

EDITORIAL

Xenotransplante

Xenotransplantation

Flávio Henrique Ferreira Galvão¹, Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque²

O xenotransplante (xenoTx), ou transplante interespecie, é definido como o transplante de órgãos, tecidos ou células entre diferentes espécies e representa uma das propostas mais interessantes para resolver a escassez de doadores. A perspectiva de extrair tecidos e órgãos de animais imunologicamente modulados, com pouca ou nenhuma chance de provocar rejeição em humanos, torna o xenoTx atraente para fins clínicos¹⁻⁶. Essa proposta melhoraria os resultados clínicos e reduziria o tempo de espera e a mortalidade dos pacientes na lista de espera para transplante porque forneceria órgãos de boa qualidade a qualquer momento.

Nos anos 60/70, houve várias tentativas de xenoTx usando grandes macacos, porcos e ovelhas⁶. Naquela época, o conceito de morte encefálica ainda não estava bem estabelecido, causando importantes carências de órgãos adequados para transplante⁶. Vários artigos foram publicados descrevendo um total de 33 xenoTxs de rins em humanos. Particularmente notável é uma série de 13 casos usando chimpanzés de doadores que tiveram uma sobrevivência máxima de nove meses, descrita em 1964 por Reemtsma et al.⁷. Starzl et al.⁸ realizaram seis transplantes renais com babuínos doadores, com sobrevida máxima de cerca de dois meses. Também foram realizados doze xenoTxs hepáticos. Starzl et al. realizaram quatro transplantes entre 1966 e 1974 com enxerto de chimpanzés, com sobrevida máxima de 14 dias⁶. O grupo de Starzl também realizou mais dois transplantes com doadores de babuínos entre 1992 e 1993, com sobrevivência máxima de 70 dias⁹. Hardy et al. realizaram em 1964 o primeiro xenotransplante cardíaco no homem com sobrevida de apenas um dia⁶. Depois disso, mais seis tentativas desse xenotransplante foram feitas também sem sucesso significativo; no entanto, Bailey et al. em 1984, realizaram a maior sobrevida do xenotransplante cardíaco utilizando terapia com ciclosporina e o coração funcionou por 20 dias⁶.

No entanto, complicações como a rejeição hiperaguda (HAR), que destrói rapidamente o enxerto, o advento da morte encefálica estabelecendo doadores cadavéricos e a possibilidade de transmissão de infecções interespecie, atualmente impedem a aplicação clínica do xenoTx, justificando assim pesquisas nessa área¹⁻⁹.

-
1. Professor Chefe do LIM 37, Cirurgião da Disciplina de Transplante de Fígado e Órgãos do Aparelho Digestivo, Departamento de Gastroenterologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1924-3208>. E-mail: fgalvao@usp.br.
 2. Professor Titular e Chefe da Disciplina de Transplante de Fígado e Órgãos do Aparelho Digestivo, LIM 37, Departamento de Gastroenterologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7607-7168>. E-mail: profluizcarneiro@gmail.com / profluizcarneiro@usp.br.

O xenoTx é classicamente dividido em dois tipos: concordante e discordante. O xenoTx discordante é realizada entre espécies muito diferentes, como entre porcos e seres humanos. O xenoTx concordante envolve indivíduos de espécies semelhantes, como ratos e camundongos, ou grandes macacos e humanos. O grau de diferença entre as espécies envolvidas determina a intensidade da resposta imune humoral do xenoTx envolvendo reação antígeno / anticorpo interespecies pré-formadas. Assim, xenoTx discordante geralmente causa HAR, com total destruição do enxerto em poucas horas. No xenoTx concordante, geralmente há rejeição vascular aguda com destruição do enxerto em poucos dias¹⁻³.

De fato, a maior limitação do xenotransplante é o HAR, uma reação imune que rapidamente destrói o enxerto. Considerada uma catástrofe imunológica, sua fisiopatologia no xenoTx ainda não está totalmente esclarecida. É uma reação principalmente humoral, mediado pela ativação principalmente de IgM e Anticorpos preformados da classe IgG conhecidos como anticorpos xenorreativos. No HAR, há uma forte e rápida deposição de anticorpos no endotélio vascular do enxerto, aumentando a migração, adesão e ativação dos leucócitos e receptores de membrana¹⁻¹⁰.

Essa ativação leva à liberação de anafilatoxinas, histamina e serotonina, que ativam outros mediadores como fator de ativação plaquetária (PAF) e citocinas inflamatórias. Alterações no sistema vascular endotelial expõe a membrana basal, promovendo a ativação de plaquetas e fatores do complemento, principalmente C2a e C5a. Há também inibição de anticoagulantes naturais, como sulfato de heparina e eicoadenosina difosfato, com formação de depósitos de microtrombos e fibrina¹⁻⁵. A consequência final de esta reação é a presença de trombose microvascular e hemorragia intersticial, que destrói rapidamente o enxerto. Se os mecanismos da HAR puderem ser inibidos, os enxertos geralmente evoluem para rejeição vascular aguda.

Macroscopicamente, os enxertos com HAR mostram inicialmente descoloração e, posteriormente, cor roxa, congestão vascular, e hemorragia parenquimatosa¹⁻³. Vários aspectos da fisiopatologia da RHA ainda são desconhecidos, principalmente no que se refere ao seu tratamento. Entre os mecanismos envolvidos na resposta imune do RHA que ainda precisam de melhor esclarecimento, destacamos a participação da imunidade mediada por células, a coagulopatia que ocorre nessa reação, o envolvimento de citocinas inflamatórias e reguladoras, além de sua superfamília, as quimiocinas⁹. A dificuldade em entender e tratar a HAR é provavelmente decorrente da falta de modelos apropriados para seu estudo. Macacos do Velho Mundo (babuíno, gorila, chimpanzé e orangotango) são os animais com potencial para xenoTx, pois compartilham mais de 95% de similaridade genética com seres humanos. Esses animais, assim como os humanos, não expressam galactose- α -1,3-galactose (Gal- α -1,3-Gal), um oligossacarídeo presente na maioria das bactérias para essas espécies. Através da evolução imunológica, essas espécies extinguíram essa molécula de seu genoma e desenvolveram anticorpos pré-formados contra ele, tornando-os mais resistentes a infecções graves. Em contraste, as outras espécies de mamíferos, como os suínos, não mostraram esse desenvolvimento evolutivo e expressaram Gal- α -1,3-Gal. Assim, os órgãos suínos transplantados em humanos são rapidamente destruídos por anticorpos pré-formados de primatas contra antígenos porcinos, principalmente o Gal- α -1,3-Gal⁵. No entanto, os primatas têm muitas limitações para uso em pesquisa ou como doadores por serem animais que transmitem facilmente zoonose, não acasalam adequadamente em cativeiro devido à depressão, estão atualmente em risco de extinção e seu uso para transplante causa grande repúdio social¹⁰.

Há mais de 40 anos o suíno é estudado como doador de órgão para seres humanos, principalmente no sistema de assistência hepática temporária, na hepatite fulminante. O sistema de assistência hepática temporária visa manter esses pacientes clinicamente estáveis até o aparecimento de doador compatível¹⁰⁻¹¹. Observou-se com este procedimento melhora bioquímica e neurológica dos pacientes com hepatite fulminante^{12,13}. Recentemente foram desenvolvidos suínos transgênicos por diversos modos de modulação genética, visando torna-los compatíveis imunologicamente aos humanos. A utilização destes animais no Tx

mostrou resultados promissores^{13,14}. O desenvolvimento da tecnologia de engenharia genética para a produção de suínos transgênicos é uma grande promessa para o xenoTx. Suínos com $\alpha 1,3$ -galactosiltransferase gene knockout-(GTKO) e / ou outras adaptações de expressão genética (inclusão de genes humanos que causam tolerância imunológica), por exemplo, proteínas reguladoras do fator do complemento, ou relativas ao complexo CD47 do sinal regulatório da proteína alfa (SIRP α), e / ou genes reguladores da trombose humana ou manipulação de células derivadas de fígado de fetos para realizar marcação genética favorecem a criação de suínos com knockout de genes indutores de rejeição. Alguns autores acreditam que essas manipulações genéticas promovida por metodologia denominada CRISPR/ Cas9, que induzem manipulação genética produzindo tolerância imunológica e combatem complicações como a trombocitopenia combinados com novos regimes imunossuppressores, devem controlar a rejeição hipeaguda no xenoenxerto e melhorar a sobrevida de enxertos provenientes de suíno^{3,15,16}. Na verdade, essa tecnologia poderá remover uma fonte inesgotável de órgãos para transplante e transformar o Tx entre humanos (alloTx) um tema apenas para interesse histórico.

Suínos são animais com grande potencial para uso em xenoTx experimental e clínico. Apesar de promover uma reação discordante em humanos com conseqüente HAR, seus órgãos, especialmente o fígado, apresentam e semelhanças morfológicas com as dos seres humanos. Outras vantagens do uso de suínos incluem baixos custos de manutenção e acasalamento, podem acasalar em cativeiro sem problemas, o tamanho de seus órgãos é adequado para pequenos e grandes pacientes, menor restrição social e a possibilidade de produzir suínos transgênicos livre de patógenos e imunocompatível com humanos para evitar rejeição¹⁰⁻¹⁴.

Os suínos também foram estudados como doadores de órgãos na assistência temporária ao fígado durante hepatite fulminante. A assistência temporária ao fígado visa manter esses pacientes clinicamente estáveis até o aparecimento de um doador¹⁰⁻¹¹. Este procedimento mostrou melhora bioquímica e neurológica em pacientes com hepatite fulminante^{12,13}. Recentemente, porcos transgênicos foram desenvolvidos por vários métodos de modificação genética, com o objetivo de torná-los imunologicamente semelhantes aos humanos. O uso desses animais no xenoTx pré-clínico pesquisa mostrou resultados promissores^{13,14}.

As ferramentas para edição de genes em porcos estão melhorando rapidamente, de modo que cortes precisos no DNA devem ser gerados excluir com sucesso genes. O desenvolvimento de meios para substituir genes de porco por genes humanos por A precisão é muito desejável para o desenvolvimento futuro de doadores de suínos para o xenotransplante. Recentemente Dos Santos et al.¹⁷, em colaboração entre o LIM 37 e a Faculdade de Medicina da Universidade de Indiana, usaram CRISPR / Cas9 para produzir um suíno nocaute no gene da trombomodulina (pTHBD) e substituí-lo por um plasmídeo contendo um marcador de seleção de antibióticos sem promotor e o exon para trombomodulina humana¹⁷. A recombinase PhiC31 foi usada para remover o marcador de seleção de antibióticos para criar endotelial da aorta porcina células que expressam trombomodulina humana em vez de pTHBD, impulsionadas pelo promotor endógeno de porco. O cassete de seleção sem promotor permitiu o enriquecimento eficiente de células que contêm os transgene permitindo a expressão do transgene humano pelo promotor endógeno de pTHBD. Regulação gênica foi mantida após a substituição do gene porque o promotor endógeno de porco foi mantido intacto posição. Portanto, esses autores concluíram que a tecnologia Cas9 e a recombinase tornam o ser humano via ortotópica de suínos e pavimentar o caminho para a criação de suínos com genes humanos que podem ser expressa nos tecidos apropriados que preservam a regulação gênica. Essas melhorias na terapia genética podem permitir o uso de suínos geneticamente modificados como doadores seguros para transplante de órgãos em um futuro próximo¹⁷.

O Laboratório de Investigação Médica 37 (LIM 37) desenvolve um linha de pesquisa sem precedentes sobre xenotransplante multivisceral. Este modelo foi idealizado devido à grande falta de órgãos para esse

tipo de transplante, atualmente indicado para diversas doenças graves da sistema digestivo, como doenças congênitas, insuficiência intestinal com complicações da administração parenteral prolongada nutrição, alguns tumores abdominais restritos ao abdome, catástrofes abdominais, entre outros¹⁸⁻²³.

Nesta pesquisa, comparamos o HAR em três combinações de espécies usadas em multivisceral xenotransplante. Enxertos multiviscerais (esôfago, estômago, intestino delgado, cólon, fígado, pâncreas, baço, e rins) foram removidos e implantados heterotopicamente nas combinações doador-receptor cão-porco (n = 5); porco-cão (n = 5) e porco-coelho (n = 15). Alotransplante multivisceral [porco-porco (n = 5), cachorro-cão (n = 4) e coelho-coelho (n = 5)] compuseram o grupo controle. Três horas após a reperfusão, amostras de enxertos foram coletados para histopatologia e imuno-histoquímica. Modelos usando cães foram interrompidos devido à proibição de o uso deste animal para pesquisa por lei federal. O HAR foi observado visualmente em todos os xenoenxertos cerca de 15 minutos após reperfusão. A autópsia revelou HAR em todos os órgãos do xenoenxerto multivisceral; Contudo, observamos uma HAR menos grave no fígado em comparação com o esôfago, estômago, intestino delgado, cólon, pâncreas, baço e rins.

A fixação de IgG por imuno-histoquímica foi forte em xenoenxertos e ausente em aloenxertos. O HAR estava ausente em todos os aloenxertos¹⁸⁻²³. Portanto, podemos verificar que os três modelos diferentes para xenotransplante multivisceral neste experimento são relevantes para o estudo da HAR e foram submetidos a evolução semelhante. A expressão de IgG por imunofluorescência foi forte nos locais de HAR e mostramos pela primeira vez que o fígado é mais tolerante à HAR do que outros órgãos abdominais após multivisceral transplante¹⁸⁻²³. Os resultados dessas pesquisas tiveram um grande impacto internacional e foram o motivo de a publicação de um artigo de um grupo da Universidade de Pittsburgh que destacou a relevância dos achados da pesquisa mencionada²⁴.

Em conclusão, o xenotransplante é uma solução potencial para a falta de órgãos; no entanto, HAR e a possibilidade de transmissão de infecções entre espécies dificulta atualmente esse procedimento. Adiantamentos na pesquisa de xenotransplante e na biotecnologia CRISPR / Cas9 podem produzir suínos transgênicos imunocompatível com seres humanos e livre de patógenos para servir como doador de órgãos em um futuro próximo.

REFERÊNCIAS

1. Yang YG, Sykes M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:519-31. doi: 10.1038/nri2099.
2. Cooper DK. Clinical xenotransplantation--how close are we? *Lancet*. 2003;362:557. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14118-9
3. Ekser B, Ezzelarab M, RHAa H, van der Windt DJ, Wijkstrom M, Bottino R, Trucco M, Cooper DK. Clinical xenotransplantation: the next medical revolution? *Lancet*. 2012;379:672-83. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61091-X.
4. Denner J, Tönjes RR. Infection barriers to successful xenotransplantation focusing on porcine endogenous retroviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25:318-43. doi: 10.1128/CMR.05011-11.
5. Zhong R. Gal knockout and beyond. *Am J Transplant*. 2007;7:5-11. doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01615.x.
6. Taniguchi S, Cooper DK. Clinical xenotransplantation: past, present and future. *Ann R Coll Surg Eng*. 1997;79:13-9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2502626/>.
7. Reemtsma K, Mccracken BH, Schlegel JU, Pearl MA, Pearce CW, Dewitt CW, Smith PE, Hewitt RL, Flinger RL, Creech O Jr. Renal heterotransplantation in man. *Ann Surg*. 1964;160(3):384-408. doi: 10.1097/00000658-196409000-00006
8. Starzl TE, Marchior TL, Peters GN, Kirkpatrick CH, Wilson WEC, Porter D, Rifkind KA, Ogden DA, Hitchcock CR, Waddell WR. Renal heterotransplantation from baboon to man: experience with 6 cases. *Transplantation*.

- 1964;2:752-76. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2972727/>.
9. Starzl TE, Fung J, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Marino IR, Doyle H, Zeevi A, Warty V, Michaels M. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet*. 1993;341:65-71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2962592/>.
 10. Dehoux JP, Gianello P. The importance of large animal models in transplantation. *Front Biosci*. 2007;12:4864-80. doi: 10.2741/2434.
 11. Ibrahim Z, Busch J, Awwad M, Wagner R, Wells K, Cooper DK. Selected physiologic compatibilities and incompatibilities between human and porcine organ systems. *Xenotransplantation*. 2006;13(6):488-99. Doi: 10.1111/j.1399-3089.2006.00346.x.
 12. Chari RS, Collins BH, Magee JC, DiMaio JM, Kirk AD, RHAland RC, McCann RL, Platt JL, Meyers WC. Treatment of hepatic failure with ex vivo pig-liver perfusion followed by liver transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331:234-37. doi: 10.1056/NEJM199407283310404.
 13. Levy MF, Crippin J, Sutton S, Netto G, McCormack J, Curriel T, Goldstein RM, Newman JT, Gonwa TA, Bancheureau J, Diamond LE, Byrne G, Logan J, Klintmalm BG. Liver transplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers. *Transplantation*. 2000;69:272-80. doi: 10.1097/00007890-200001270-00013.
 14. Gock H, Nottle M, Lew AM, d'Apice AJ, Cowan P. Genetic modification of pigs for solid organ xenotransplantation. *Transplant Rev*. 2011;25:9-20. doi: 10.1016/j.trre.2010.10.001.
 15. Ekser B, Klein E, He J, Stolz DB, Echeverri GJ, Long C, Lin CC, Ezzelarab M, Hara H, Veroux M, Ayares D, Cooper DKC, Gridelli B. Genetically-engineered pig-to-baboon liver xenotransplantation: histopathology of xenografts and native organs. *PLoS One*. 2012;7:e29720. doi: 10.1371/journal.pone.0029720.
 16. Waghmare SK, Estrada J, Reyes L, Li P, Ivary B, Sidner RA, Burlak C, Tector AJ. Gene targeting and cloning in pigs using fetal liver derived cells. *J Surg Res*. 2011;171:e223-9. doi: 10.1016/j.jss.2011.07.051.ix.
 17. Nunes Dos Santos RM, Carneiro D'Albuquerque LA, Reyes LM, Estrada JL, Wang ZY, Tector M, Tector AJ. J CRISPR/Cas and recombinase-based human-to-pig orthotopic gene exchange for xenotransplantation. *Surg Res*. 2018;229:28-40. doi: 10.1016/j.jss.2018.03.051.
 18. Galvao FH, Pompeu E, de Mello ES, da Costa Lino Costa A, Mory E, Dos Santos RM, Santos VR, Machado MC, Bacchella T. Experimental multivisceral xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2008;15:184-90. doi: 10.1111/j.1399-3089.2008.00470.x.
 19. Galvão FH, Farias AQ, Pompeu E, Waisberg DR, Teixeira AR, de Mello ES, Costa AC, Galvão R de C, Santos VR, Chaib E, Carrilho FJ, D'Albuquerque LA. Endoscopic features in a model of multivisceral xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2010;17:423-8. doi: 10.1111/j.1399-3089.2010.00609.x.
 20. Galvao FH, Soler W, Pompeu E, Waisberg DR, de Mello ES, Costa AC, Teodoro W, Velosa A, Capelozzi V, Antonangelo L, Chaib E, D'Albuquerque LA. IgG profile in hyperacute rejection after multivisceral xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2012;19:298-304. doi: 10.1111/xen.12002.
 21. Galvao FHF. Modelo experimental de xenotransplante multivisceral [Tese Livre Docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2012.
 22. Soler WV, Waisberg DR, Pompeu E, Costa A, Capelozzi VL, Chaib E, D'Albuquerque LA, Galvao FH. Multivisceral Xenotransplantation: the effect of different species combination. *Transplantation*. 2018;102:S735. doi: 10.1097/01.tp.0000543721.67531.64.
 23. Galvao FH, Soler WV, Lee AD, Waisberg DR, Pompeu E, Costa A, D'Albuquerque LA. Evidence of liver tolerance to severe hyperacute rejection in a pioneer model of multivisceral xenotransplantation. *Transplantation*. 2019;103:S137. doi: 10.1097/01.tp.0000576252.23264.c8.
 24. Kumar G, Ekser B, Abu-Elmagd KM, Cooper DK. Multivisceral xenotransplantation. Does it have a future? *Xenotransplantation*. 2010;17:418-22. doi: 10.1111/j.1399-3089.2010.00613.x.