF	Csf, Csp, MPS y esteroides	Antes y después del trasplante	50 ± 19
B (n=4)	D5, D35, D40, D50	Corazón hDAF	Csp	Antes del trasplante	6 ± 1
C (n=8)	C49, C53, C62, C78, D17, D32, D41, D51	Riñón hDAF	Csf, Csp, MPS y esteroides	Antes y después del trasplante	11 ± 9
D (n=5)	C51, C52, C68, C69, D48	Riñón hDAF	Basiliximab, Csp y FTY720	Antes y después del trasplante	12 ± 10
E (n=5)	D22, D42, D45, D47, D49	Corazón hDAF/hMCP	Csp	Antes del trasplante	6 ± 2

Tabla 6: Grupos de estudio, xenotrasplantes, tratamiento de inmunosupresión, GAS914 y supervivencia.

^aMedia ± DT. Csf: ciclofosfamida, Csp: ciclosporina, MPS: micofenolato sódico, FTY 720: inhibidor de mTOR y Basiliximab: AcMo quimérico (murino-humano) anti-CD25.

El procedimiento quirúrgico del xenotrasplante heterotópico cardiaco ya se explicó en la primera parte de resultados. En cuanto al procedimiento quirúrgico del xenotrasplante renal de forma muy breve, fue el siguiente: una vez extraídos los órganos se conservaron en solución de preservación mantenida a 4°C, los cerdos se sacrificaban finalmente con una dosis letal de Pentobarbital. Los babuinos se sedaron utilizando ketamina y atropina, tras lo cual eran intubados. Se practicaba una laparotomía media y nefrectomía bilateral, procediéndose posteriormente al implante ortotópico de riñón de cerdo extraído previamente. Previamente a la reperusión, el animal recibía una recarga de fluidos del 110% de su volemia normal.

En general, en el conjunto de babuinos el periodo de exposición más corto a un xenoinjerto porcino fue de 4 días y el más largo de 60. El grupo A (que incluye 5 animales del Grupo B.1 de la primera parte de la tesis) sufrieron un RVA leve del xenoinjerto, mientras que todos los órganos porcinos del grupo B, 50% el grupo C, 60% grupo D y todo el grupo E sufrieron un RVA del xenoinjerto.

2.2. Depleción de Acs IgM e IgG anti- α Gal antes y después del trasplante con GAS914

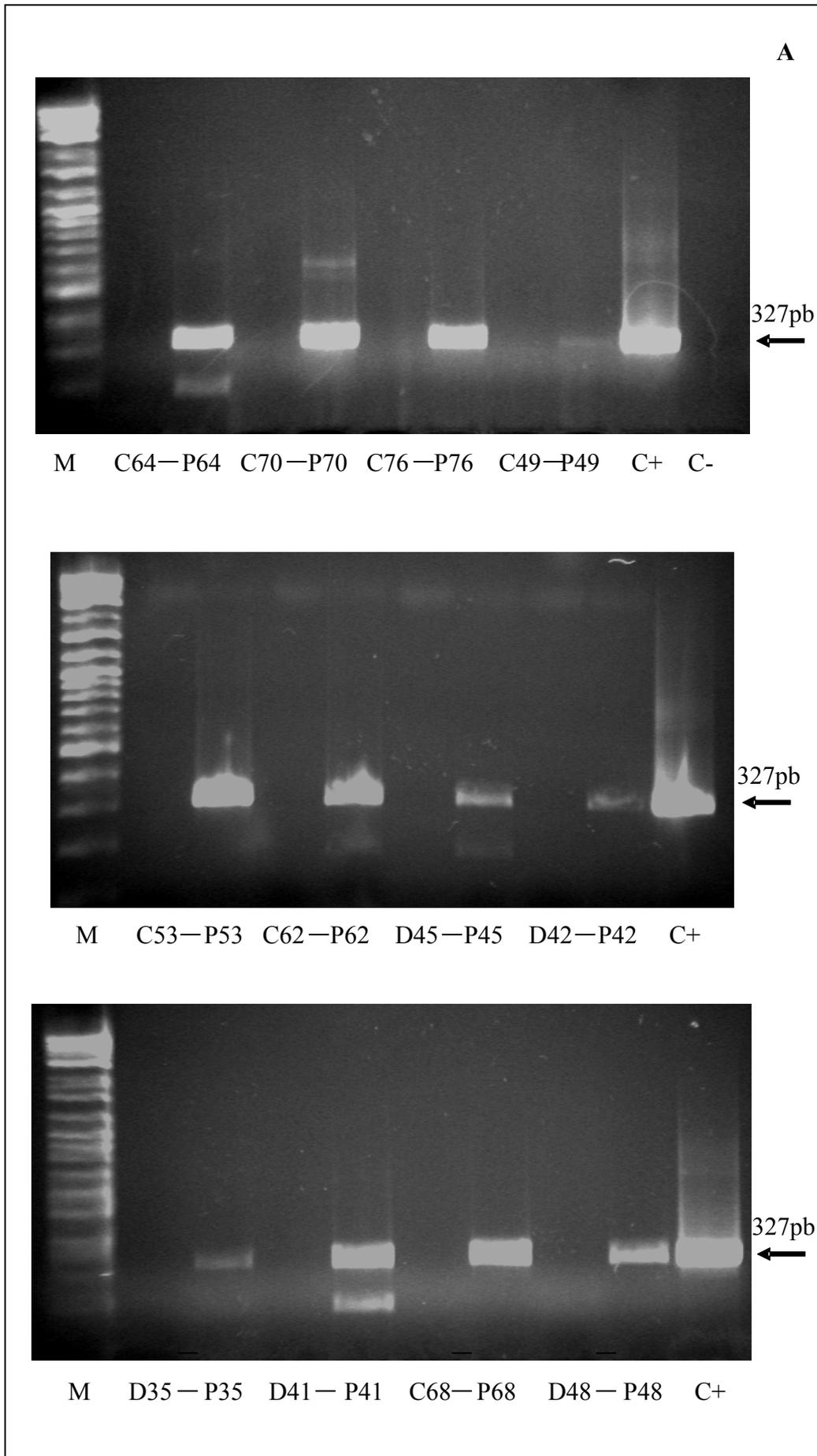
El tratamiento con GAS914 antes del trasplante redujo notablemente los niveles de Acs IgM e IgG anti- α Gal en todos los grupos en el momento del trasplante (Tabla 7), en este caso sólo se midieron los niveles de anti- α Gal T2, ya que es el tipo de anti- α Gal mayoritario, los cuales son entre un 54% y 94% más bajos que los presentes antes del tratamiento. Después del trasplante, el GAS914 y la inmunosupresión sostenida, mantuvo los niveles de Acs IgM e IgG anti- α Gal similares o inferiores a aquellos presentes en el momento del trasplante en los grupos A, C y D. En los grupos B y E el no uso de GAS914 después del trasplante, se relacionó con un ligero aumento de los anti- α Gal IgM e IgG en el momento de la necropsia comparado con los niveles detectados en el momento del trasplante.

GRUPOS	PreTto		PreTx		Necro	
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
A	789 ± 434	681±410	151 ± 23	75 ± 85	170 ± 48	78± 26
B	804 ± 256	266±238	294 ± 93	122±122	307±104	69 ± 28
C	882 ± 443	427±387	141 ± 57	69 ± 71	120 ± 95	42 ± 51
D	1322±598	798±348	113±52	50 ± 36	83 ± 41	15 ± 13
E	907 ± 321	462±611	184±116	60 ± 40	314 ± 40	54±348

Tabla 7: Nivel (Media ± DT) de Acs IgM e IgG anti- α Gal T2 de cada grupo de estudio. **PreTto:** antes del tratamiento con GAS914. **PreTx:** antes del trasplante. **Necro:** necropsia.

2.3. Detección de las secuencias de PERV por RT-PCR en el plasma de los receptores y donantes de los xenoinjertos porcinos

Para analizar la posible presencia de partículas de PERV, se analizó el ARN del plasma procedente de los 27 babuinos de receptores de un órgano porcino en el momento de la necropsia, analizando en paralelo el ARN del plasma procedente de sus correspondientes cerdos donantes (en todos los casos en los que se disponía de la muestra). El análisis se realizó por RT-PCR, utilizando cebadores de *proteasa-polimerasa* (Patience *et al.*, 1997; Paradis *et al.*, 1999) que se escogieron por estar su secuencia muy conservada en las cuatro variantes de PERV y utilizando como control de la presencia del virus, ARN de las células HEK-293 que estaban infectadas con este retrovirus.



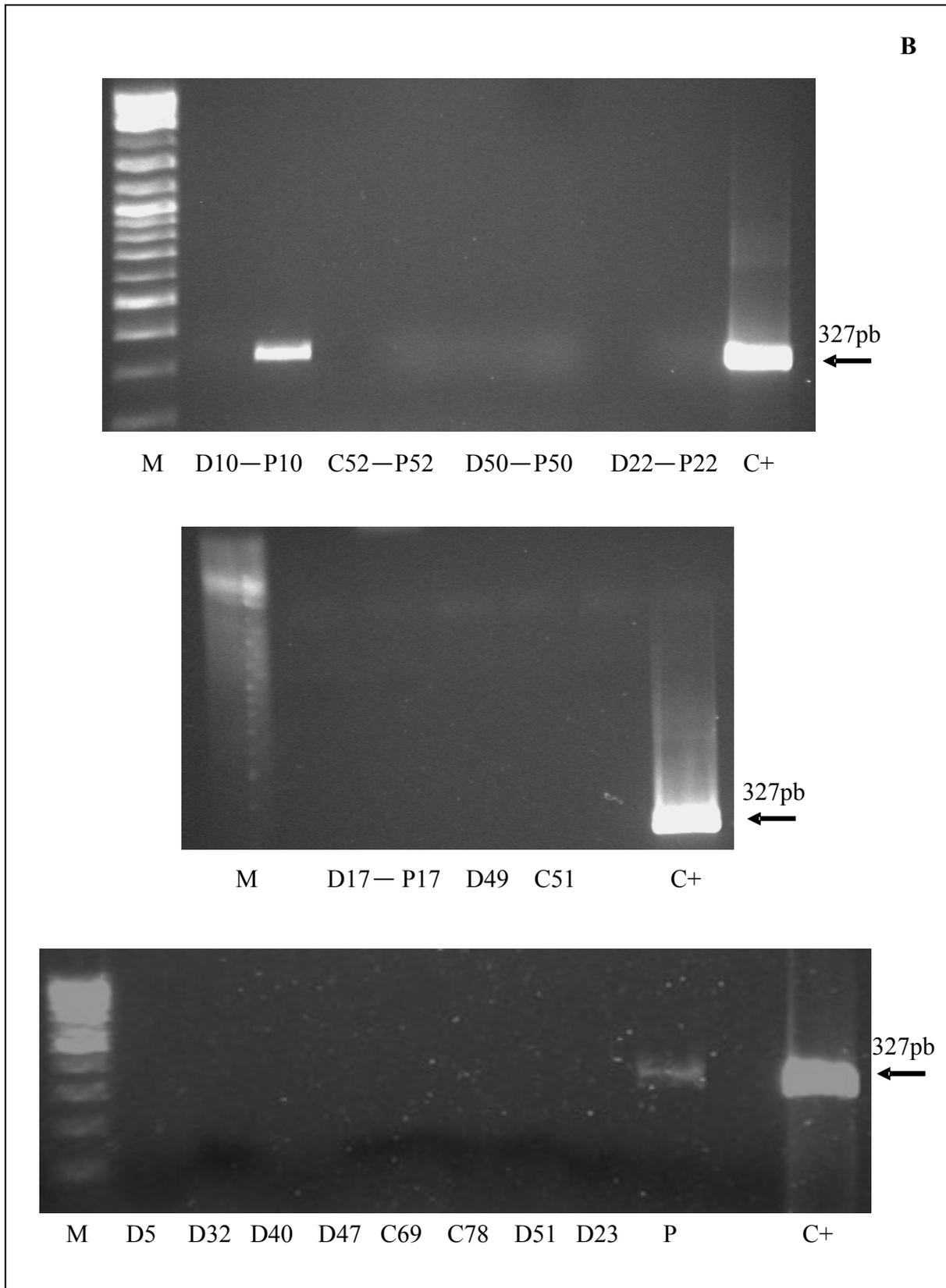
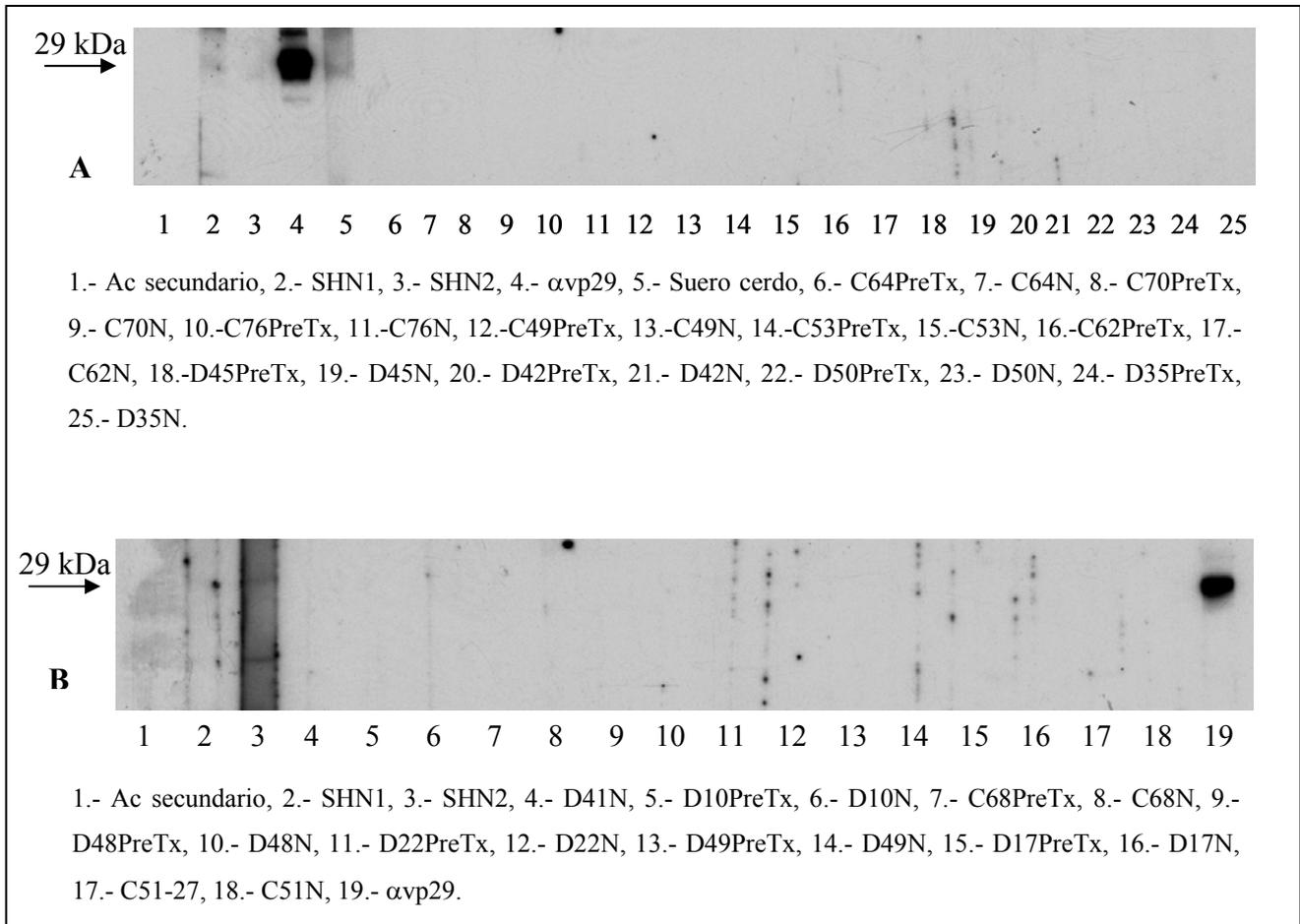


Figura 59 A, B: Resultados de la electroforesis de la RT-PCR con cebadores de *proteasa-polimerasa* y ARN de plasmas de babuinos trasplantados y sus correspondientes plasmas de los cerdos donantes (P), no disponibles en todos los casos. C+, HEK-293: Células infectadas por PERV; C- sin muestra de ARN.

Utilizando cebadores *proteasa-polimerasa* con el plasma de los 27 receptores, no se detectaron secuencias de estos fragmentos de PERV en ninguno de los casos aunque todos los donantes, excepto tres P52, P50 y P17, fueron positivos (Figura 59 A y B). Las fotos son representativas de 2 ó 3 experimentos.

2.4. Estudio de la presencia de Acs anti-PERV en el suero de los receptores de xenoinjertos porcinos

La caracterización de los posibles xenoantígenos de PERV reconocidos por el suero de los primates tras el xenotrasplante se realizó sobre lisados de células HEK-293 (infectadas con PERV). Las células se lisaron y los solubilizados se analizaron por SDS-PAGE, seguido de *western-blot* incubando la membrana obtenida con los sueros de babuinos a analizar. Se analizaron en paralelo los sueros recogidos a tiempo antes del trasplante con sueros de esos babuinos en el momento de la necropsia (Figura 60 A, B y C). No se incluyeron las muestras de sueros antes del trasplante al carecer de ellas en todos los casos (estos experimentos también se repitieron 2 ó 3 veces).



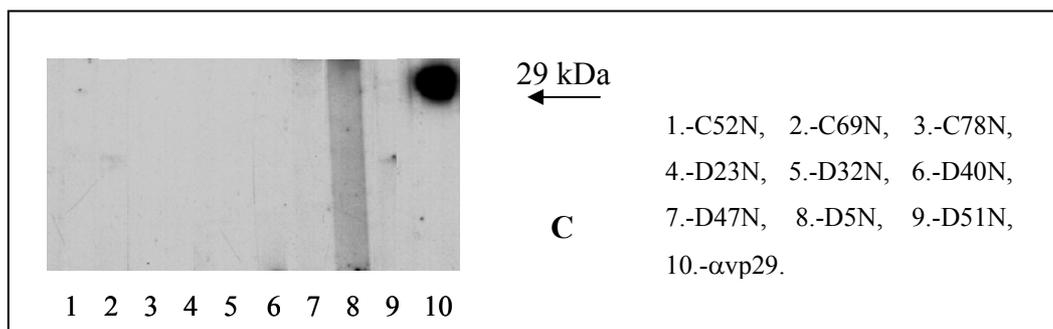


Figura 60 A, B y C: *Western-blot* para detectar Acs específicos contra proteínas de PERV en los sueros de babuinos receptores de un xenoinjerto porcino. Se utilizaron lisados de células HEK-293 infectadas con PERV. Además, se incluyeron como controles varios sueros humanos (SHN) y de cerdo, como control positivo se utilizó un suero hecho en cabra α vp29 (anti-proteína 29 del virus del sarcoma de simio). **PreTx:** antes del trasplante, **N:** necropsia.

Los resultados de los *western-blot* con los sueros de los 27 babuinos receptores muestran que en ningún caso se observan bandas que indicarían el reconocimiento de algún xenoantígeno por xenoAcs presentes en los sueros de los babuinos, sólo se detectó una banda p29 en el control que se incubó con el Ac α vp29 de cabra, que crosreacciona con la proteína vp30 de PERV. Estos resultados indican por lo tanto que parece que no existen Acs que reconozcan las proteínas del PERV en el suero de los babuinos receptores.

2.5. Detección de las secuencias de PERV por PCR en CMSP de los receptores de xenoinjertos porcinos

También quisimos analizar la posibilidad de presencia de ADN de PERV integrado en el ADN genómico de las CMSP de los babuinos receptores. Para este análisis sólo disponíamos de CMSP de 14 de los 27 babuinos receptores incluidos, que son las células que se utilizaron como fuente de ADN.

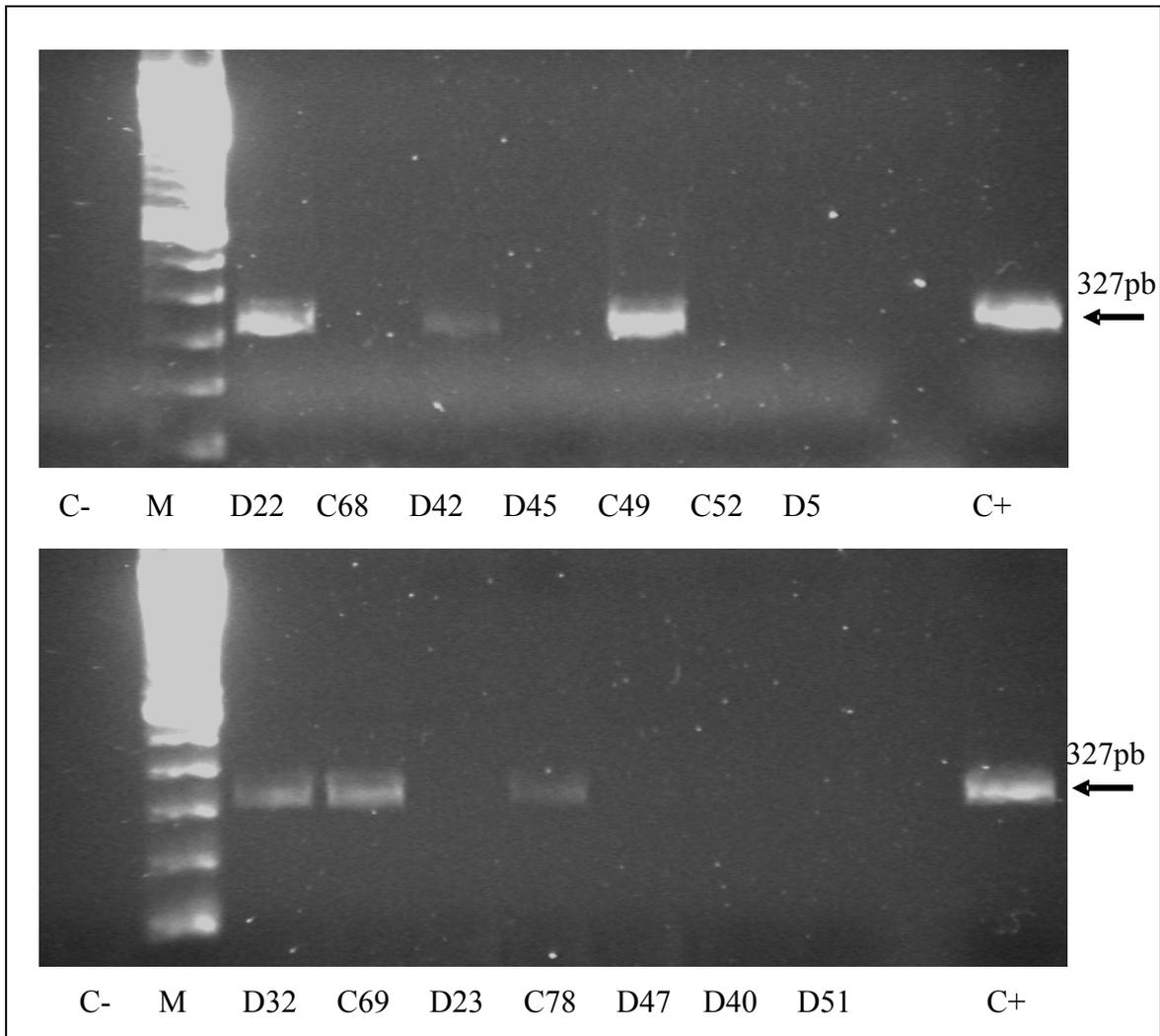
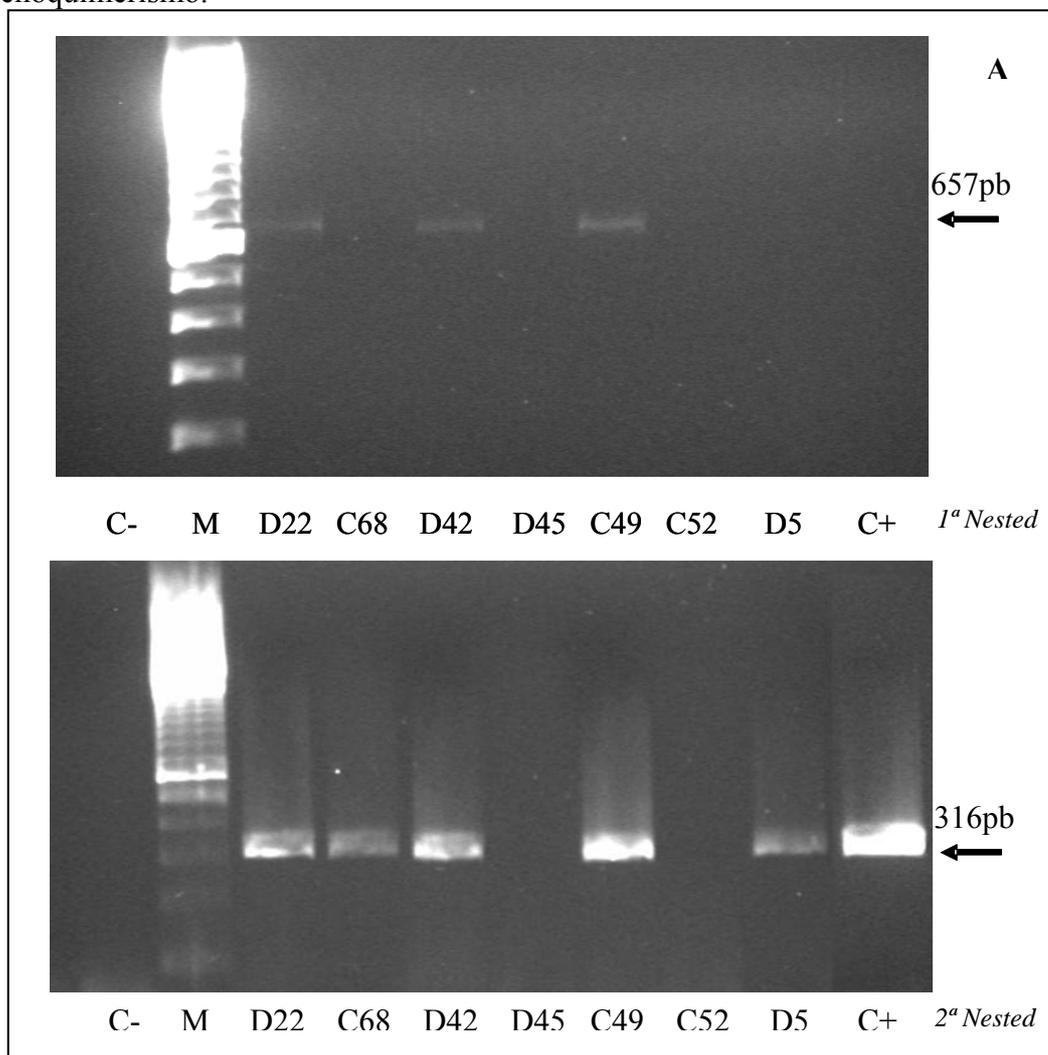


Figura 61 A y B: Resultados de la electroforesis de la PCR con cebadores de *proteasa-polimerasa* y ADN de células de varios babuinos trasplantados. C+: HEK-293; C-: sin muestra de ADN.

Tras la realización de las PCRs se detectaron secuencias de DNA de *proteasa-polimerasa* de PERV en 6 (43%) de las 14 analizadas correspondientes a los babuinos D22, D42, C49, D32, C69 y C78 (Figura 61 A y B). Estos animales pertenecieron a diferentes grupos y por tanto los resultados parecían ser independientes del órgano injertado y del tratamiento inmunosupresor utilizado.

2.6. Detección de microquimerismo de células porcinas por PCR e inmunohistoquímica en las CMSP y tejidos de los babuinos receptores de xenoinjertos porcinos

Tras la obtención de los resultados anteriores quisimos comprobar si la detección de las secuencias de PERV en esas muestras se debía a una posible infección por PERV o la presencia de células porcinas o quimerismo (fenómeno ya descrito anteriormente). Para ello en dichas muestras se realizaron PCR *Nested* utilizando cebadores de citocromo C oxidasa porcina (MitCOII) (Deng YM *et al.*, 2000) para analizar la presencia de ADN mitocondrial de cerdo. Los resultados demostraron que en todas las muestras que habían sido positivas para la presencia de ADN de *proteasa-polimerasa* de PERV también se detectó la presencia de secuencias de ADN porcino mitocondrial (Figura 62 A y B) y además también fueron positivas otras 6 muestras que habían sido negativas para el ADN de PERV, correspondientes a los babuinos D47, D40, C78, D51, D5 y C49. En resumen, el 86% de las muestras testadas fueron positivas para la presencia de ADN porcino, sugiriendo esto, que la detección de ADN de PERV en las CMSP se debió al xenoquimerismo.



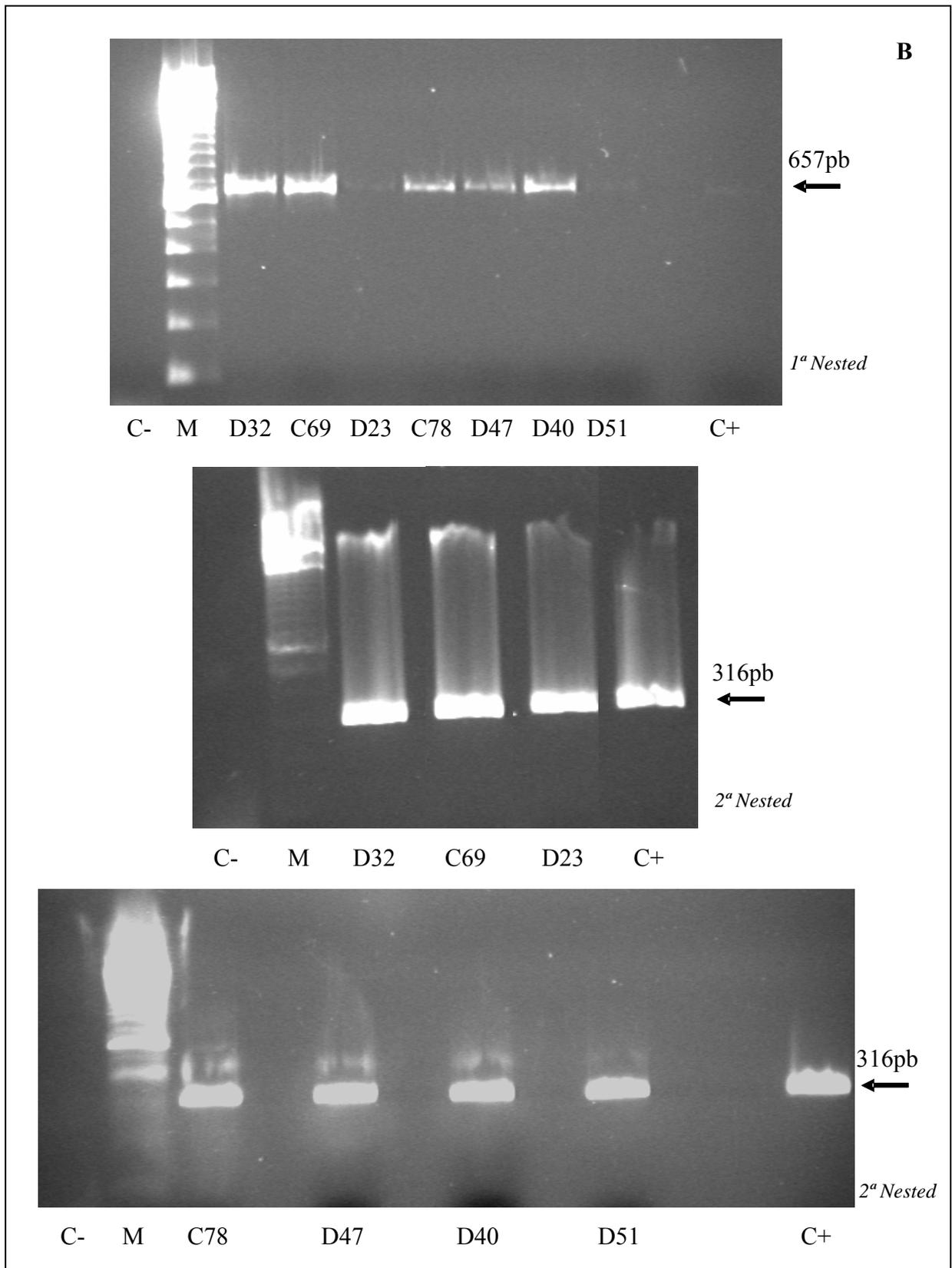


Figura 62 A, B: Resultados de la electroforesis de la *1ª Nested* y *2ª Nested* PCR con los cebadores de *MIT COII* utilizando las CMSPs de babuinos trasplantados. C- no muestra de ARN; C+ células porcinas.

Quisimos intentar confirmar los resultados obtenidos por PCR en las CMSP mediante inmunohistoquímica para analizar la presencia de PERV y/o células porcinas en otros tejidos de los babuinos trasplantados, en concreto en ganglio, bazo, hígado y riñón. El estudio de xenoquimerismo se realizó sólo en los cinco animales del grupo A porque era el grupo que había alcanzado mayor supervivencia lo que pudiera estar relacionado con la presencia de ese quimerismo. Sólo se muestran los resultados de uno de ellos (D10) como representativo del grupo.

El análisis se realizó en muestras congeladas tomadas en el momento de la necrosis del animal. Como controles se utilizaron los mismos órganos de un cerdo no transgénico (controles positivos) y de un babuino sin trasplantar (controles negativos).

En una primera aproximación utilizamos el Ac anti- α vp29 para estudiar la expresión de esta proteína en los órganos mencionados.

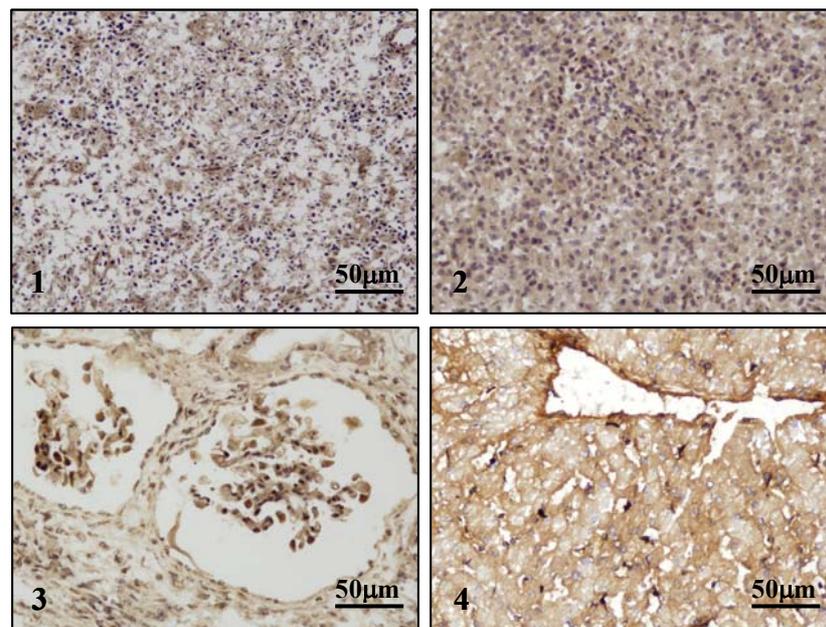


Figura 63: Expresión de vp29 de PERV en 1 Bazo, 2 Ganglio, 3 Riñón y 4 Hígado de un cerdo donante.

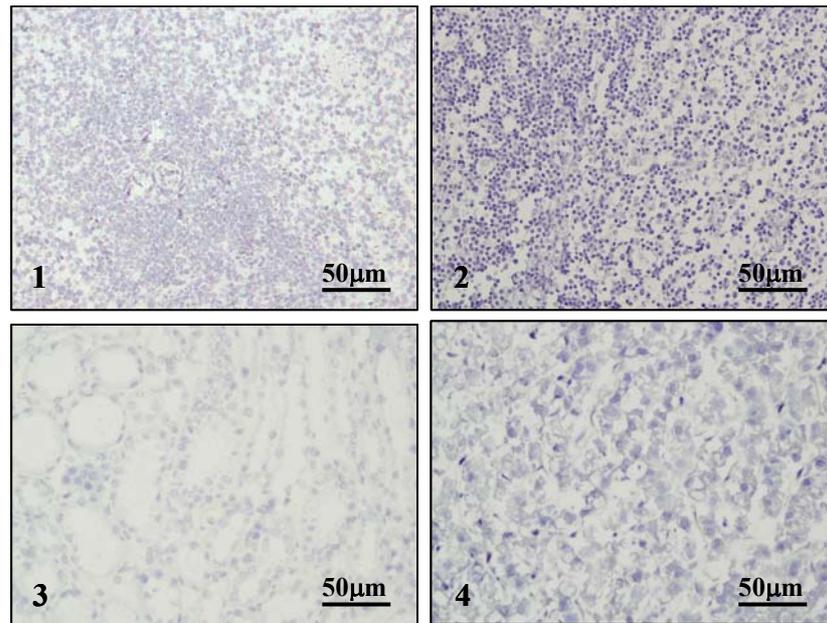


Figura 64: Expresión de vp29 de PERV en 1 Bazo, 2 Ganglio, 3 Riñón y 4 Hígado en un babuino sin trasplantar.

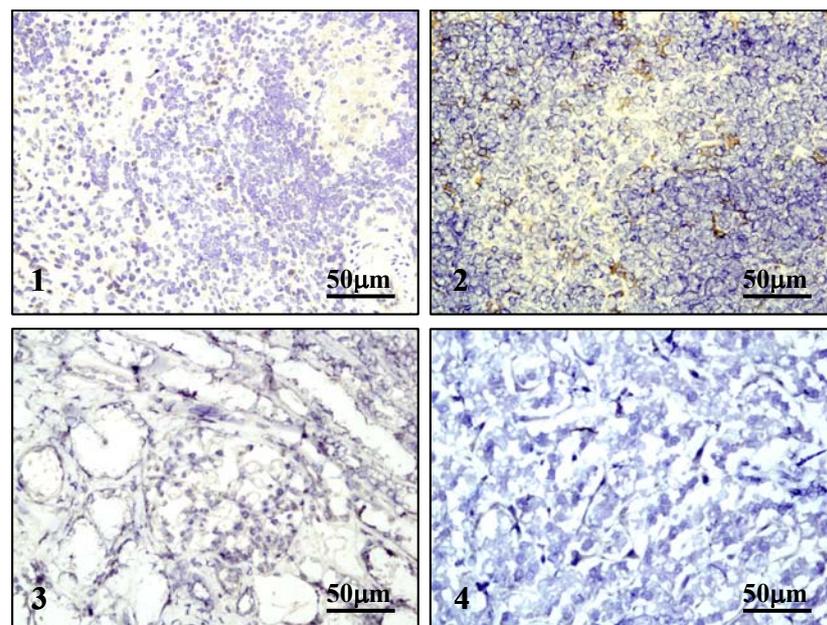


Figura 65: Expresión de vp29 de PERV en 1 Bazo, 2 Ganglio, 3 Riñón y 4 Hígado de un babuino trasplantado con un xenoinjerto porcino (D10).

Como cabía esperar en los 4 órganos de cerdo se encontró expresión positiva de PERV (Figura 63), mientras que los resultados fueron negativos en los órganos del babuino sin trasplantar (Figura 64). Cuando se realizó el mismo tipo de análisis pero en el babuino trasplantado D10 se observó una ligera expresión de PERV en bazo, ganglio y riñón, aunque no en hígado (Figura 65).

Para analizar si los resultados obtenidos en este animal con el anti-suero α vp29 eran debidos a la posible presencia de células porcinas en los órganos estudiados, utilizamos dos AcMo específicos de cerdo que reconocen la molécula CD46, presente en todas las células porcinas, y SWC3 (marcador de células mieloides), respectivamente.

Los resultados obtenidos al analizar el bazo de los animales estudiados con el AcMo CD46 mostraron que son similares a los obtenidos al estudiar la presencia de PERV, todas las células eran positivas en el cerdo, negativas en el babuino sin trasplantar y sólo algunas células positivas en el caso del babuino trasplantado. Los resultados obtenidos con el AcMo SWC3 indicaron que al menos un porcentaje elevado de estas células porcinas presentes en el babuino trasplantado son de la estirpe mieloide (Figura 66).

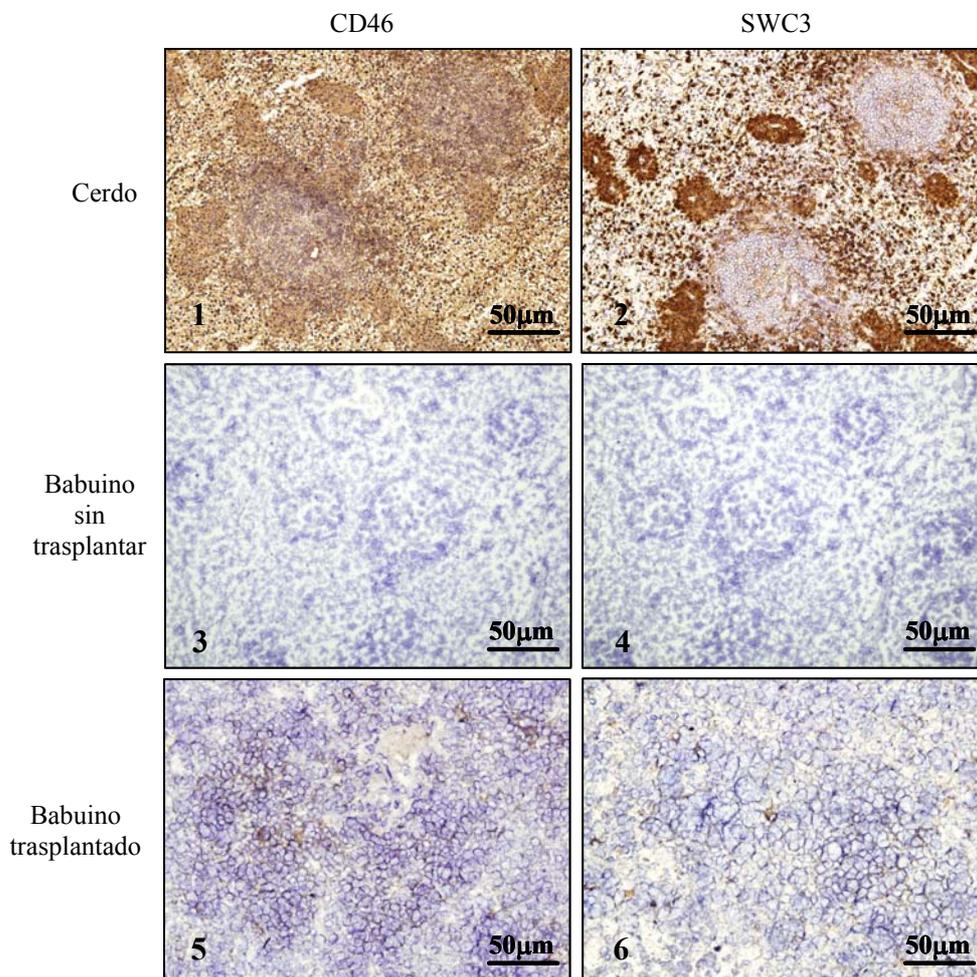


Figura 66: Expresión por inmunohistoquímica de CD46 y SWC3 en bazo de cerdo, babuino sin trasplantar y babuino trasplantado D10.

Al analizar el ganglio del animal estudiado con el Ac CD46, los resultados obtenidos mostraron que fueron similares a los obtenidos en el bazo, es decir, positivos en el cerdo, negativos en el babuino sin trasplantar y algunas células positivas en el caso del babuino trasplantado. Con el AcMo SWC3 los resultados obtenidos indicaron también que un porcentaje elevado de estas células porcinas presentes en el babuino trasplantado eran de la estirpe mieloide (Figura 67).

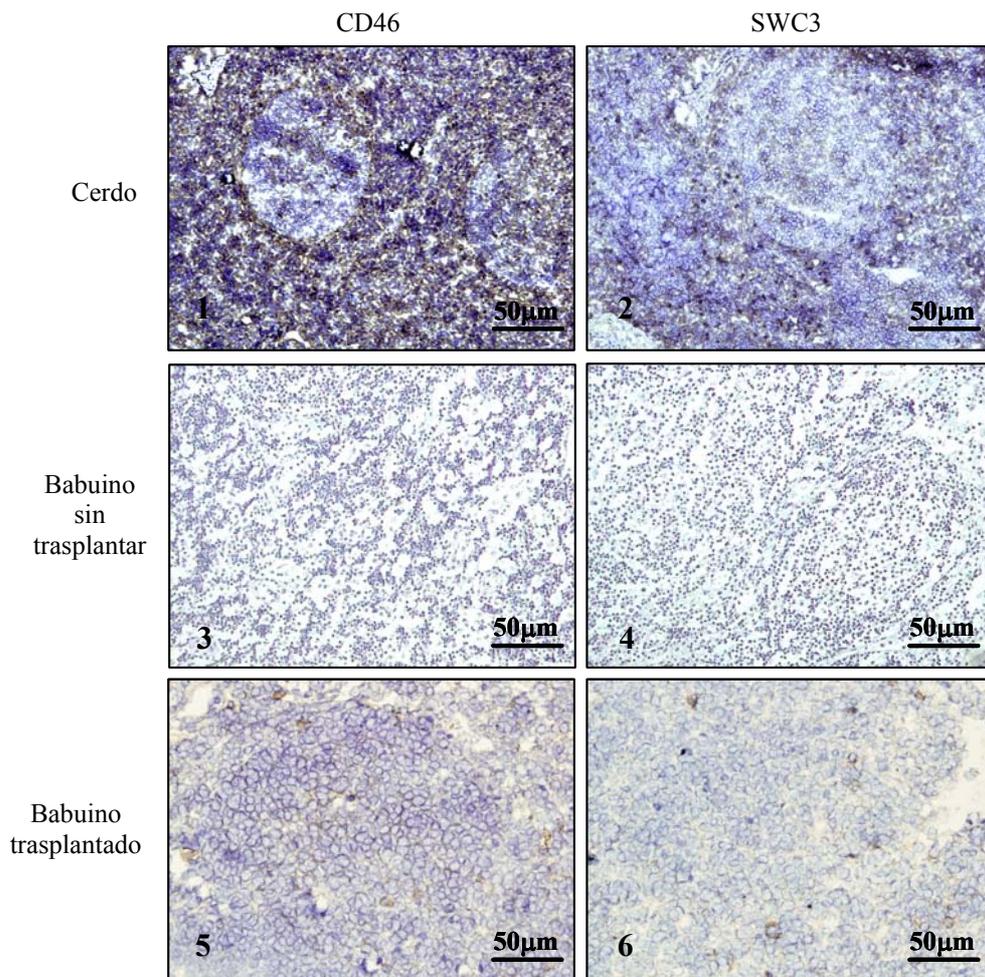


Figura 67: Expresión por inmunohistoquímica de CD46 y SWC3 en ganglio de cerdo, babuino sin trasplantar y babuino trasplantado D10.

En el caso del riñón, la expresión de CD46 era de nuevo muy positiva en el cerdo como cabía esperar y negativa en el babuino sin trasplantar. Nuevamente se observaron células positivas en el babuino trasplantado pero en este caso el número era mucho

menor que las encontradas en el riñón y ganglio y de nuevo el resultado con SWC3 sugería que algunas células eran mieloides (Figura 68).

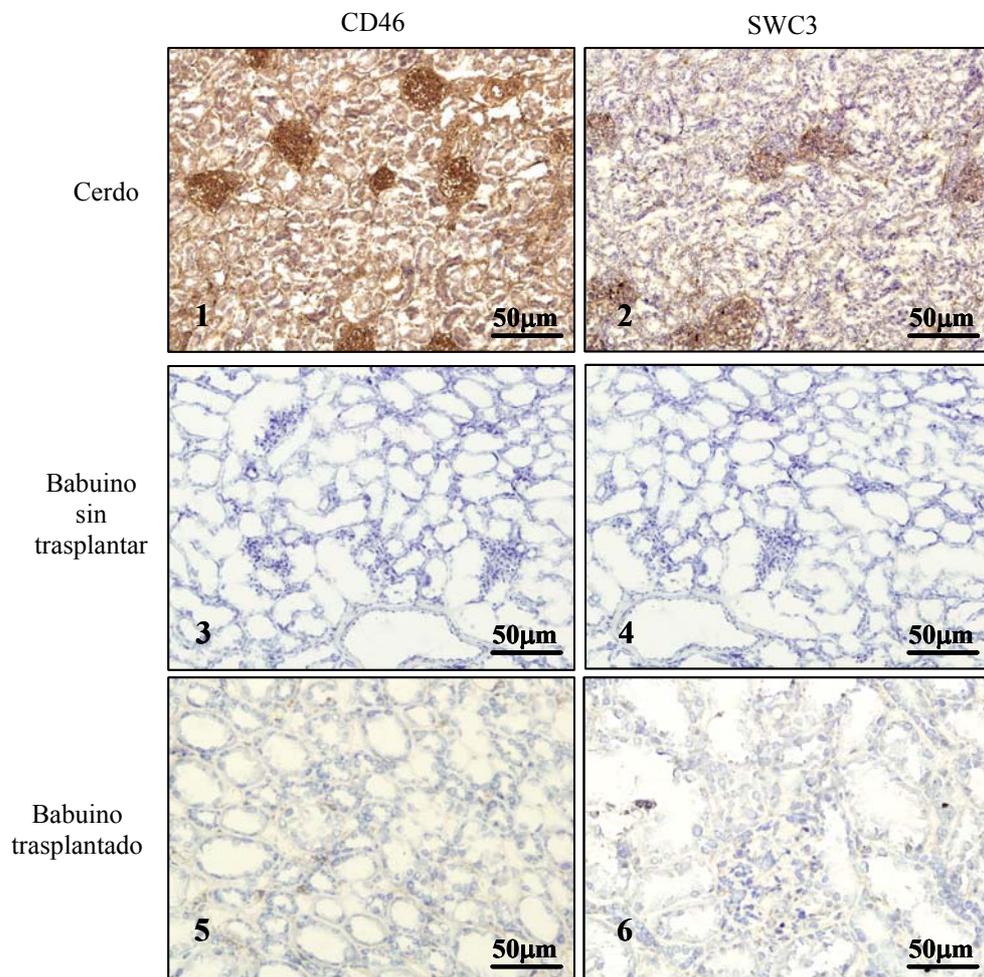


Figura 68: Expresión por inmunohistoquímica de CD46 y SWC3 en riñón de cerdo, babuino sin trasplantar y babuino trasplantado D10.

En el caso del hígado, la expresión de CD46 era positiva para cerdo, negativa para babuino sin trasplantar, pero también negativa para el babuino trasplantado lo que parecía indicar la ausencia de quimerismo porcino en este órgano, al menos para este animal. Los resultados para SWC3 fueron equivalentes (Figura 69).

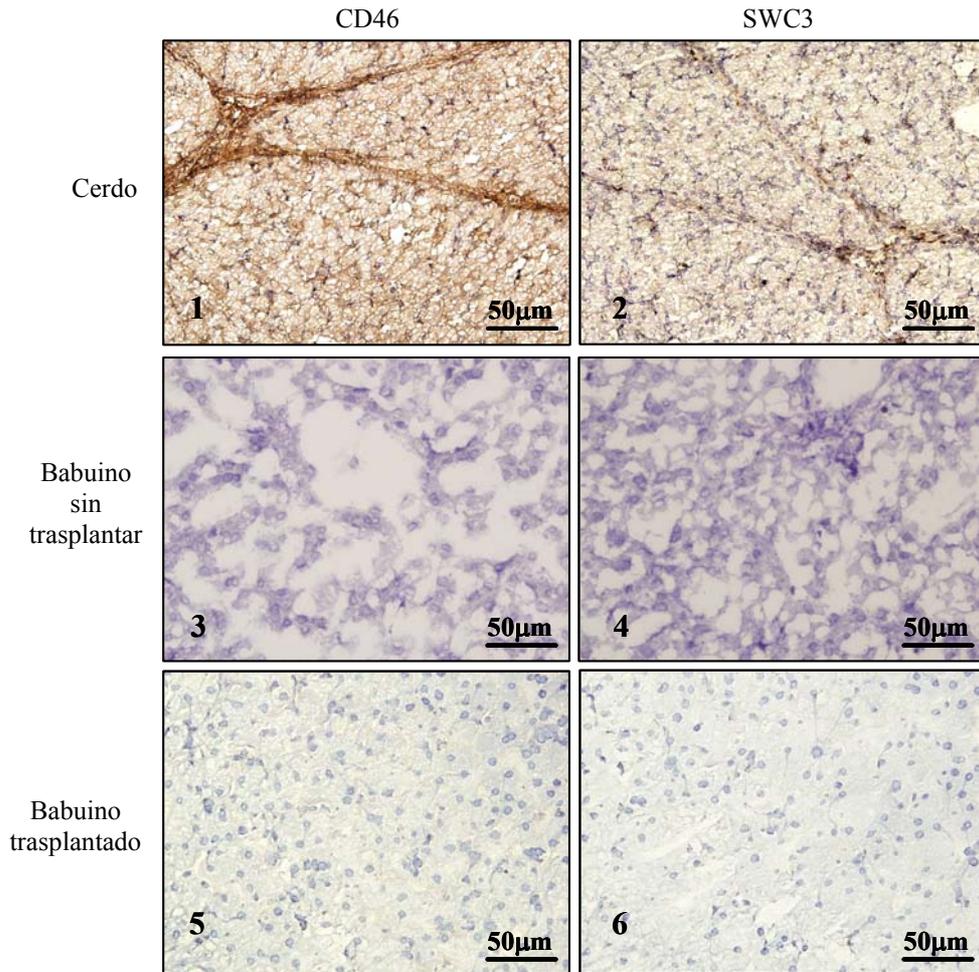


Figura 69: Expresión por inmunohistoquímica de CD46 y SWC3 en hígado de cerdo, babuino sin trasplantar y babuino trasplantado.

En resumen, analizando en conjunto los datos de cinco animales receptores estudiados del grupo A los resultados de inmunohistoquímica demostraron la presencia variable (entre 5-10%) de células porcinas (positivas para CD46 porcino) en todos los babuinos analizados, aunque en distinta proporción según los órganos estudiados (bazo>ganglio>riñón>hígado) (Tabla 8). Un porcentaje significativo de estas células parecían pertenecer a la estirpe macrófago-dendrítica tanto por su morfología como por la presencia del marcador específico SWC3. No se encontró ninguna relación entre una mayor presencia de xenoquimerismo y una mayor supervivencia.

Órgano	% Quimerismo	% de casos
Bazo	5-10%	100%
Ganglio	1-5%	100%
Riñón	1-5%	83%
Hígado	≤1%	50%

Tabla 8: Resumen de los resultados obtenidos en cada órgano.

A la vista de los resultados obtenidos, se pudo confirmar la existencia de células circulantes de cerdo en el babuino tras el xenotrasplante de corazón de cerdo hDAF transgénico, lo que indicó la existencia de xenoquimerismo en estos animales.

Resumen de resultados obtenidos en la detección de PERV y quimerismo en los plasmas, sueros y células de los babuinos xenotrasplantados (Tabla 9).

Grupo	Babuino	RT-PCR	PCR	1 ^a /2 ^a PCR NESTED <i>MitCoII</i>	Western- blot
		<i>proteasa- polimerasa</i>	<i>proteasa- polimerasa</i>		
A	C64	-	N.D.	N.D.	-
A	C70	-	N.D.	N.D.	-
A	C76	-	N.D.	N.D.	-
A	D10	-	N.D.	N.D.	-
A	D23	-	-	+	-
B	D5	-	-	+	-
B	D35	-	N.D.	N.D.	-
B	D40	-	-	+	-
B	D50	-	N.D.	N.D.	-
C	C49	-	+	+	-
C	C53	-	N.D.	N.D.	-
C	C62	-	N.D.	N.D.	-
C	C78	-	+	+	-
C	D17	-	N.D.	N.D.	-
C	D32	-	+	+	-
C	D41	-	N.D.	N.D.	-
C	D51	-	-	+	-

D	C51	-	N.D.	N.D.	-
D	C52	-	-	-	-
D	C68	-	-	+	-
D	C69	-	+	+	-
D	D48	-	N.D.	N.D.	-
E	D22	-	+	+	-
E	D42	-	+	+	-
E	D45	-	-	-	-
E	D47	-	-	+	-
E	D49	-	N.D.	N.D.	-

Tabla 9: Resumen de resultados RT-PCR y PCR con cebadores *proteasa- polimerasa* y cebadores *Mit COII* a partir de las CMSPs de babuino y *western-blot*. **N.D.** muestra no disponible.

3. Obtención y caracterización de células útiles para su uso en un modelo porcino de regeneración cardiaca

3.1. Obtención y caracterización de mioblastos

Los mioblastos se obtuvieron a partir de músculo esquelético porcino, tras digestiones con colagenasa y tripsina, se subcultivaron 2-3 veces hasta su uso aproximadamente 4 semanas después. También se cultivaron cardiomiocitos a partir de corazón de cerdos normales, que se obtuvieron con el mismo proceso de digestión y se cultivaron de la misma forma que los mioblastos. Los mioblastos se compararon con los cardiomiocitos morfológicamente, tras examen en el microscopio invertido, antigénicamente por citometría de flujo y por inmunohistoquímica empleando para ello marcadores específicos de cardiomiocitos.

- **Análisis morfológico de los mioblastos**

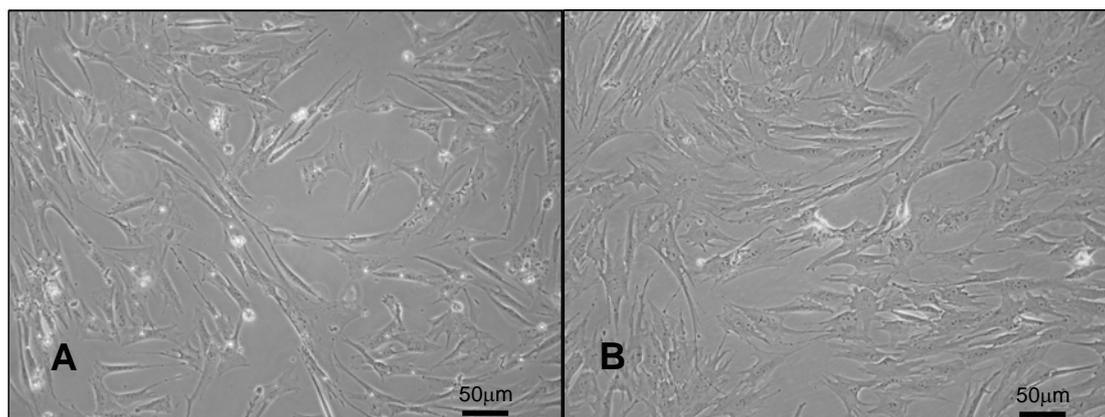


Figura 70: Fotografías de cultivos realizadas en un microscopio invertido a las 2 semanas de cultivo aproximadamente. A) Cardiomiocitos, B) Mioblastos.

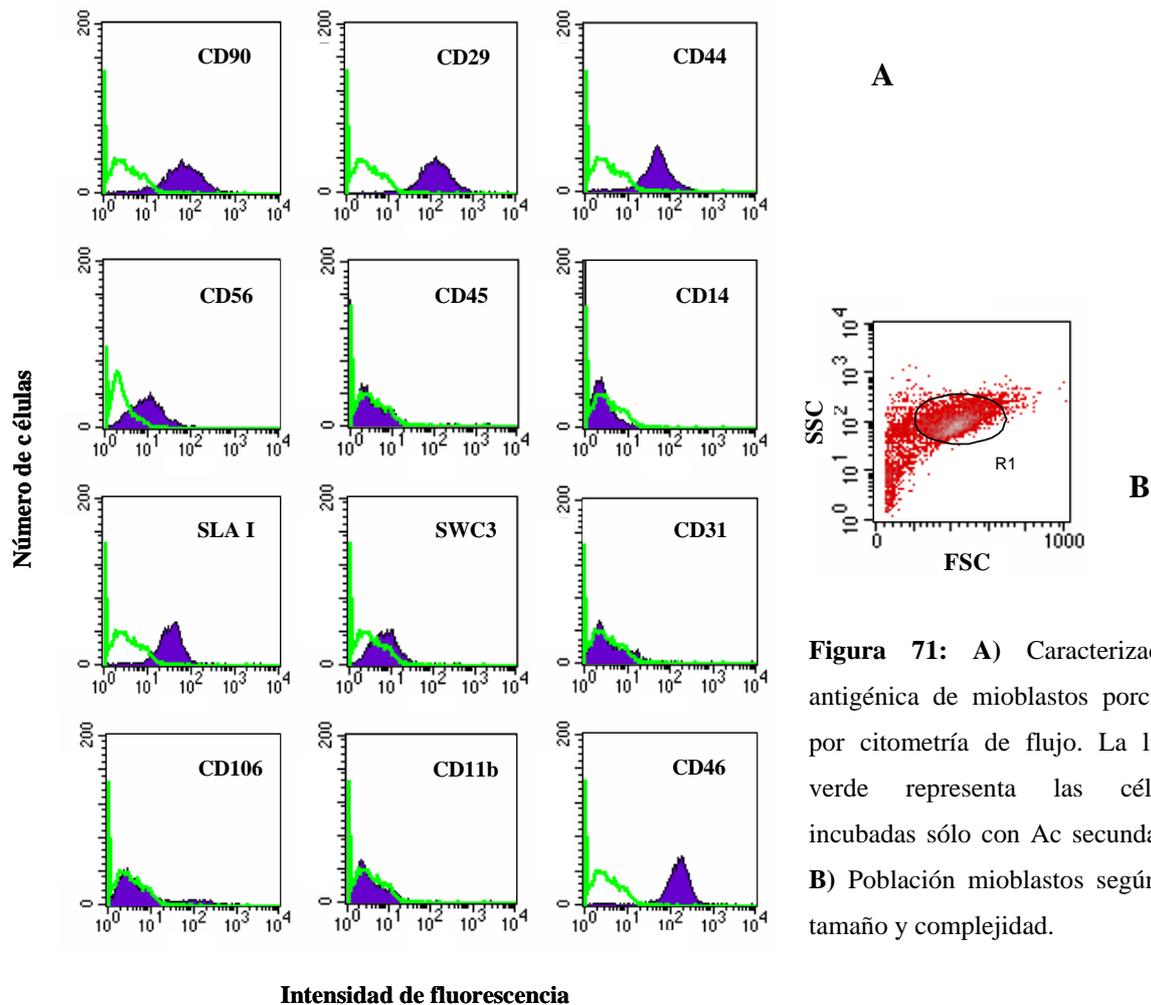
Como se puede observar en las fotografías de los cultivos, tanto los cardiomiocitos como los mioblastos son muy similares entre sí morfológicamente. Ambos tienen una forma alargada, con forma de huso parecida a la de fibroblastos (Figura 70).

- **Caracterización antigénica por citometría de flujo**

La caracterización de dichas células se realizó por citometría de flujo con los AcMo que reconocen los antígenos que habían sido anteriormente utilizados en estudios similares

en humanos CD14, CD29, CD44, CD45, CD56 y CD90, y además para una mayor caracterización se utilizaron otros Acs específicos de cerdo, que reconocen CD11b, CD31, CD46, CD106, SLA I y SWC3.

Los mioblastos expresaron los antígenos CD90 (79,13%±21,14), CD29 (95%±10,38), CD44 (91,45%±10,80), CD56 (27,32%±31,74), SLA I (62,8%±37,19), SWC3 (7,32%±6,40) y CD46 (96,95%±3,88) y no expresaron o expresaron en bajo porcentaje (menos del 5%) el resto de marcadores CD45 (0,60±0,46), CD14 (3,31±8,26), CD31 (1,81±1,77), CD106 (3,89±4,31), CD11b (2,56±4,32) (Media ± DT) (n=8), se muestra un experimento representativo en la figura 71.



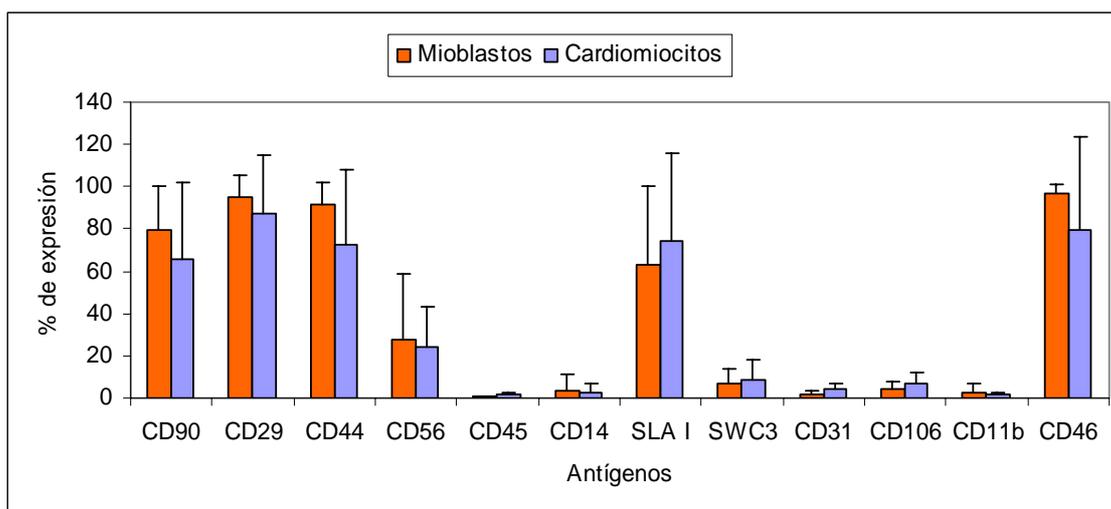


Figura 72: Caracterización antigénica de mioblastos y cardiomiocitos por citometría de flujo.

Se analizaron los mismos marcadores en cardiomiocitos y los resultados fueron que también expresaron los antígenos CD90 ($81,94\% \pm 6,09$), CD29 ($99,70\% \pm 0,2$), CD44 ($82,92\% \pm 31,01$), CD56 ($26,63\% \pm 21,51$), SLA I ($92,84\% \pm 4,76$), SWC3 ($10,26 \pm 10,34$), CD31 ($5,05 \pm 2,66$), CD106 ($8,17 \pm 4,81$), CD46 ($99,37\% \pm 0,46$) y no expresan o expresan (menos del 5%) CD45 ($1,72 \pm 1,35$), CD14 ($3,44 \pm 4,51$) y CD11b ($1,73 \pm 1,10$) ($n=4$) (Figura 72).

Tras el análisis estadístico de los datos obtenidos en la citometría de flujo de los mioblastos y cardiomiocitos, los resultados indicaron que no existían diferencias significativas en la expresión de los antígenos analizados entre ambos tipos celulares.

- **Caracterización antigénica por inmunohistoquímica**

La comparación antigénica entre mioblastos obtenidos de cultivo y cardiomiocitos de cortes de tejido cardíaco también se realizó por inmunohistoquímica empleando los marcadores actina muscular, que es una proteína del músculo; conexina 43, que forma parte de las uniones GAP; desmina, que está localizada en miofibrillas del músculo esquelético y músculo cardíaco en las líneas Z, regiones de unión celular y discos intercalares cardíacos; y troponina T, que está localizada principalmente en las bandas I de miofibrillas. En ambos casos se cuantificó su expresión mediante un programa informático, *analySIS^D FIVE*, para facilitar su comparación.

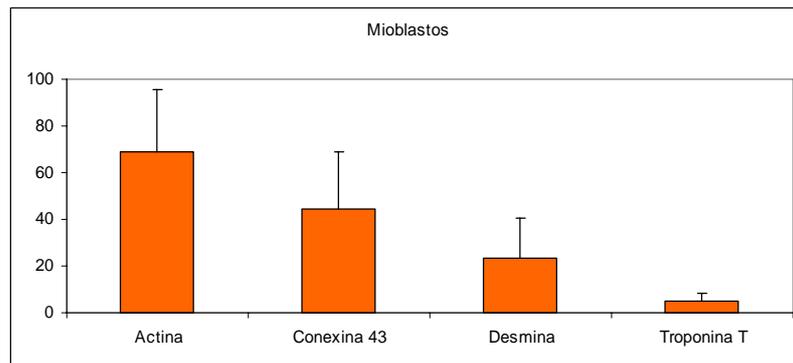


Figura 73: Cuantificación de la expresión de actina muscular, conexina 43, desmina y troponina T en mioblastos, los resultados se muestran como la media del % expresión de cada marcador (n=8).

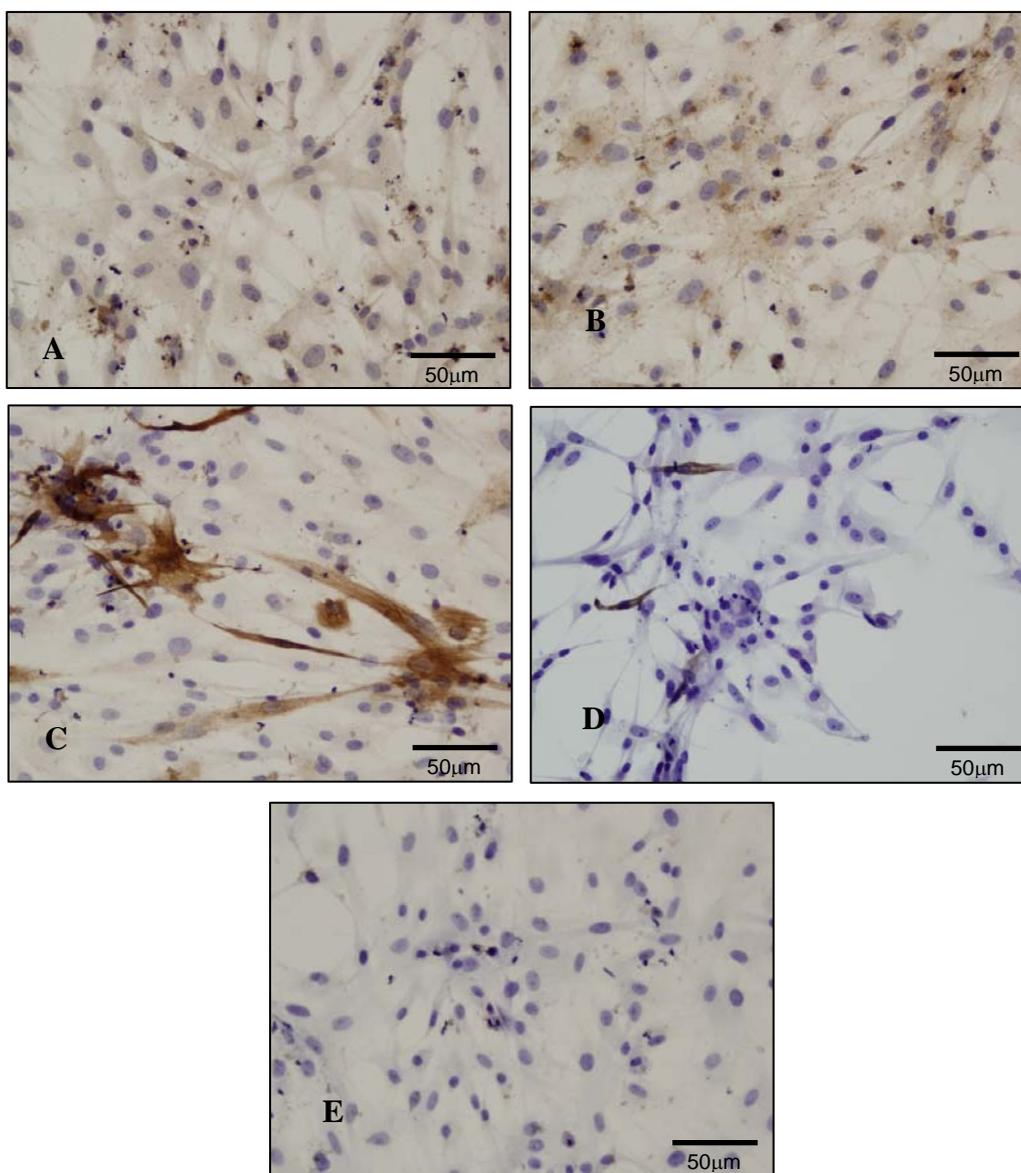


Figura 74: Inmunohistoquímica de un cultivo de mioblastos con los marcadores A) Actina muscular, B) Conexina 43, C) Desmina, D) Troponina T y E) control negativo mioblastos sin AcMo.

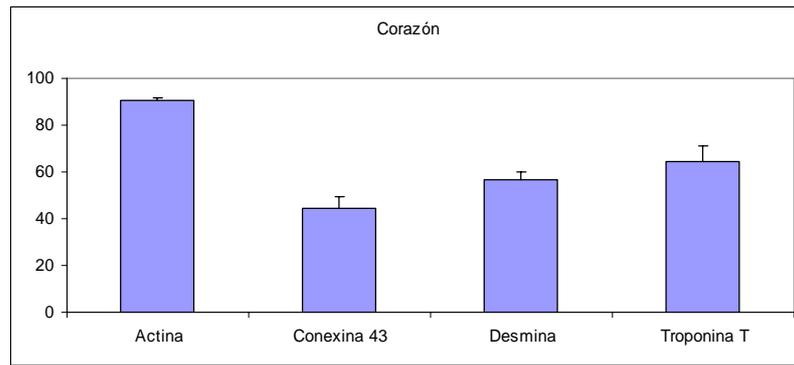


Figura 75: Cuantificación de la expresión de actina muscular, conexina 43, desmina y troponina T en tejido de corazón, los resultados se muestran como la media del % expresión de cada marcador (n=3).

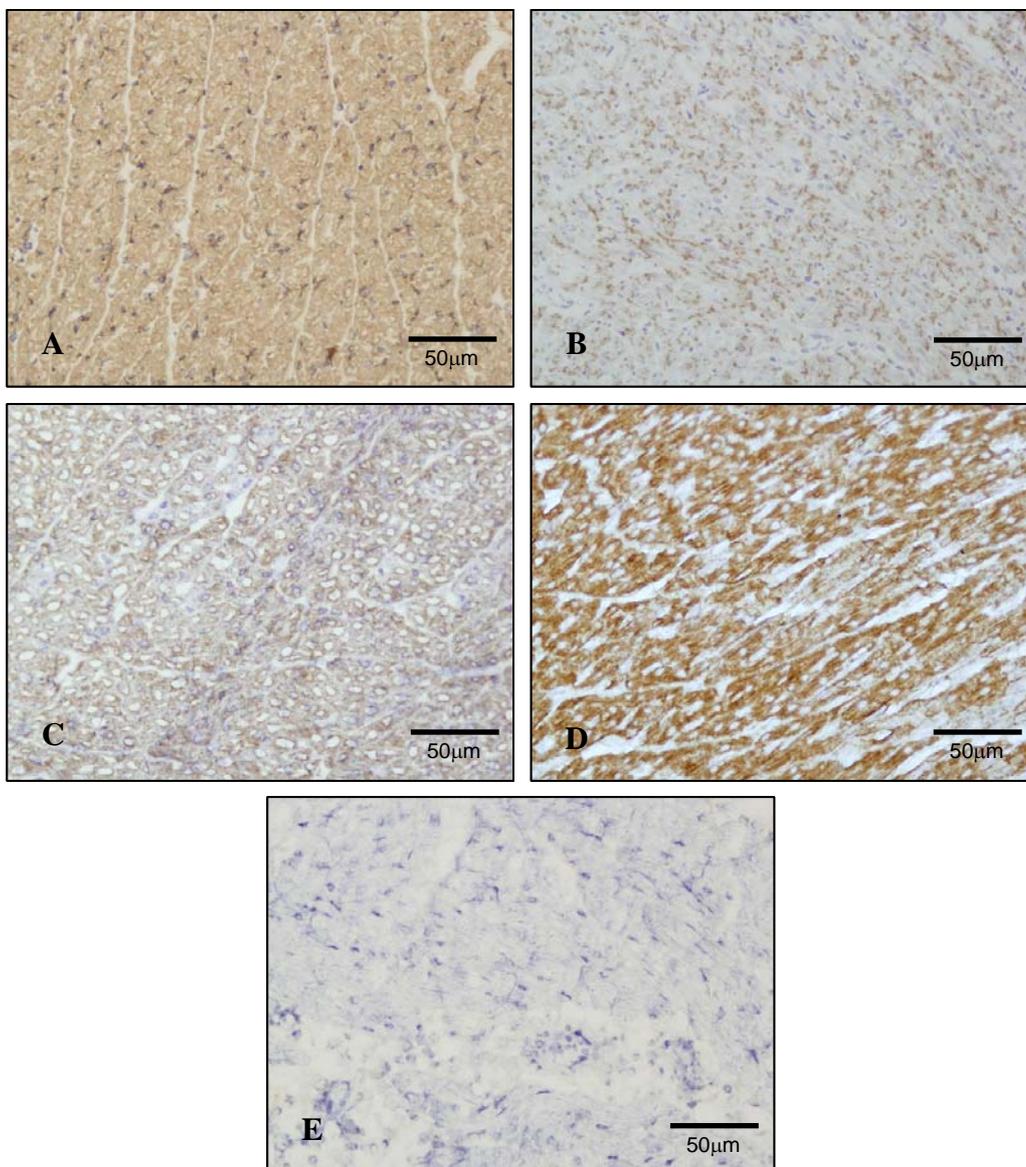


Figura 76: Inmunohistoquímica de tejido de corazón porcino con los marcadores A) Actina muscular, B) Conexina 43, C) Desmina, D) Troponina T y E) control negativo cardiomiocitos sin AcMo.

Viendo los gráficos de cuantificación, se puede observar que los mioblastos obtenidos en cultivo expresaron actina muscular un $68,85 \pm 26,7\%$, conexina 43 un $44,70 \pm 24,0\%$, desmina un $23,46 \pm 17,2\%$ y troponina T un $4,89 \pm 3,68\%$ ($n=3$) (Figura 73), se muestra un experimento representativo en la figura 74. La expresión de estos marcadores en los cardiomiocitos fue similar en el caso de conexina 43 $44,47 \pm 4,94\%$, siendo mayor la expresión de actina muscular $90,36 \pm 1,17\%$, desmina $56,67 \pm 3,19\%$ y troponina T $64,65 \pm 6,33\%$ ($n=3$) (Media \pm DT) (Figura 75). En las figuras 74 y 76 se muestran experimentos representativos donde se aprecia la expresión de actina muscular, conexina 43, desmina y troponina T, en mioblastos y tejido de corazón.

3.2. Obtención y caracterización de CMMp

Las CMM se obtuvieron a partir de aspirados medulares de fémur, costillas o esternón porcinos, tras lavarlas con HBSS se sometieron a un gradiente de densidad, a las 72 horas se eliminaron las células no adherentes. Las células adherentes se cultivaron aproximadamente hasta 4 semanas, durante las cuales se subcultivaron 2-3 veces. Se compararon morfológica y fenotípicamente con los cardiomiocitos por citometría de flujo, para caracterizar sus marcadores de superficie, y por inmunohistoquímica empleando para ello los marcadores específicos de cardiomiocitos ya comentados.

- **Caracterización morfológica e identificación**

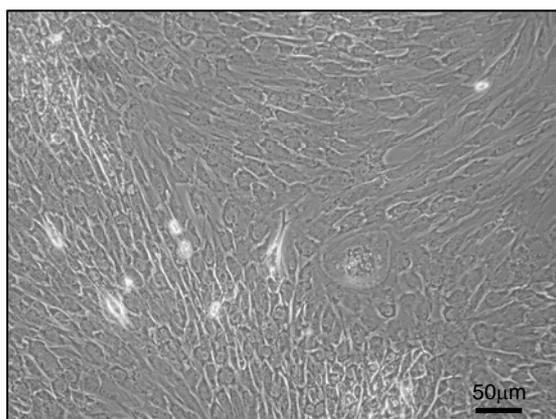


Figura 77: Fotografía del cultivo de las CMMp realizada en un microscopio invertido, aproximadamente 4 semanas después del comienzo del cultivo.

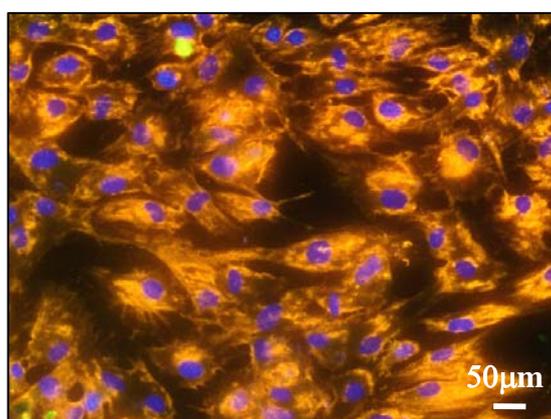
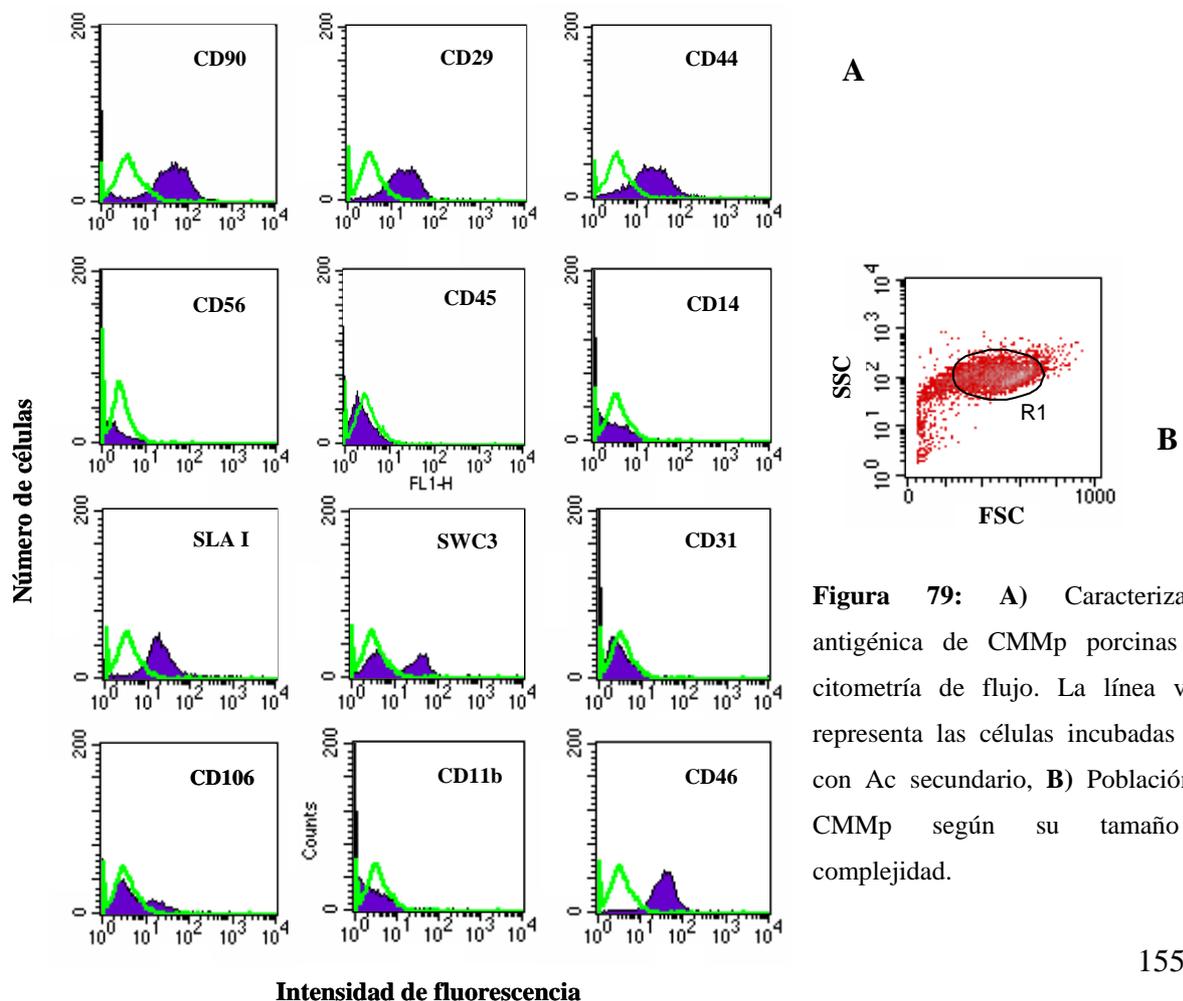


Figura 78: Inmunofluorescencia de CMMp utilizando como Ac primario un AcMo que reconoce la vimentina.

Morfológicamente las CMMp son muy diferentes tanto a mioblastos como a cardiomiocitos, no tienen forma de huso (Figura 77). Para identificar si realmente eran CMMp y analizar la pureza del cultivo se utilizó el AcMo que reconoce a la vimentina, marcador de CMM (Figura 78). Los resultados demostraron que prácticamente el 100% de las células expresaban este marcador, lo que indica la pureza y especificidad del cultivo.

- **Caracterización antigénica por citometría de flujo**

Las CMMp se caracterizaron con los mismos AcMo empleados en la caracterización de los mioblastos obteniendo los siguientes resultados, estas células expresaron CD90 (62,38%±32,96), CD29 (88,76%±18,68), CD44 (55,28%±32,44), SLA I (53,11%±28,86), SWC3 (10,62%±13,47), CD106 (6,06%±7,57), CD46 (90,34%±14,82) y no expresaron o lo hicieron en menos del 5% CD56 (3,14%±7,15), CD45 (3,82%±4,48), CD14 (2,28%±3,47), CD31 (2,30%±2,75), CD11b (4,68%±4,47) (n=11). Se muestra un experimento representativo en la figura 79. Esto, concuerda con los datos descritos anteriormente para las CMM humanas e indican, por tanto, que ambos tipos de células eran fenotípicamente similares.



3.3. Diferenciación de CMMp a cardiomiocitos

Para tratar de diferenciar las CMMp a células con características de cardiomiocitos, después de 48 horas de la eliminación de las células adherentes del cultivo de CMM, se añadió 5-azacitidina al medio de cultivo DMEM en una concentración 10mM. El medio se eliminó 24 horas más tarde, se añadió medio nuevo y las células se dejaron cultivando hasta unas 4 semanas cambiando el medio cada 2 ó 3 días. Las células obtenidas se compararon con las no diferenciadas con 5-azacitidina y con los cardiomiocitos por citometría de flujo y por inmunohistoquímica empleando los mismos marcadores específicos de cardiomiocitos.

- **Caracterización morfológica**

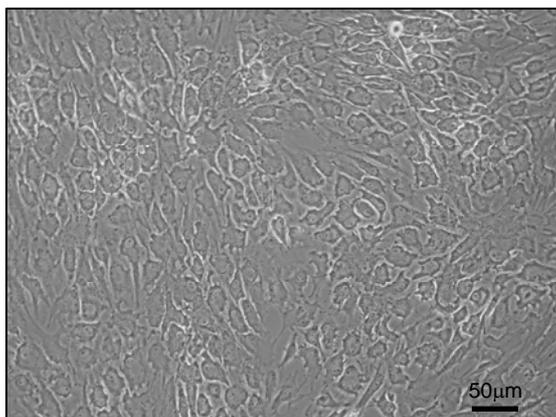


Figura 80: Fotografía del cultivo de CMMp tratadas con 5-azacitidina realizada en un microscopio invertido, aproximadamente 4 semanas después del comienzo del cultivo.

Morfológicamente las CMMp diferenciadas (Figura 80) eran muy parecidas a las CMMp sin diferenciar (Figura 77) y por tanto también muy diferentes a los cardiomiocitos y mioblastos descritos anteriormente (Figura 70).

- **Caracterización antigénica por citometría de flujo**

El análisis por citometría de flujo indicó que las CMMp diferenciadas con 5-azacitidina expresaron CD90 (48,97%±33,93), CD29 (85,44%±17,86), CD44 (48,02%±34,86), SLA I (56,07%±31,31), SWC3 (9,69%±12,66), CD106 (5,99%±6,12), CD46 (92,27%±7,46) y no expresaron o expresaron menos de 5%, CD56 (1,11%±2,11), CD45 (4,28%±6,27), CD14 (0,92%±0,78), CD31 (2,71%±3,41) y CD11b (3,50%±5,30) (n=11) (Figura 81).

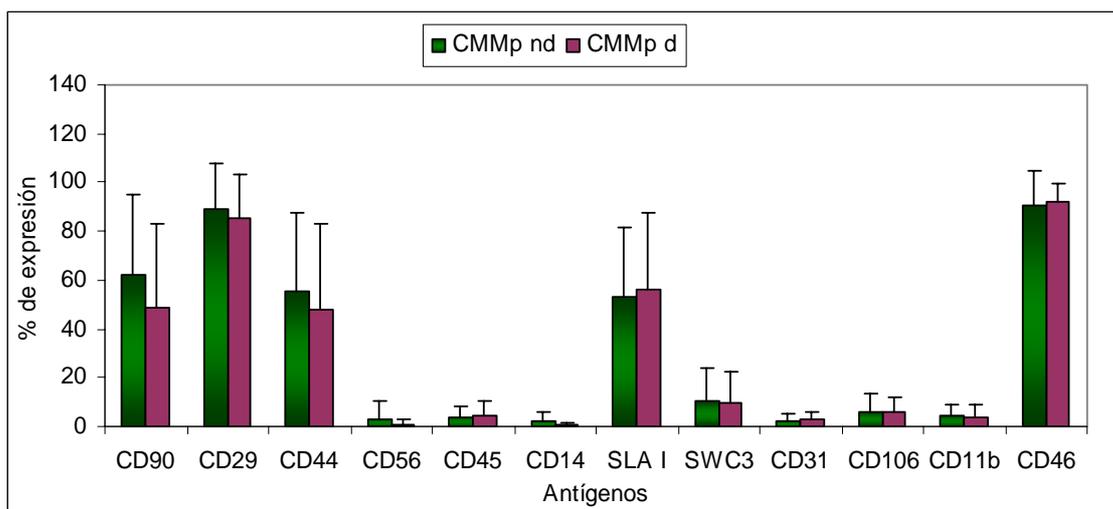


Figura 81: Caracterización antigénica de CMMp no diferenciadas y diferenciadas con 5-azacitidina por citometría de flujo.

Cuando se compararon los niveles de expresión de todos estos antígenos en las CMMp diferenciadas con 5-azacitidina con los obtenidos anteriormente en las CMMp sin diferenciar no se encontraron diferencias significativas.

- **Caracterización antigénica por inmunohistoquímica**

Para estos estudios nuevamente se compararon las CMMp no diferenciadas y diferenciadas con 5-azacitidina, analizando la expresión de los mismos 4 marcadores: actina muscular, conexina 43, desmina y troponina T, se habían utilizado con los mioblastos.

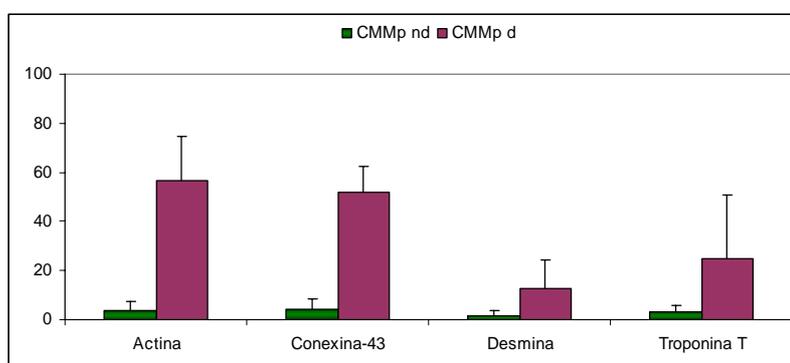


Figura 82: Cuantificación de la expresión de actina muscular, conexina 43, desmina y troponina T en CMMp (n=4) y CMMpd (n=6), los resultados se muestran como la media del % de expresión de cada marcador.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de la expresión de los cuatro marcadores en las CMMp no diferenciadas o diferenciadas demostraron que la expresión de la actina muscular aumenta de $3,76\pm 3,7\%$ a $56,78\pm 17,58\%$, tras el tratamiento con 5-azacitidina, y lo mismo ocurrió con la conexina 43 que pasó de una expresión de $4,22\pm 4,3\%$ a $51,88\pm 10,48\%$, con la desmina que pasó de $1,44\pm 2,02\%$ a $12,62\pm 11,70\%$ y la troponina T que aumentó de $3,39\pm 2,44\%$ a $25,08\pm 25,81\%$ (CMMp n=4 y CMMp diferenciadas n=6) (Media \pm DT) (Figura 82). Se muestran experimentos representativos de las expresiones de los 4 marcadores en las CMMp no diferenciadas y diferenciadas en las figuras 83 y 84 respectivamente.

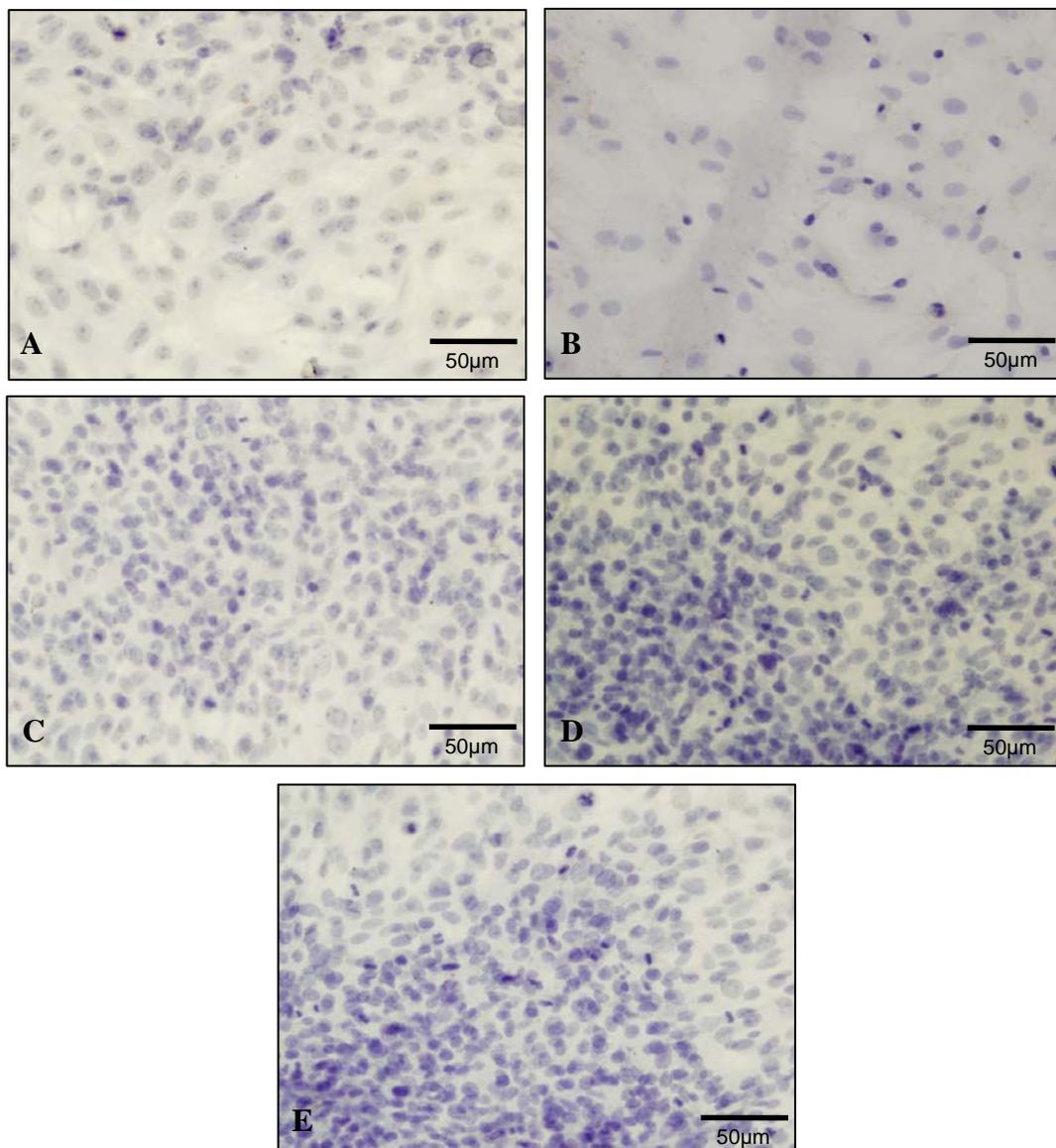


Figura 83: Inmunohistoquímica en CMMp con los marcadores A) Actina muscular, B) Conexina 43, C) Desmina, D) Troponina T y E) control negativo CMMp sin AcMo.

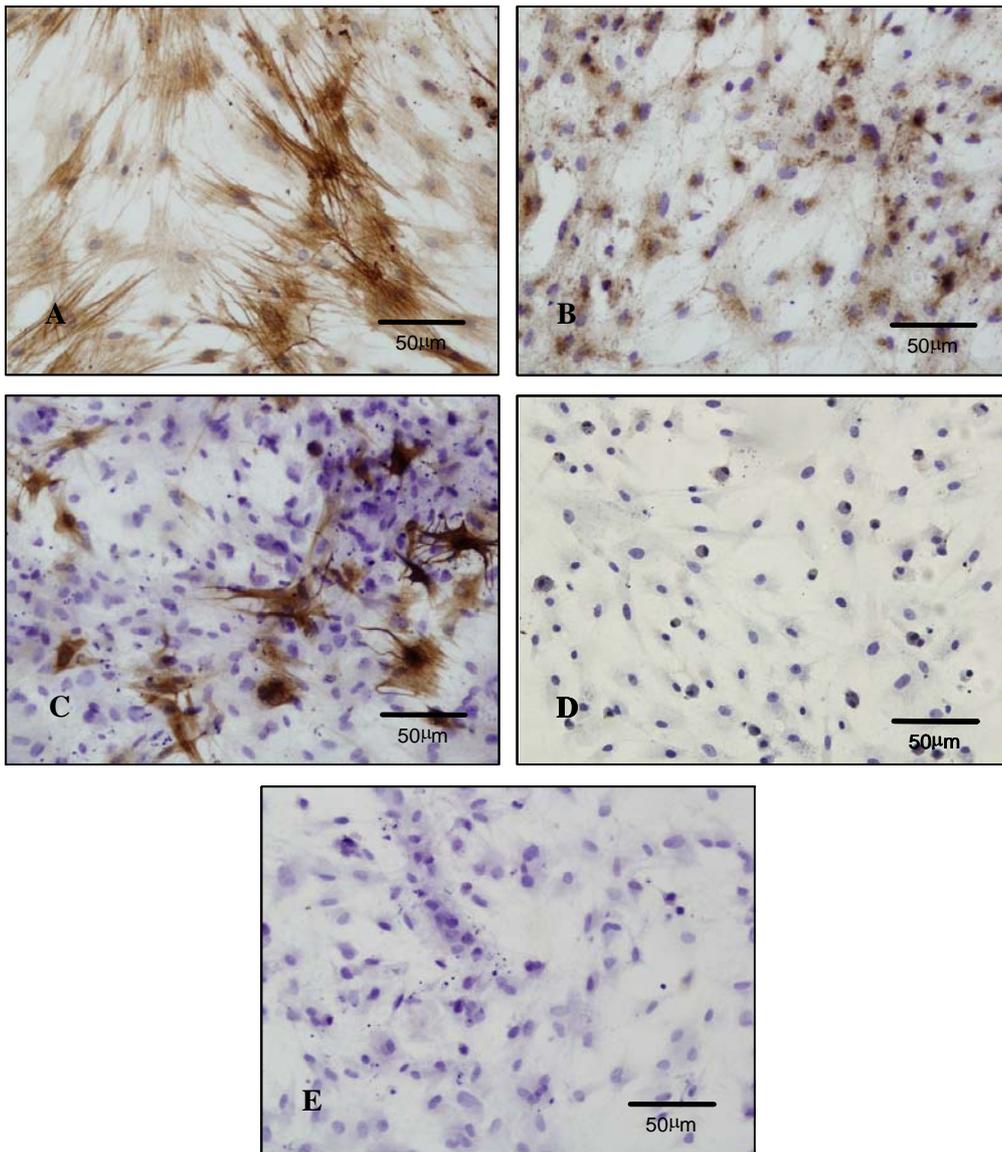


Figura 84: Inmunohistoquímica en CMMp diferenciadas con 5-azacitidina con los marcadores A) Actina muscular, B) Conexina 43, C) Desmina, D) Troponina T y E) control negativo, CMMpd sin AcMo.

En estas figuras se observa que en las CMMp no diferenciadas los 4 marcadores prácticamente no se expresan, sin embargo, tras la estimulación con 5-azacitidina, algunas de las CMMp adquirieron el fenotipo de cardiomiocitos como indica la observación de la actina y la desmina que se expresan en las miofibrillas y la conexina 43, siendo esta expresión muy similar a la de cardiomiocitos.

- **Confirmación de la expresión de conexina 43 en las CMMpd por *western-blot***

De forma adicional, la aparición de expresión de conexina 43 en las CMMp diferenciadas con 5-azacitidina se analizó por inmunoprecipitación y *western-blot* utilizando el AcMo que reconoce el antígeno, por ser representativo de los 4 utilizados en inmunohistoquímica y ser el único AcMo entre ellos que funcionaba en esta técnica. Para ello se obtuvieron lisados de CMMp sin diferenciar y diferenciadas con 5-azacitidina.

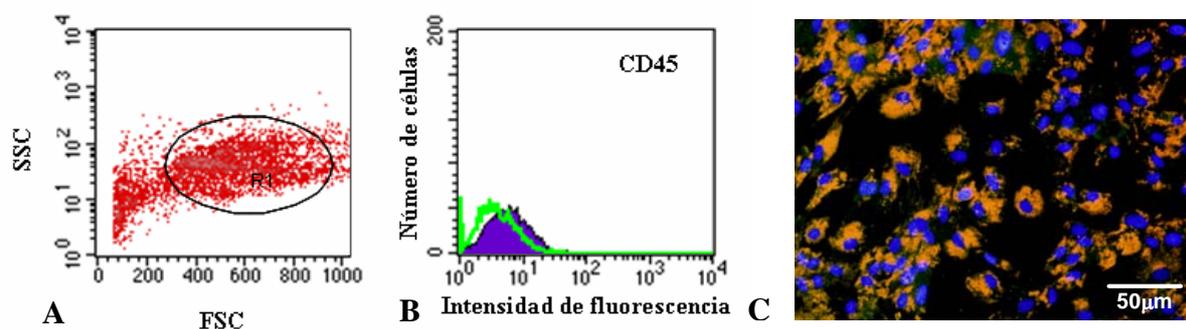


Figura 85: A) Tamaño y complejidad y B) caracterización antigénica con CD45 de CMMp obtenidas de MO después de separar las células CD45⁺ con las Dynabeads por citometría de flujo, C) CMMp marcadas con vimentina tras la separación magnética por inmunofluorescencia.

Las CMMp sin diferenciar se separaron de la población total de MO con un kit de Dynal (Oslo, Noruega), seleccionando células CD45 negativas, para separar las CMMp de la otra población mayoritaria en la MO que eran las células hematopoyéticas (CD45⁺). En esta técnica primero se unen las bolas magnéticas a un AcMo, en este caso un sobrenadante 4D5/CR3 (anti-CD45). Las células obtenidas de la MO y separadas por un gradiente de densidad se incubaron junto con las bolas magnéticas una vez marcadas con el AcMo. Las células no unidas a las bolas fueron las que se utilizaron para el lisado, se comprobó por citometría de flujo que eran CD45⁻ (Figura 85A y B) y que se marcaban con vimentina (Figura 85C), para comprobar que realmente se trataba de CMMp. Se realizó esta técnica debido a que cuando se usaron las CMMp seleccionadas a partir de MO por su propiedad de adherencia al plástico y eliminación de las no adherentes (mayoritariamente células hematopoyéticas CD45⁺), el método promueve por sí solo una pequeña activación de las mismas y cierta expresión de conexina 43.

Las CMMp cultivadas se diferenciaron con 5-azacitidina a diferentes concentraciones (10, 15 y 20 μ M) y diferentes tiempos de incubación (24 y 48 horas), con estas células se realizaron los lisados que se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana que se incubó con el AcMo que reconoce la conexina 43 y como Ac secundario se utilizó anti-Igs murinas marcado con peroxidasa que se reveló con ECL.

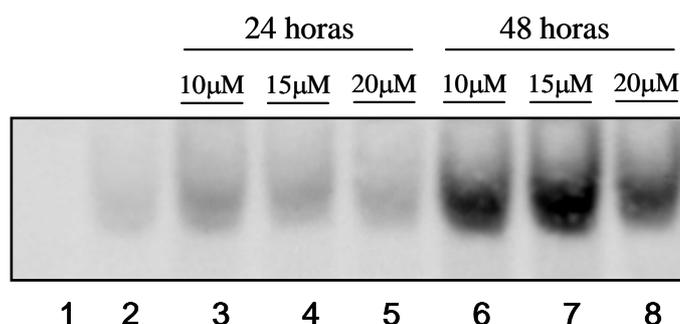


Figura 86: Western-blot donde se incluyen: 1.-CMMp sin diferenciar, 2.-Cardiomiocitos, 3-8.- CMMp + 5-azacitidina. Se utilizó como Ac primario conexina 43 y como Ac secundario anti-Igs murinas marcado con peroxidasa.

Los resultados demostraron que las CMMp sin diferenciar fueron negativas y el resto de CMMp diferenciadas positivas para la expresión de conexina 43 (Figura 86), la intensidad de la señal fue mayor al aumentar el tiempo de incubación pero no varió al aumentar las diferentes concentraciones con 5-azacitidina, incluso disminuye. Se utilizó como control positivo un lisado de cardiomiocitos, que mostró una señal positiva aunque más débil que las CMMp diferenciadas a 24 y 48 horas.

- **Diferenciación de las CMMp con 5-azacitidina a otras estirpes celulares**

Para comprobar que tras el tratamiento con 5-azacitidina las CMMp no se diferenciaron a otras estirpes que no fueran cardiomiocitos, se realizaron tinciones específicas para otras células, de las que anteriormente en la literatura había numerosas referencias acerca de su posible aparición tras la diferenciación de CMM al tener origen mesodérmico (Song L *et al.*, 2004), entre ellas los adipocitos, condrocitos y osteocitos. Para determinar la posible diferenciación a alguno de estas estirpes se realizaron las tinciones específicas Oil-Red-O para adipocitos, azul alcian y safranina O para condrocitos y rojo alizarina y von Kossa para osteocitos.

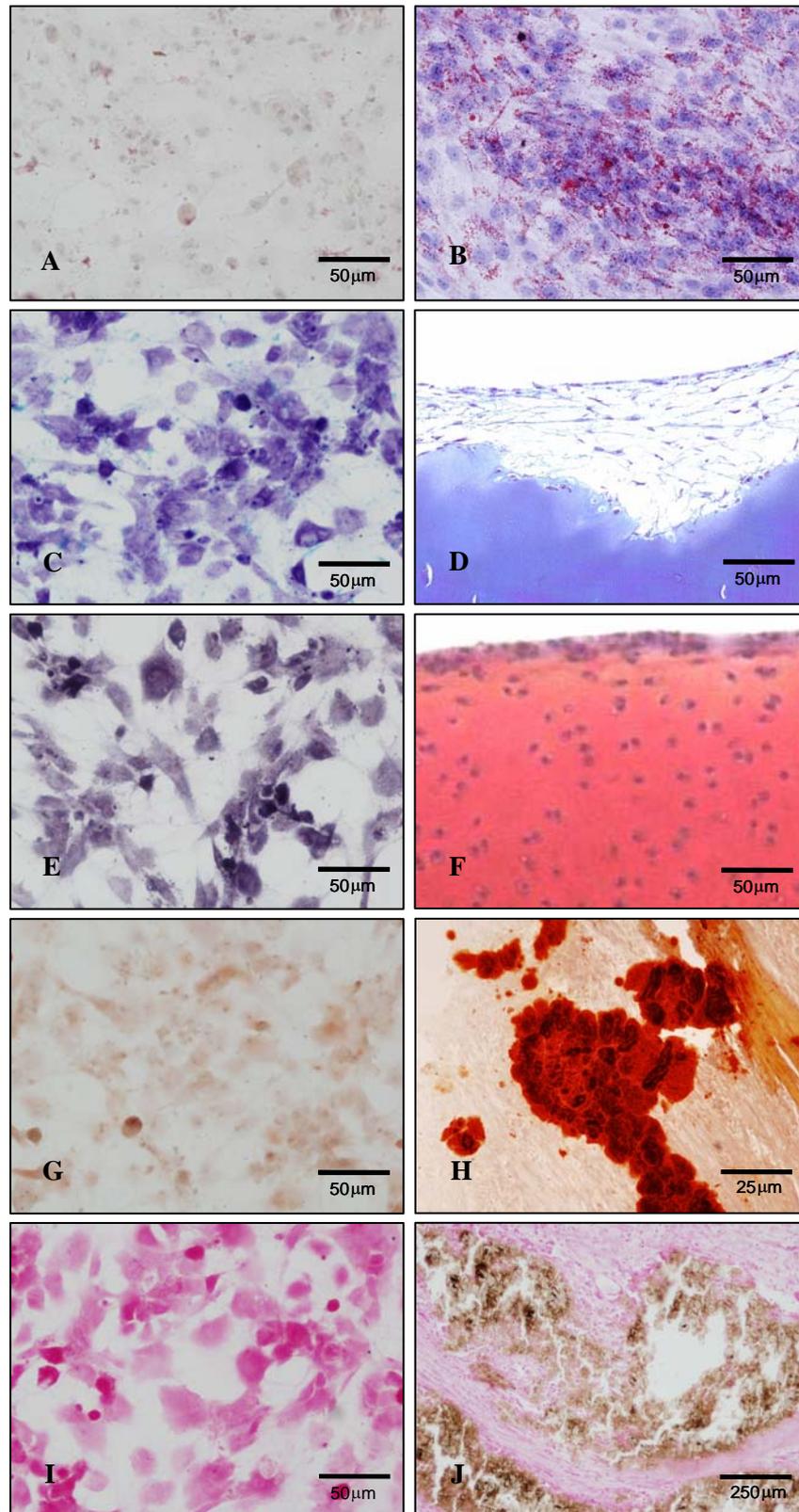


Figura 87: Tinciones específicas de Adipocitos: Oil-Red-O A) CMMp diferenciadas y B) adipocitos porcinos; Condrocitos: azul alcian C) CMMp diferenciadas y D) cartílago humano con condrocitos porcinos; safranina O E) CMMp diferenciadas y F) cartílago de cerdo; y Osteocitos: rojo alizarina G) CMMp diferenciadas y H) corazón porcino con calcificaciones; y von Kossa I) CMMp diferenciadas y J) corazón porcino con calcificaciones.

A la vista de los resultados obtenidos en las tinciones, se pudo observar que las CMMp tratadas con 5-azacitidina no parecían diferenciarse a otras estirpes celulares como adipocitos, condrocitos u osteocitos (Figura 87).

3.4. Obtención y caracterización de las líneas inmortalizadas de CMMp

Como los cultivos primarios tienen limitaciones del tiempo en cultivo y en el número de células obtenidas, en colaboración con el grupo del Dr. Rodríguez-Barbosa de Murcia, se trató de obtener una fuente continua de CMMp mediante la inmortalización de las CMMp. Para ello las células de los cultivos primarios de CMMp se transfectaron con el plásmido pRNS-1. El ADN plasmídico se purificó con un kit de Quiagen y se introdujo en las células, mediado por liposomas, empleando para ello lipofectamina. La selección de transformantes se realizó a las 24 h en medio suplementado con higromicina B. Se aislaron aproximadamente 20 colonias para obtener a partir de ellas diversas líneas de crecimiento. De todas ellas se seleccionaron 4 para nuestros estudios posteriores, a las que se les denominó pBMC-2, pBMC-3, pBMC-4 y pBMC-5 (porcine Bone Marrow Cells).

Con estas 4 líneas se realizaron los mismos estudios morfológicos, por citometría de flujo e inmunohistoquímicos que con el resto de las células de cultivos primarios, tanto sin diferenciar como diferenciadas con 5-azacitidina.

- **Análisis morfológico e identificación**

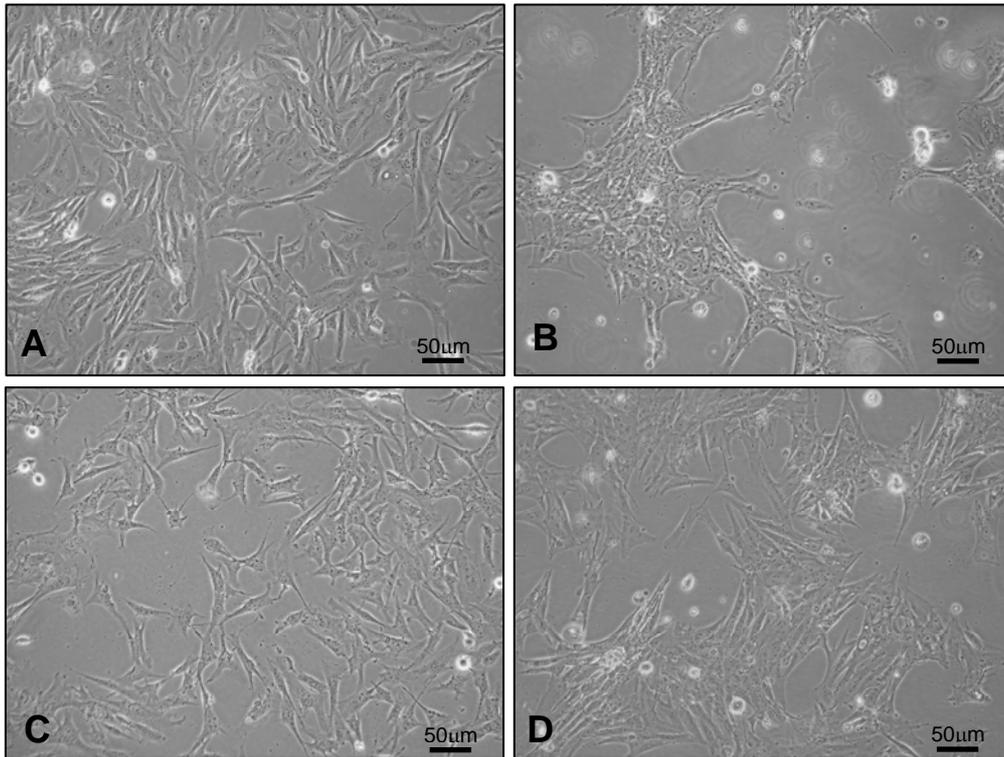


Figura 88: Fotografías de cultivos realizadas en un microscopio invertido. A) pBMC-2, B) pBMC-3, C) pBMC-4 y D) pBMC-5, aproximadamente 1 semana después del comienzo del cultivo.

Las líneas celulares eran muy similares entre sí morfológicamente, con una forma alargada parecida a fibroblastos y con forma de huso pero muy diferentes al cultivo primario de CMMp (Figura 88). Sin embargo, a pesar de no existir diferencias morfológicas, sí las había en su crecimiento, siendo las pBMC-2 y pBMC-3 las líneas que mejor y más rápido crecían, seguidas de pBMC-4 y por último la línea pBMC-5, que tenía un crecimiento muy lento y además envejecía muy rápidamente.

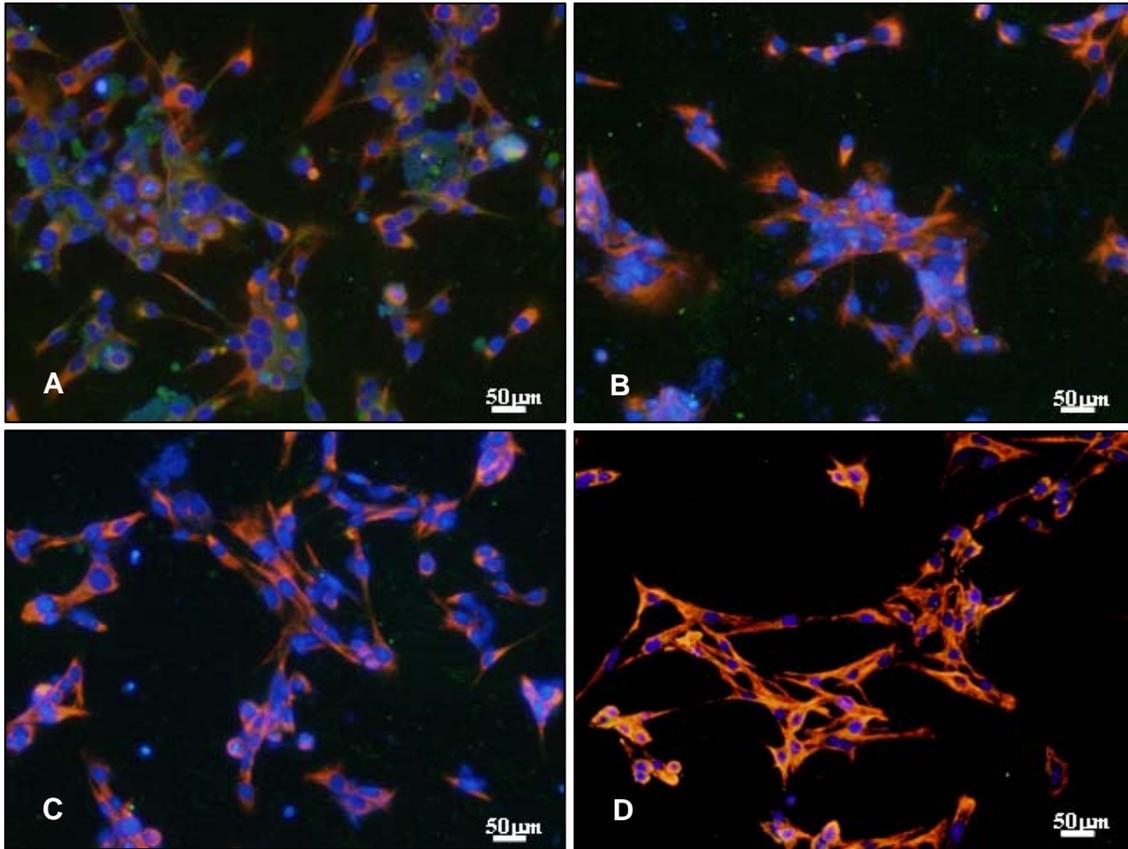


Figura 89: Inmunofluorescencia en las líneas celulares A) pBMC-2, B) pBMC-3, C) pBMC-4 y D) pBMC-5, utilizando como Ac primario un AcMo anti-vimentina.

Para su identificación inicial por inmunohistoquímica se utilizó, al igual que en CMMp primarias, el análisis de la expresión de vimentina. En la figura 89 se observa que, al igual que las CMMp, en las cuatro líneas prácticamente el 100% de las células eran positivas para vimentina, por lo que se corroboraba que eran CMM.

- **Caracterización antigénica de las líneas pBMC por citometría de flujo**

Utilizando los mismos marcadores antigénicos que en la caracterización de las CMMp primarias, se obtuvieron los resultados indicados en la tabla 10.

	CMMp nd (n=11)	pBMC-2 nd (n=3)	pBMC-3 nd (n=5)	pBMC-4nd (n=3)	pBMC-5 nd (n=3)
CD90	62,38%±32,96	44,35±47,53	57,28±15,52	46,79±3,38	35,78±10,75
CD29	88,76%±18,68	97,21±4,72	95,56±1,59	97,23±0,83	98,11±1,42
CD44	55,28%±32,44	70,19±45,62	75,71±20,27	96,3±0,95	95,74±2,73
CD56	3,14%±7,15	17,45±29,74	3,3±4,55	0,35±0,45	0
CD45	3,82%±4,48	0,97±0,35	1,09±0,69	6,04±7,36	0,87±1,42
CD14	2,28%±3,47	1,32±0,51	0,18±0,41	0,49±0,85	1,52±0,49
SLA I	53,11%±28,86	94,68±8,88	95,18±2,07	97,49±0,72	98,75±0,81
SWC3	10,62%±13,47	41,4±32,81	2,55±3,93	32,53±17,66	25,1±36,53
CD31	2,30%±2,75	2,05±1,25	6,79±14,36	7,65±13,25	0,06±0,11
CD106	6,06%±7,57	1,47±0,16	12,5±11,42	8,52±14,76	1,22±2,04
CD11b	4,68%±4,47	0,32±0,13	2,26±3,23	4,46±5,9	0,9±0,27
CD46	90,34%±14,82	95±8,47	94,83±2,52	96,49±1,51	96,95±2,59

Tabla 10: Los datos representan la media del % de células positivas \pm DT obtenidas en los experimentos de citometría de flujo.

A la vista de los resultados, y tras realizar los análisis estadísticos indicados previamente en materiales y métodos, se observó que existían diferencias significativas entre los cultivos primarios de CMMp y las líneas celulares sólo en la expresión de algunos marcadores que se mencionan a continuación:

CD44: CMMp-pBMC-4 ($p=0,036$), CMMp-pBMC-5 ($p=0,024$), pBMC-3-pBMC-4 ($p=0,025$), pBMC-3- pBMC-5 ($p=0,025$).

CD56: CMMp-pBMC-5 ($p=0,032$).

SLA I: CMMp-pBMC-2 ($p=0,024$), CMMp-pBMC-3 ($p=0,015$), CMMp-pBMC-4 ($p=0,036$), CMMp-pBMC-5 ($p=0,024$), pBMC-3- pBMC-5 ($p=0,025$).

SWC3: pBMC-3- pBMC-4 ($p=0,025$).

CD106: CMMp-pBMC-2 ($p=0,01$), pBMC-3- pBMC-5 ($p=0,025$), pBMC-2- pBMC-3 ($p=0,022$).

De todos estos datos destacó la expresión de SLA I en las CMMp que respecto expresión en todas las líneas aumentó en todas hasta un 95%, también aumentó CD44 aunque no en la misma proporción, SWC3 tuvo una expresión diferente entre todas las líneas aunque sólo fue estadísticamente significativo en el caso de las pBMC-3 y pBMC-4. El CD56 se expresó sólo en pBMC-2, aunque su expresión no fue muy alta.

En el caso de CD106 había diferencias significativas de la expresión tanto comparando las líneas con el cultivo primario como cuando se compararon entre ellas.

3.5. Diferenciación de las líneas de CMMp inmortalizadas a cardiomiocitos

Al igual que en el caso de los cultivos primarios de CMMp, se añadió 5-azacitidina al medio de cultivo RPMI 1640 en una concentración de 10mM. El medio se eliminó 24 horas más tarde, se añadió medio nuevo y las células se dejaron en cultivo hasta que llegaron a la confluencia. Las 4 líneas celulares se utilizaron para caracterizar sus marcadores de superficie por citometría de flujo y se compararon entre sí los datos sin diferenciar y diferenciadas con 5-azacitidina y con los cardiomiocitos. Finalmente se determinó la expresión de marcadores específicos de cardiomiocitos por inmunohistoquímica.

- **Análisis morfológico**

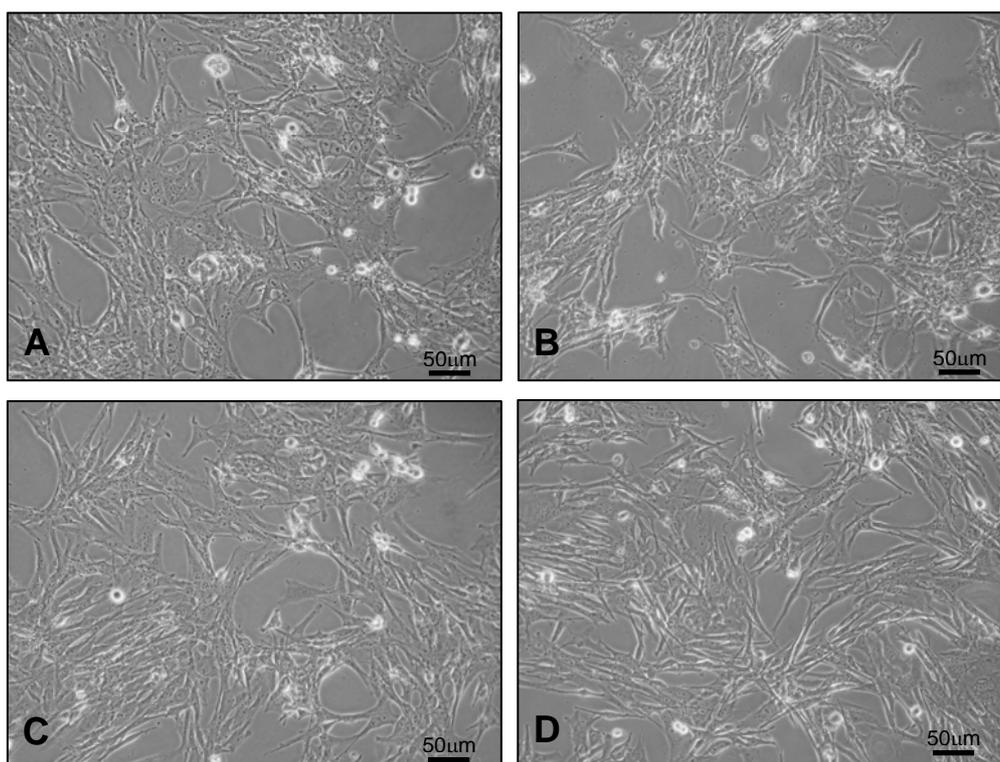


Figura 90: Fotografías de cultivos realizadas en un microscopio invertido. A) pBMC-2d, B) pBMC-3d, C) pBMC-4d y D) pBMC-5d.

Como se muestra en la figura 90, las 4 líneas pBMC tras ser tratadas con 5-azacitidina no varían su morfología y por lo tanto eran muy similares a las cultivadas sin diferenciar.

- **Caracterización antigénica por citometría de flujo**

Se realizaron técnicas de citometría de flujo con las cuatro líneas celulares de CMM (pBMC-2, pBMC-3, pBMC-4 y pBMC-5) diferenciadas con 5-azacitidina, empleando para ello los marcadores de cardiomiocitos utilizados previamente CD90, CD29, CD44, CD56, CD45, CD14, SLA I, SWC3, CD31, CD11b y CD106.

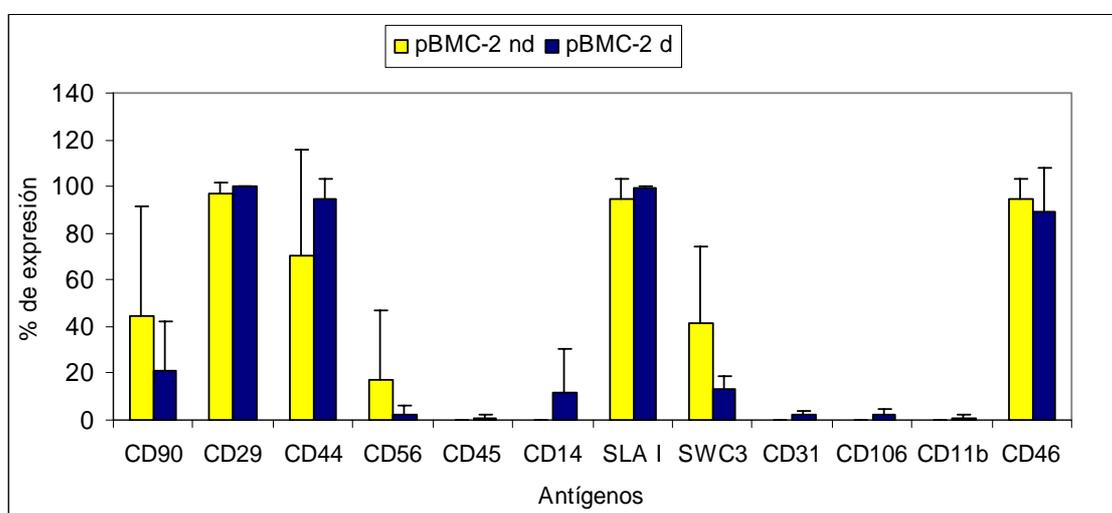


Figura 91: Caracterización antigénica de la línea pBMC-2 no diferenciadas y diferenciadas con 5-azacitidina por citometría de flujo.

Las células pBMC-2 después de tratarlas con 5-azacitidina expresaron CD90 ($21,25\% \pm 21,15$), CD29 ($99,73\% \pm 0,28$), CD44 ($94,56\% \pm 9,07$), CD14 ($12,11\% \pm 18,29$), SLA I ($99,15\% \pm 1,19$), CD46 ($89,5\% \pm 18,05$), SWC3 ($13,6\% \pm 5,27$), siendo negativas o expresan menos del 5% para CD56 ($2,31\% \pm 3,78$), CD45 ($0,88\% \pm 1,17$), CD31 ($2,22\% \pm 1,97$), CD106 ($2,45\% \pm 2,24$) y CD11b ($1,06\% \pm 1,53$) ($n=3$). Al comparar los niveles de expresión de los antígenos en pBMC-2 y pBMC-2 diferenciadas con 5-azacitidina, no se encontraron diferencias significativas (Figura 91).

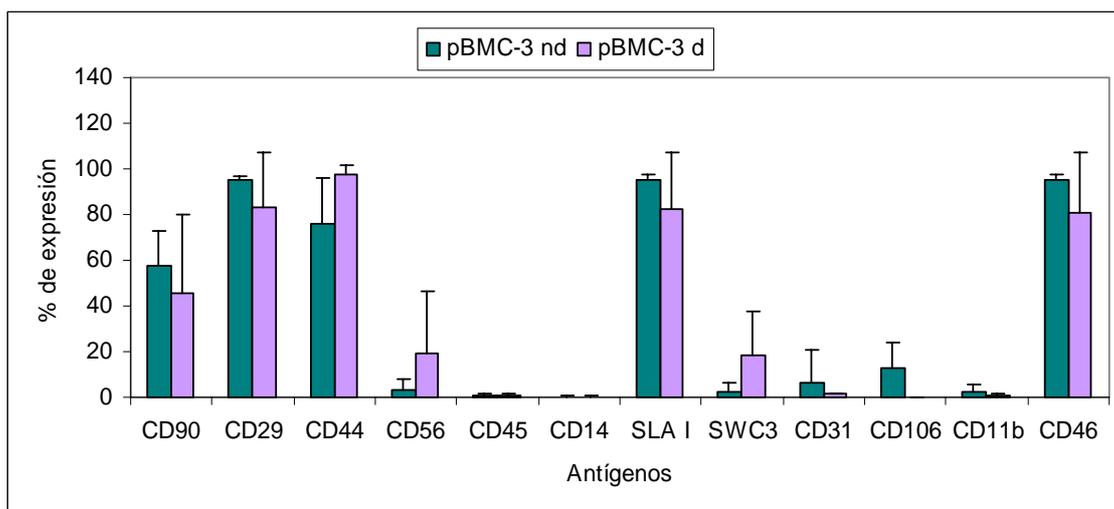


Figura 92: Caracterización antigénica de pBMC-3 y pBMC-3 diferenciadas con 5-azacitidina por citometría de flujo.

Las células pBMC-3 después de ser diferenciadas con 5-azacitidina expresaron CD90 (45,66%±34,33), CD29 (83,07%±24,46), CD44 (97,54%±4,18), CD56 (19,58%±27,05), SLA I (82,42%±24,66), SWC3 (18,41%±19,31), CD46 (81,2%±25,93) y no expresaron o expresaron menos del 5%, CD45 (0,82%±0,44), CD14 (0,2%±0,24), CD31 (1,27%±0,70), CD106 (0,23%±0,13) y CD11b (0,82%±0,46) (n=6). Después de comparar los niveles de expresión de los antígenos en pBMC-3 y pBMC-3 diferenciadas con 5-azacitidina, se encontraron diferencias significativas en CD44 (p=0,011), SWC3 (p=0,018), CD106 (p=0,006) (Figura 92).

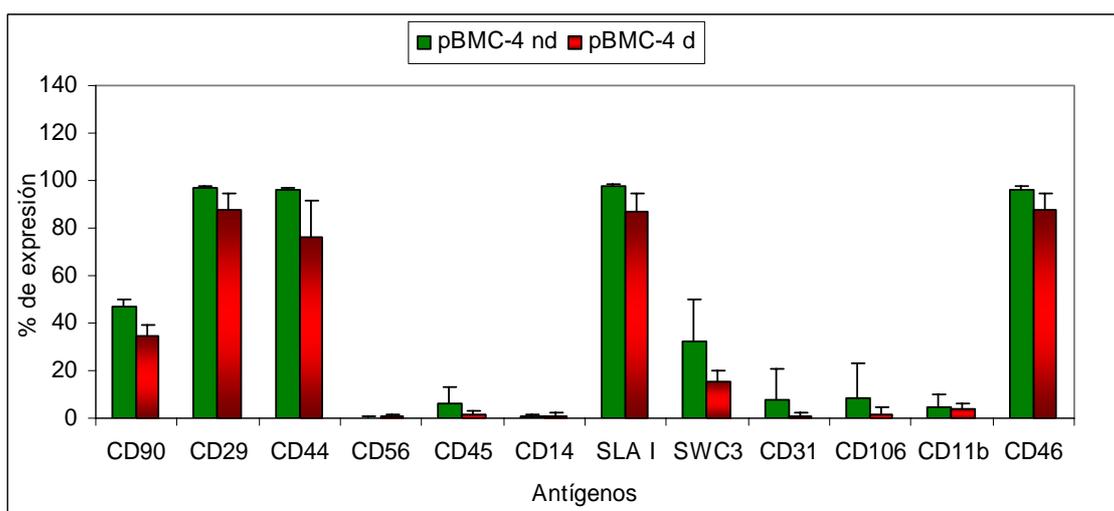


Figura 93: Caracterización antigénica de pBMC-4 y pBMC-4 diferenciadas con 5-azacitidina por citometría de flujo.

Los datos de citometría de flujo indicaron que las pBMC-4 diferenciadas con 5-azacitidina expresaron CD90 (34,71%±4,59), CD29 (87,73%±7,05), CD44 (76,42%±15,35), SLA I (86,89%±8,02), SWC3 (15,61%±4,45), CD46 (87,75%±6,78), y no expresaron o expresaron menos del 5%, CD56 (0,87%±0,92), CD45 (1,85%±1,26), CD14 (0,88%±1,51), CD31 (0,78%±1,34), CD106 (1,64%±2,84), CD11b (4,16%±2,14) (n=3). Al comparar los niveles de expresión de los antígenos en pBMC-4 y pBMC-4 diferenciadas con 5-azacitidina, se encontraron diferencias significativas en CD90 (p=0,05), CD29 (p=0,05), CD44 (p=0,05) y SLA I (p=0,05) (Figura 93).

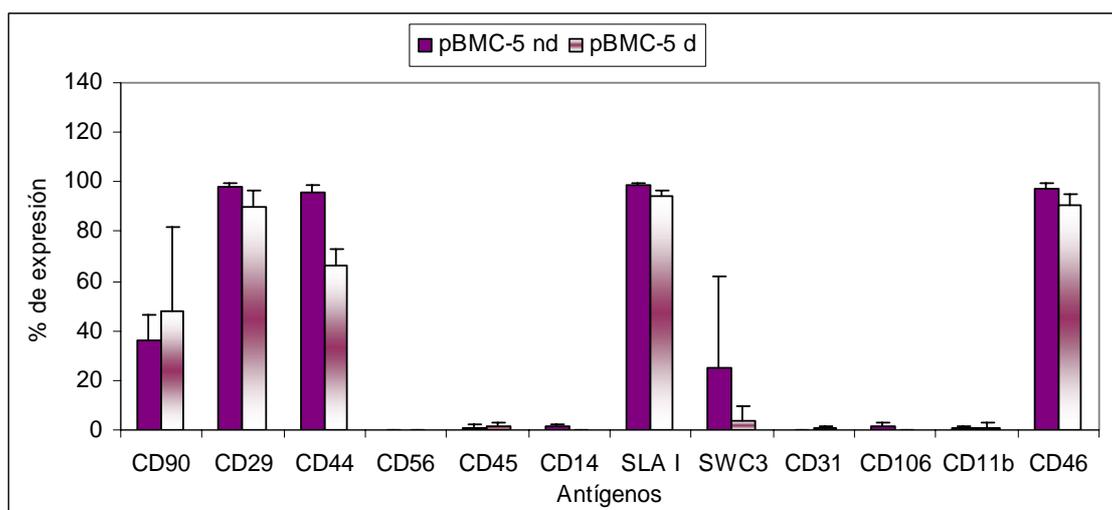


Figura 94: Caracterización antigénica de pBMC-5 y pBMC-5 diferenciadas con 5-azacitidina por citometría de flujo.

En los datos de citometría de flujo se observó que tras su tratamiento con 5-azacitidina, las pBMC-5 expresaron CD90 (47,89%±34,12), CD29 (89,69%±6,58), CD44 (66,53%±6,16), SLA I (94,11%±2,06), CD46 (90,82%±4,36), y no expresaron o expresaron menos del 5%, CD56 (0%), CD45 (1,17%±2,03), CD14 (0,09%±0,16), SWC3 (3,41%±5,91), CD31 (0,5%±0,86), CD106 (0%), CD11b (1,08%±1,83) (n=3). Se compararon los niveles de expresión de los antígenos en pBMC-5 y pBMC-5 diferenciadas con 5-azacitidina, y se encontraron diferencias significativas entre CD90 (p=0,05), CD29 (p=0,05), CD44 (p=0,05) y SLA I (p=0,05) (Figura 94).

- **Caracterización antigénica por inmunohistoquímica**

También se realizaron técnicas de inmunohistoquímica con las cuatro líneas celulares de CMM, sin diferenciar y diferenciadas con 5-azacitidina, empleando para ello los marcadores de cardiomiocitos utilizados previamente, actina muscular, conexina 43, desmina y troponina T.

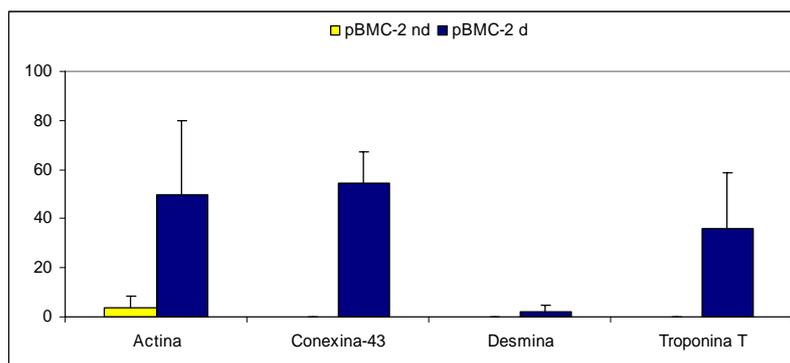


Figura 95: Cuantificación de la expresión de actina muscular, conexina 43, desmina y troponina T en pBMC-2nd (n=2) y pBMC-2d (n=3), los resultados se muestran como la media del % de expresión de cada marcador.

En primer lugar se analizó la expresión de los cuatro marcadores en la línea pBMC-2 no diferenciada y diferenciada con 5-azacitidina. Los resultados de la cuantificación de la expresión de estos marcadores en varios experimentos, mostraron que la expresión de actina muscular pasó de $3,61 \pm 5,1\%$ en no diferenciadas a $49,87 \pm 29,98\%$ en diferenciadas con 5-azacitidina, la expresión de conexina 43 pasó de $0,002 \pm 0,003\%$ en no diferenciadas a $54,54 \pm 12,54\%$ en diferenciadas, la expresión de desmina pasó de $0,004 \pm 0,006\%$ en no diferenciadas a $2,31 \pm 2,45\%$ en diferenciadas y por último la expresión de troponina T pasó de $0,006 \pm 0,008\%$ en no diferenciadas a $35,93 \pm 22,84\%$ en diferenciadas (Media \pm DT) (Figura 95).

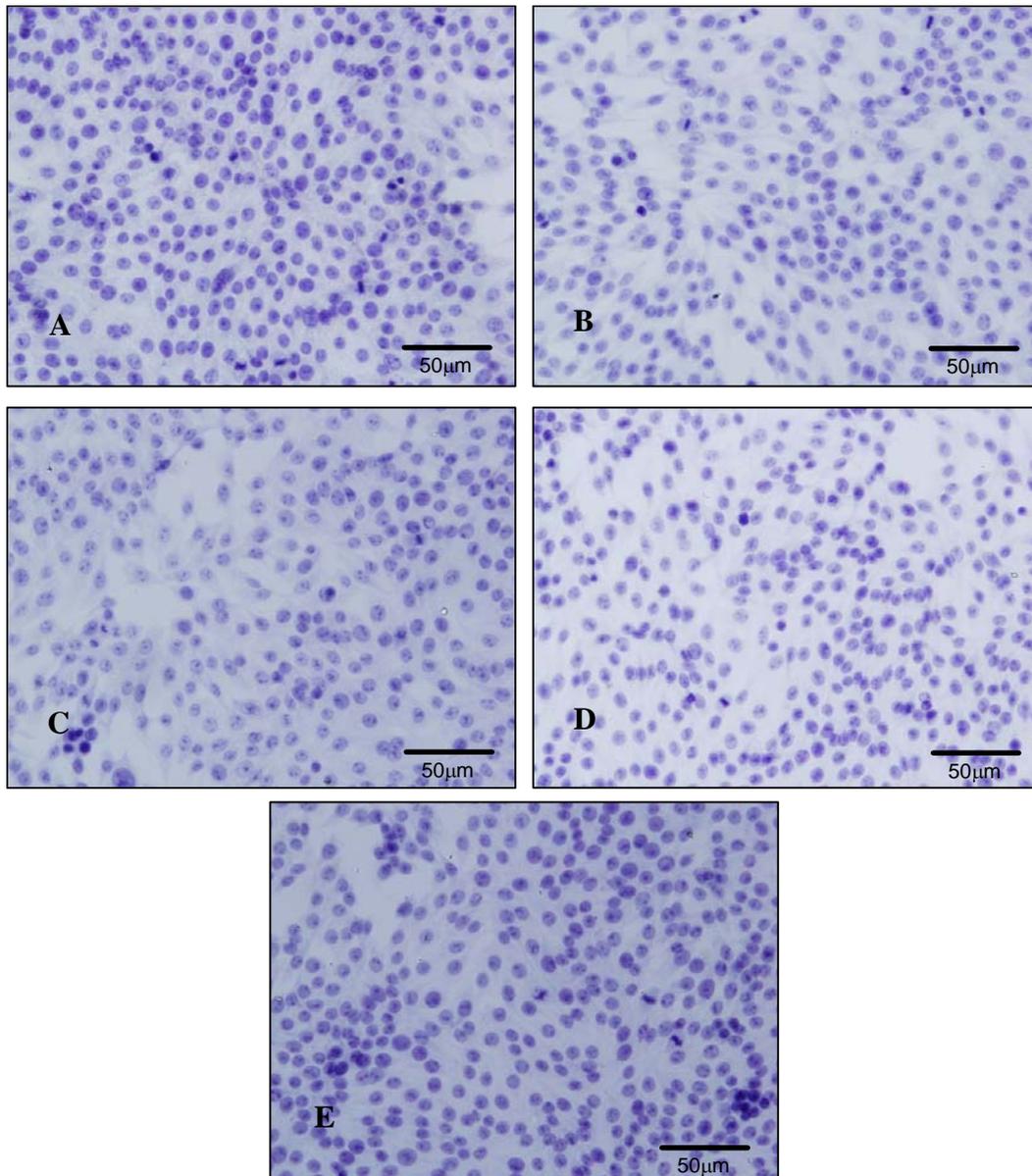


Figura 96: Inmunohistoquímica de pBMC-2 con los marcadores A) Actina muscular, B) Conexina 43, C) Desmina, D) Troponina T y E) control negativo sin AcMo.

En las figuras 96 y 97 se muestran experimentos representativos de las pBMC-2 no diferenciadas y diferenciadas con 5-azacitidina respectivamente, en las que se observa que las pBMC-2nd eran prácticamente negativas para la expresión de los 4 marcadores utilizados (Figura 96), y al diferenciarlas con 5-azacitidina aumenta de forma clara la expresión en distinta proporción de actina muscular, conexina 43 y troponina T, y en menor proporción la desmina (Figura 97).

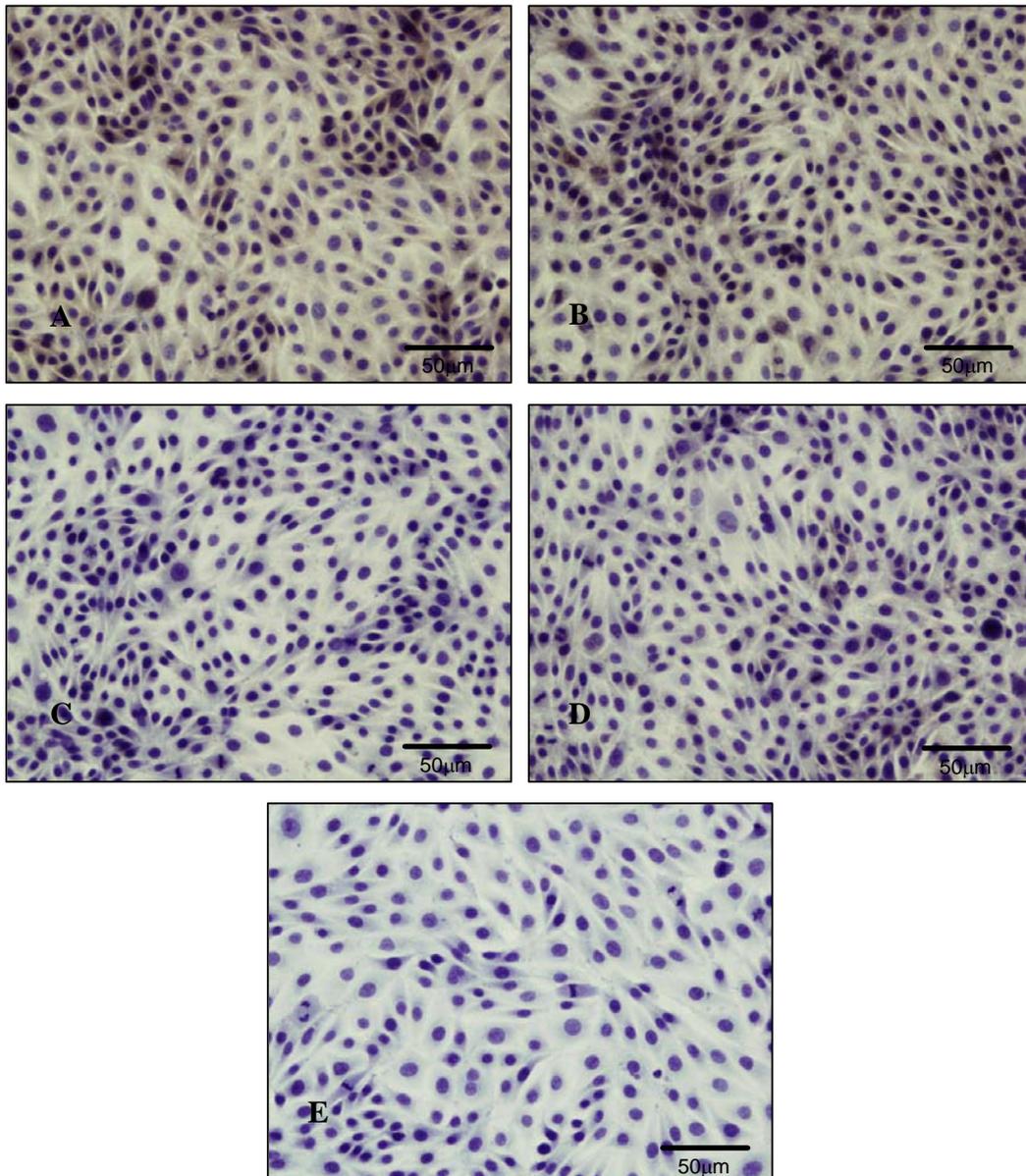


Figura 97: Inmunohistoquímica de pBMC-2d con los marcadores A) Actina muscular, B) Conexina 43, C) Desmina, D) Troponina T y E) control negativo sin AcMo.

Se realizó el mismo tipo de análisis en las tres líneas restantes para determinar la expresión de los mismos marcadores empleados en la línea pBMC-2.

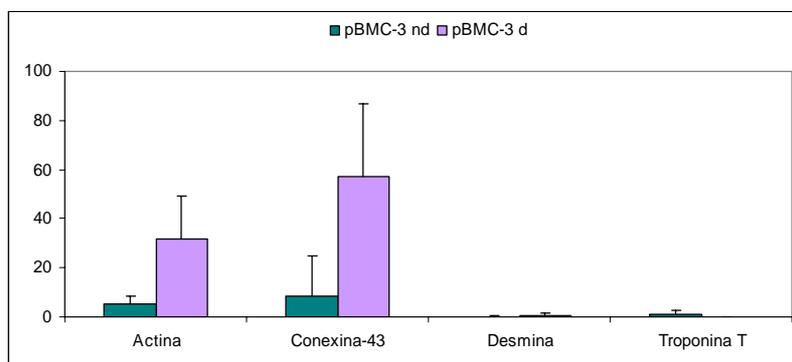


Figura 98: Cuantificación de la expresión de actina muscular, conexina 43, desmina y troponina T en pBMC-3nd (n=4) y pBMC-3d (n=3), los resultados se muestran como la media del % de expresión de cada marcador.

Los resultados de la cuantificación de la expresión de los marcadores en las pBMC-3nd y su comparación con las pBMC-3 diferenciadas demostraron que la expresión de actina muscular pasaba de $5,26 \pm 3,43\%$ a $31,91 \pm 17,11\%$ después de diferenciarlas con 5-azacitidina, la expresión de conexina 43 pasó de $8,41 \pm 16,54\%$ a $56,95 \pm 29,85\%$ tras la diferenciación, mientras que no se observó aumento de expresión de desmina que pasó de $0,15 \pm 0,31\%$ a $0,57 \pm 0,97\%$ ni de troponina T de $0,83 \pm 1,65\%$ a $0,12 \pm 0,14\%$ (Media \pm DT) (Figura 98).

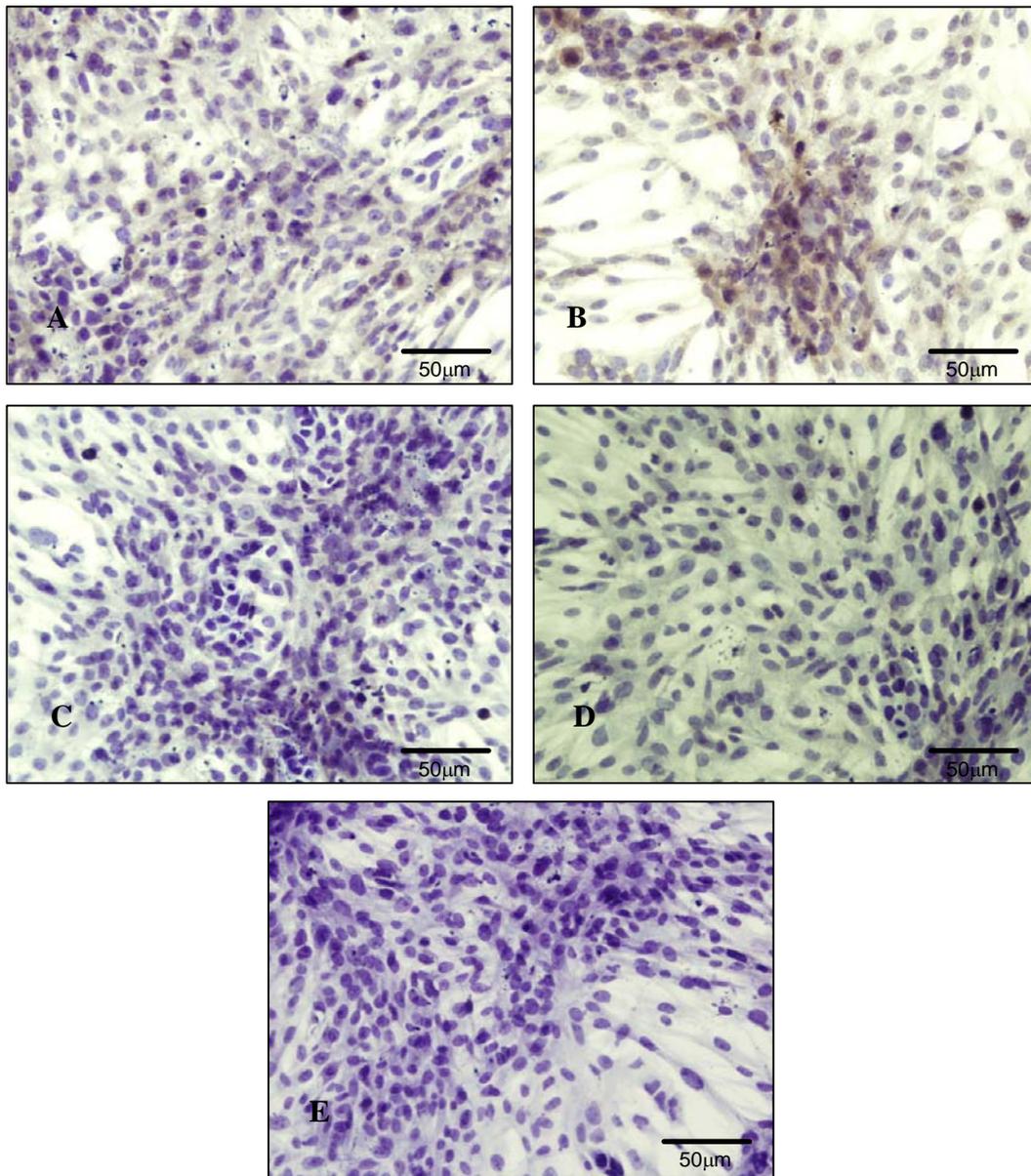


Figura 99: Inmunohistoquímica de pBMC-3nd, con los marcadores A) actina muscular, B) conexina 43, C) desmina, D) troponina T y E) control negativo sin AcMo.

Se muestra un experimento representativo de las pBMC-3 no diferenciadas y diferenciadas con 5-azacitidina en las figuras 99 y 100 respectivamente, con marcadores de cardiomiocitos. Las pBMC-3nd sólo expresaban muy débilmente actina muscular y conexina 43, no expresaban nada desmina y troponina T (Figura 99). Tras la diferenciación al igual que las pBMC-2d, tanto actina muscular como conexina 43 eran los marcadores más expresados, siendo la desmina y la troponina T los marcadores que no se expresaron.

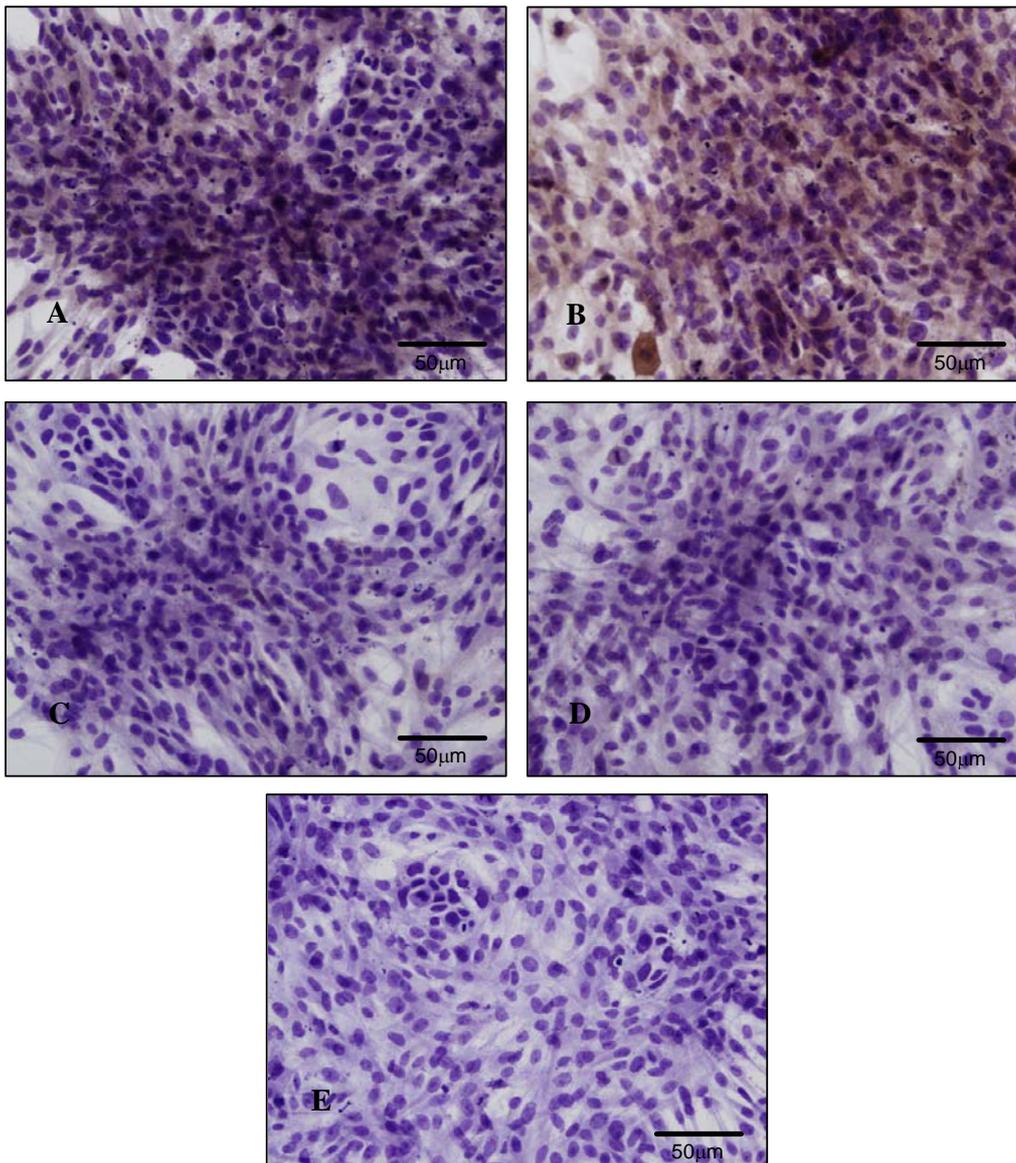


Figura 100: Inmunohistoquímica de pBMC-3d con los marcadores A) Actina muscular, B) Conexina 43, C) Desmina, D) Troponina T y E) control negativo sin AcMo.

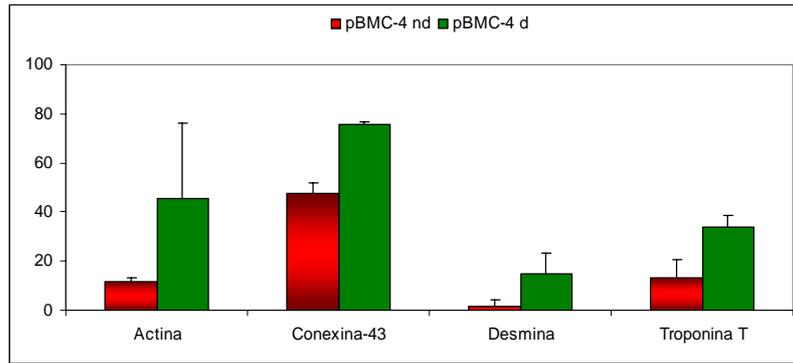


Figura 101: Cuantificación de la expresión de actina muscular, conexina 43, desmina y troponina T en pBMC-4nd (n=2) y pBMC4d (n=2), los resultados se muestran como la media del % de expresión de cada marcador.

En el caso de la línea pBMC-4 cuando se comparó la expresión de marcadores en pBMC-4 y pBMC-4 diferenciadas con 5-azacitidina se observó que la expresión de actina muscular era de $11,45 \pm 1,90\%$ y después de la diferenciación con 5-azacitidina pasó a $45,33 \pm 31,06\%$, la expresión de conexina 43 pasó de $47,87 \pm 3,93\%$ a $75,91 \pm 0,89\%$ después de la diferenciación, la expresión de desmina pasó de $1,69 \pm 2,39\%$ a $14,85 \pm 8,59\%$ y la expresión de troponina T pasó de $13,41 \pm 7,06\%$ a $33,84 \pm 4,85\%$ (Media \pm DT) (Figura 101).

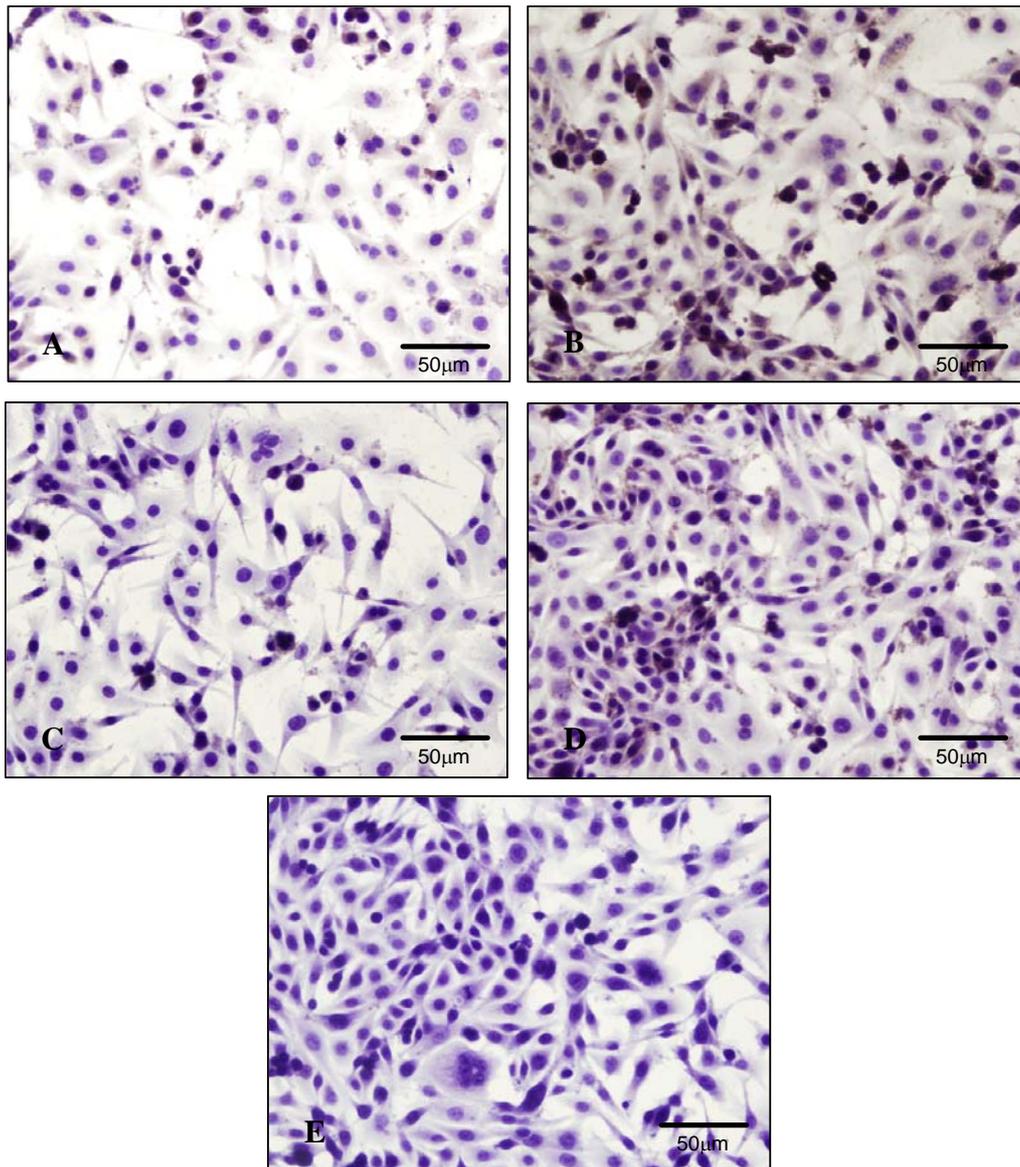


Figura 102: Inmunohistoquímica de pBMC-4nd con los marcadores A) Actina muscular, B) Conexina 43, C) Desmina, D) Troponina T y E) control negativo sin AcMo.

Se muestra un experimento representativo de los datos de cuantificación en la figura 102. Se observó que en las en pBMC4nd los marcadores eran algo positivos aunque en algún caso muy levemente, siendo llamativa sobre todo la expresión de conexina 43 mientras que los otros tres marcadores se expresaron más levemente. En las células pBMC-4 diferenciadas se observó que se expresaron todos los marcadores de cardiomiocitos, aunque la desmina en menor medida (Figura 103).

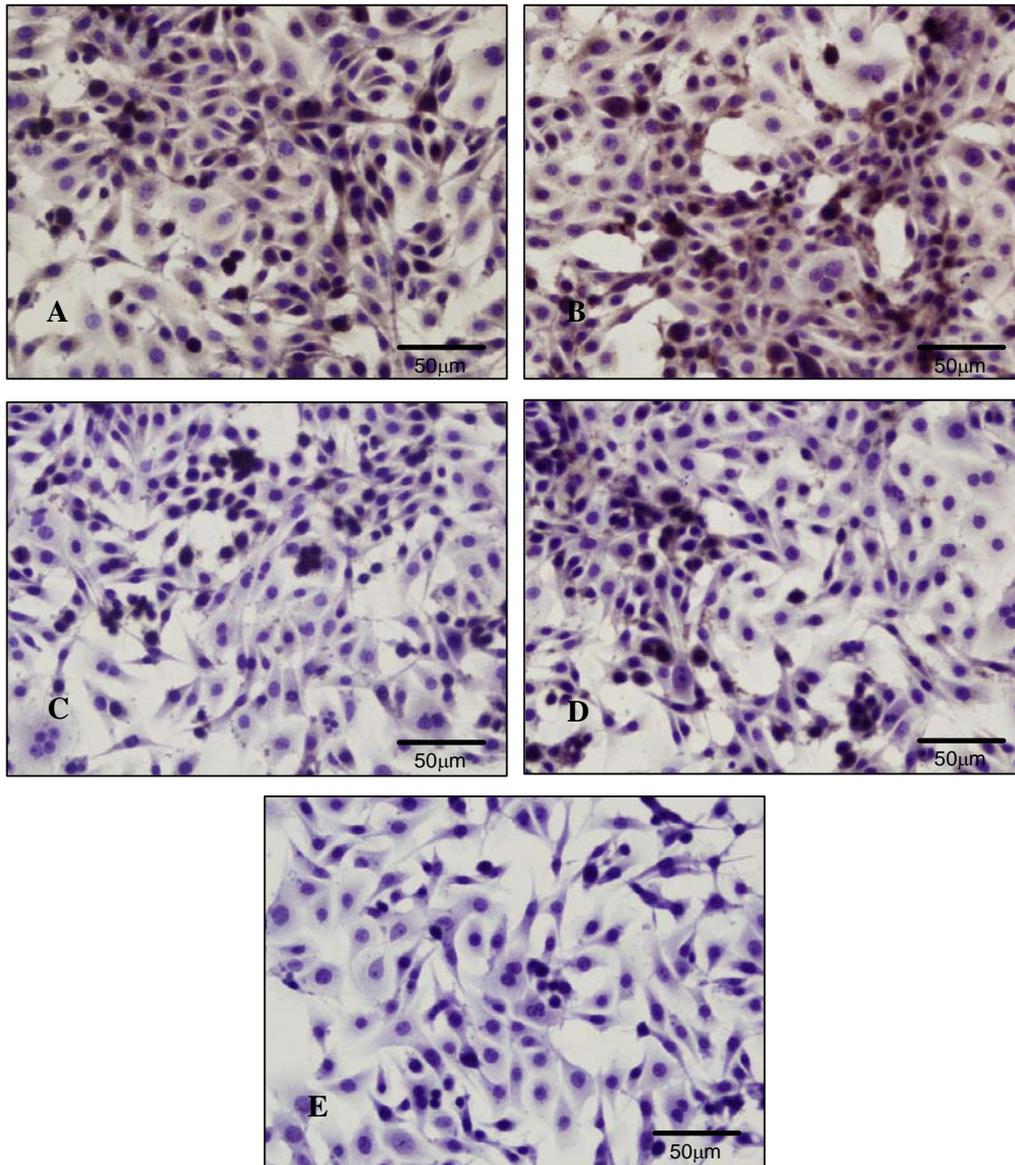


Figura 103: Inmunohistoquímica de pBMC-4d con los marcadores A) Actina muscular, B) Conexina 43, C) Desmina, D) Troponina T y E) control negativo sin AcMo.

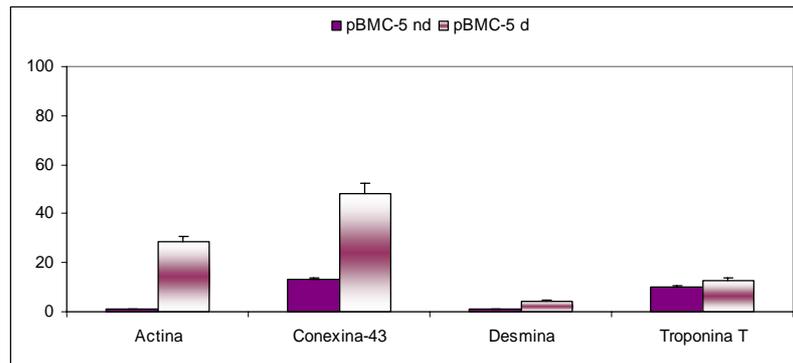


Figura 104: Cuantificación de la expresión de actina muscular, conexina 43, desmina y troponina T en pBMC-5 nd (n=2) y pBMC5d (n=2), los resultados se muestran como la media del % de expresión de cada marcador.

Por último, al cuantificar las imágenes de las células pBMC-5nd se observó que la expresión era muy baja para actina $0,98 \pm 0,11\%$ que tras la diferenciación pasó a ser $28,65 \pm 2,08\%$, la expresión de conexina 43 pasó de $13,11 \pm 0,86\%$ a $48,33 \pm 4,24\%$ después de la diferenciación, la expresión de desmina pasó de $0,94 \pm 0,37\%$ a $4,16 \pm 0,58\%$ y la expresión de troponina T pasó de $10,19 \pm 0,55\%$ a $12,74 \pm 1,25\%$ (Media \pm DT) (Figura 104).

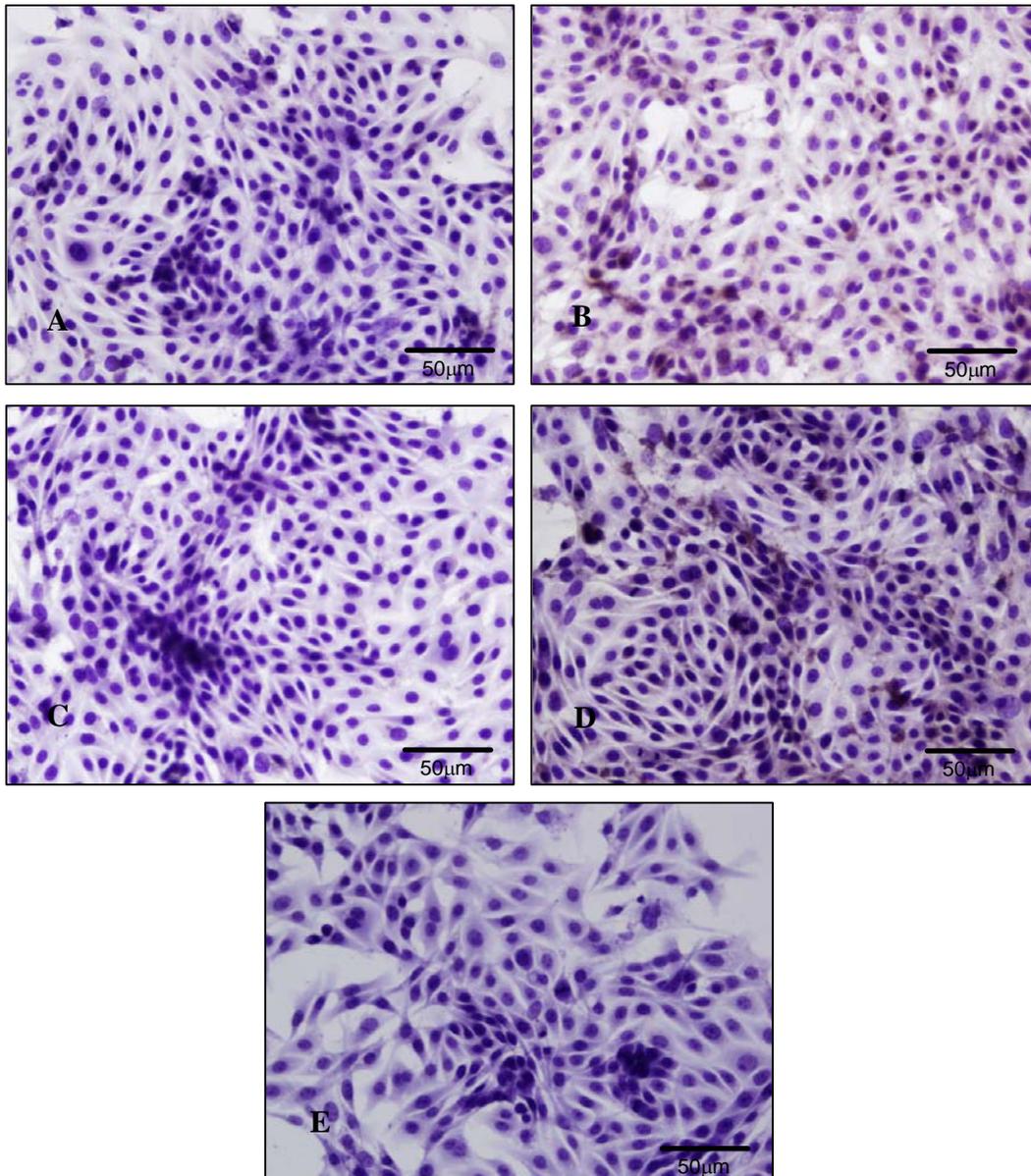


Figura 105: Inmunohistoquímica en pBMC-5nd con los marcadores A) Actina muscular, B) Conexina 43, C) Desmina, D) Troponina T y E) control negativo sin AcMo.

De nuevo se muestra un experimento representativo, en este caso de la línea pBMC-5nd donde los marcadores conexina 43 y troponina T se expresaron ligeramente, actina muscular y desmina no se expresó (Figura 105). Sin embargo la línea pBMC-5 una vez diferenciada expresó los 4 marcadores de cardiomiocitos siendo la desmina el que menos se expresaba (Figura 106).

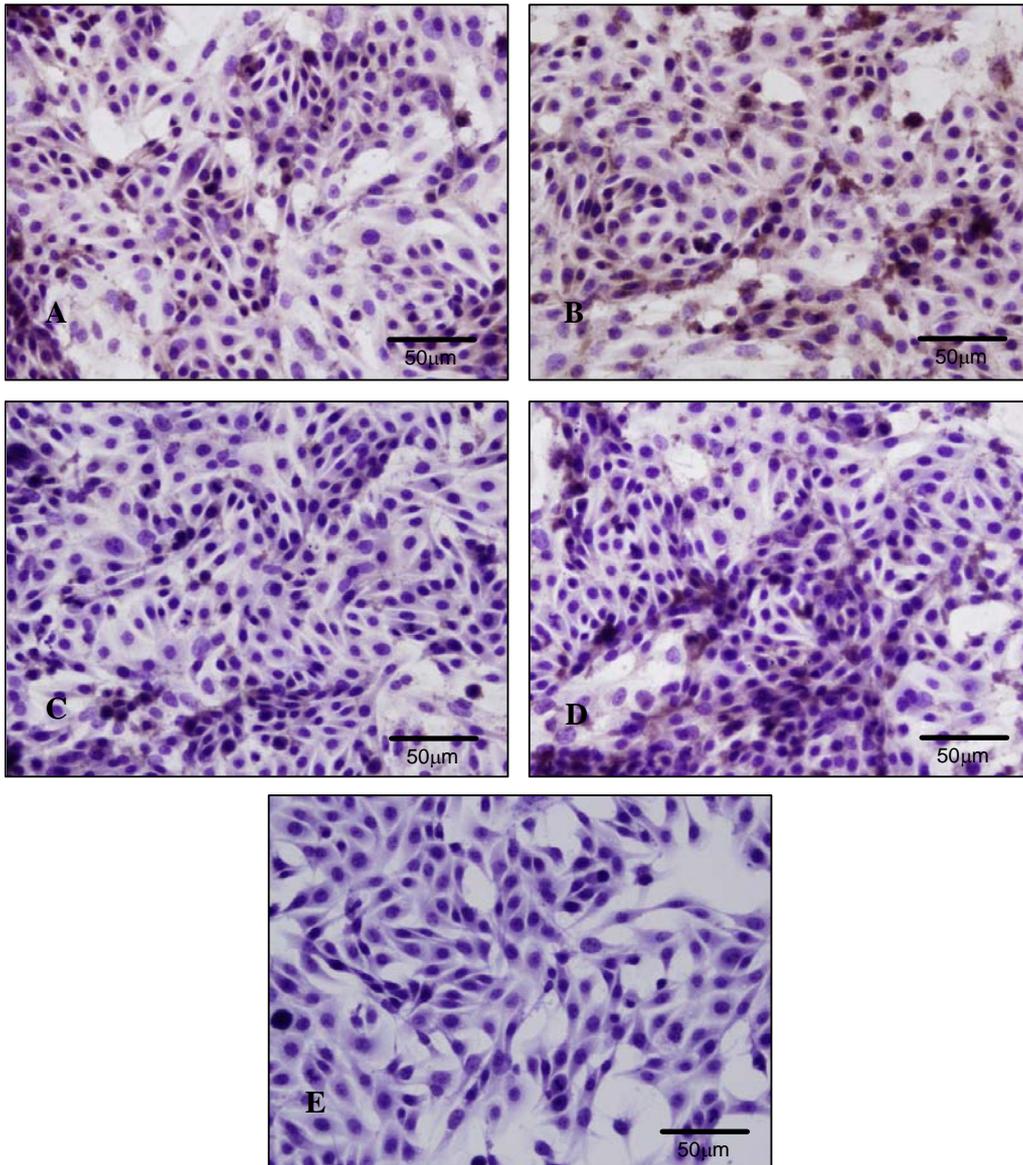


Figura 106: Inmunohistoquímica en pBMC-5d con los marcadores A) Actina muscular, B) Conexina 43, C) Desmina, D) Troponina T y E) control negativo sin AcMo.

- **Fenotipo miogénico**

Para completar los estudios de inmunohistoquímica, se analizó si las células obtenidas tras el tratamiento con 5-azacitidina tanto de las CMMp primarias como de las líneas inmortalizadas pBMC individualmente. Presentaban un fenotipo similar al de los cardiomiocitos obtenidos de cultivos primarios de corazón tras su caracterización por citometría de flujo.

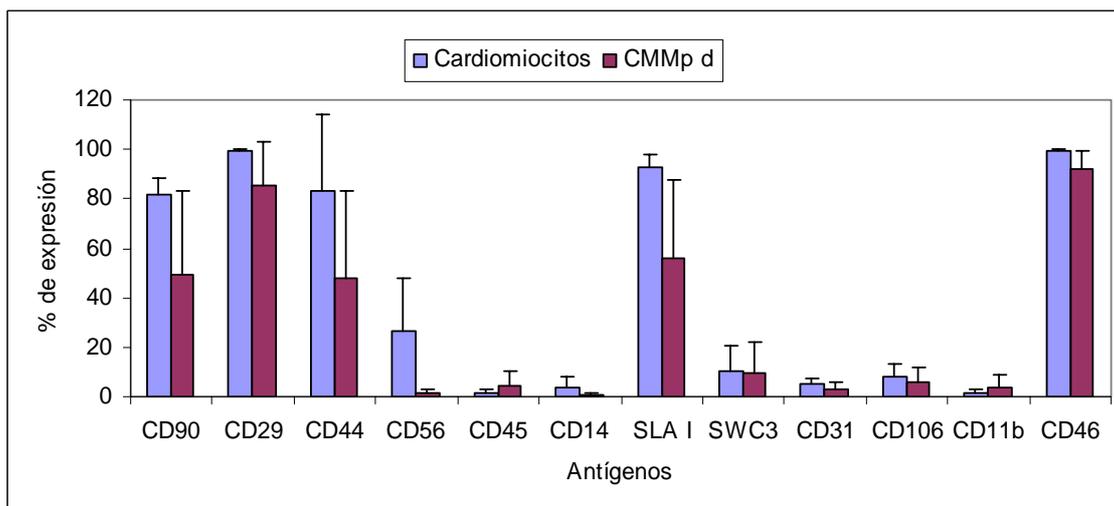


Figura 107: Nivel de expresión de antígenos en cardiomiocitos y CMMp d diferenciadas con 5-azacitidina por citometría de flujo.

Al comparar la expresión del panel de antígenos utilizados entre los cardiomiocitos y las CMMpd se detectaron diferencias significativas en la expresión de CD90 ($p=0,05$), CD29 ($p=0,04$), CD56 ($p=0,006$), SLA I ($p=0,05$) y CD46 ($p=0,026$) que disminuían en CMMp d (Figura 107).

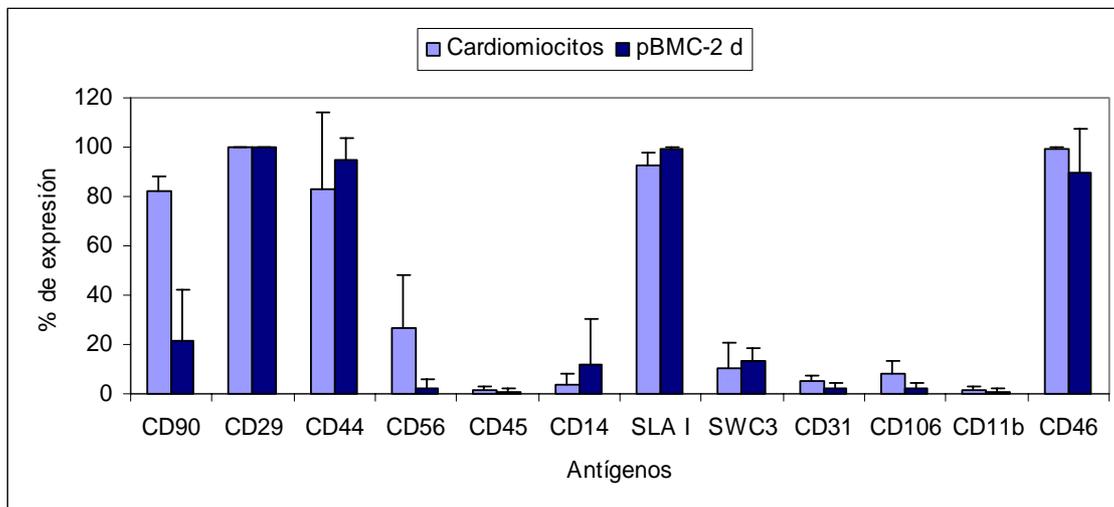


Figura 108: Nivel de expresión de antígenos en cardiomiocitos y pBMC-2 diferenciadas con 5-azacitidina.

Al comparar la expresión de antígenos de cardiomiocitos y pBMC-2d, se observó sólo una disminución estadísticamente significativa en la expresión de CD90 ($p=0,034$) (Figura 108).

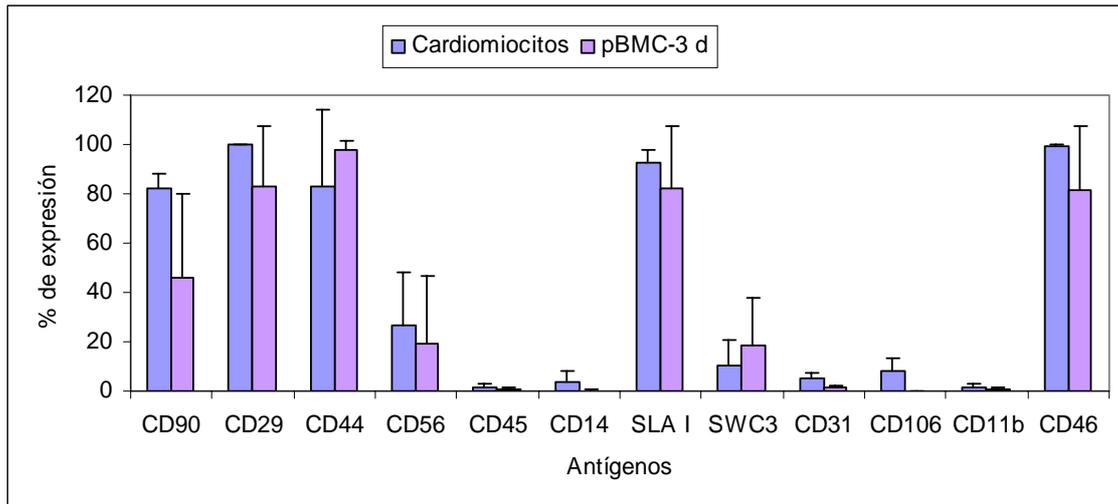


Figura 109: Nivel de expresión de antígenos en cardiomiocitos y pBMC-3 diferenciadas con 5-azacitidina.

En el mismo tipo de estudio se comparó la expresión de antígenos de cardiomiocitos y pBMC-3d, demostró diferencias significativas en la expresión de CD29 ($p=0,033$), CD46 ($p=0,033$) y de CD106 ($p=0,011$) que sólo se expresó en cardiomiocitos (Figura 109).

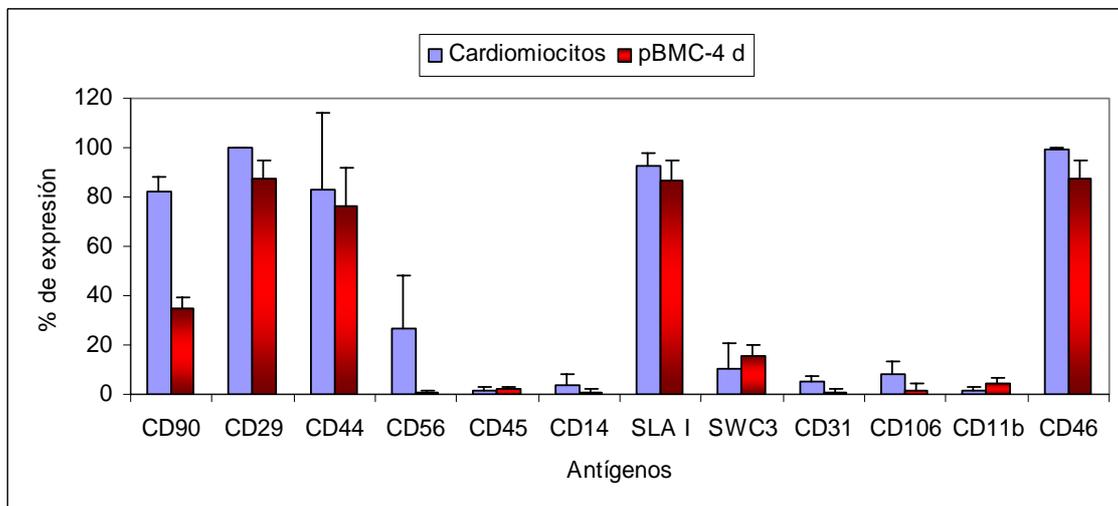


Figura 110: Nivel de expresión de antígenos en cardiomiocitos y pBMC-4 diferenciadas con 5-azacitidina.

Comparando la expresión de antígenos de cardiomiocitos y pBMC-4d, se observó diferencias significativas en CD90 ($p=0,034$), CD29 ($p=0,034$) y CD46 ($p=0,034$) en todos los casos se expresaron más en cardiomiocitos (Figura 110).

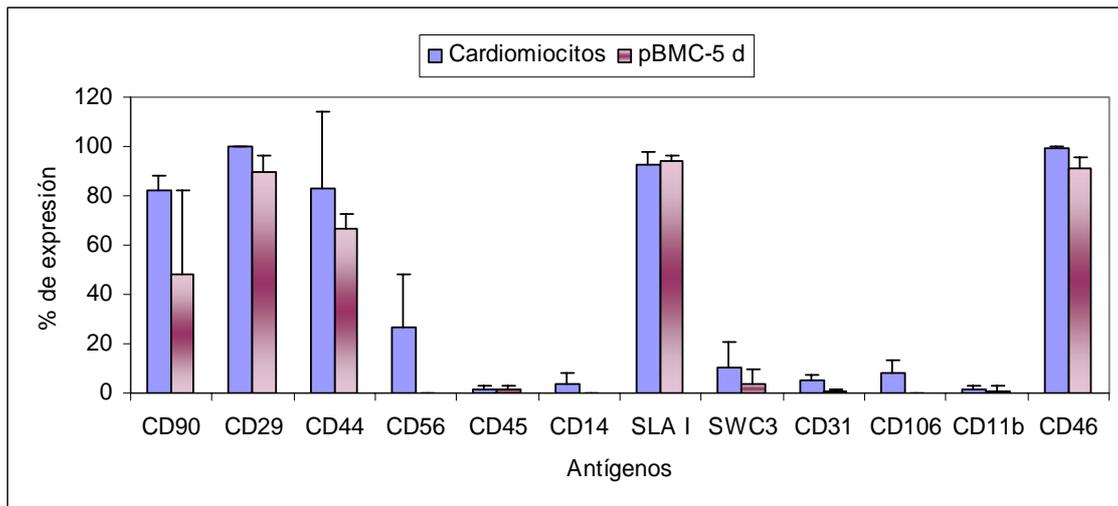


Figura 111: Nivel de expresión de antígenos en cardiomiocitos y pBMC-5 diferenciadas con 5-azacitidina.

Por último, al comparar la expresión de antígenos de cardiomiocitos y pBMC-5d, se encontraron diferencias significativas en CD29 ($p=0,034$), CD56 ($p=0,028$), CD106 ($p=0,028$) y CD46 ($p=0,034$) en todos los casos en la expresión disminuyó en la línea pBMC-5 (Figura 111).

En la tabla 11 se resumen los datos de las citometrías de flujo de cardiomiocitos, mioblastos, CMMp y líneas celulares diferenciadas con 5-azacitidina.

	Cardiomiocitos (n=4)	Mioblastos (n=8)	CMMp d (n=11)	pBMC-2 d (n=3)	pBMC-3 d (n=6)	pBMC-4 d (n=3)	pBMC-5 d (n=3)
CD90	81,94%±6,09	79,13±21,14	48,97%±33,93	21,25±21,15	45,66±34,33	34,71±4,6	47,89±34,12
CD29	99,70%±0,2	95±10,38	85,44%±17,86	99,73±0,28	83,07±24,46	87,73±7,05	89,69±6,59
CD44	82,92%±31,01	91,45±10,8	48,02%±34,86	94,56±9,07	97,54±4,18	76,42±15,36	66,53±6,17
CD56	26,63%±21,51	27,32±31,74	1,11%±2,11	2,31±3,78	19,58±27,05	0,87±0,92	0,00
CD45	1,72±1,35	0,6±0,46	4,28%±6,27	0,88±1,17	0,82±0,44	1,85±1,27	1,17±2,03
CD14	3,44±4,51	3,31±8,26	0,92%±0,78	12,11±18,29	0,2±0,24	0,88±1,52	0,09±0,16
SLA I	92,84%±4,76	62,8±37,19	56,07%±31,31	99,15±1,19	82,42±24,66	86,89±8,02	94,11±2,06
SWC3	10,26±10,34	7,32±6,4	9,69%±12,66	13,6±5,27	18,41±19,31	15,61±4,45	3,41±5,91
CD31	5,05±2,66	1,81±1,77	2,71%±3,41	2,22±1,97	1,27±0,7	0,78±1,35	0,5±0,87
CD106	8,17±4,81	3,89±4,31	5,99%±6,12	2,45±2,24	0,23±0,13	1,64±2,85	0,00
CD11b	1,73±1,10	2,56±4,32	3,50%±5,30	1,06±1,53	0,82±0,46	4,16±2,14	1,08±1,84
CD46	99,37%±0,46	96,95±3,88	92,27%±7,46	89,5±18,05	81,2±25,93	87,75±6,79	90,82±4,37

Tabla 11: Media de la intensidad de fluorescencia ± DT obtenidas de los datos de citometría de flujo. Están resaltados en gris aquellos antígenos en los que se encontraron las diferencias significativas de expresión entre los distintos tipos celulares estudiados.

V. DISCUSIÓN

La posibilidad de sustituir un órgano que presenta un fracaso irreversible por otro que funcione normalmente procedente de un cadáver, o más raramente de un familiar vivo, ha sido uno de los avances más importantes de la medicina en la segunda mitad del siglo XX. Sin embargo, el éxito del trasplante como terapéutica ha creado un nuevo problema: una demanda de órganos para trasplante muy superior a la disponibilidad actualmente existente. Este problema se ha convertido en la limitación más acuciante del trasplante de órganos y la que está llevando a la realización de un número cada vez mayor de trasplantes con órganos, o porciones de los mismos, procedentes de donantes vivos sanos, lo que conlleva importantes problemas de tipo ético. Alternativas a estos tipos de trasplante como el xenotrasplante o la terapia celular podrían ser soluciones para este problema.

1. Xenotrasplante de órganos de cerdos transgénicos a babuinos

El xenotrasplante de órganos de cerdo constituye una de mejores alternativas para poder subsanar algún día el insuficiente número de órganos cadavéricos humanos para trasplante. La producción de cerdos transgénicos para las hCRP (Schuurman HJ *et al.*, 2003; Shimizu A *et al.*, 2005) creó numerosas expectativas sobre una pronta utilización de estos animales como fuente de órganos para trasplante en humanos. Sin embargo, esta aplicación clínica no ha sido posible fundamentalmente por dos razones: a) la dificultad para obtener supervivencias prolongadas de los xenoinjertos porcinos en modelos experimentales con primates no humanos debido al RVA que sufren y b) el potencial riesgo de transmisión de infecciones por parte de los xenoinjertos que pudieran poner en peligro la salud pública.

Por todo ello, nuestros experimentos se han realizado en un modelo experimental pre-clínico de xenotrasplante de órganos de cerdos transgénicos en babuinos con los objetivos de 1) investigar la especificidad de los Acs y la patogénesis del RVA que se produce, 2) estudiar la eficacia de la depleción continuada de los Acs anti- α Gal con GAS914 en aumentar la supervivencia de los xenoinjertos y 3) analizar la posible infección por PERV en el suero y las células de los babuinos receptores.

1.1. Barrera inmunológica en el xenotrasplante heterotópico de corazón de cerdo hDAF en babuinos

1.1.1 Eficacia del transgen hDAF en la prevención del RHA o el RVA

Hasta el momento, la causa fundamental por la que no ha sido posible obtener supervivencias prolongadas de xenoinjertos porcinos transgénicos para las hCRPs es que éstos no pueden evitar el rechazo humoral, mediado por Acs y complemento, de forma indefinida. En nuestro estudio hemos examinado el patrón histopatológico e inmunológico del rechazo producido en 10 xenotrasplantes (en un grupo de 15) de corazones de cerdos transgénicos para hDAF en babuinos tratados con inmunosupresión farmacológica. Tres de los animales (20%) sufrieron RHA, con una media de supervivencia de 1,33 horas, mientras que los otros 7 (47%) sufrieron RVA, con una media de supervivencia de 17,57 días y cinco (33%) animales murieron por causas no inmunológicas, con una media de supervivencia de 3,75 días. En los distintos experimentos de otros grupos la frecuencia de aparición del RHA variaba según el órgano xenotrasplantado, el animal receptor o incluso el tipo de xenotrasplante. Anteriores experimentos mostraban que los babuinos que recibían xenotrasplantes de corazones hDAF de forma heterotópica sufrían RHA en el 11% de los animales, sin embargo si el trasplante era ortotópico sólo lo sufrían el 6% de los receptores (Schoorman HJ *et al.*, 2002). Cuando los animales trasplantados eran monos *Cynomolgus* con corazones porcinos hDAF trasplantados de forma heterotópica el 7% de los animales que sufrían RHA. También en casos de xenotrasplantes de riñones hDAF, alrededor de un 25% de los babuinos trasplantados sufrieron RHA (Lam TT *et al.*, 2004). En otros estudios, sin embargo, no se observó ningún caso de RHA en trasplantes de corazones de cerdos transgénicos a babuinos, sufriendo todos los injertos RVA (Chen RH *et al.*, 2000) y alcanzaron supervivencias de 1 mes (Vial CM *et al.*, 2000).

En los babuinos estudiados cuyos injertos sufrieron RHA, éste podría haber sido aparentemente causado por factores del receptor porque no se encontraron diferencias patentes, por ejemplo, con respecto a la expresión de la proteína hDAF en los animales que sufrieron RHA y los que sufrieron RVA. El análisis de la expresión del transgen hDAF por inmunohistoquímica de cada oreja de los animales empleados, demostró una

expresión similar en todos los animales empleados (datos no mostrados). Además, no se encontraron diferencias patentes con respecto a la expresión de la proteína hDAF en las biopsias obtenidas antes del trasplante ni a los 30 minutos o en el momento de la necropsia, entre los distintos corazones trasplantados. En la biopsia tomada 30 minutos después de la reperfusión, así como en las últimas biopsias de los xenoinjertos tomadas en el momento de la necropsia en los babuinos con RHA, se observaron signos de patológicos de RHA y depósitos de IgG, IgM, C3, C5b-9 y pocos depósitos de C4 y fibrina sugiriendo que la proteína hDAF no puede prevenir la producción de complejos de ataque de membrana después de la deposición de Acs naturales en el xenoinjerto y la activación del complemento (Fecke W *et al.*, 2002). Por el contrario, en los animales que sufrieron RVA, se observó una patología normal acompañada de ausencia de depósitos de C5-b9 en la biopsia obtenida 30 minutos después del trasplante a pesar de que en ambos grupos se una deposición similar de Acs xenoreactivos, C3 y C4.

Existen claras pruebas de la implicación de los xenoAcs y particularmente de los Acs anti- α Gal en el proceso de RHA que se produce tanto en órganos naturales como en transgénicos hDAF (Schuurman HJ *et al.*, 2003; Máñez R *et al.*, 2000). En nuestro estudio cuando analizamos los niveles de Acs IgG e IgM anti- α Gal DI, T2, T6, APA y Acs anti-células porcinas (CMSP, células T y endoteliales) tanto en los animales que sufrieron RHA como RVA, antes del trasplante e inmediatamente después de éste, en ambos casos todos los Acs disminuyen tras el trasplante, sin embargo, los niveles de APA son superiores antes del trasplante en los animales que sufrieron RHA, pudiendo ser estos Acs los responsables del RHA. Esta observación es similar a la obtenida de los resultados de xenotrasplantes de corazón de cerdo hDAF en *Cynomolgus* (Lam TT *et al.*, 2004), en los que se constataron que los receptores que sufren RHA tienen unos niveles de APA significativamente más altos que los que no los sufren.

Dado que los APA incluyen todos los Acs hemolíticos contra células porcinas, anti- α Gal y otros, nuestros resultados sugieren que el RHA se produciría por la presencia de otros Acs no anti- α Gal. Sin embargo, con la utilización sistemática GAS914 que neutraliza los Acs anti- α Gal, como se comentará más adelante en la discusión, el RHA no se ha observado. Una posible explicación sería que estos Acs responsables del RHA sean autoAcs (López E *et al.*, 2000) y que el GAS914 permita también una cierta reducción de los mismos por la polireactividad que presentan todos estos Acs naturales. Por tanto, aunque el riesgo de RHA usando los cerdos hDAF es bajo, su posible

existencia implica que en receptores de estos órganos debe estar considerada la depleción de Acs anti- α Gal para prevenir este tipo de rechazo (Mañez R *et al.*, 2000; Katopodis AG *et al.*, 2002).

Del resto de los animales que no sufrieron RHA, ningún trasplante falló debido a RVA en los 10 días siguientes al trasplante (media de supervivencia 17,57 días). En biopsias de 30 minutos después de la reperfusión de órganos y durante la primera semana, las biopsias o el tejido completo del órgano de estos animales mostraron una patología normal con depósitos de IgG, IgM, C4 o C3 pero una ausencia clara de depósitos de C5b-9. La ausencia de RVA y la ausencia de cambios en la patología durante la primera semana tras el trasplante estaban asociados con una ausencia de APA circulantes y una reducción notable de Acs xenoreactivos valorados en los diversos ensayos realizados incluyendo diferentes subtipos de Acs anti- α Gal, APA y Acs anti-células porcinas.

Parece que este fenómeno se debe a la absorción de estos Acs por el injerto, en combinación con la inmunosupresión que inhibe la producción de nuevos Acs. Sin embargo, tras la primera semana tanto los Acs anti- α Gal empezaron a subir, manteniéndose en esos niveles hasta el momento del RVA en tres de los animales y volviendo a bajar en los 4 animales restantes del grupo. Se han ensayado distintas estrategias para encontrar la inmunosupresión adecuada para evitar la vuelta de Acs anti- α Gal. Se había intentado anteriormente la depleción por inmunoadsorción extracorpórea, con o sin inmunosupresión, pero ésta no evita el aumento de Acs en 4-7 días después del trasplante del corazón hDAF (Lambrigts D *et al.*, 1998; Mañez R *et al.*, 2000). Esto puede ser explicado por el hecho de que la mayoría de los inmunosupresores actualmente disponibles son adecuados para evitar la síntesis de Acs dependientes de células T, pero no son eficaces contra la síntesis de Acs no dependientes de células T como es la producción existente de Acs naturales anti-carbohidratos, como los α Gal. Solamente la Csf en altas dosis parece tener un efecto, pero este tratamiento produce una leucopenia muy importante que no se puede mantener por periodos prolongados de tiempo.

Por tanto, hDAF durante la primera semana tras el trasplante, parece ser eficaz para suministrar la adecuada regulación de la activación del complemento incluyendo la inhibición de la producción C5b-9. Esta eficacia de hDAF es similar a su eficacia en la prevención del RHA. Sin embargo, a pesar de que esta presencia de hDAF se mantiene (como se demuestra por inmunohistoquímica), los corazones hDAF se acaban perdiendo debido a RVA como indica el hallazgo de depósitos de componentes terminales del

complemento C3, C4, C5b-9 y depósitos de IgG, IgM y fibrina en el momento de la necropsia de todos los animales del grupo A.2. Aparentemente, esta falta de eficacia de hDAF en prevenir los depósitos de C5b-9 debe estar relacionada con el aumento de Acs xenoreactivos circulantes a partir del día 7 tras el trasplante. El aumento podría reflejar sobrecarga de depósitos de Acs sobre el injerto, por lo que éstos volverían a la circulación. Sin embargo, con respecto a la expresión de hDAF es importante mencionar que su detección está basada en la expresión de epitopes reconocidos por el Ac usado, lo que puede dar información errónea de la función biológica de la molécula. Por tanto, tiene aún que investigarse cual es el complejo mecanismo preciso implicado en la regulación del complemento que da lugar a la deposición de C5b-9 en relación a la saturación del injerto por Acs xenoreactivos. En este proceso parece no tener un papel importante el exceso de xenoAcs, al menos los estudiados, después del trasplante si se comparan éstos con los niveles antes del trasplante (Máñez R *et al.*, 2000), de la misma forma que los desórdenes de la coagulación por la activación de células endoteliales sin depósitos de complemento tampoco parece mediado por estos mediadores inmunológicos (Bühler L *et al.*, 2001).

Los Acs investigados en este estudio que mejor reflejan el fallo de la regulación del complemento en estas condiciones son las anti- α Gal IgM y particularmente los APA. Estas observaciones confirman los resultados del perfil de Acs observado tras el RVA que sufrieron primates trasplantados con riñones hDAF (Richards AC *et al.*, 2002). En este caso, los APA no fueron detectados durante la primera semana tras el trasplante, pero el fallo orgánico sucedió a la vez que se observaron los niveles más altos de estos Acs después del trasplante o después de un aumento y posterior descenso de los niveles. Estas observaciones apuntan hacia la consideración de otro importante factor en el desencadenamiento de RVA a pesar de la expresión constante de hDAF, resaltando el hecho de que tal vez sea más importante la calidad y tipo de Acs que la cantidad de éstos. Considerando el amplio espectro de epitopes frente a los que van dirigidos los APA y los ensayos anti-células porcinas, se puede proponer la hipótesis de que el espectro de Acs, por ejemplo su especificidad y/o avidéz, cambia como resultado de la sensibilización del injerto a pesar de la fuerte inmunosupresión suministrada. De esta forma, los estudios futuros deben investigar la relación entre nuevos Acs inducidos que surgen después del trasplante y el fallo de la proteína hDAF para realizar una adecuada regulación del complemento.

Una observación interesante de este estudio fue la naturaleza transitoria del aumento de Acs xenoreactivos circulantes que inducen el fallo de la regulación del complemento, fenómeno que concuerda con observaciones de otros estudios de xenotrasplante. Por ejemplo, en el modelo de trasplante hámster-rata, la CyA no previene el rechazo humoral del xenoinjerto pero causa una producción temporal de Acs anti-hámster que no se repiten después de un retrasplante de corazón de hámster (Chong AS *et al.*, 2000). Dado que la potente inmunosupresión suministrada en este estudio no puede prevenir el aumento de Acs tras el trasplante y que su producción está asociada con un fallo de la regulación del complemento y con el RVA de los corazones hDAF, la naturaleza temporal de la reacción puede ofrecer nuevas alternativas para el potencial farmacológico para la prevención del rechazo.

En resumen, el RHA de los órganos transgénicos para hDAF puede ser asociado con altos niveles de Acs anti-cerdo. Se ha propuesto la hipótesis de que el transgen hDAF tiene un umbral en eficacia, por encima del cual el ataque de Acs y la regulación del complemento no pueden prevenir el RHA. De igual modo, el RVA en trasplante de corazones hDAF de cerdo a babuino puede estar causado por una desregulación del complemento que inicialmente previene RHA en la mayoría de los casos. En nuestro estudio, la pérdida de eficacia de la inhibición del complemento aparece después del día 7 y se relaciona con un aumento de xenoAcs detectados en varios ensayos, aunque ninguno de los Acs detectados excedía el nivel en circulación presente antes del trasplante. Para el futuro de los xenotrasplantes de órganos porcinos usando animales donantes transgénicos hDAF es crucial un mejor entendimiento de los mecanismos por los cuales los xenoAcs impiden la regulación del complemento mediado por proteínas hDAF y como poder eliminar, o al menos disminuir, los niveles de estos xenoAcs.

1.1.2. Efecto del tratamiento con el polímero GAS914 sobre los niveles de los Acs anti- α Gal, APA y anti-células porcinas, y en la prevención del RVA

En base a los resultados obtenidos descritos anteriormente, y a la necesidad de eliminar o disminuir la presencia de xenoAcs para evitar el RVA, en el mismo modelo de xenotrasplante de corazón de cerdo transgénico hDAF en babuino, también se investigó la eficacia de la administración intravenosa de GAS914, una forma soluble de α Gal en forma de T2, en combinación con la pauta de inmunosupresión farmacológica ya utilizada, en la neutralización de xenoAcs antes y después del trasplante. Los ocho

babuinos receptores incluidos en este estudio recibieron GAS914. De ellos, seis babuinos alcanzaron una media de supervivencia elevada (29 días, rango 6-60) no mostrando ningún xenoinjerto signos patentes de RVA, siendo sacrificados la mayoría por complicaciones secundarias. Los otros dos babuinos fueron tratados con la misma inmunosupresión pero con un 50 % de reducción en la dosis de Csf, sufriendo en estos casos de forma evidente RVA (supervivencia 7 y 9 días). No se observó toxicidad o efectos secundarios asociados al tratamiento con GAS914 incluso a dosis elevadas, esto es debido seguramente a que esta sustancia es metabolizada por el hígado y excretada por los riñones (Mañez R *et al.*, 2001b) sin provocar ninguna complicación ni depósito de inmunocomplejos. Estas supervivencias son similares a las de otros grupos en otros modelos de animales tratados con GAS914. En un modelo similar pero de trasplante ortotópico de corazones hDAF, los babuinos tratados con GAS914 alcanzaron supervivencias de hasta 25 días (Brandl U *et al.*, 2005). En corazones hDAF trasplantados en monos *Rhesus* tratados con factor de veneno de cobra Yunan (Y-CVF), se lograban supervivencias de 8-13 días, mientras que al añadir GAS914 al protocolo se alcanzan supervivencias de hasta 60 días (Chen G *et al.*, 2004). De forma similar Lam TT *et al.* en 2004 demostraron que GAS914 prolongaba la supervivencia de xenotrasplantes cardíacos y renales en primates no humanos.

Nuestros resultados demuestran que la administración intravenosa de GAS914 en babuinos produce de forma inmediata una rápida y significativa reducción de los Acs anti- α Gal preformados que es suficiente para prevenir el RHA de los corazones hDAF transgénicos. El tratamiento antes del trasplante redujo el nivel de Acs en el momento del trasplante tanto de los Acs IgG e IgM anti- α Gal DI, T2, T6 y APA. Los niveles de Acs anti- α Gal permanecieron bajos durante todo el periodo postoperatorio por la continua administración de GAS914 y no se observó ningún incremento en el nivel de ninguno de estos Acs en el momento de la muerte del animal o del fracaso del xenoinjerto, con la excepción de la observación de un incremento considerable de los Acs APA en el momento del RVA en los dos animales tratados con el 50% de Csf.

Estos resultados indican que, aunque el GAS914 contiene sólo residuos α Gal en forma de T2 que eliminan Acs dirigidos contra este antígeno, es capaz de eliminar también significativamente Acs anti- α Gal contra otras especificidades en animales xenotrasplantados como ya había sido observado por nuestro grupo anteriormente en animales sin trasplantar (Mañez R *et al.*, 2001b). Intentos anteriores mediante columnas inmunoabsorbentes que contenían un único fenotipo α Gal (Lin SS *et al.*, 2000) habían

resultado ineficaces para eliminar otro tipo de residuos α Gal. Sin embargo, otros autores consideran que la eliminación de Acs frente a los residuos α Gal T2 y T6 requiere el uso de residuos específicos (Kuwaki K *et al.*, 2004). Además, aunque utilizando otros monómeros sintéticos de oligosacáridos α Gal se había observado una unión menor de éstos a las Igs IgM anti- α Gal (Rieben R *et al.*, 2000), en nuestro caso con GAS914 la neutralización fue igualmente efectiva y se unió a ambos tipos de Igs IgM e IgG. Esto es muy importante porque el RHA esta predominantemente producido por las IgM (Goldberg LC *et al.*, 1996), pero las IgG anti- α Gal son también importantes.

Diversos autores han apuntado la necesidad de realizar distintos tipos de ensayos para la determinación de xenoAcs en los experimentos de xenotrasplante (Richards AC *et al.*, 2002) para determinar no sólo los específicos de los residuos α Gal sino ampliar el espectro al resto de xenoAcs frente a las diversas moléculas posibles frente a las que se puede dirigir la respuesta. Por eso hemos analizado por citometría de flujo la presencia de Acs frente a células porcinas (CMSP, L35 y endoteliales) tanto en el grupo de animales no tratados como en el de tratados con GAS914.

En nuestro estudio se observa que en el grupo de animales no tratados los niveles de Acs IgM anti-CMSP son muy altos antes del trasplante con respecto a la necropsia, sin embargo en el momento de la necropsia estos Acs siguen estando presentes, aunque de forma reducida y podrían ser responsables del RVA. En otros estudios con cerdos *knockout*, también se detecta la presencia de estos Acs en un modelo de xenotrasplante de corazón porcino a babuino (Tseng YL *et al.*, 2006). Tras el pretratamiento con GAS914 al igual que ocurría con los Acs anti- α Gal en el resto de los ensayos realizados para analizar los xenoAcs de tipo IgM anti-células porcinas (CMSPs, linfocitos T o endoteliales) se observó una reducción sustancial de los Acs que se mantuvo durante el periodo postrasplante hasta el momento de la necropsia, lo que indica que la población mayoritaria de Acs frente a los tres tipos de células son anti- α Gal. Esta observación *in vivo* esta de acuerdo con las observaciones *in vitro* usando ensayos similares con sueros de primates no trasplantados, en las que también se demostró una alta correlación de los resultados de los diferentes ensayos para la determinación de Acs anti-células porcinas y la casi completa depleción después de la absorción de Acs anti- α Gal con una resina que contiene residuos α Gal (Lam TT *et al.*, 2004).

Los niveles de Acs anti-linfocitos T, al igual que los niveles de Acs anti-células endoteliales porcinas son muy inferiores a los de las CMSP antes del trasplante, lo que pudiera indicar que los xenoAcs naturales presentes en los babuinos van dirigidos frente

a moléculas que no están expresadas de forma mayoritaria en las células T o en las endoteliales, sino que sugiere que podrían estar dirigidas al resto de las poblaciones presentes en las CMSP, como son los linfocitos B o los monocitos, aunque no sabemos frente a cuales. Los datos obtenidos con el estudio más amplio del grupo B.2 parecen sustentar esta hipótesis. Aunque los resultados en nuestros grupos de animales parecen sugerir que la implicación de Acs anti-células endoteliales no es muy grande, existen trabajos en los que se defiende la hipótesis de que la presencia de Acs IgM anti-células endoteliales está estrechamente relacionada con el RVA (Dorling A, 2003). En otros estudios de xenotrasplante de riñón porcino a mono *Cynomolgus* obtienen los mismos resultados y relacionan los Acs anti-células endoteliales con el rechazo de los injertos (Richards AC *et al.*, 2002). También en modelos de xenotrasplante cardiaco de rata a ratón se encuentran Acs anti-células endoteliales de todas las subclases, esencialmente IgM e IgG2a en el momento del rechazo (Matsumiya G *et al.*, 1994).

Podríamos concluir que la neutralización efectiva producida por GAS914 de los xenoAcs preformados e inducidos anti- α Gal, es capaz de prevenir no sólo el RHA sino también el RVA en las primeras fases después del trasplante. En las biopsias de los xenoinjertos de los animales tratados con GAS914 obtenidas a los 30 minutos después del trasplante y las biopsias de los xenoinjertos de los animales sacrificados tempranamente por complicaciones quirúrgicas se observaron pocos depósitos de IgG y no se observaron depósitos de IgM, C3, C4, C5b-9, fibrina. Esto parece indicar la ausencia de otras especificidades diferentes de los anti- α Gal al principio del xenotrasplante. Sin embargo, a pesar de que la continua depleción de los anti- α Gal permite prolongar significativamente la supervivencia de los xenoinjertos, no evita totalmente el RVA y en las biopsias de las necropsias de los animales que más sobrevivieron ya se observaron algunos depósitos de IgG, IgM, C3, C4 y ninguno de C5b-9 y fibrina, a pesar de la ausencia de Acs anti- α Gal. Aunque siempre en menores cantidades que en los animales no tratados, lo que sugiere que los xenoAcs que participan en ese tipo de rechazo no son sólo anti- α Gal.

1.1.3. Producción de Acs inducidos no anti- α Gal citotóxicos o no citotóxicos tras el xenotrasplante de cerdo hDAF en babuinos

Esta hipótesis se vio sustentada por otro de nuestros resultados que indicaba que el GAS914 no puede prevenir el RVA de los corazones de cerdo transgénico hDAF trasplantados a babuinos si se reduce la dosis de Csf en la terapia inducida como ocurrió en dos de los animales. En estos casos, GAS914 fue también eficaz en la eliminación de Acs IgM e IgG anti- α Gal DI, TRI2 y TRI6 tanto después del trasplante como antes, pero en estas circunstancias no puede prevenir la aparición de Acs citotóxicos, seguramente no anti- α Gal, contra células porcinas mostrado tras realizar el ensayo APA. Hay autores que sugieren (Ghanekar A *et al.*, 2002) que los bajos niveles de anti- α Gal que permanecen a pesar de la terapia del GAS914 pueden ser suficientes para dar lugar al daño del injerto a largo plazo, otros grupos apuntan también a la posible participación de Acs que no sean anti- α Gal en la aparición del RVA, en un modelo similar al nuestro, a pesar de que el tratamiento con GAS914 reduce los niveles de Acs anti- α Gal (Lam TT *et al.*, 2004). Resultados similares en otros estudios en los que el GAS914 reducía los niveles de Acs anti- α Gal en xenotrasplantes de riñón de cerdo a babuino, y también sugerían la asociación del RVA a Acs no anti- α Gal (Chen G *et al.*, 2006). La identificación de especificidades porcinas reconocidas por estos Acs no anti- α Gal y como evitar esta producción sin el uso de potentes tratamientos de inmunosupresión citotóxicos son los siguientes desafíos en el xenotrasplante de órganos de cerdo porcinos en primates no humanos. Nuestros estudios preliminares indicaron que al menos en uno de los babuinos receptores estos Acs citotóxicos no anti- α Gal iban dirigidos frente a CMSPs porcinas, tanto a antígenos presentes en los linfocitos como en monocitos.

Además, otro factor a considerar es que el RVA que se produce en el xenotrasplante se caracteriza, entre otros procesos, por una activación del endotelio vascular (Gollackner B *et al.*, 2004). Los resultados de nuestros experimentos muestran que la activación de las células endoteliales se produce también con ausencia o presencia de mínimos depósitos de IgG e IgM y completa ausencia de depósitos de C5b-9 y fibrina en los xenoinjertos de cerdos hDAF trasplantados a babuinos tratados con GAS914 con larga supervivencia y sin signos claros de rechazo y que no tenían Acs anti- α Gal ni APA en el momento de la necropsia. Estos datos sugieren que los Acs no citotóxicos no detectados tras el ensayo APA que se fijan transitoriamente al endotelio, podrían ser los

responsables de la activación. Esta premisa estaría apoyada en el estudio reciente de Bühler L (Bühler L *et al.* 2001) que demostró que Acs no anti- α Gal producen una citotoxicidad baja pero real frente a células de cerdo. Esta activación puede tener a la larga un papel negativo en la supervivencia del injerto, pero aún no tenemos datos suficientes para establecer una relación directa entre el estado de activación y la supervivencia del injerto. Otra explicación podría ser la implicación de factores no inmunológicos, como trastornos de la coagulación la microangiopatía trombótica descrita en xenoinjertos renales hDAF trasplantados en babuinos (Bühler L *et al.*, 2001) pueden afectar la supervivencia en situaciones similares, desconociéndose si se produce por mediadores inmunológicos o una incompatibilidad de coagulación/fibrinólisis entre el cerdo y el primate no humano.

Por tanto, podríamos concluir que para una prevención permanente del RVA mediado por Acs es necesaria también la identificación de los Acs anti-cerdo dirigidos frente a antígenos no α Gal que pueden ser producidos en pequeñas cantidades. Galili U en 2001, sugiere que la baja respuesta detectada contra este tipo de antígenos es debida a que se necesita un tiempo relativamente muy largo para que los teóricamente numerosos clones B puedan expandirse y alcanzar la producción de títulos detectables. Un mejor conocimiento de los xenoantígenos implicados en el RVA observado en el modelo de xenotrasplante de cerdo transgénico para las CRPh, en primates no humanos permitiría el diseño de estrategias terapéuticas para prevenir o revertir este tipo de rechazo.

En resumen, nuestros resultados de la barrera inmunológica en el xenotrasplante heterotópico de corazón de cerdo hDAF en babuinos, demuestran que con la utilización de protocolos inmunosupresores que incluyen dosis elevadas de ciclofosfamida en el periodo perioperatorio, el RVA tiene lugar con un nivel de xenoAcs inferior al que había antes del trasplante, lo que sugiere que después del mismo la función del hDAF se pierde, total o parcialmente, a pesar de detectarse su presencia por inmunohistoquímica en el xenoinjerto rechazado. Esta disfunción de la proteína sintetizada por el transgen humano determina que la prevención o al menos disminución del RVA de xenoinjertos porcinos hDAF sólo se alcance por medio de la neutralización continuada de los Acs naturales anti- α Gal mediante la molécula GAS914, en combinación con protocolos inmunosupresores que inhiben la producción de nuevos xenoAcs, alcanzándose una supervivencia media de xenoinjertos porcinos cardiacos de 28 días con un máximo de 60 días.

En estas circunstancias, la causa principal de fracaso del xenoinjerto no es el rechazo del mismo, sino el fallecimiento del receptor por los efectos secundarios del tratamiento inmunosupresor. Esto nos llevó a investigar hasta que punto la posibilidad de neutralizar de forma indefinida los Acs anti- α Gal permitía una disminución del tratamiento inmunosupresor después del trasplante. El resultado ha sido la demostración de que al disminuir las dosis de ciclofosfamida a la mitad, se produce un RVA mediado por xenoAcs no anti- α Gal y que, dado que no estaban presentes antes del trasplante, sugieren que serían inducidos por el xenoinjerto. Dado que el rechazo humoral causado por estos Acs no podría ser evitado por cerdos *knockout* para α Gal (Lai L *et al.*, 2002), la obtención de un régimen inmunosupresor que inhiba la producción de estos Acs inducidos con unos efectos secundarios tolerables por el receptor a largo plazo, es clave para que el xenotrasplante de órganos porcinos pueda ser llevado a la clínica.

1.2. Barrera infecciosa en el xenotrasplante de órganos de cerdos transgénicos a babuinos

1.2.1. Análisis de la posible transmisión de PERV a babuinos con fuerte inmunosupresión y depleción persistente de Acs anti- α Gal

Como ya se ha expuesto anteriormente, el xenotrasplante de órganos procedentes de cerdos transgénicos para las hCRPs en los modelos experimentales preclínicos de xenotrasplante, en el que los receptores son primates no humanos, junto con la utilización de protocolos terapéuticos cada vez más refinados, ha permitido disminuir significativamente los diversos tipos de rechazo y obtener supervivencias medias de un mes, con un máximo que oscila entre dos y tres meses (Vial CM *et al.*, 2000; Lam TT *et al.*, 2004; Schuurman HJ *et al.*, 2002). Estos mismos modelos de xenotrasplante han demostrado que la función de órganos con baja complejidad desde el punto de vista de síntesis y acción de hormonas y proteínas, como el corazón o el riñón, pueden mantener la correcta fisiología de los receptores. Sin embargo, se desconoce si el xenotrasplante de órganos porcinos comporta algún riesgo para el receptor, en especial de aquellos microorganismos como los PERV, que no pueden ser eliminados mediante la producción de los animales fuente de órganos en condiciones libres de patógenos específicos. En particular, la transmisión de PERV a humanos ganó una tremenda atención tras el informe de transmisión a células humanas *in vitro* e *in vivo* a ratones

diabéticos no obesos, con inmunodeficiencia severa combinada (NOD/SCID) de ratón (Patience C *et al.*, 1997; Van der Laan LJW *et al.*, 2000; Martin U *et al.*, 2002). Aunque no se ha demostrado transmisión entre especies en humanos tratados con células vivas, tejidos u órganos porcinos (Paradis K *et al.*, 1999; Martin U *et al.*, 2002; Switzer WM *et al.*, 2001; Loss M *et al.*, 2001), la posibilidad de que el xenotrasplante de órganos de cerdo en humanos pueda acompañarse de la transmisión de agentes infecciosos para el receptor, y en especial al resto de la población, ha llevado a algunos científicos a proponer una moratoria para este tipo de investigaciones a nivel clínico.

El modelo experimental que más se aproxima a la situación que representa un xenotrasplante porcino en humanos es la realización del mismo en primates no humanos, ya que éstos deben recibir un tratamiento inmunosupresor con unos efectos que, si no idénticos, son muy similares al que tendría en humanos. Aunque inicialmente se consideró que las células de babuino eran resistentes a la infección por PERV *in vitro* posteriormente se ha demostrado que al igual que las células humanas, las células de babuino pueden ser infectadas *in vitro* por ese retrovirus (Blusch JH *et al.*, 2000), con lo que los modelos experimentales de xenotrasplante de órganos porcinos en los que sea posible alcanzar supervivencias prolongadas se convierten en los ideales para investigar el riesgo de infección por PERV, que es punto fundamental para considerar un potencial ensayo clínico de xenotrasplante.

En nuestro estudio, hemos investigado si la transferencia *in vivo* de PERV y/o el desarrollo de una respuesta específica frente a PERV se modifican después de un xenotrasplante de órganos de cerdos a babuinos por el uso de tratamiento de potentes inmunosupresores, el uso de órganos de cerdos transgénicos para las hCRP, una reducción sostenida de los Acs anti- α Gal con el tratamiento con GAS914 y/o un tiempo prolongado de contacto con los órganos de cerdos. Nuestros resultados negativos tras el análisis por RT-PCR de la presencia de secuencias de PERV en el plasma de 27 babuinos receptores de órganos (corazón o riñón) de cerdos transgénicos hDAF o hMCP/hDAF, a pesar de la presencia positiva de secuencias de PERV en sus correspondientes donantes, sugiere la ausencia de infección. En tres de los donantes analizados no se detectó presencia de PERV, estos resultados también son encontrados en otros estudios (Wood JC *et al.*, 2004). Estos resultados son similares a los encontrados por otros grupos con modelos preclínicos equivalentes. Así, tanto en el caso de xenotrasplantes de corazón, piel o células pancreáticas a distintas especies de primates no humanos (Switzer WM *et al.*, 2001), ó incluso 535 días tras el trasplante de

células porcinas a babuinos con inmunosupresión selectiva contra células B y eficaz eliminación de Acs anti- α Gal (Simon AR *et al.*, 2003), en ninguno de los casos analizados encontraron infección por PERV. Paralelamente, en nuestro estudio también analizamos la presencia de Acs frente a PERV en los sueros de los 27 babuinos del estudio antes del trasplante y en el momento de la necropsia, igualmente con resultados negativos. Esta falta de respuesta inmunológica frente al virus ha sido demostrada por otros autores tanto en babuinos inmunodeprimidos trasplantados con pulmones, células endoteliales o CMSP porcinas (Martin U *et al.*, 2002), como en pacientes hemofílicos tratados con factor VIII porcino (Heneine W *et al.*, 2001). Por tanto, la ausencia de transmisión demostrada en nuestro estudio, el cual incluía 4 intensos regímenes de inmunosupresión en algunos casos durante un periodo de tiempo prolongado, confirma los datos previos indicando que estas terapias no aumentan el riesgo de infección por PERV en estos animales, al menos durante los dos meses que cubre este estudio. Todos estos resultados apuntan a la evidencia de una baja susceptibilidad de los primates no humanos, incluidos los babuinos utilizados en nuestro modelo, hacia la producción de infección por PERV tras un xenotrasplante de órganos porcinos.

Nuestros resultados estarían por tanto en contra de lo observado en los modelos de ratón NOD/SCID, en los que se ha demostrado la infección de células humanas *in vivo* por PERV (Patience C *et al.*, 1997; Van der Laan LJW *et al.*, 2000; Martin U *et al.*, 2002). Sin embargo, la extrema inmunodeficiencia de este animal se caracteriza por una total ausencia de inmunidad mediada por linfocitos T y B, en el que es posible reproducir prácticamente cualquier tipo de infección o conseguir que células de otras especies como las humanas sobrevivan, no permitiendo concluir que algo parecido pueda ocurrir en humanos. Al contrario, estarían en concordancia con las investigaciones realizadas en un grupo de 160 personas que han estado en contacto con órganos, tejidos o células vivas de cerdo, y no han demostrado ninguna infección a pesar de demostrarse la presencia de células porcinas circulantes incluso 8 años después de la exposición (Paradis K *et al.*, 1999). Aunque estos resultados obtenidos en humanos sugerían ya la posibilidad de seguridad en la utilización de órganos porcinos para trasplante en humanos, estos estudios tenían algunas limitaciones (Blusch JH *et al.*, 2002); entre ellas, el hecho de que sólo algunos de los sujetos analizados estaban sometidos a inmunosupresión, y en los casos en los que estaban, esta inmunosupresión era muy similar a la que se administra en los alotrasplantes y que es considerablemente menor a la que sería necesario usar en el caso de un xenotrasplante y no incluían células y/o

tejidos de cerdos transgénicos para las hCRP. Además, todos los datos en conjunto sugieren que la ausencia de infección observada *in vivo* en el estudio, con excepción de los resultados del modelo de ratones NOD/SCID, puede ser debida a que PERV es capaz de infectar células humanas sólo bajo un claro fallo o falta de la inmunidad humoral y celular como ocurre en el modelo murino. En humanos, esta condición es incompatible con más de un año de vida debido a la susceptibilidad a infecciones bacterianas, fúngicas o virales.

Entre los elementos inmunológicos ausentes en ratones NOD/SCID se incluyen los Acs naturales contra azúcares α Gal. Como se ha mencionado anteriormente, los Acs anti- α Gal son uno de los mayores elementos implicados en el rechazo de los órganos de cerdo, incluso si se usan como fuente órganos de animales transgénicos para las hCRP, y la depleción de estos Acs parece ser uno de los mayores elementos que prolongan la supervivencia en los modelos de xenotrasplante de cerdo a primates no humanos, tal como hemos demostrado nosotros y otros autores (Kuwaki K *et al.*, 2004; Ritzhaupt A *et al.*, 2002). Se ha postulado que la potencial reducción de los Acs anti- α Gal, podría ayudar a la supervivencia del virus y potenciar el riesgo de infección por PERV (Rother RP *et al.*, 1995). Los resultados de nuestro estudio demuestran que una depleción sostenida de Acs anti- α Gal (6-27% de los niveles presentes antes del tratamiento) por el GAS914 y la fuerte inmunosupresión utilizada (el complemento no disminuye al menos que se utilicen tratamientos específicos), no está asociado con un riesgo mayor de infección por PERV. No está claro si el nivel residual de Acs anti- α Gal observado tras el tratamiento con GAS914 es suficiente para proteger al receptor del órgano porcino de la infección por PERV. De todas formas, es importante señalar que estos resultados implicarían que si se requiere la depleción de los Acs anti- α Gal para prevenir el rechazo del xenoinjerto porcino, el riesgo potencial de infección por PERV no va a aumentar por este tratamiento. Por otro lado, como ya se mencionó anteriormente los Acs anti- α Gal no tienen una única especificidad y el papel del polimorfismo de Acs anti- α Gal en la protección contra la infección por PERV no está claro, por lo que la depleción de estos Acs con múltiples oligosacáridos podría modificar el riesgo de infección. Hasta ahora en receptores de órganos porcinos bajo estos tratamientos (Kuwaki K *et al.*, 2004) no se han encontrado signos evidentes de infección, lo que sugiere que la depleción múltiple de Acs anti- α Gal no modifica el riesgo de infección por PERV después de un trasplante de órganos de cerdo.

En nuestro estudio también se analizó la potencial infección por PERV de las CMSP circulantes de algunos de los babuinos receptores de los órganos porcinos. Células primarias de primates no humanos y líneas celulares pueden ser infectadas con PERV, aunque no está claro si el virus se puede replicar en esas células (Blusch JH *et al.*, 2000; Ritzhaurt A *et al.*, 2002). Por técnicas de PCR se detectaron secuencias de ADN *polimerasa-proteasa* en el 43% de las muestras utilizadas. Desafortunadamente, el análisis por PCR de las potenciales infecciones de PERV en los modelos de xenotrasplante de cerdo a primate no humano han sido enturbiados por falsos positivos debido a las células porcinas quiméricas (Loss M *et al.*, 2001). De forma paralela también se analizó la presencia de PERV en otros órganos de los babuinos trasplantados mediante técnicas de inmunohistoquímica y el Ac específico de vp29 de PERV, que dieron como resultado la presencia de células positivas para PERV en bazo, ganglios, riñón e hígado obtenidos del receptor en la necropsia, resultando que aunque también sugería la posible presencia de células infectadas por PERV en otros órganos podría, al igual que en las CMSP, ser debido a la presencia de células porcinas o xenoquimerismo.

1.2.2. Presencia de xenoquimerismo en babuinos sometidos a un xenotrasplante

El microquimerismo debido a una fuente de células animales se ha visto que ocurre en diferentes receptores de xenoinjertos durante periodos de tiempo que van desde días a varios años en algunos casos (Patience C *et al.*, 1997; Simon AR *et al.*, 2002). En nuestro estudio usando ensayos de PCR adecuados, encontramos presencia de ADN mitocondrial porcino en todas las muestras de CMSP que fueron positivas para las secuencias de ADN de PERV, independientemente del periodo de tiempo correspondiente a la aceptación del injerto, y en el 75% de las muestras de CMSPs que dieron negativas para las secuencias de ADN de *proteasa-polimerasa*. La presencia de ADN mitocondrial porcino en células de algunos de estos animales sugiere la presencia de xenoquimerismo (Deng YM *et al.*, 2000).

Un análisis más exhaustivo de este quimerismo, por inmunohistoquímica, demostró que las células porcinas también se encontraron en bazo, ganglios, riñón e hígado obtenidos del receptor en la necropsia, utilizando Acs que reconocen específicamente distintos antígenos porcinos. Los resultados de inmunohistoquímica demostraron la presencia variable (entre 5-10%) de células porcinas (positivas para CD46 porcino) en todos los babuinos analizados, aunque en distinta proporción según los órganos estudiados

(bazo>ganglio>riñón>hígado). Un porcentaje significativo de estas células parecían pertenecer a la estirpe macrófago-dendrítica tanto por su morfología como por la presencia de marcadores específicos (positivas para SWC3). No se encontró ninguna relación entre una mayor presencia de xenoquimerismo y una mayor supervivencia. La presencia de quimerismo no es solo un fenómeno observado en el xenotrasplante (Tomita Y *et al.*, 2006) sino que ha sido ampliamente observado en el caso de los alotrasplantes tanto a nivel experimental (Tomita Y *et al.*, 2006) como a nivel clínico tras el trasplante de diversos órganos como pulmón, riñón o corazón (Anversa P *et al.*, 2002b), entre otros. En todos estos casos se ha querido analizar si existía una relación entre la presencia de células quiméricas en el receptor, lo que equivaldría a la existencia de una posible tolerancia hacia el órgano trasplantado, y la supervivencia del injerto, pero en ningún caso se ha encontrado ninguna clara correlación. Nuestros resultados confirman la existencia de células circulantes de cerdo en el babuino tras el xenotrasplante de corazón de cerdo hDAF transgénico, lo que indica la existencia de xenoquimerismo en estos animales, aunque no parece estar relacionado con la supervivencia del xenoinjerto

En resumen, tras el estudio de la barrera infecciosa en el xenotrasplante de órganos de cerdo transgénico hDAF o hMCP/hDAF a babuinos muy inmunodeprimidos, nuestros resultados indican que no hay una transmisión de PERV desde el donante al babuino receptor aunque exista una depleción sostenida de Acs anti- α Gal. Estos datos proporcionan información adicional acerca del bajo riesgo de transmisión de PERV entre especies en el xenotrasplante de órganos de cerdo, sugiriendo que este aspecto no debe ser un obstáculo para los ensayos clínicos. La ausencia de infección en los receptores de un xenoinjerto sometidos a un fuerte tratamiento inmunosupresor, aunque no excluye totalmente el riesgo de infección, reduce éste a niveles mínimos. Cuando se considere que los resultados de eficacia en los modelos experimentales con babuinos son los adecuados, no tiene que haber otros obstáculos para realizar ensayos clínicos de xenotrasplante con órganos, tejidos o células porcinas.

2. Obtención de células porcinas para el desarrollo de modelos preclínicos de terapia celular aplicada a regeneración cardiaca utilizando el cerdo como modelo biomédico

La terapia celular se ha propuesto como alternativa al trasplante de órganos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares utilizando para ello células autólogas crecidas *ex vivo* (Jain M *et al.*, 2001; Menasche P *et al.*, 2001). Para poder llevar a la clínica esta posibilidad, es necesario desarrollar los experimentos preclínicos en animales grandes y por ello hemos utilizado el cerdo como animal experimental en la presente tesis y además es el modelo biomédico ideal.

2.1. Caracterización fenotípica de mioblastos porcinos

Uno de los tipos celulares que se han propuesto para su aplicación en la terapia celular para las enfermedades cardiacas son los mioblastos de músculo esquelético (Sinanan AC *et al.*, 2006). Por ello, en nuestro estudio obtuvimos tanto mioblastos a partir de músculo esquelético porcino como miocitos de músculo cardiaco y los caracterizamos fenotípicamente para tratar de compararlos. Por inmunohistoquímica con marcadores de cardiomiocitos como actina muscular, conexina 43, desmina y troponina T (Xu W *et al.*, 2004; Steele A *et al.*, 2005; Suzuki K *et al.*, 2001), la expresión de estos marcadores, aunque es algo superior en cardiomiocitos es muy similar entre ambos en ambos casos actina muscular y conexina 43 son los marcadores que más se expresan y, desmina y troponina T los que menos. También ambos tipos celulares se determinó la expresión de determinados marcadores de superficie por citometría de flujo como CD90, CD29, CD44, CD56, CD45, CD14, SLA I, SWC3, CD31, CD106, CD11b, CD46 (Gang EJ *et al.*, 2004; Sinanan AC *et al.*, 2004) y resultaron ser fenotípicamente similares ya que sólo se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD45, pero en ambos casos la expresión era inferior a 2% por lo tanto se consideró negativa. El CD56 es marcador de mioblastos (Ghostine S *et al.*, 2002) expresándose un 27%.

Los mioblastos esqueléticos de varias especies han sido aislados y aplicados en diferentes modelos cardiacos experimentales animales. Los primeros experimentos se realizaron en un modelo de lesión por frío en corazón de perro (Marelli D *et al.*, 1992), y los resultados permitieron la evaluación de la seguridad y viabilidad de este tipo de trasplante (Yoon PD *et al.*, 1995). En un modelo de conejo, tras el trasplante de

mioblastos autólogos en el corazón dañado, se observaron agrupaciones de células alargadas y estriadas que retenían características tanto de mioblastos como cardiomiocitos cohabitando en la zona infartada (Taylor DA *et al.*, 1998). En un modelo cardiaco de oveja, el trasplante de mioblastos esqueléticos puede limitar el deterioro de la fracción de eyección y mejorar la función sistólica en el área de la cicatriz (Ghostine S *et al.*, 2002). La supervivencia de los mioblastos esqueléticos trasplantados ha sido confirmada durante más de 7 meses en modelos de isquemia de corazones porcinos y más de un año en modelos de corazones de ratas y ovejas (Ghostine S *et al.*, 2002; Haider HKH *et al.*, 2004; Pouzet B *et al.*, 2001).

A pesar del éxito aparente de todas estas aproximaciones experimentales, existe una gran controversia acerca de si los mioblastos actúan realmente como miocitos. El mayor problema es que los mioblastos esqueléticos trasplantados generalmente no expresan conexina 43 ni uniones GAP que pudieran producir un acoplamiento eléctrico que rodeara al miocardio (Reinecke H *et al.*, 2002), nuestros resultados demuestran que, al menos *in vitro*, los mioblastos porcinos expresan la conexina 43 en un 44,7%. Otros problemas sobre el uso de estas células han sido que los registros intercelulares de mioblastos trasplantados en miocardio infartado de rata mostraron actividad contráctil de nuevos miotubos formados, que son totalmente independientes de los cardiomiocitos vecinos (Leobon B *et al.*, 2003). Este fenómeno podría producir arritmias después del trasplante de mioblastos (Menasche P, 2002). De hecho, varios pacientes en fase I del estudio tuvieron que recibir un desfibrilador implantable. Además uno de 5 pacientes, en otro estudio en el que se utilizó inyección intramiocárdica con catéter de mioblastos esqueléticos autólogos (Smits PC *et al.*, 2003) desarrolló temporadas asintomáticas de taquicardias ventriculares no sostenidas. En otros ocho casos publicados, los autores observaron dos muertes repentinas y tres arritmias ventriculares serias (Makkar RR *et al.*, 2003). Este potencial pro arrítmico de los mioblastos esqueléticos limitará de forma importante el uso de este tipo de células (Müller P *et al.*, 2005).

2.2. Caracterización y diferenciación a cardiomiocitos de CMMp primarias e inmortalizadas

Debido a los problemas anteriormente mencionados con los mioblastos, en los últimos años se han buscado otras fuentes de células para reparación cardiaca, entre ellas destacan las CMM de MO. Nuestro grupo ha aislado CMM a partir de aspirados

medulares de MO porcina para caracterizarlas y así analizar su potencial para su uso en terapia celular. Las CMM de diferentes especies, como humanas o murinas, estudiadas por diferentes métodos en multitud de laboratorios, tienen condiciones reproducibles (Sottile V *et al.*, 2002; Zuk PA *et al.*, 2002; Pittenger MF *et al.*, 2004).

Tras su aislamiento y cultivo, las CMMp mostraron ser morfológicamente similares a las CMM humanas, con formas alargadas y de fibroblastos (Conconi MT *et al.*, 2006; Bonab MM *et al.*, 2006). Estas células expresaban vimentina entre un 90-100 % (Chen X *et al.*, 2006; Kassis I *et al.*, 2006; Li CD *et al.*, 2005) lo que demostraba su pureza. También, tras su caracterización por citometría de flujo se demostró que expresaban en superficie los antígenos definidos como característicos de CMM humanas (Abdallah BM *et al.*, 2005; Yoon YS *et al.*, 2005). Ambas presentan una alta expresión de CD90, CD29, CD44, SLA I y CD46, también expresan SWC3 y CD106, aunque en menor cantidad. (Pittenger MF *et al.*, 2000; Majumdar MK *et al.*, 2003). Las CMM humanas tienen un número de moléculas de superficie que son ligandos de células T, como son CD90, moléculas de adhesión de células vasculares (CD106), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) e ICAM-2 e integrinas como CD49 y alguna de estas moléculas se expresan también en las CMMp (Pittenger MF *et al.*, 1999; Majumdar MK *et al.*, 1998). Las CMM humanas carecen de las moléculas coestimuladoras B7, CD80 y CD86, y éstas no se expresan tras el tratamiento con el interferón (Tse WT *et al.*, 2003), en nuestro caso no hemos podido analizar esta expresión al carecer de AcMo porcinos equivalentes. Intuitivamente, cabría esperar que las CMM alogénicas estimularan la proliferación de los linfocitos T y las CMM del donante, deberían reconocer las células respondedoras y el receptor debería rechazarlas. Sin embargo, hay evidencias experimentales que indican que esto no sucede seguramente debido a esta falta de expresión de moléculas coestimuladoras (Tse WT *et al.*, 2003; Di Nicola M *et al.*, 2002; Le Blanc K *et al.*, 2003). Si esto ocurriese con las CMMp sería muy interesante a la hora de utilizarlas en modelos porcinos *in vivo* porque podrían ser alogénicas y no sería necesario obtenerlas del mismo animal en estudio.

Se ha demostrado que diversos productos químicos pueden inducir en las CMM un fenotipo miogénico (Wakitani S *et al.*, 1995). Para ello cultivamos las CMMp con 5-azacitidina durante 24 horas (Tomita S *et al.*, 1999) y caracterizamos las células obtenidas comparándolas con las CMMp sin cultivar con el inductor químico y con cardiomiocitos aislados directamente de corazón. Por citometría de flujo no se encontraron diferencias significativas en la expresión de antígenos de superficie entre

las CMMp tratadas con 5-azacitidina y las no tratadas, aunque si se encontraron algunas diferencias significativas al comparar las CMMp tratadas con los cardiomiocitos en la expresión de CD29, SLA I, CD46 y sobre todo en la de CD90 y CD56. Además, los tres tipos celulares se compararon por técnicas de inmunohistoquímica, con las que se detectó que tras la estimulación con 5-azacitidina de las CMMp obtuvimos un porcentaje variable pero significativo de células con características de cardiomiocitos que expresaban marcadores como actina muscular, desmina, conexina 43 y troponina T que no eran expresados o lo eran a bajos niveles en las CMM antes de su estimulación, ya que en media las CMMp pasaron de expresar actina muscular de 3,76% a 56,78%, la conexina 43 de 4,22% a 51,88%, la desmina de 1,44% a 12,62% y la troponina T de 3,39% a 25,08%. Como prueba adicional de la diferenciación de las CMMp a cardiomiocitos, se analizó la expresión de la proteína conexina 43 por *western-blot* confirmando estos experimentos los resultados obtenidos en inmunohistoquímica. La detección de conexina 43, que forma parte de las uniones GAP, ya fue utilizado en otros estudios realizados con CMM humanas (Chang MG *et al.*, 2006; Roura S *et al.*, 2006).

El trabajo pionero de Makino (Makino S *et al.*, 1999), demostró que la exposición de CMM murinas a 5-azacitidina podría inducir la generación de miocitos cardiacos *in vitro*. Los autores fueron capaces de seleccionar células similares a cardiomiocitos en base a la presencia de contracciones espontáneas (Makino S *et al.*, 1999). Demostraron que estas células expresaban el péptido natriurético atrial, desmina, actinina y miosina, así como la presencia de los sarcómeros típicos y núcleos centrales por microscopía electrónica. Posteriormente, diversos estudios han mostrado resultados similares al lograr diferenciar CMM humanas *in vitro* con 5-azacitidina en cardiomiocitos que expresaban marcadores de cardiomiocitos sugiriendo que estas células son potencialmente útiles para la reparación del miocardio (Xu W *et al.*, 2004). Sin embargo, otros autores han indicado una falta de diferenciación de CMM de ratón a cardiomiocitos después del tratamiento con 5-azacitidina en diferentes concentraciones y tiempos puesto que las células obtenidas no expresaban troponina I, ni la cadena pesada de la miosina ni conexina 43 (Liu Y *et al.*, 2003).

Además de productos químicos, se han utilizado otras aproximaciones para obtener cardiomiocitos a partir de CMM, como por transfección con un plásmido recombinante que contenía cDNA EGFP seguido por el promotor del gen cardíaco específico de la cadena ligera de la miosina-2v (MLC-2v) (Hattan N *et al.*, 2005). *In vitro*, estas células expresaban genes específicos de cardiomiocitos, α -actina esquelética y la cadena pesada

de la β -miosina. Cuando se inyectaron en el miocardio de ratones normales adultos, estas células se integraron en el miocardio del huésped, expresando conexina 43 y con supervivencias al menos durante 3 meses. En un estudio reciente Beeres *et al.* indican que las CMM adultas humanas tienen potencialidad para conectar eléctricamente capas de cardiomiocitos de rata cultivados *in vitro*. Todos estos resultados proporcionan evidencias concluyentes y directas de que las CMM derivadas de MO se pueden diferenciar en cardiomiocitos (Dawn B *et al.*, 2005). No sólo las CMM de MO presentan esta propiedad, sino que las CMM residentes en el hígado (Malouf NN *et al.*, 2001) y en el tejido adiposo (Rangappa S *et al.*, 2003; Planat-Benard V *et al.*, 2004) parecen tener también la habilidad para diferenciarse en cardiomiocitos.

Se sabe que las CMM son capaces de diferenciarse en condrocitos, adipocitos y osteocitos utilizando para ello diferentes tratamientos con estímulos (Pittenger MF *et al.*, 2004). Para probar si el tratamiento con 5-azacitidina también provocaba la diferenciación de las CMMp en estas estirpes, realizamos tinciones específicas para ellas y se observó que en todas las tinciones obtuvimos un resultado negativo, lo que indicaba que el tratamiento químico utilizado podría servir para una diferenciación específica en la obtención de cardiomiocitos sin tener peligro de aparición de otras estirpes celulares que impedirían su uso en los modelos *in vivo*.

También experimentalmente *in vivo* las CMM humanas son capaces de diferenciarse en fenotipo de cardiomiocitos después de su inyección en el ventrículo izquierdo de ratones CB17 SCID/beige adultos, son positivas para desmina y troponina T, permanecen 14 días después de la inyección positivas para desmina a los 60 días y muestran un potencial cardiomiogénico (Toma C *et al.*, 2002). En diversas aproximaciones de estudios clínicos en los últimos años se han utilizado las CMM humanas para reparar zonas infartadas o de cicatriz tras un infarto de miocardio (Le Blanc K *et al.*, 2006; Zhang S *et al.*, 2006; Pak HN *et al.*, 2003) y en todos ellos han confirmado su utilidad. Los resultados positivos obtenidos con CMM condujeron a muchos investigadores a utilizar células frescas de MO, sin separar, para cardiomioplastia en humanos (Thompson RB *et al.*, 2003; Wang JS *et al.*, 2000; Bel A *et al.*, 2003; Nishida M *et al.*, 2003). Esta aproximación experimental evitaba la manipulación *in vitro* de las células inyectadas, pero no investigaba qué fracción de células de MO era la responsable de la regeneración miocárdica y consecuentemente, las células administradas podrían ser capaces de diferenciarse en otros tipos celulares no deseados. Sin embargo, independientemente de la población de células madre de MO o el modelo animal

utilizado, la mayoría de los estudios en cardiomioplastia celular mostraron una mejoría de la función cardiaca después del infarto de miocardio en el grupo tratado comparado con el grupo control no tratado (Muller P *et al.*, 2005).

Debido a que las CMM tienen un crecimiento limitado, otro de nuestros objetivos fue establecer líneas celulares inmortalizadas para facilitar los estudios *in vitro* para la inducción de diferentes linajes celulares (Pittenger MF *et al.*, 1999). Mediante la transformación de CMMp primarias con el plásmido pRNS-1 establecimos 4 líneas celulares a las que denominamos pBMC -2, -3, -4 y -5, que mostraron ser morfológicamente similares a las células primarias y similares entre sí, con la única diferencia de un crecimiento más lento de las pBMC-4 y -5. También mostraron un 100% de expresión del marcador vimentina característico de CMM. El análisis fenotípico por citometría de flujo demostró también su enorme similitud con las CMMp primarias en cuanto a la expresión de marcadores en superficie, salvo en la expresión de SLA-I y SWC3. Esta observación ya ha sido descrita anteriormente en otros estudios en los que estos dos antígenos se expresan de forma diferente en cultivos primarios y líneas celulares (Carrillo A *et al.*, 2002). Al igual que con las CMMp primarias, analizamos su potencial cardiomiogénico tras su estimulación con 5-azacitidina, nuevamente obtuvimos resultados que indicaban la aparición de la expresión de los marcadores de cardiomiocitos en las líneas tratadas, aunque en distinta proporción según las líneas analizadas ya que, tanto actina muscular como conexina 43 se expresaban en las 4 líneas, pero desmina se expresaba sólo en pBMC-4 y troponina T en todas excepto pBMC-3, en los controles sin diferenciar de las líneas pBMC-4 y -5 se expresaban ligeramente tanto la actina muscular como la conexina 43. Este fenómeno había sido descrito en algunas ocasiones, las CMM pueden expresar marcadores de cardiomiocitos espontáneamente (Bayes-Genis A *et al.*, 2005). Estas líneas de CMM inmortalizadas son las primeras de origen porcino descritas en la literatura. Anteriormente, otros grupos han obtenido tanto líneas de CMM humanas (Nishioka K *et al.*, 2003) como de ratón (Fukuda K, 2002) y que en ambos casos se había demostrado su potencial cardiomiogénico.

En conclusión, las CMMp primarias y las inmortalizadas pueden ser útiles herramientas para analizar si la implantación de CMM autólogas o incluso heterólogas, después de la diferenciación miogénica *ex vivo* puede mejorar la función cardiaca en un modelo *in vivo* de infarto de miocardio realizado en cerdo. Además, ambos tipos de células pueden

ser valiosas en general para los estudios *in vitro* de la capacidad de estas células para diferenciarse en otros múltiples linajes de células para terapia celular como osteocitos, condrocitos o adipocitos (Pittenger MF *et al.*, 2004).

2.3. Comparación del potencial uso clínico de mioblastos esqueléticos y CMM

Durante la última década, el éxito obtenido con el trasplante de mioblastos en diferentes modelos animales demostró que, en general y salvo casos aislados, el trasplante autólogo de mioblastos puede llevarse a cabo con efectos beneficiosos (Premaratne GU *et al.*, 2006). El trasplante de CMM para reparación cardíaca es más reciente, los primeros experimentos en animales demostraron que la inyección de células de MO producía una regeneración de cardiomiocitos, células endoteliales y células del músculo liso vascular produciendo una regeneración del 68% del miocardio infartado y la formación de nuevos vasos sanguíneos con mejoría de la función del ventrículo izquierdo y atenuación de la remodelación (Orlic D *et al.*, 2001b). A este estudio le han sido seguido un amplio repertorio de estudios de experimentación con animales y clínicos, todos con resultados seguros y en algunos casos beneficiosos (Zimmet JM *et al.*, 2005; Li TS *et al.*, 2005; Kajstura J *et al.*, 2005; Linke A *et al.*, 2005).

Ambos tipos celulares tienen características comparables, como su disponibilidad de fuentes autólogas sin tener problemas éticos y su fácil expansión *in vitro* en condiciones de cultivo que permiten alcanzar el elevado número de células que se necesitan para el trasplante. Sin embargo, los mioblastos son más resistentes a la isquemia y, por lo tanto, podrían ser los ideales para el trasplante en el miocardio isquémico. En cambio, una ventaja de las CMM sobre los mioblastos es su naturaleza plástica, que les proporciona su habilidad para transdiferenciarse en cardiomiocitos. Sin embargo, algunos investigadores tras los resultados obtenidos en un modelo en oveja sugirieron que la naturaleza plástica de las CMM es una desventaja y recomiendan precaución en el uso de CMM para trasplante cardíaco ya que podrían diferenciarse en otros tipos celulares como fibroblastos (Bel A *et al.*, 2003). En este respecto, los mioblastos poseen una ventajosa naturaleza unipotencial, porque son intrínsecamente miogénicos y, por lo tanto, su formación en otra cosa que no sean miofibrillas es remota. En contra, existen estudios en los que se han producido arritmias cardíacas después del trasplante de mioblastos, esto no se ha producido después del trasplante de CMM.

Aunque la comparación entre la implantación de CMM y cardiomiocitos, en un modelo porcino de infarto de miocardio, indicaba que ambos tipos de células mejoraron la carga y evitaron la expansión de la zona infartada, algunas de las CMM se diferenciaron en células endoteliales formando nuevos vasos sanguíneos en el miocardio infartado, lo que indicaba que estas CMM mostraron una mayor plasticidad *in vivo* que los cardiomiocitos y ofrecieron una alternativa práctica al trasplante de cardiomiocitos para restaurar la función tras un infarto en cerdos (Yau TM *et al.*, 2003). Por otro lado, comparando la eficiencia de CMM y mioblastos, se demostró que el trasplante intracardiaco de un número igual de progenitores de CMM o mioblastos autólogos produjo un grado similar de mejora en ambos tipos de trasplante en conejos (Thompson RB *et al.*, 2003).

Podríamos concluir que los beneficios que se obtengan tras el trasplante de células en el miocardio dañado van a depender de la elección de células donantes CMM o mioblastos, procedimiento de implantación, etc., ya que dependiendo de las condiciones, los mecanismos que se desencadenan posteriormente en el corazón son diferentes. En ensayos clínicos, el trasplante de mioblastos, al diferenciarse en miofibrillas, pueden proporcionar firme sujeción para un miocardio débil, previniendo la dilatación del ventrículo izquierdo y aumenta la función diastólica cardiaca más significativamente; mientras que el trasplante de CMM debe ser más importante en la mejora de la función diastólica (Ye L *et al.*, 2006). Considerando todos estos significativos aunque controvertidos resultados, un buen acercamiento podría ser combinar ambos tipos de células trasplantados simultáneamente para alcanzar los beneficios asociados con el uso de cada tipo celular en ratas (Ott HC *et al.*, 2004). Este efecto sinérgico de ambos tipos de células sería clínicamente más apropiado.

VI. CONCLUSIONES

1. En el xenotrasplante de corazones de cerdos transgénicos hDAF a babuinos tratados con una potente inmunosupresión farmacológica el RHA podría estar asociado a la presencia antes del trasplante de altos niveles de Acs hemolíticos citotóxicos tanto anti- α Gal como no anti- α Gal.
2. La expresión del transgen humano DAF en los xenoinjertos porcinos no es suficiente para evitar el RVA que se produce en el xenotrasplante de corazones de cerdos transgénicos hDAF en babuinos.
3. El tratamiento con GAS914, una matriz de polilisina lineal soluble que contiene residuos α Gal, durante 17 días antes del trasplante y de forma continuada después del trasplante previene el RHA y atenúa de forma consistente el RVA que se produce en los xenotrasplantes porcinos hDAF en babuinos.
4. El inmunosupresor GAS914 elimina tanto los xenoAcs de tipo IgM e IgG anti- α Gal DI, T2 y T6, tanto antes como después del trasplante. Sin embargo, en ausencia de una inmunosupresión adecuada, Acs citotóxicos con otras especificidades no anti- α Gal pueden ser inducidos por el xenoinjerto después del trasplante y causar el RVA.
5. Durante el xenotrasplante de cerdos transgénicos para hDAF en babuinos se produce una activación del endotelio, tanto en presencia como en ausencia de Acs anti- α Gal, que a la larga tiene un papel negativo en la supervivencia del injerto. Las causas de esta activación del endotelio son desconocidas, aunque uno de los mediadores podrían ser Acs no citotóxicos que se fijen transitoriamente al endotelio.
6. La depleción persistente de Acs anti- α Gal por el GAS914 junto con una potente inmunosupresión farmacológica no aumenta el riesgo de infección por PERV en el trasplante de órganos de cerdos transgénicos a babuinos.
7. Tras el xenotrasplante de órganos de cerdos transgénicos a babuinos existen en los receptores células de cerdo, tanto circulantes como en los tejidos, lo que indica la existencia de xenoquimerismo en estos animales, aunque éste no parece estar relacionado con la supervivencia del xenoinjerto.

8. Los mioblastos porcinos, derivados de musculo esquelético, y las CMM porcinas tratadas con 5-azacitidina *in vitro* presentan enormes similitudes antigénicas con los cardiomiocitos porcinos. El tratamiento con 5-azacitidina de las CMMp induce en éstas el fenotipo miogénico pero no el condrogénico, adipogénico u osteogénico.

9. Se han obtenido 4 líneas inmortalizadas de CMM porcinas similares fenotípicamente a las primarias, que se pueden mantener en cultivo indefinidamente y que conservan la capacidad de diferenciarse a cardiomiocitos tras el tratamiento con 5-azacitidina, siendo la que conserva mejor estas características la línea pBMC-2.

10. La obtención de mioblastos porcinos y, la obtención y diferenciación de CMM porcinas primarias o inmortalizadas pueden ser una útil herramienta para el desarrollo de modelos de terapia celular *in vivo* utilizando como modelo biomédico el cerdo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ABDALLAH BM, HAACK-SORENSEN M, BURNS JS, ELSNAB B, JAKOB F, HOKLAND P, KASSEM M. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jan 21; 326(3):527-38.
- AHN C, KIM JY, LEE BC, KANG SK, LEE JR, HWANG WS. The past, present, and future of xenotransplantation. *Yonsei Med J.* 2004 Dec 31; 45(6):1017-24.
- AICHER A, BRENNER W, ZUHAYRA M, BADORFF C, MASSOUDI S, ASSMUS B, ECKEY T, HENZE E, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation.* 2003 Apr 29; 107(16):2134-9.
- ALEXANDRE GP, GIANELLO P, LATINNE D. Plasmapheresis and splenectomy in experimental renal xenotransplantation. In Hardy MA. eds *Xenograft*. NY, Elsevier, 1989. p25
- ALLAN JS, BROUSSARD SR, MICHAELS MG, STARZL TE, LEIGHTON KL, WHITEHEAD EM, COMUZZIE AG, LANFORD RE, LELAND MM, SWITZER WM, HENEINE W. Amplification of simian retroviral sequences from human recipients of baboon liver transplants. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998 Jul 1; 14(10):821-4.
- AL-MOHANNA F, COLLISON K, PARHAR R, KWAASI A, MEYER B, SALEH S, ALLEN S, AL-SEDAIRY S, STERN D, YACOUB M. Activation of naive xenogeneic but not allogeneic endothelial cells by human naive neutrophils: a potential occult barrier to xenotransplantation. *Am J Pathol.* 1997 Jul; 151(1):111-20.
- ANVERSA P, LERI A, KAJSTURA J, NADAL-GINARD B. Myocyte growth and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2002a Feb; 34(2):91-105.
- ANVERSA P, NADAL-GINARD B. Cardiac chimerism: methods matter. *Circulation.* 2002b Oct 29;106(18):e129-31
- ASAHARA T, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA C, PASTORE C, SILVER M, KEARNE M, MAGNER M, ISNER JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999 Aug 6; 85(3):221-8.

- ASHTON-CHESS J, MEURETTE G, KARAM G, PETZOLD T, MINAULT D, NAULET J, TESSON L, PLAT M, ANEGON I, SOULILLOU JP, BLANCHO G. The study of mitoxantrone as a potential immunosuppressor in transgenic pig renal xenotransplantation in baboons: comparison with cyclophosphamide. *Xenotransplantation*. 2004 Mar; 11(2):112-22.
- ASHTON-CHESS J, ROUSSEL JC, BERNARD P, BARREAU N, KARAM G, DANTAL J, MOREAU A, LETESSIER E, NAGASAKA T, EMANUELE C, MINAULT D, SOULILLOU JP, BLANCHO G. The effect of immunoglobulin immunoadsorption on delayed xenograft rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons. *Xenotransplantation*. 2003 Nov; 10(6):552-561.
- ASSMUS B, SCHACHINGER V, TEUPE C, BRITTEN M, LEHMANN R, DOBERT N, GRUNWALD F, AICHER A, URBICH C, MARTIN H, HOELZER D, DIMMELER S, ZEIHNER AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002 Dec 10; 106(24):3009-17.
- ATKINS BZ, HUEMAN MT, MEUCHEL JM, COTTMAN MJ, HUTCHESON KA, TAYLOR DA. Myogenic cell transplantation improves in vivo regional performance in infarcted rabbit myocardium. *J Heart Lung Transplant*. 1999 Dec; 18(12):1173-80.
- ATKINSON JP, OGLESBY TJ, WHITE D, ADAMS EA, LISZEWSKI MK. Separation of self from non-self in the complement system: a role for membrane cofactor protein and decay accelerating factor. *Clin Exp Immunol*. 1991 Oct; 86 Suppl 1:27-30.
- BACH FH, WINKLER H, FERRAN C, HANCOCK WW, ROBSON SC. Delayed xenograft rejection. *Immunol Today*. 1996 Aug; 17(8):379-84.
- BALLEEN KK. New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood*. 2005 May 15; 105(10):3786-92.
- BARDY GH, LEE KL, MARK DB, POOLE JE, PACKER DL, BOINEAU R, DOMANSKI M, TROUTMAN C, ANDERSON J, JOHNSON G, MCNULTY SE, CLAPP-CHANNING N, DAVIDSON-RAY LD, FRAULO ES, FISHBEIN DP, LUCERI RM, IP JH; SUDDEN CARDIAC DEATH IN HEART FAILURE TRIAL (SCD-HEFT) INVESTIGATORS. Amiodarone or an implantable cardioverter-

- defibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med.* 2005 Jan 20; 352 (3):225-37.
- BARTHOLOMEW A, STURGEON C, SIATSKAS M, FERRER K, MCINTOSH K, PATIL S, HARDY W, DEVINE S, UCKER D, DEANS R, MOSELEY A, HOFFMAN R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002 Jan; 30(1):42-8.
 - BAYES-GENIS A, ROURA S, SOLER-BOTIJA C, FARRE J, HOVE-MADSEN L, LLACH A, CINCA J. Identification of cardiomyogenic lineage markers in untreated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Transplant Proc.* 2005 Nov; 37(9):4077-9.
 - BEERES SL, AT SMA DE, VAN DER LAARSE A, PIJNAPPELS DA, VAN TUYN J, FIBBE WE, DE VRIES AA, YPEY DL, VAN DER WALL EE, SCHALIJ MJ. Human adult bone marrow mesenchymal stem cells repair experimental conduction block in rat cardiomyocyte cultures. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Nov 15; 46(10):1943-52.
 - BEL A, MESSAS E, AGBULUT O, RICHARD P, SAMUEL JL, BRUNEVAL P, HAGEGE AA, MENASCHE P. Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. *Circulation.* 2003 Sep 9; 108 Suppl 1:II247-52.
 - BELTRAMI AP, URBANEK K, KAJSTURA J, YAN SM, FINATO N, BUSSANI R, NADAL-GINARD B, SILVESTRI F, LERI A, BELTRAMI CA, ANVERSA P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001 Jun 7; 344(23):1750-7.
 - BERKE G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12: 735-73.
 - BLUSCH JH, PATIENCE C, MARTIN U. Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2002; 9: 242-251.
 - BLUSCH JH, PATIENCE C, TAKEUCHI Y, TEMPLIN C, ROOS C, VON DER HELM K, STEINHOFF G, MARTIN U. Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus. *J Virol.* 2000 Aug; 74(16):7687-90.
 - BONAB MM, ALIMOGHADDAM K, TALEBIAN F, GHAFFARI SH, GHAVAMZADEH A, NIKBIN B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 2006 Mar 10; 7:14.

- BORG K, AHLBERG G, HEDBERG B, EDSTROM L. Muscle fibre degeneration in distal myopathy (Welander) ultrastructure related to immunohistochemical observations on cytoskeletal proteins and Leu-19 antigen. *Neuromuscul Disord.* 1993Mar; 3(2):149-55.
- BRANDL U, MICHEL S, ERHARDT M, BRENNER P, BITTMANN I, ROSSLE M, BASCHNEGGER H, BAUER A, HAMMER C, SCHMOECKEL M, REICHART B. Administration of GAS914 in an orthotopic pig-to-baboon heart transplantation model. *Xenotransplantation.* 2005 Mar; 12(2):134-41.
- BRAZELTON TR, CHEUNG A, MORRIS RE. Pharmacologic Immunosuppressants in Xenotransplantation. 602-633. En: *Xenotransplantation: the xenotransplantation of organs and tissues between species.* Cooper DKC *et al.* Berlín. New York: Springer, c1997.
- BUCHER P, MOREL P, BUHLER LH. Xenotransplantation: an update on recent progress and future perspectives. *Transpl Int.* 2005 Aug; 18(8):894-901.
- BÜHLER L, YAMADA K, KITAMURA H, ALWAYN IP, BASKER M, APPEL JZ 3RD, COLVIN RB, WHITE-SCHARF ME, SACHS DH, ROBSON SC, AWWAD M, COOPER DK. Pig kidney transplantation in baboons: anti-Gal(alpha)1-3Gal IgM alone is associated with acute humoral xenograft rejection and disseminated intravascular coagulation. *Transplantation.* 2001 Dec 15; 72(11):1743-52.
- CAMPAGNOLI C, ROBERTS IA, KUMAR S, BENNETT PR, BELLANTUONO I, FISK NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 2001 Oct 15; 98(8):2396-402.
- CAPLICE NM, DEB A. Myocardial-cell replacement: the science, the clinic and the future. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2004 Dec; 1(2):90-5.
- CAPLICE NM, GERSH BJ, ALEGRIA JR. Cell therapy for cardiovascular disease: what cells, what diseases and for whom? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2005 Jan; 2(1):37-43.
- CAPLICE NM, GERSH BJ. Stem cells to repair the heart: a clinical perspective. *Circ Res.* 2003 Jan 10; 92(1):6-8.
- CAROBBI A, ARANEDA D, QUARANTILLO P, THOMAS JM, THOMAS FT. Synergism of splenectomy and immunosuppressive drugs in prolongation of cardiac xenograft survival. *Transplant Proc.* 1992 Apr; 24(2):527.

- CARRILLO A, CHAMORRO S, RODRIGUEZ-GAGO M, ALVAREZ B, MOLINA MJ, RODRIGUEZ-BARBOSA JI, SANCHEZ A, RAMIREZ P, MUNOZ A, DOMINGUEZ J, PARRILLA P, YELAMOS J. Isolation and characterization of immortalized porcine aortic endothelial cell lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002 Oct 8; 89(1-2):91-8.
- CASTAÑER ALABAU L, FRANCO MASIDE A, BOOTELLO GIL A. Respuesta inmune al trasplante. *Clínicas Urológicas de la Complutense*, 7, 61-121.1999. Servicio de Publicaciones. UCM.
- CASTELLANOS MARTÍNEZ R, GUEVARA ROSALES M, ROBINSON RODRÍGUEZ R, VÁZQUEZ RÍOS CML. Respuestas inmunes: innata y adaptativa. *Medisan* 2000;4(2):64-74
- CELLI S, VALDIVIA LA, FUNG JJ, DEMETRIS AJ, MARINO IR, MURASE N, STARZL TE. Long-term survival of heart and liver xenografts with splenectomy and FK 506. *Transplant Proc.* 1993 Feb; 25(1 Pt 1):647-8.
- CHAN DV, AUCHINCLOSS H JR. Human anti-pig cell-mediated cytotoxicity *in vitro* involves not as well T cell components. *Xenotransplantation.* 1996; 3: 158-165
- CHANG MG, TUNG L, SEKAR RB, CHANG CY, CYSYK J, DONG P, MARBAN E, ABRAHAM MR. Proarrhythmic potential of mesenchymal stem cell transplantation revealed in an *in vitro* coculture model. *Circulation.* 2006 Apr 18; 113(15):1832-41.
- CHAPMAN LE, FOLKS TM, SALOMON DR, PATTERSON AP, EGGERTMAN TE, NOGUCHI PD. Xenotransplantation and xenogeneic infections. *N Engl J Med.* 1995 Nov 30; 333(22):1498-501.
- CHAWLA M, BODNAR CA, SEN A, KALLOS MS, BEHIE LA. Production of islet-like structures from neonatal porcine pancreatic tissue in suspension bioreactors. *Biotechnol Prog.* 2006 Mar-Apr; 22(2):561-7.
- CHEN G, SUN H, YANG H, KUBELIK D, GARCIA B, LUO Y, XIANG Y, QIAN A, COPEMAN L, LIU W, CARDELLA CJ, WANG W, XIONG Y, WALL W, WHITE DJ, ZHONG R. The role of anti-non-Gal antibodies in the development of acute humoral xenograft rejection of hDAF transgenic porcine kidneys in baboons receiving anti-Gal antibody neutralization therapy. *Transplantation.* 2006 Jan 27; 81(2):273-83.

- CHEN G, SUN QY, WANG XM, SHEN SQ, GUO H, WANG H, WU Y, WANG WY, XIONG YL, CHEN S. Improved suppression of circulating complement does not block acute vascular rejection of pig-to-rhesus monkey cardiac transplants. *Xenotransplantation*. 2004 Mar; 11(2):123-32.
- CHEN H, XU D, WU J, DALOZE P. Prolongation of hamster to rat xenograft survival by rapamycin. *Transplant Proc*. 1992 Apr; 24(2):715-6.
- CHEN JC, GOLDHAMER DJ. Skeletal muscle stem cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003 Nov 13; 1:101.
- CHEN RH, KADNER A, MITCHELL RN, ADAMS DH. Mechanism of delayed rejection in transgenic pig-to-primate cardiac xenotransplantation. *J Surg Res*. 2000 May 15; 90(2):119-25.
- CHEN X, XU HB, WAN C, MCCAIGUE M, LI G. Bioreactor Expansion of Human Adult Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Stem Cells*. 2006 May 25
- CHERNYAKHOVSKAYA IYU, FONTALIN LN. Immunological tolerance to xenogeneic grafts induced by cyclophosphamide in adult animals. *Folia Biol (Praha)*. 1994; 40(6):371-80.
- CHIEN KR. Stem cells: lost in translation. *Nature*. 2004 Apr 8; 428(6983):607-8.
- CHIU RC, ZIBAITIS A, KAO RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg*. 1995 Jul;60(1):12-8.
- CHONG AS, MA LL, YIN D, BLINDER L, SHEN J, WILLIAMS JW. Tolerance of T-independent xeno-antibody responses in the hamster-to-rat xenotransplantation model is species-restricted but not tissue-specific. *Xenotransplantation*. 2000 Feb; 7(1):48-57.
- CHRISTENSEN T, MOLLER-LARSEN A. Human endogenous retroviruses and disease? *Ugeskr Laeger*. 2003 Feb 3; 165(6):556-61.
- COHEN JJ, DUKE RC, FADOK VA, SELLINS KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol*. 1992; 10:267-93.
- COLLIGNON P, PURDY L. Xenografts: are the risks so great that we should not proceed? *Microbes Infect*. 2001 Apr; 3(4):341-8.
- CONCONI MT, BURRA P, DI LIDDO R, CALORE C, TURETTA M, BELLINI S, BO P, NUSSDORFER GG, PARNIGOTTO PP. CD105(+) cells from Wharton's

- jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med*. 2006 Dec; 18(6):1089-96.
- COOPER DK, GOLLACKNER B, KNOSALLA C, TERANISHI K. Xenotransplantation-how far have we come? *Transpl Immunol*. 2002 May;9(2-4):251-6.
 - COOPER DK, KEMP E, PLATT JL, WHITE DJG Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species (2^a edición), 1997 Springer-Verlag.
 - COTTS WG, JOHNSON MR. The challenge of rejection and cardiac allograft vasculopathy. *Heart Fail Rev*. 2001 Sep; 6(3):227-40.
 - COWAN PJ, AMINIAN A, BARLOW H, BROWN AA, CHEN CG, FISICARO N, FRANCIS DM, GOODMAN DJ, HAN W, KUREK M, NOTTLE MB, PEARSE MJ, SALVARIS E, SHINKEL TA, STAINSBY GV, STEWART AB, D'APICE AJ. Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation*. 2000 Jun 27; 69(12):2504-15.
 - CREMASCHI GA, STERIN-BORDA L. MHC class I-hormone receptor associations: still a physiological enigma? *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*. 1994; 44(3):55-64.
 - CURTSINGER JM, SCHMIDT CS, MONDINO A, LINS DC, KEDL RM, JENKINS MK, MESCHER MF. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol*. 1999 Mar 15; 162(6):3256-62.
 - DAAR AS, SHEREMETA L. The science of stem cells: ethical, legal and social issues. *Exp Clin Transplant*. 2003 Dec; 1(2):139-46.
 - DAAR AS. Ethics of xenotransplantation: animal issues, consent, and likely transformation of transplant ethics. *World J Surg*. 1997 Nov-Dec; 21(9):975-82.
 - DAI W, HALE SL, MARTIN BJ, KUANG JQ, DOW JS, WOLD LE, KLONER RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation*. 2005 Jul 12; 112(2):214-23.
 - DAVILA E, BYRNE GW, LABRECHE PT, MCGREGOR HC, SCHWAB AK, DAVIES WR, RAO VP, OI K, TAZELAAR HD, LOGAN JS, MCGREGOR CG.

- T-cell responses during pig-to-primate xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2006 Jan; 13(1):31-40.
- DAWN B, BOLLI R. Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment. *Basic Res Cardiol*. 2005 Nov; 100(6):494-503.
 - DENG YM, TUCH BE, RAWLINSON WD. Transmission of porcine endogenous retroviruses in severe combined immunodeficient mice xenotransplanted with fetal porcine pancreatic cells. *Transplantation* 2000; 70:10 10-1016.
 - DEZAWA M. Future views and challenges to the peripheral nerve regeneration by cell based therapy. *Rinsho Shinkeigaku*. 2005 Nov; 45(11):877-9.
 - DI NICOLA M, CARLO-STELLA C, MAGNI M, MILANESI M, LONGONI PD, MATTEUCCI P, GRISANTI S, GIANNI AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 May 15; 99(10):3838-43.
 - DOMENECH N, BULLIDO R, ALVAREZ B, CAMPOS E, RODRIGUEZ-CARRENO MP, GOMEZ DEL MORAL M, ALONSO F, EZQUERRA A, DOMINGUEZ J. Characterization of a novel activation antigen on porcine lymphocytes recognized by monoclonal antibody 5A6/8. *Vet Res*. 2004 May-Jun; 35(3):339-48.
 - DOR FJ, TSENG YL, CHENG J, MORAN K, SANDERSON TM, LANCOS CJ, SHIMIZU A, YAMADA K, AWWAD M, SACHS DH, HAWLEY RJ, SCHUURMAN HJ, COOPER DK. alpha1,3-Galactosyltransferase gene-knockout miniature swine produce natural cytotoxic anti-Gal antibodies. *Transplantation*. 2004 Jul 15; 78(1):15-20.
 - DORLING A. Are anti-endothelial cell antibodies a pre-requisite for the acute vascular rejection of xenografts? *Xenotransplantation*. 2003 Jan; 10(1):16-23.
 - DUNNETT SB, ROSSER AE. Cell therapy in Huntington's disease. *NeuroRx*. 2004 Oct; 1(4):394-405.
 - EMERICH DF, WINN SR, CHRISTENSON L, PALMATIER MA, GENTILE FT, SANBERG PR. A novel approach to neural transplantation in Parkinson's disease: use of polymer-encapsulated cell therapy. *Neurosci Biobehav Rev*. 1992 winter; 16(4):437-47.

- FECKE W, LONG J, RICHARDS A, HARRISON R. Protection of hDAF-transgenic porcine endothelial cells against activation by human complement: role of the membrane attack complex. *Xenotransplantation*. 2002 Mar; 9(2):97-105.
- FLEISCHER N, CHEN C, SURANA M, LEISER M, ROSSETTI L, PRALONG W, EFRAT S. Functional analysis of a conditionally transformed pancreatic beta-cell line. *Diabetes*. 1998 Sep; 47(9):1419-25.
- FODOR WL, WILLIAMS BL, MATIS LA, MADRI JA, ROLLINS SA, KNIGHT JW, VELANDER W, SQUINTO SP. Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 8; 91(23):11153-7.
- FOUILLARD L, BENSIDHOUM M, BORIES D, BONTE H, LOPEZ M, MOSELEY AM, SMITH A, LESAGE S, BEAUJEAN F, THIERRY D, GOURMELON P, NAJMAN A, GORIN NC. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia*. 2003 Feb; 17(2):474-6.
- FU FH, ZURAKOWSKI D, BROWNE JE, MANDELBAUM B, ERGGELET C, MOSELEY JB JR, ANDERSON AF, MICHELI LJ. Autologous chondrocyte implantation versus debridement for treatment of full-thickness chondral defects of the knee: an observational cohort study with 3-year follow-up. *Am J Sports Med*. 2005 Nov; 33(11):1658-66.
- FUCHS E, SEGRE JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell*. 2000 Jan 7; 100(1):143-55.
- FUJITA F, YAMASHITA-FUTSUKI I, EGUCHI S, KAMOHARA Y, FUJIOKA H, YANAGA K, FURUI J, MORIUCHI R, KANEMATSU T, KATAMINE S. Inactivation of porcine endogenous retrovirus by human serum as a function of complement activated through the classical pathway. *Hepatol Res*. 2003 Jun; 26(2):106-113.
- FUKUDA K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs* 2001; 25(3): 187-93
- FUKUDA K. Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2002 Mar;42(1):1-9.
- GALILI U. The nature of elicited xenoantibodies. *Transplant Proc*. 2001 Feb-Mar;33(1-2):688-9.

- GANG EJ, HONG SH, JEONG JA, HWANG SH, KIM SW, YANG IH, AHN C, HAN H, KIM H. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Aug 13; 321(1):102-8.
- GARCIA B, SUN HT, YANG HJ, CHEN G, ZHONG R. Xenotransplantation of human decay accelerating factor transgenic porcine kidney to non-human primates: 4 years experience at a Canadian center. *Transplant Proc*. 2004 Jul-Aug; 36(6):1714-6.
- GERSH BJ, SIMARI RD. Cardiac cell-repair therapy: clinical issues. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006 Mar; 3 Suppl 1:S105-9.
- GHANEKAR A, LAJOIE G, LUO Y, YANG H, CHOI J, GARCIA B, COLE EH, GREIG PD, CATTRAL MS, PHILLIPS MJ, CARDELLA CJ, LEVY GA, ZHONG R, GRANT DR. Improvement in rejection of human decay accelerating factor transgenic pig-to-primate renal xenografts with administration of rabbit antithymocyte serum. *Transplantation*. 2002 Jul 15; 74(1):28-35.
- GHOSTINE S, CARRION C, SOUZA LC, RICHARD P, BRUNEVALL P, VILQUIN JT, POUZET B, SCHWARTZ K, MENASCHE P, HAGEGE AA. Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation*. 2002 Sep 24; 106(12 Suppl 1):I131-6.
- GILL RG, WOLF L. Immunobiology of cellular transplantation. *Cell Transplant*. 1995 Jul-Aug; 4(4):361-70.
- GIMENO MJ, MANEIRO E, RENDAL E, RAMALLAL M, SANJURJO L, BLANCO FJ. Cell therapy: a therapeutic alternative to treat focal cartilage lesions. *Transplant Proc*. 2005 Nov; 37(9):4080-3.
- GLASER R, LU MM, NARULA N, EPSTEIN JA. Smooth muscle cells, but not myocytes, of host origin in transplanted human hearts. *Circulation*. 2002 Jul 2; 106(1):17-9.
- GLASGOW SC, KANAKASABAI S, RAMACHANDRAN S, MOHANAKUMAR T, CHAPMAN WC. Complement depletion enhances pulmonary inflammatory response after liver injury. *J Gastrointest Surg*. 2006 Mar; 10(3):357-64.
- GNECCHI M, HE H, LIANG OD, MELO LG, MORELLO F, MU H, NOISEUX N, ZHANG L, PRATT RE, ING WALL JS, DZAU VJ. Paracrine action accounts for

- marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 2005 Apr; 11(4):367-8.
- GOLDBERG LC, LEE J, CAIRNS T, WEYMOUTH-WILSON A, SIMPSON P, LAWSON C, HACKING A, NILSSON R, HAKIM N, TAUBE D. Polymorphism within the human anti-pig repertoire. *Transplant Proc.* 1996 Apr; 28(2):549-50.
 - GOLLACKNER B, GOH SK, QAWI I, BUHLER L, KNOSALLA C, DANIEL S, KACZMAREK E, AWWAD M, COOPER DK, ROBSON SC. Acute vascular rejection of xenografts: roles of natural and elicited xenoreactive antibodies in activation of vascular endothelial cells and induction of procoagulant activity. *Transplantation.* 2004 Jun 15; 77(11):1735-41.
 - GOLLACKNER B, MUELLER NJ, HOUSER S, QAWI I, SOIZIC D, KNOSALLA C, BUHLER L, DOR FJ, AWWAD M, SACHS DH, COOPER DK, ROBSON SC, FISHMAN JA. Porcine cytomegalovirus and coagulopathy in pig-to-primate xenotransplantation. *Transplantation.* 2003 Jun 15; 75(11):1841-7.
 - GRIFFITH LM, PAVLETIC SZ, TYNDALL A, GRATWOHL A, FURST DE, FORMAN SJ, NASH RA. Target populations in allogeneic hematopoietic cell transplantation for autoimmune diseases- a workshop accompanying: cellular therapy for treatment of autoimmune diseases, basic science and clinical studies, including new developments in hematopoietic and mesenchymal stem cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006 Jun; 12(6):688-90.
 - GUDAS VM, CARMICHAEL PG, MORRIS RE. Comparison of the immunosuppressive and toxic effects of FK506 and cyclosporine in xenograft recipients. *Transplant Proc.* 1989 Feb; 21(1 Pt 1):1072-3.
 - GUTIERREZ FUENTES JA, GOMEZ-JERIQUE J, GOMEZ DE LA CAMARA A, ANGEL RUBIO M, GARCIA HERNANDEZ A, ARISTEGUI I. Diet and Cardiovascular Risk in Spain Study (DRECE II). Diet and cardiovascular risk in Spain. Description of the evolution of cardiovascular prolile. *Med Clin (Barc).* 2000 Dec 2; 115(19):726-9.
 - HAFT JW, MONTOYA P, ALNAJJAR O, POSNER SR, BULL JL, IANNETTONI MD, BARTLETT RH, HIRSCHL RB. An artificial lung reduces pulmonary impedance and improves right ventricular efficiency in pulmonary hypertension. *General Thoracic Surgery* (2001)122, 6:1094-1100.

- HAGEGE AA, MAROLLEAU JP, VILQUIN JT, ALHERITIERE A, PEYRARD S, DUBOC D, ABERGEL E, MESSAS E, MOUSSEAUX E, SCHWARTZ K, DESNOS M, MENASCHE P. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation*. 2006 Jul 4; 114(1 Suppl):I108-13.
- HAIDER HKH, JIANG SJ, YE L, AZIZ S, LAW PK, SIM EK. Effectiveness of transient immunosuppression using cyclosporine for xenomyoblast transplantation for cardiac repair. *Transplant Proc*. 2004 Jan-Feb; 36(1):232-5.
- HALLORAN PF. Call for revolution: a new approach to describing allograft deterioration. *Am J Transplant*. 2002 Mar; 2(3):195-200.
- HAMMOND EH, ENSLEY RD, YOWELL RL, CRAVEN CM, BRISTOW MR, RENLUND DG, O'CONNELL JB. Vascular rejection of human cardiac allografts and the role of humoral immunity in chronic allograft rejection. *Transplant Proc*. 1991 Apr; 23(2 Suppl 2):26-30.
- HAMMOND EH, YOWELL RL, NUNODA S, MENLOVE RL, RENLUND DG, BRISTOW MR, GAY WA JR, JONES KW, O'CONNELL JB. Vascular (humoral) rejection in heart transplantation: pathologic observations and clinical implications. *J Heart Transplant*. 1989 Nov-Dec; 8(6):430-43.
- HAMMOND-MCKIBBEN D, SAULNIER M, ZHANG J, RISHER N, LAKE P, WEETALL M. Immunologic pathways in a quantitative model of immunosuppression based on rejection of an allogeneic or xenogeneic tumor graft. *Transplantation*. 2005 Apr 27; 79(8):889-96.
- HANCOCK WW. Beyond hyperacute rejection: strategies for development of pig-primate xenotransplantation. *Kidney Int Suppl*. 1997 Mar; 58:S36-40.
- HATTAN N, KAWAGUCHI H, ANDO K, KUWABARA E, FUJITA J, MURATA M, SUEMATSU M, MORI H, FUKUDA K. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res*. 2005 Feb 1;65(2):334-44.
- HAVERSON K, SAALMULLER A, ALVAREZ B, ALONSO F, BAILEY M, BIANCHI AT, BOERSMA WJ, CHEN Z, DAVIS WC, DOMINGUEZ J, ENGELHARDT H, EZQUERRA A, GROSMARE LS, HAMILTON MJ, HOLLEMWEGUER E, HUANG CA, KHANNA KV, KUEBART G, LACKOVIC G, LEDBETTER JA, LEE R, LLANES D, LUNNEY JK, MCCULLOUGH KC,

- MOLITOR T, NIELSEN J, NIEWOLD TA, PESCOVITZ MD, DE LA LASTRA JM, REHAKOVA Z, SALMON H, SCHNITZLEIN WM, SEEBACH J, SIMON A, SINKORA J, SINKORA M, STOKES CR, SUMMERFIELD A, SVER L, THACKER E, VALPOTIC I, YANG H, ZUCKERMANN FA, ZWART R. Overview of the Third International Workshop on Swine Leukocyte Differentiation Antigens. *Vet Immunol Immunopathol*. 2001 Jul 20; 80(1-2):5-23.
- HENEINE W, SWITZER WM, SOUCIE JM, EVATT BL, SHANMUGAM V, ROSALES GV, MATTHEWS A, SANDSTROM P, FOLKS TM. Evidence of porcine endogenous retroviruses in porcine factor VIII and evaluation of transmission to recipients with hemophilia. *J Infect Dis*. 2001 Feb 15; 183(4):648-52.
 - HERREROS J, PROSPER F, PEREZ A, GAVIRA JJ, GARCIA-VELLOSO MJ, BARBA J, SANCHEZ PL, CANIZO C, RABAGO G, MARTI-CLIMENT JM, HERNANDEZ M, LOPEZ-HOLGADO N, GONZALEZ-SANTOS JM, MARTIN-LUENGO C, ALEGRIA E. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2003 Nov;24(22):2012-20.
 - HODGSON DM, BEHFAR A, ZINGMAN LV, KANE GC, PEREZ-TERZIC C, ALEKSEEV AE, PUCEAT M, TERZIC A. Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Aug; 287(2):H471-9.
 - HONEY CR, SHEN H. Immunosuppression for neural xenografts: a comparison of cyclosporin and anti-CD25 monoclonal antibody. *J Neurosurg*. 1999 Jul; 91(1):109-13.
 - INVERARDI L, SAMAJA M, MOTTERLINI R, MANGILI F, BENDER JR, PARDI R. Early recognition of a discordant xenogeneic organ by human circulating lymphocytes. *J Immunol*. 1992 Aug 15; 149(4):1416-23.
 - IRGANG M, SAUER IM, KARLAS A, ZEILINGER K, GERLACH JC, KURTH R, NEUHAUS P, JAIN M, DERSIMONIAN H, BRENNER DA, NGOY S, TELLER P, EDGE AS, ZAWADZKA A, WETZEL K, SAWYER DB, COLUCCI WS, APSTEIN CS, LIAO R. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Apr 10; 103(14):1920-7.

- ITANO AA, MCSORLEY SJ, REINHARDT RL, EHST BD, INGULLI E, RUDENSKY AY, JENKINS MK. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity*. 2003 Jul; 19(1):47-57.
- JAIN M, DERSIMONIAN H, BRENNER DA, NGOY S, TELLER P, EDGE AS, ZAWADZKA A, WETZEL K, SAWYER DB, COLUCCI WS, APSTEIN CS, LIAO R. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Apr 10; 103(14):1920-7.
- JAISWAL N, HAYNESWORTH SE, CAPLAN AI, BRUDER SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997 Feb; 64(2):295-312.
- JALAN R, WILLIAMS R. Prospects for extracorporeal liver support. *Gut* 2004; 53; 890-898.
- JENKINS MK, TAYLOR PS, NORTON SD, URDAHL KB. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol*. 1991 Oct 15; 147(8):2461-6.
- JOHNSTONE B, HERING TM, CAPLAN AI, GOLDBERG VM, YOO JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1998 Jan 10; 238(1):265-72.
- KAJSTURA J, LERI A, CASTALDO C, NADAL-GINARD B, ANVERSA P. Myocyte growth in the failing heart. *Surg Clin North Am*. 2004 Feb; 84(1):161-77.
- KAJSTURA J, LERI A, FINATO N, DI LORETO C, BELTRAMI CA, ANVERSA P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 21; 95(15):8801-5.
- KAJSTURA J, ROTA M, WHANG B, CASCAPERA S, HOSODA T, BEARZI C, NURZYNSKA D, KASAHARA H, ZIAS E, BONAFE M, NADAL-GINARD B, TORELLA D, NASCIMBENE A, QUAINI F, URBANEK K, LERI A, ANVERSA P. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res*. 2005 Jan 7; 96(1):127-37.
- KAMANO C, VAGEFI PA, KUMAGAI N, YAMAMOTO S, BARTH RN, LAMATTINA JC, MORAN SG, SACHS DH, YAMADA K. Vascularized thymic lobe transplantation in miniature swine: thymopoiesis and tolerance induction across

- fully MHC-mismatched barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 16; 101(11):3827-32.
- KASSIS I, ZANGI L, RIVKIN R, LEVDANSKY L, SAMUEL S, MARX G, GORODETSKY R. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant*. 2006 May; 37(10):967-76.
 - KATOPODIS AG, WARNER RG, DUTHALER RO, STREIFF MB, BRUELISAUER A, KRETZ O, DOROBEK B, PERSOHN E, ANDRES H, SCHWEITZER A, THOMA G, KINZY W, QUESNIAUX VF, COZZI E, DAVIES HF, MANEZ R, WHITE D. Removal of anti-Gal α 1,3Gal xenoantibodies with an injectable polymer. *J Clin Invest*. 2002 Dec; 110(12):1869-77.
 - KEHAT I, KHIMOVICH L, CASPI O, GEPSTEIN A, SHOFTI R, ARBEL G, HUBER I, SATIN J, ITSKOVITZ-ELDOR J, GEPSTEIN L. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2004 Oct; 22(10):1282-9.
 - KESSLER PD, BYRNE BJ. Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol*. 1999; 61:219-42.
 - KIM JH, AUERBACH JM, RODRIGUEZ-GOMEZ JA, VELASCO I, GAVIN D, LUMELSKY N, LEE SH, NGUYEN J, SANCHEZ-PERNAUTE R, BANKIEWICZ K, MCKAY R. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 2002 Jul 4; 418(6893):50-6.
 - KLYMIUK N, MULLER M, BREM G, AIGNER B. Characterization of porcine endogenous retrovirus gamma pro-pol nucleotide sequences. *J Virol*. 2002 Nov; 76(22):11738-43.
 - KOBAYASHI T, COOPER DKC. Anti-Gal, α Gal epitopes and xenotransplantation. En: Galili U, Avila JL, editors α Gal and Anti-Gal: α -1,3-Galactosyltransferase. α Gal Epitopes and the Natural Anti-Gal antibody (Subcellular Biochemistry Series), vol.32. New York, London: Kluwer Academic/Plenum; 1999: 229-57.
 - KOBAYASHI T, NEETHLING FA, KOREN E, TANIGUCHI S, YE Y, NIEKRASZ M, TAKAGI H, HANCOCK WW, COOPER DK. In vitro and in vivo investigation of anticomplement agents FUT-175 and K76COOH, in the prevention

- of hyperacute rejection following discordant xenotransplantation in a nonhuman primate model. *Transplant Proc.* 1996 Apr; 28(2):604.
- KOLBER-SIMONDS D, LAI L, WATT SR, DENARO M, ARN S, AUGENSTEIN ML, BETTHAUSER J, CARTER DB, GREENSTEIN JL, HAO Y, IM GS, LIU Z, MELL GD, MURPHY CN, PARK KW, RIEKE A, RYAN DJ, SACHS DH, FORSBERG EJ, PRATHER RS, HAWLEY RJ. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 11; 101(19):7335-40.
 - KORSGREN O, BUHLER LH, GROTH CG. Toward clinical trials of islet xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2003 Jul; 10(4):289-92.
 - KOYAMADA N, SATO A, TAKAYAMA J, USUDA M, KAWAGISHI N, DOI H, FUJIMORI K, SATOMI S. Macrophage depletion prevents anti-graft antibody production and results in long-term survival in xenotransplantation. *Transplant Proc.* 2005 Jan-Feb; 37(1):514-5.
 - KROSHUS TJ, BOLMAN RM III, DALMASSO AP, ROLLINS SA, GUILMETTE ER, WILLIAMS BL, SQUINTO SP, FODOR WL. Expression of human CD59 in transgenic pig organs enhances organ survival in an ex vivo xenogeneic perfusion model. *Transplantation.* 1996 May 27;61(10):1513-21.
 - KURIHARA T, MIYAZAWA T, MIYAGAWA S, TOMONAGA K, HAZAMA K, YAMADA J, SHIRAKURA R, MATSUURA Y. Sensitivity to human serum of gammaretroviruses produced from pig endothelial cells transduced with glycosyltransferase genes. *Xenotransplantation.* 2003 Nov; 10(6):562-8.
 - KUWAKI K, KNOSALLA C, DOR FJ, GOLLACKNER B, TSENG YL, HOUSER S, MUELLER N, PRABHARASUTH D, ALT A, MORAN K, CHENG J, BEHDAD A, SACHS DH, FISHMAN JA, SCHURMAN HJ, AWWAD M, COOPER DK. Suppression of natural and elicited antibodies in pig-to-baboon heart transplantation using a human anti-human CD154 mAb-based regimen. *Am J Transplant.* 2004 Mar; 4(3):363-72.
 - KUWAKI K, TSENG YL, DOR FJ, SHIMIZU A, HOUSER SL, SANDERSON TM, LANCOS CJ, PRABHARASUTH DD, CHENG J, MORAN K, HISASHI Y, MUELLER N, YAMADA K, GREENSTEIN JL, HAWLEY RJ, PATIENCE C, AWWAD M, FISHMAN JA, ROBSON SC, SCHURMAN HJ, SACHS DH,

- COOPER DK. Heart transplantation in baboons using alpha1, 3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med.* 2005 Jan; 11(1):29-31.
- LABARRERE CA, NELSON DR, PARK JW. Pathologic markers of allograft arteriopathy: insight into the pathophysiology of cardiac allograft chronic rejection. *Curr Opin Cardiol.* 2001 Mar; 16(2):110-7.
 - LACHMAN P. The control of homologous lysis. *Immunol Today.* 1991; 12:312-15
 - LAFLAMME MA, MYERSON D, SAFFITZ JE, MURRY CE. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res.* 2002 Apr 5; 90(6):634-40.
 - LAI L, KOLBER-SIMONDS D, PARK KW, CHEONG HT, GREENSTEIN JL, IMAGES, SAMUEL M, BONK A, RIEKE A, DAY BN, MURPHY CN, CARTER DB, HAWLEY RJ, PRATHER RS. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science.* 2002 Feb 8;295(5557):1089-92.
 - LAM TT, HAUSEN B, BOEKE-PURKIS K, PANIAGUA R, LAU M, HOOK L, BERRY G, HIGGINS J, DUTHALER RO, KATOPODIS AG, ROBBINS R, REITZ B, BORIE D, SCHUURMAN HJ, MORRIS RE. Hyperacute rejection of hDAF-transgenic pig organ xenografts in cynomolgus monkeys: influence of pre-existing anti-pig antibodies and prevention by the alpha Gal glycoconjugate GAS914. *Xenotransplantation.* 2004 Nov; 11 (6):517-24.
 - LAM TT, HAUSEN B, HOOK L, LAU M, HIGGINS J, CHRISTIANS U, JACOBSEN W, BALUOM M, DUTHALER R, KATOPODIS A, CHAVEZ G, COZZI E, HARRISON R, SCHUURMAN HJ, BORIE D, MORRIS RE. The effect of soluble complement receptor type 1 on acute humoral xenograft rejection in hDAF-transgenic pig-to-primate life-supporting kidney xenografts. *Xenotransplantation.* 2005 Jan; 12(1):20-9.
 - LAMBRIGTS D, VAN CALSTER P, XU Y, AWWAD M, NEETHLING FA, KOZLOWSKI T, FOLEY A, WATTS A, CHAE SJ, FISHMAN J, THALL AD, WHITE-SCHARF ME, SACHS DH, COOPER DK. Pharmacologic immunosuppressive therapy and extracorporeal immunoadsorption in the suppression of anti-alphaGal antibody in the baboon. *Xenotransplantation.* 1998 Nov; 5(4):274-83.

- LATINNE D, SOARES M, HAVAUX X, CORMONT F, LESNIKOSKI B, BACH FH, BAZIN H. Depletion of IgM xenoreactive natural antibodies by injection of anti-mu monoclonal antibodies. *Immunol Rev.* 1994 Oct; 141:95-125.
- LAWSON JH, DANIELS LJ, PLATT JL. The evaluation of thrombomodulin activity in porcine to human xenotransplantation. *Transplant Proc.* 1997 Feb-Mar; 29(1-2):884-5.
- LE BLANC K, RINGDEN O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2006 Jul 29
- LE BLANC K, TAMMIK L, SUNDBERG B, HAYNESWORTH SE, RINGDEN O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol.* 2003 Jan; 57(1):11-20.
- LEE MS, MAKKAR RR. Stem-cell transplantation in myocardial infarction: a status report. *Ann Intern Med.* 2004 May 4; 140(9):729-37.
- LEHNERT AM, YI S, BURGESS JS, O'CONNELL PJ. Pancreatic islet xenograft tolerance after short-term costimulation blockade is associated with increased CD4+ T cell apoptosis but not immune deviation. *Transplantation.* 2000 Mar 27; 69(6):1176-85.
- LEOBON B, GARCIN I, MENASCHE P, VILQUIN JT, AUDINAT E, CHARPAK S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 24; 100(13):7808-11.
- LEONARD RJ, LAZAROW A, HEGRE OD. Pancreatic islet transplantation in the rat. *Diabetes.* 1973 Jun; 22(6):413-28.
- LEVY JA. Murine xenotropic type C viruses. III. Phenotypic mixing with avian leukosis and sarcoma viruses. *Virology.* 1977 Apr; 77(2):811-25.
- LI CD, ZHANG WY, LI HL, JIANG XX, ZHANG Y, TANG PH, MAO N. Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation. *Cell Res.* 2005 Jul; 15(7):539-47.
- LI F, WANG X, CAPASSO JM, GERDES AM. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol.* 1996 Aug; 28(8):1737-46.
- LI TS, HAYASHI M, ITO H, FURUTANI A, MURATA T, MATSUZAKI M, HAMANO K. Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial

- implantation of ex vivo transforming growth factor-beta-preprogrammed bone marrow stem cells. *Circulation*. 2005 May 17; 111(19):2438-45.
- LIN SS, HANAWAY MJ, GONZALEZ-STAWINSKI GV, LAU CL, PARKER W, DAVIS RD, BYRNE GW, DIAMOND LE, LOGAN JS, PLATT JL. The role of anti-Galalpha1-3Gal antibodies in acute vascular rejection and accommodation of xenografts. *Transplantation*. 2000 Dec 27; 70(12):1667-74.
 - LIN SS, WEIDNER BC, BYRNE GW, DIAMOND LE, LAWSON JH, HOOPES CW, DANIELS LJ, DAGGETT CW, PARKER W, HARLAND RC, DAVIS RD, BOLLINGER RR, LOGAN JS, PLATT JL. The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants. *J Clin Invest*. 1998 Apr 15; 101(8):1745-56.
 - LIN Y, VANDEPUTTE M, WAER M. Accommodation and T-independent B cell tolerance in rats with long term surviving hamster heart xenografts. *J Immunol*. 1998 Jan 1; 160(1):369-75.
 - LINDVALL O. Stem cells for cell therapy in Parkinson's disease. *Pharmacol Res*. 2003 Apr; 47(4):279-87.
 - LINKE A, MULLER P, NURZYNSKA D, CASARSA C, TORELLA D, NASCIMBENE A, CASTALDO C, CASCAPERA S, BOHM M, QUAINI F, URBANEK K, LERI A, HINTZE TH, KAJSTURA J, ANVERSA P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 21; 102(25):8966-71.
 - LIU Y, SONG J, LIU W, WAN Y, CHEN X, HU C. Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? *Cardiovasc Res*. 2003 May 1; 58(2):460-8.
 - LOPEZ E, CENTENO A, CRESPO F, JUFFE A, FILGUEIRA P, VEIRA P, WARNER R, KATOPODIS A, MAÑEZ R. Augmented anti-alphaGalactosyl antibodies in adult baboons in the setting of intestinal parasitic infections are not associated with higher titers of anti-pig hemolytic antibody. *Transplant Proc*. 2000 Aug; 32(5):890-1.
 - LÓPEZ-NAVIDAD A, KULISEVSKY J, CABALLERO F. Historia de la actitud y conducta en la obtención y extracción de órganos y tejidos para trasplantes. *A*.

- López-Navidad en El donante de órganos y tejidos. Evaluación y manejo. Springer-Verlag Ibérica. Barcelona 1997.
- LOSORDO DW, DIMMELER S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*. 2004 Jun 8; 109(22):2692-7.
 - LOSS M, ARENDS H, WINKLER M, PRZEMECK M, STEINHOFF G, RENSING S, KAUP FJ, HEDRICH HJ, WINKLER ME, MARTIN U. Analysis of potential porcine endogenous retrovirus (PERV) transmission in a whole-organ xenotransplantation model without interfering microchimerism. *Transpl Int*. 2001; 14(1):31-7.
 - LUO H, CHEN H, DALOZE P, CHANG JY, ST-LOUIS G, WU J. Inhibition of in vitro immunoglobulin production by rapamycin. *Transplantation*. 1992 May; 53(5):1071-6.
 - LUSSO P, DI MARZO VERONESE F, ENSOLI B, FRANCHINI G, JEMMA C, DEROCCO SE, KALYANARAMAN VS, GALLO RC. Expanded HIV-1 cellular tropism by phenotypic mixing with murine endogenous retroviruses. *Science*. 1990 Feb 16; 247(4944):848-52.
 - MAGRE S, TAKEUCHI Y, BARTOSCH B. Xenotransplantation and pig endogenous retroviruses. *Rev Med Virol*. 2003 Sep-Oct; 13(5):311-29.
 - MAJUMDAR MK, KEANE-MOORE M, BUYANER D, HARDY WB, MOORMAN MA, MCINTOSH KR, MOSCA JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2003 Mar-Apr; 10(2):228-41.
 - MAJUMDAR MK, THIEDE MA, MOSCA JD, MOORMAN M, GERSON SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 1998 Jul;176(1):57-66.
 - MAKINO S, FUKUDA K, MIYOSHI S, KONISHI F, KODAMA H, PAN J, SANO M, TAKAHASHI T, HORI S, ABE H, HATA J, UMEZAWA A, OGAWA S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999 Mar; 103(5):697-705.
 - MAKKAR RR, LILL M, CHEN PS. Stem cell therapy for myocardial repair: is it arrhythmogenic? *J Am Coll Cardiol*. 2003 Dec 17; 42(12):2070-2.

- MALDONADO-LOPEZ R, MALISZEWSKI C, URBAIN J, MOSER M. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha (+) and CD8alpha (-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J Immunol.* 2001 Oct 15; 167(8):4345-50.
- MALOUF NN, COLEMAN WB, GRISHAM JW, LININGER RA, MADDEN VJ, SPROUL M, ANDERSON PA. Adult-derived stem cells from the liver become myocytes in the heart in vivo. *Am J Pathol.* 2001 Jun; 158(6):1929-35.
- MAÑEZ R, BLANCO FJ, DIAZ I, CENTENO A, LOPEZ-PELAEZ E, HERMIDA M, DAVIES HF, KATOPODIS A. Removal of bowel aerobic gram-negative bacteria is more effective than immunosuppression with cyclophosphamide and steroids to decrease natural alpha-galactosyl IgG antibodies. *Xenotransplantation.* 2001a; 8(1):15-23.
- MAÑEZ R, CENTENO A, LÓPEZ-PÉLAEZ E, DOMÉNECH N, DUTHALER R, KATOPODIS A. Sustained reduction of anti-aGal and anti-pig hemolytic antibodies in vivo with the polymer GAS914. *American Journal of Transplantation* 2001b; 1 (1): 457.
- MAÑEZ R, CRESPO F, GONZALEZ E, CENTENO A, JUFFE A, ARNAL F, COZZI E, WHITE DJ, DUTHALER R, KINZY W, OEHRLEIN R, KATOPODIS A. Neutralization of anti-alphaGalactosyl antibodies without immunosuppression prevents hyperacute rejection but not acute vascular rejection of pig organs transplanted into baboons. *Transplant Proc.* 2000 Aug; 32(5):888-9.
- MANG R. Endogenous retroviruses and xenotransplantation *Veterinary Sciences Tomorrow.* 2001 Dec; 4: 1-23.
- MANN DL. Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach. *Circulation.* 1999 Aug 31; 100(9):999-1008.
- MARELLI D, DESROSIERS C, EL-ALFY M, KAO RL, CHIU RC. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant.* 1992; 1(6):383-90.
- MARELLI D, MA F, CHIU RC. Satellite cell implantation for neomyocardial regeneration. *Transplant Proc.* 1992 Dec; 24(6):2995.
- MARRUGAT J, ELOSUA R, ALDASORO E, TORMO MJ, VANACLOCHA H, SEGURA A, FIOL M, MORENO-IRIBAS C, PEREZ G, ARTEAGOITIA JM, CIRERA L, CABADES A, VEGA G, AYESTARAN JI, GARCIA V, HURTADO-DE-SARACHO I, GARCIA J, ZURRIAGA O, MUNIZ J, SALA J; Investigacion

- Busqueda Especifica y Registro de; Isquemia Coronaria Aguda Investigators. Regional variability in population acute myocardial infarction cumulative incidence and mortality rates in Spain 1997 and 1998. *Eur J Epidemiol.* 2004; 19(9):831-9.
- MARTIN U, TACKE SJ, SIMON AR, SCHRODER C, WIEBE K, LAPIN B, HAVERICH A, DENNER J, STEINHOFF G. Absence of PERV specific humoral immune response in baboons after transplantation of porcine cells or organs. *Transpl Int.* 2002 Jul; 15(7):361-8.
 - MATSUMIYA G, SHIRAKURA R, MIYAGAWA S, IZUTANI H, SAWA Y, NAKATA S, MATSUDA H. Analysis of rejection mechanism in the rat to mouse cardiac xenotransplantation. Role and characteristics of anti-endothelial cell antibodies. *Transplantation.* 1994 Jun 15; 57(11):1653-60.
 - MCCURRY KR, KOOYMAN DL, ALVARADO CG, COTTERELL AH, MARTIN MJ, LOGAN JS, PLATT JL. Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med.* 1995 May; 1(5):423-7.
 - MCGILL CJ, BROOKS G. Cell cycle control mechanisms and their role in cardiac growth. *Cardiovasc Res.* 1995 Oct; 30(4):557-69.
 - MCGREGOR CG, DAVIES WR, OI K, TEOTIA SS, SCHIRMER JM, RISDAHL JM, TAZELAAR HD, KREMERS WK, WALKER RC, BYRNE GW, LOGAN JS. Cardiac xenotransplantation: recent preclinical progress with 3-month median survival. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Sep; 130(3):844-51.
 - MCKANE BW, RAMACHANDRAN S, YANG J, XU XC, MOHANAKUMAR T. Xenoreactive anti-Galalpha (1,3) Gal antibodies prevent porcine endogenous retrovirus infection of human in vivo. *Hum Immunol.* 2003 Jul; 64(7):708-17.
 - MCKANE W, LEE J, PRESTON R, HACKING A, SIMPSON P, LYND S, GOLDBERG L, CAIRNS T, TAUBE D. Polymorphism in the human anti-pig natural antibody repertoire: implications for antigen-specific immunoadsorption. *Transplantation.* 1998 Sep 15; 66(5):626-33.
 - MEDRANO ALBERTO MJ, BOIX MARTINEZ R, CERRATO CRESPLAN E, RAMIREZ SANTA-PAU M. Incidence and prevalence of ischaemic heart disease and cerebrovascular disease in Spain: a systematic review of the literature *Rev Esp Salud Publica.* 2006 Jan-Feb; 80(1):5-15.

- MENASCHE P, HAGEGE AA, SCORSIN M, POUZET B, DESNOS M, DUBOC D, SCHWARTZ K, VILQUIN JT, MAROLLEAU JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001 Jan 27; 357(9252):279-80.
- MENASCHE P. Myoblast transplantation: feasibility, safety and efficacy. *Ann Med*. 2002; 34(5):314-5.
- MEONI C, BERTUZZI F, PONTIROLI AE, FALQUI L, MONACO L, SORIA M, ARCELLONI C, PARONI R, FOGLENI C, POLASTRI L, GALBIATI F, FOLLI F, DAVALLI AM. Development and characterization of pituitary GH3 cell clones stably transfected with a human proinsulin cDNA. *Cell Transplant*. 2000 Nov-Dec; 9(6):829-40.
- MICHAELS MG, ALCENDOR DJ, ST GEORGE K, RINALDO CR JR, EHRLICH GD, BECICH MJ, HAYWARD GS. Distinguishing baboon cytomegalovirus from human cytomegalovirus: importance for xenotransplantation. *J Infect Dis*. 1997 Dec; 176(6):1476-83.
- MILLAN MT, GECZY C, STUHLMEIER KM, GOODMAN DJ, FERRAN C, BACH FH. Human monocytes activate porcine endothelial cells, resulting in increased E-selectin, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1, and plasminogen activator inhibitor-type-1 expression. *Transplantation*. 1997 Feb 15; 63(3):421-9.
- MIN JY, SULLIVAN MF, YANG Y, ZHANG JP, CONVERSO KL, MORGAN JP, XIAO YF. Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. *Ann Thorac Surg* 2002; 74(5): 1568-75
- MINAMI K, VON KNYPHAUSEN, SUZUKI R, BLANZ U, ARUSOGLU L, MORSHUIS M, EL-BANAYOSY A, KÖRFER R. Mechanical ventricular circulatory support in children; bad Oeynhausen experience. *Ann. Torca. Cardiovasc. Surg*. Vol. 11 No 5 (2005).
- MOBERG AW, SHONS AR, GEWURZ H, MOZES M, NAJARIAN JS. Prolongation of renal xenografts by the simultaneous sequestration of preformed antibody, inhibition of complement, coagulation and antibody synthesis. *Transplant Proc*. 1971 Mar; 3(1):538-41.
- MOULY V, AAMIRI A, PERIE S, MAMCHAOUY K, BARANI A, BIGOT A, BOUAZZA B, FRANCOIS V, FURLING D, JACQUEMIN V, NEGRONI E,

- RIEDERER I, VIGNAUD A, ST GUILY JL, BUTLER-BROWNE GS. Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? *Acta Myol.* 2005 Oct; 24(2):128-33.
- MÜLLER P, BELTRAMI AP, CESSSELLI D, PFEIFFER P, KAZAKOV A, BOHM M. Myocardial regeneration by endogenous adult progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Aug; 39(2):377-87.
 - MÜLLER P, PFEIFFER P, KOGLIN J, SCHAFERS HJ, SEELAND U, JANZEN I, URBSCHAT S, BOHM M. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation.* 2002 Jul 2; 106(1):31-5.
 - MURASE N, STARZL TE, DEMETRIS AJ, VALDIVIA L, TANABE M, CRAMER D, MAKOWKA L. Hamster-to-rat heart and liver xenotransplantation with FK506 plus antiproliferative drugs. *Transplantation.* 1993 Apr; 55(4):701-7.
 - MURRY CE, REINECKE H, PABON LM. Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol.* 2006 May 2; 47(9):1777-85.
 - MURRY CE, RUPART MJ, SOONPAA M, NAKAJIMA H, FIELD LJ. Absence of cardiac differentiation in haematopoietic stem cells transplanted into normal and injured hearts. *Circulation* 2001; 104; 599.
 - NEGRONI E, BUTLER-BROWNE GS, MOULY V. Myogenic stem cells: regeneration and cell therapy in human skeletal muscle. *Pathol Biol (Paris).* 2006 Mar; 54(2):100-8. Epub 2005 Oct 21.
 - NISHIDA M, LI TS, HIRATA K, YANO M, MATSUZAKI M, HAMANO K. Improvement of cardiac function by bone marrow cell implantation in a rat hypoperfusion heart model. *Ann Thorac Surg.* 2003 Mar; 75(3):768-73
 - NISHIMORI H, SUZUKI S, KIDO K, TASHIRO H, ARITA S, OHDAN H, AMEMIYA H. Combination therapy with FK 506 and splenectomy may induce tolerance in cardiac xenografts. *Transplant Proc.* 1994 Jun; 26(3):1064-6.
 - NISHIOKA K, FUJIMORI Y, HASHIMOTO-TAMAOKI T, KAI S, QIU H, KOBAYASHI N, TANAKA N, WESTERMAN KA, LEBOULCH P, HARA H. Immortalization of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells by removable simian virus 40T antigen gene: analysis of the ability to support expansion of cord blood hematopoietic progenitor cells. *Int J Oncol.* 2003 Oct; 23(4):925-32.

- NORMILE D, ENSERINK M. SARS in China. Tracking the roots of a killer. *Science*. 2003 Jul 18; 301(5631):297-9.
- O'BRIEN TA, TIEDEMANN K, VOWELS MR. No longer a biological waste product: umbilical cord blood. *Med J Aust*. 2006 Apr 17; 184(8):407-10.
- OLSEN SL, WAGONER LE, HAMMOND EH, TAYLOR DO, YOWELL RL, ENSLEY RD, BRISTOW MR, O'CONNELL JB, RENLUND DG. Vascular rejection in heart transplantation: clinical correlation, treatment options, and future considerations. *J Heart Lung Transplant*. 1993 Mar-Apr; 12(2):S135-42.
- ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2001a Jun; 938: 221-9.
- ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B, PICKEL J, MCKAY R, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001b Apr 5; 410(6829):701-5.
- ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, LIMANA F, JAKONIUK I, QUAINI F, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001c Aug 28; 98(18):10344-9.
- OTT HC, BONAROS N, MARKSTEINER R, WOLF D, MARGREITER E, SCHACHNER T, LAUFER G, HERING S. Combined transplantation of skeletal myoblasts and bone marrow stem cells for myocardial repair in rats. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004 Apr; 25(4):627-34.
- PACKER M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1992 Jul; 20(1):248-54.
- PAK HN, QAYYUM M, KIM DT, HAMABE A, MIYAUCHI Y, LILL MC, FRANTZEN M, TAKIZAWA K, CHEN LS, FISHBEIN MC, SHARIFI BG, CHEN PS, MAKKAR R. Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a Swine model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003 Aug; 14(8):841-8.
- PALMER A, TAUBE D, WELSH K, BEWICK M, GJORSTRUP P, THICK M. Removal of anti-HLA antibodies by extracorporeal immunoadsorption to enable renal transplantation. *Lancet*. 1989 Jan 7; 1(8628):10-2.

- PARADIS K, LANGFORD G, LONG Z, HENEINE W, SANDSTROM P, SWITZER WM, CHAPMAN LE, LOCKEY C, ONIONS D, OTTO E. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science*. 1999 Aug 20; 285(5431):1236-41.
- PASSIER R. Potential of human embryonic stem cells in regenerative medicine. *Horm Res*. 2003; 60 Suppl 3:11-4.
- PASUMARTHI KB, FIELD LJ. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res*. 2002 May 31; 90(10):1044-54.
- PATIENCE C, TAKEUCHI Y, WEISS RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* 1997; 3: 282.
- PATTERSON MJ, KLONER RA. Flow cytometric analysis of S-phase DNA content in human, fetal myocardium. *Cardiac and Vascular Regeneration* 2000; 1:92-96.
- PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147
- PITTENGER MF, MARTIN BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004 Jul 9;95(1):9-20.
- PITTENGER MF, MOSCA JD, MCINTOSH KR. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000; 251:3-11.
- Plan Integral de Cardiopatía Isquémica 2004-2007. Madrid Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003
- PLANAT-BENARD V, MENARD C, ANDRE M, PUCEAT M, PEREZ A, GARCIA-VERDUGO JM, PENICAUD L, CASTEILLA L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res*. 2004 Feb 6; 94(2):223-9.
- PLATT JL, LIN SS, MCGREGOR CG. Acute vascular rejection. *Xenotransplantation*. 1998 Aug; 5(3):169-75.
- PODACK ER, HENGARTNER H, LICHTENHELD MG. A central role of perforin in cytotoxicity? *Annu Rev Immunol*. 1991; 9:129-57.

- POLEJAEVA IA, CHEN SH, VAUGHT TD, PAGE RL, MULLINS J, BALL S, DAI Y, BOONE J, WALKER S, AYARES DL, COLMAN A, CAMPBELL KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*. 2000 Sep 7; 407(6800):86-90.
- POOLEY JL, HEATH WR, SHORTMAN K. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol*. 2001 May 1; 166(9):5327-30.
- POSEKANY KJ, PITTMAN HK, BRADFIELD JF, HAISCH CE, VERBANAC KM. Induction of cytolytic anti-Gal antibodies in alpha-1,3-galactosyltransferase gene knockout mice by oral inoculation with *Escherichia coli* O86:B7 bacteria. *Infect Immun*. 2002 Nov; 70(11):6215-22.
- POUZET B, GHOSTINE S, VILQUIN JT, GARCIN I, SCORSIN M, HAGEGE AA, DUBOC D, SCHWARTZ K, MENASCHE P. Is skeletal myoblast transplantation clinically relevant in the era of angiotensin-converting enzyme inhibitors? *Circulation*. 2001 Sep 18; 104(12 Suppl 1):I223-8.
- PREMARATNE GU, TAMBARA K, FUJITA M, LIN X, KANEMITSU N, TOMITA S, SAKAGUCHI G, NAKAJIMA H, IKEDA T, KOMEDA M. Repeated implantation is a more effective cell delivery method in skeletal myoblast transplantation for rat myocardial infarction. *Circ J*. 2006 Sep; 70(9):1184-9.
- PROCKOP DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr 4; 276(5309):71-4.
- PRUITT SK, BALDWIN WM 3RD, BARTH RN, SANFILIPPO F. The effect of xenoreactive antibody and B cell depletion on hyperacute rejection of guinea pig-to-rat cardiac xenografts. *Transplantation*. 1993 Dec; 56(6):1318-24.
- PRUITT SK, BOLLINGER RR, COLLINS BH, MARSH HC JR, LEVIN JL, RUDOLPH AR, BALDWIN WM 3RD, SANFILIPPO F. Effect of continuous complement inhibition using soluble complement receptor type 1 on survival of pig-to-primate cardiac xenografts. *Transplantation*. 1997 Mar 27; 63(6):900-2.
- PULENDRAN B, SMITH JL, CASPARY G, BRASEL K, PETTIT D, MARASKOVSKY E, MALISZEWSKI CR. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 2; 96(3):1036-41.

- QUAINI F, URBANEK K, BELTRAMI AP, FINATO N, BELTRAMI CA, NADAL-GINARD B, KAJSTURA J, LERI A, ANVERSA P. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 2002 Jan 3; 346(1):5-15.
- RAJNOCH C, CHACHQUES JC, BERREBI A, BRUNEVAL P, BENOIT MO, CARPENTIER A. Cellular therapy reverses myocardial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001 May; 121(5):871-8.
- RAMIREZ P, MONTOYA MJ, RIOS A, GARCIA PALENCIANO C, MAJADO M, CHAVEZ R, MUÑOZ A, FERNANDEZ OM, SANCHEZ A, SEGURA B, SANSANO T, ACOSTA F, ROBLES R, SANCHEZ F, FUENTE T, CASCALES P, GONZALEZ F, RUIZ D, MARTINEZ L, PONS JA, RODRIGUEZ JI, YELAMOS J, COWAN P, D'APICE A, PARRILLA P. Prevention of hyperacute rejection in a model of orthotopic liver xenotransplantation from pig to baboon using polytransgenic pig livers (CD55, CD59, and H-transferase). *Transplant Proc*. 2005 Nov; 37(9):4103-6.
- RANGAPPA S, FEN C, LEE EH, BONGSO A, SIM EK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*. 2003 Mar; 75(3):775-9.
- REEMTSMA K. Renal heterotransplantation from nonhuman primates to man. *Ann N Y Acad Sci*. 1969 Jul 3; 162(1):412-8.
- REGUEIRO GONZÁLEZ JR, LÓPEZ LARREA C, GONZALEZ RODRÍGUEZ S, MARTINEZ NAVES E, *Inmunología. Biología y patología del sistema inmune*. 3^a Ed. Ediciones Médica Panamericana.2002.
- REINECKE H, POPPA V, MURRY CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol*. 2002 Feb; 34(2):241-9.
- RICHARDS AC, DAVIES HF, MCLAUGHLIN ML, COPEMAN LS, HOLMES BJ, DOS SANTOS CRUZ G, BYCROFT S, CHAVEZ G, WHITE DJ, SCHUURMAN HJ, COZZI E. Serum anti-pig antibodies as potential indicators of acute humoral xenograft rejection in pig-to-cynomolgus monkey kidney transplantation. *Transplantation*. 2002 Mar 27; 73(6):881-9.
- RIEBEN R, BOVIN NV, KORCHAGINA EY, ORIOL R, NIFANTEV NE, TSVETKOV DE, DAHA MR, MOHACSI PJ, JOZIASSE DH. Xenotransplantation: in vitro analysis of synthetic alpha-galactosyl inhibitors of

- human anti-Gal α 1-3Gal IgM and IgG antibodies. *Glycobiology*. 2000 Feb; 10(2):141-8.
- RITZHAUPT A, VAN DER LAAN LJ, SALOMON DR, WILSON CA. Porcine endogenous retrovirus infects but does not replicate in nonhuman primate primary cells and cell lines. *J Virol*. 2002 Nov; 76(22):11312-20.
 - ROITT IM. *Inmunología fundamentos*. 7ª Ed.1994. Editorial Médica Panamericana.
 - ROLLINS SA, EVANS MJ, JOHNSON KK, ELLIOT EA, SQUINTO SP, MATIS LA, ROTHER RP. Molecular and functional analysis of porcine E-selectin reveals a potential role in xenograft rejection. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Oct 28; 204(2):763-71.
 - ROLLINS SA, MATIS LA, SPRINGHORN JP, SETTER E, WOLFF DW. Monoclonal antibodies directed against human C5 and C8 block complement-mediated damage of xenogeneic cells and organs. *Transplantation*. 1995 Dec 15; 60(11):1284-92.
 - ROTHER RP, FODOR WL, SPRINGHORN JP, BIRKS CW, SETTER E, SANDRIN MS, SQUINTO SP, ROLLINS SA. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl natural antibody. *J Exp Med*. 1995 Nov 1; 182(5):1345-55.
 - ROTHSTEIN DM, SAYEGH MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Immunol Rev*. 2003 Dec; 196:85-108.
 - ROURA S, FARRE J, SOLER-BOTIJA C, LLACH A, HOVE-MADSEN L, CAIRO JJ, GODIA F, CINCA J, BAYES-GENIS A. Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105 (+) mesenchymal stem cells. *Eur J Heart Fail*. 2006 Feb 26
 - SACHS DH, SABLINSKI T. Tolerance across discordant xenogenic barriers. *Xenotransplantation* 1995; 2:234-9
 - SALDEEN J, KRIZ V, GREN N, WELSH M. SHB and angiogenic factors promote ES cell differentiation to insulin-producing cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jun 2; 344(2):517-524.
 - SAMSTEIN B, PLATT JL. Physiologic and immunologic hurdles to xenotransplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Jan; 12(1):182-93.
 - SANCHEZ A, RAMIREZ P, PINO G, CHAVEZ R, MAJADO M, MUNITIZ V, MUNOZ A, PALENCIANO CG, YELAMOS J, RODRIGUEZ-GAGO M, PONS

- JA, PARRILLA P. Immunopathology of an hDAF transgenic pig model liver xenotransplant into a primate. *Transplant Proc.* 2003 Aug; 35(5):2041-2.
- SCHACHINGER V, ASSMUS B, BRITTEN MB, HONOLD J, LEHMANN R, TEUPE C, ABOLMAALI ND, VOGL TJ, HOFMANN WK, MARTIN H, DIMMELER S, ZEIHNER AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Oct 19; 44(8):1690-9.
 - SCHMIDT CS, MESCHER MF. Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo. *J Immunol.* 1999 Sep 1; 163(5):2561-7.
 - SCHMOECKEL M, BHATTI FN, ZAIDI A, COZZI E, WATERWORTH PD, TOLAN MJ, PINO-CHAVEZ G, GODDARD M, WARNER RG, LANGFORD GA, DUNNING JJ, WALLWORK J, WHITE DJ. Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model. *Transplantation.* 1998 Jun 27; 65(12):1570-7.
 - SCHUURMAN HJ, CHENG J, LAM T. Pathology of xenograft rejection: a commentary. *Xenotransplantation* 2003; 10: 293.
 - SCHUURMAN HJ, PINO-CHAVEZ G, PHILLIPS MJ, THOMAS L, WHITE DJ, COZZI E. Incidence of hyperacute rejection in pig-to-primate transplantation using organs from hDAF-transgenic donors. *Transplantation.* 2002 Apr 15; 73(7):1146-51.
 - SHAKE JG, GRUBER PJ, BAUMGARTNER WA, SENECHAL G, MEYERS J, REDMOND JM, PITTENGER MF, MARTIN BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* 2002 Jun;73(6):1919-25
 - SHIM W, WONG P. Stem cell cardiomyoplasty: state-of-the-art. *Ann Acad Med Singapore.* 2004 Jul; 33(4):451-60.
 - SHIMIZU A, YAMADA K, YAMAMOTO S, LAVELLE JM, BARTH RN, ROBSON SC, SACHS DH, COLVIN RB. Thrombotic microangiopathic glomerulopathy in human decay accelerating factor-transgenic swine-to-baboon kidney xenografts. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Sep; 16(9):2732-45.
 - SIMINIAK T, FISZER D, JERZYKOWSKA O, GRYGIELSKA B, ROZWADOWSKA N, KALMUCKI P, KURPISZ M. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment

- of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. *Eur Heart J.* 2005 Jun; 26(12):1188-95.
- SIMON AR, SCHRODER C, MARTIN U, TESSMANN R, TEMPLIN C, LAAF G, WIEBE K, STEINHOFF G, LAPIN B, CHIKOBAVA M, HAVERICH A. Induction of long-term peripheral microchimerism in non-human primates in a model of xenogeneic peripheral tolerance induction. *Ann Transplant.* 2002; 7(3):40-5.
 - SIMON AR, TEMPLIN C, SCHRODER C, LAAFF G, TESSMANN R, WINKLER ME, TACKE S, DENNER J, LAPIN B, CHIKOBAVA M, PATIENCE C, STEINHOFF G, AGRBA VZ, HAVERICH A, MARTIN U. No evidence for productive PERV infection of baboon cells in in vivo infection model. *Ann Transplant.* 2003; 8(3):24-34.
 - SIMON PM, NEETHLING FA, TANIGUCHI S, GOODE PL, ZOPF D, HANCOCK WW, COOPER DK. Intravenous infusion of Galalpha1-3Gal oligosaccharides in baboons delays hyperacute rejection of porcine heart xenografts. *Transplantation.* 1998 Feb 15; 65(3):346-53.
 - SINANAN AC, BUXTON PG, LEWIS MP. Muscling in on stem cells. *Biol Cell.* 2006 Apr; 98(4):203-14.
 - SINANAN AC, HUNT NP, LEWIS MP. Human adult craniofacial muscle-derived cells: neural-cell adhesion-molecule (NCAM; CD56)-expressing cells appear to contain multipotential stem cells. *Biotechnol Appl Biochem.* 2004 Aug; 40(Pt 1):25-34.
 - SINGH SK, CLARKE ID, TERASAKI M, BONN VE, HAWKINS C, SQUIRE J, DIRKS PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003 Sep 15; 63(18):5821-8.
 - SMITS PC, VAN GEUNS RJ, POLDERMANS D, BOUNTIOUKOS M, ONDERWATER EE, LEE CH, MAAT AP, SERRUYS PW. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Dec 17; 42(12):2063-9.
 - SONG L, TUAN RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J.* 2004 Jun; 18(9):980-2.

- SOONPAA MH, FIELD LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res.* 1998 Jul 13; 83(1):15-26.
- SORIA B, BEDOYA FJ, MARTIN F. Gastrointestinal stem cells. I. Pancreatic stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Aug; 289(2):G177-80.
- SORIA B, SKOUDY A, MARTIN F. From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2001 Apr; 44(4):407-15.
- SOTTILE V, HALLEUX C, BASSILANA F, KELLER H, SEUWEN K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone.* 2002 May; 30(5):699-704.
- SPECTOR DH, WADE E, WRIGHT DA, KOVAL V, CLARK C, JAQUISH D, SPECTOR SA. Human immunodeficiency virus pseudotypes with expanded cellular and species tropism. *Virology.* 1990 May; 64(5):2298-308.
- STARZL TE, TZAKIS A, FUNG JJ, TODO S, DEMETRIS AJ, MANEZ R, MARINO IR, VALDIVIA L, MURASE N. Prospects of clinical xenotransplantation. *Transplant Proc.* 1994 Jun; 26(3):1082-8.
- STEELE A, JONES OY, GOK F, MARIKAR Y, STEELE P, CHAMIZO W, SCOTT M, BOUCEK RJ JR. Stem-like cells traffic from heart ex vivo, expand in vitro, and can be transplanted in vivo. *J Heart Lung Transplant.* 2005 Nov; 24(11):1930-9.
- STEINGASS SK. Hematopoietic Cell Transplantation in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Semin Oncol Nurs.* 2006 May; 22(2):107-16.
- STEWART DJ, ZHAO YD, COURTMAN DW. Cell therapy for pulmonary hypertension: what is the true potential of endothelial progenitor cells? *Circulation.* 2004 Mar 30; 109(12):e172-3
- STRAUER BE, BREHM M, ZEUS T, BARTSCH T, SCHANNWELL C, ANTKE C, SORG RV, KOGLER G, WERNET P, MULLER HW, KOSTERING M. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Nov 1; 46(9):1651-8.
- STRAUER BE, BREHM M, ZEUS T, KOSTERING M, HERNANDEZ A, SORG RV, KOGLER G, WERNET P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002 Oct 8; 106(15):1913-8.

- SUZUKI K, BRAND NJ, ALLEN S, KHAN MA, FARRELL AO, MURTUZA B, OAKLEY RE, YACOUB MH. Overexpression of connexin 43 in skeletal myoblasts: Relevance to cell transplantation to the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Oct; 122(4):759-66.
- SWITZER WM, MICHLER RE, SHANMUGAM V, MATTHEWS A, HUSSAIN AI, WRIGHT A, SANDSTROM P, CHAPMAN LE, WEBER C, SAFLEY S, DENNY RR, NAVARRO A, EVANS V, NORIN AJ, KWIATKOWSKI P, HENEINE W. Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus infection to nonhuman primate recipients of porcine cells, tissues, or organs. *Transplantation.* 2001 Apr 15; 71(7):959-65.
- TAKAGI M. Cell processing engineering for ex-vivo expansion of hematopoietic cells. *J Biosci Bioeng.* 2005 Mar; 99(3):189-96.
- TANEMURA M, MARUYAMA S, GALILI U. Differential expression of alpha-GAL epitopes (Galalpha1-3Galbeta1-4GlcNAc-R) on pig and mouse organs. *Transplantation.* 2000 Jan 15; 69(1):187-90.
- TAYLOR DA, ATKINS BZ, HUNGSPREUGS P, JONES TR, REEDY MC, HUTCHESON KA, GLOWER DD, KRAUS WE. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med.* 1998 Aug; 4(8):929-33.
- TAYLOR MV. Muscle development: molecules of myoblast fusion. *Curr Biol.* 2000 Sep 7;10(17):R646-8.
- TEEHAN GS, LIANGOS O, JABER BL. Update on dialytic Management of acute renal failure. *J Intensive Care Med* (2003); 18: 130-138.
- TERADA N, HAMAZAKI T, OKA M, HOKI M, MASTALERZ DM, NAKANO Y, MEYER EM, MOREL L, PETERSEN BE, SCOTT EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* 2002 Apr 4; 416(6880):542-5.
- TERASAKI PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant.* 2003 Jun; 3(6):665-73.
- TERMAN DS, GARCIA-RINALDI R, MCCALMON R, CRUMB CC, MATTIOLI C, COOK G, POSER R. Modification of hyperacute renal xenograft rejection after extracorporeal immunoadsorption of heterospecific antibody. *Int J Artif Organs.* 1979 Jan; 2(1):35-41.

- THOMPSON RB, EMANI SM, DAVIS BH, VAN DEN BOS EJ, MORIMOTO Y, CRAIG D, GLOWER D, TAYLOR DA. Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. *Circulation*. 2003 Sep 9; 108 Suppl 1:II264-71.
- TOMA C, PITTENGER MF, CAHILL KS, BYRNE BJ, KESSLER PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002 Jan 1; 105(1):93-8.
- TOMÁS L, VARAS C, PÉREZ I, PUIG, BALAGUER VINTRÓ I: Factores de riesgo y morbimortalidad coronaria en una cohorte laboral mediterránea seguida durante 28 años. Estudio de Manresa. *Rev. Esp. Cardiol*. 2001; 54:1146-1154.
- TOMITA S, LI RK, WEISEL RD, MICKLE DA, KIM EJ, SAKAI T, JIA ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. 1999 Nov 9; 100(19 Suppl):II247-56.
- TOMITA S, MICKLE DA, WEISEL RD, JIA ZQ, TUMIATI LC, ALLIDINA Y, LIU P, LI RK. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123(6): 1132-40
- TOMITA Y, SHIMIZU I, IWAI T, ZHANG QW, OKANO S, KAJIWARA T, ONZUKA T, TOMINAGA R. Application of chimerism-based drug-induced tolerance to rat into mouse xenotransplantation. *Scand J Immunol*. 2006 Oct; 64(4):392-7.
- TORELLA D, ELLISON GM, NADAL-GINARD B, INDOLFI C. Cardiac stem and progenitor cell biology for regenerative medicine. *Trends Cardiovasc Med*. 2005 Aug; 15(6):229-36.
- TSE WT, PENDLETON JD, BEYER WM, EGALKA MC, GUINAN EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003 Feb 15; 75(3):389-97.
- TSENG YL, MORAN K, DOR FJ, SANDERSON TM, LI W, LANCOS CJ, SCHUURMAN HJ, SACHS DH, COOPER DK. Elicited antibodies in baboons exposed to tissues from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs. *Transplantation*. 2006 Apr 15; 81(7):1058-62.

- TUCKER AW, GALBRAITH D, MCEWAN P, ONIONS D. Evaluation of porcine cytomegalovirus as a potential zoonotic agent in xenotransplantation. *Transplant Proc.* 1999 Feb-Mar; 31(1-2):915.
- UENO T, NAKAMURA T, TORIMURA T, SATA M. Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis. *Med Mol Morphol.* 2006 Mar; 39(1):16-21.
- VAN DER LAAN LJ, LOCKEY C, GRIFFETH BC, FRASIER FS, WILSON CA, ONIONS DE, HERING BJ, LONG Z, OTTO E, TORBETT BE, SALOMON DR. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature.* 2000 Sep 7; 407(6800):90-4.
- VAQUERO J, ZURITA M, OYA S, SANTOS M. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: Systemic or local administration? *Neurosci Lett.* 2006 May 1; 398(1-2):129-34.
- VIAL CM, OSTLIE DJ, BHATTI FN, COZZI E, GODDARD M, CHAVEZ GP, WALLWORK J, WHITE DJ, DUNNING JJ. Life supporting function for over one month of a transgenic porcine heart in a baboon. *J Heart Lung Transplant.* 2000 Feb; 19(2):224-9.
- VIGNEAU C, ZHENG F, POLGAR K, WILSON PD, STRIKER G. Stem cells and kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006 May; 15(3):238-44.
- VRIENS PW, STOOT JH, VAN DER STEENHOVEN TJ, HOYT G, BOUWMAN E, ROBBINS RC. Pre-transplant blood transfusion and cyclosporin A induce long-term hamster cardiac xenograft survival in immunocompetent rats. *Xenotransplantation.* 2005 Jan; 12(1):63-71.
- VULLIET PR, GREELEY M, HALLORAN SM, MACDONALD KA, KITTLESON MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet.* 2004 Mar 6; 363(9411):783-4.
- WAKITANI S, SAITO T, CAPLAN AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995 Dec; 18(12):1417-26.
- WANG H, ARP J, HUANG X, LIU W, RAMCHARRAN S, JIANG J, GARCIA B, KANAI N, MIN W, O'CONNELL PJ, ZHONG R. Distinct subsets of dendritic cells regulate the pattern of acute xenograft rejection and susceptibility to cyclosporine therapy. *J Immunol.* 2006 Mar 15; 176(6):3525-35.

- WANG JS, SHUM-TIM D, GALIPEAU J, CHEDRAWY E, ELIOPOULOS N, CHIU RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000 Nov; 120(5):999-1005.
- WATTS A, FOLEY A, AWWAD M, TRETER S, LAMBRIGTS D, BUHLER L, GOJO S, BASKER M, ORAVEC G, SACHS DH, ANDREWS D, COOPER DK. Plasma perfusion by apheresis through a gal immunoaffinity column successfully depletes anti-Gal antibody: experience with 275 aphereses in baboons. *Transplant Proc.* 2000 Aug; 32(5):860.
- WEISS RA. Transgenic pigs and virus adaptation. *Nature* 1998; 391: 327.
- WOLLERT KC, DREXLER H. Cell-based therapy for heart failure. *Curr Opin Cardiol.* 2006 May; 21(3):234-9.
- WOLLERT KC, DREXLER H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res.* 2005 Feb 4; 96(2):151-63.
- WOLLERT KC, MEYER GP, LOTZ J, RINGES-LICHTENBERG S, LIPPOLT P, BREIDENBACH C, FICHTNER S, KORTE T, HORNIG B, MESSINGER D, ARSENIJEV L, HERTENSTEIN B, GANSER A, DREXLER H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004 Jul 10-16; 364(9429):141-8.
- WOOD JC, QUINN G, SULING KM, OLDMIXON BA, VAN TINE BA, CINA R, ARN S, HUANG CA, SCOBIE L, ONIONS DE, SACHS DH, SCHUURMAN HJ, FISHMAN JA, PATIENCE C. Identification of exogenous forms of human-tropic porcine endogenous retrovirus in miniature Swine. *J Virol.* 2004 Mar; 78(5):2494-501.
- WRIGHT JR, POHAJDAK B. Cell therapy for diabetes using porcine islet tissue. *Cell Transplant.* 2001 Mar-Apr; 10(2):125-43.
- XU W, ZHANG X, QIAN H, ZHU W, SUN X, HU J, ZHOU H, CHEN Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004 Jul; 229(7):623-31.
- XU Y, LORF T, SABLINSKI T, GIANELLO P, BAILIN M, MONROY R, KOZLOWSKI T, AWWAD M, COOPER DK, SACHS DH. Removal of anti-porcine natural antibodies from human and nonhuman primate plasma in vitro and

- in vivo by a Gal α 1-3Gal β 1-4 β Glc-X immunoaffinity column. *Transplantation*. 1998 Jan 27; 65(2):172-9.
- YAMADA K, YAZAWA K, SHIMIZU A, IWANAGA T, HISASHI Y, NUHN M, O'MALLEY P, NOBORI S, VAGEFI PA, PATIENCE C, FISHMAN J, COOPER DK, HAWLEY RJ, GREENSTEIN J, SCHUURMAN HJ, AWWAD M, SYKES M, SACHS DH. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1, 3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med*. 2005 Jan; 11(1):32-4.
 - YATSCOFF RW, WANG S, KEENAN R, CHACKOWSKY P, LOWES N, KOSHAL A. Efficacy of rapamycin, RS-61443 and cyclophosphamide in the prolongation of survival of discordant pig to rabbit cardiac xenografts. *Can J Cardiol*. 1994 Sep; 10(7):711-6.
 - YAU TM, TOMITA S, WEISEL RD, JIA ZQ, TUMIATI LC, MICKLE DA, LI RK. Beneficial effect of autologous cell transplantation on infarcted heart function: comparison between bone marrow stromal cells and heart cells. *Ann Thorac Surg*. 2003 Jan; 75(1):169-76; discussion 176-7.
 - YE L, HAIDER HKH, SIM EK. Adult stem cells for cardiac repair: a choice between skeletal myoblasts and bone marrow stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006 Jan; 231(1):8-19.
 - YOON PD, KAO RL, MAGOVERN GJ. Myocardial regeneration. Transplanting satellite cells into damaged myocardium. *Tex Heart Inst J*. 1995; 22(2):119-25.
 - YOON YS, PARK JS, TKEBUCHAVA T, LUEDEMAN C, LOSORDO DW. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004 Jun 29; 109(25):3154-7.
 - YOON YS, WECKER A, HEYD L, PARK JS, TKEBUCHAVA T, KUSANO K, HANLEY A, SCADOVA H, QIN G, CHA DH, JOHNSON KL, AIKAWA R, ASAHARA T, LOSORDO DW. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2005 Feb; 115(2):326-38.
 - YOUNG RG, BUTLER DL, WEBER W, CAPLAN AI, GORDON SL, FINK DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*. 1998 Jul; 16(4):406-13.

- ZAIDI A, SCHMOECKEL M, BHATTI F, WATERWORTH P, TOLAN M, COZZI E, CHAVEZ G, LANGFORD G, THIRU S, WALLWORK J, WHITE D, FRIEND P. Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors. *Transplantation*. 1998 Jun 27; 65(12):1584-90.
- ZHANG S, GE J, SUN A, XU D, QIAN J, LIN J, ZHAO Y, HU H, LI Y, WANG K, ZOU Y. Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source. *J Cell Biochem*. 2006 Nov 1; 99(4):1132-47.
- ZHANG Z, BEDARD E, LUO Y, WANG H, DENG S, KELVIN D, ZHONG R. Animal models in xenotransplantation. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000 Sep; 9(9):2051-68.
- ZIMMET JM, HARE JM. Emerging role for bone marrow derived mesenchymal stem cells in myocardial regenerative therapy. *Basic Res Cardiol*. 2005 Nov; 100(6):471-81.
- ZUK PA, ZHU M, ASHJIAN P, DE UGARTE DA, HUANG JI, MIZUNO H, ALFONSO ZC, FRASER JK, BENHAIM P, HEDRICK MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec; 13(12):4279-95.

Páginas web:

- <http://stemcells.nih.gov>
- <http://student.biology.arizona.edu>
- <http://www.clevelandclinic.org>
- <http://www.dialyse-45.net>
- <http://www.lib.mcg.edu>
- <http://www.socgenmicrobiol.org.uk>

VIII. ABREVIATURAS

µg: microgramo

µl: microlitro

µm: micrómetro

µM: micromolar

Ac ó Acs: anticuerpo/s

AcMo: anticuerpo monoclonal

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

APA: anticuerpos antihemolíticos porcinos

APC: células presentadoras de antígeno

ARN: ácido ribonucleico

BSA: seroalbúmina bovina

CDR: región determinante complementaria

cm: centímetros

cm²: centímetros cuadrados

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CMM: células madre mesenquimales

CMMp: CMM porcinas

CMMp d: CMMp diferenciadas con 5-azacitidina

CMMp nd: CMMp no diferenciadas con 5-azacitidina

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

CRP: proteínas reguladoras del complemento

Csf: ciclofosfamida

Csp: ciclosporina

DC: células dendríticas

DEPC: dietil pirocarbonato

DI: disacárido

DiO: 3, 3'-dioctadecloxacarbocianina perclorato

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: dimetil sulfóxido

dNTP: deoxirribonucleótidos.

DO: densidad óptica

DT: Desviación típica
EIA: inmunoadsorción extracorpórea
EPC: células progenitoras endoteliales
Fab: fragmento de unión a antígeno
FAS: receptor de la inducción de apoptosis CD95
Fc: fracción cristalizable
FITC: isotiocianato de fluoresceína
Fw: cebador *forward*
g: gramo
H: cadena pesada
HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*
hDAF: *human deccay accelerating factor*
HLA: complejo mayor de histocompatibilidad humano
hMCP: *human membrane cofactor proteín*
HRF: factor homólogo de restricción
Ig(s): inmunoglobulinas
IgG: inmunoglobulina G
IgM: inmunoglobulina M
IL: interleucina
kDa: kiloDaltons
kg: kilogramo
L: cadena ligera
M: molar
MAC: complejo de ataque de membrana
MBL: lectina que se une a manosa
Mdp: metilprednisolona
MFI: media de intensidad de fluorescencia
mg: miligramo
ml: mililitro
mM: miliMolar
MMF: micofenolato mofetil
MO: médula ósea
Necro: necropsia
NK: células *natural killer* o asesinas naturales

nm: nanómetros

°C: grados centígrados

P/S: penicilina / estreptomicina

pb: pares de bases

pBMC (2, 3, 4, 5): línea de células madre mesenquimales porcinas

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PE: ficoeritrina

PERV: retrovirus endógeno porcino

PMSF: ácido fenilmetilsulfonil fluorhídrico

PreTx: pretrasplante

RHA: rechazo hiperagudo

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa reversotranscriptasa

Rv: cebador *reverse*

RVA: rechazo vascular agudo

SBF: suero bovino fetal

SDS: dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: Sodium dodecil sulfate –polyacrylamide gel electrophoresis: electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

SHN: *pool* de sueros humanos estándar

SLA: complejo mayor de histocompatibilidad porcino

TCR: receptor de células T

T2, T6: trisacárido 2 ó 6

TNF: Factor de necrosis tumoral

x g: fuerza centrífuga relativa

α Gal: galactosa- α (1-3)-galactosa (Gal- α (1-3)-Gal)